



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรึงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 สำหรับการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

Immobilization of green alga *Tetraspora* sp. CU2551 for biohydrogen production

นายเชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2560

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การตรึงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 สำหรับการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ
แหล่งเงิน ทุนอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ.....2560..... จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน.....350,000.....บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย.....1..... ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2559 ถึง 30 กันยายน 2560.....

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ สังกัด สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบัน
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อ-สกุล ผู้ร่วมวิจัย ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์ สังกัด สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี
พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ได้รับการยืนยันว่ามีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในระบบเซลล์อิสระ งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนด้วยเทคนิคการตรึงเซลล์สาหร่ายด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่มีรูพรุนขนาดเล็ก ผลการทดลองพบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอัลจิเนตที่ 2.80-3.35 มิลลิเมตร ความเข้มข้นของเซลล์ในอัลจิเนตที่ 0.125 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตรของอัลจิเนต และความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ 4 เปอร์เซ็นต์จะเป็นสภาวะที่เซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด การบ่มในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศจะให้ได้รับผลผลิตไฮโดรเจนเป็น 0.0923 ± 0.0036 และ 1.7766 ± 0.0567 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อนำเซลล์ตรึงไปบ่มในอาหารที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S) จะมีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นจากผลผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ตรึงในอาหาร TAP 1.2 เท่า จากนั้นทำการทดสอบจำนวนรอบของการนำมาใช้ซ้ำเพื่อการผลิตแก๊สไฮโดรเจนในอาหาร TAP-S ผลการทดลองพบว่าเซลล์ตรึงที่บ่มภายใต้สภาวะไม่มีอากาศจะสามารถผลิตไฮโดรเจนซ้ำได้ทั้งหมด 3 รอบ โดยปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ใน 2 รอบแรกจะให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสม 7.6823 ± 0.8792 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งคิดเป็น 6 เท่าเมื่อเทียบกับผลผลิตไฮโดรเจนในระบบเซลล์อิสระ ส่วนการบ่มเซลล์ตรึงในสภาวะที่มีอากาศพบว่าเซลล์ตรึงจะสามารถผลิตไฮโดรเจนซ้ำได้ทั้งหมด 6 รอบ โดยให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสม 11.3231 ± 0.9283 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงเป็น 38 เท่าของไฮโดรเจนจากระบบเซลล์อิสระ และสูงกว่าไฮโดรเจนจากจุลสาหร่าย (สาหร่ายสีเขียวหรือไซยาโนแบคทีเรีย) สายพันธุ์อื่นๆประมาณ 1.4-2 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Immobilization of green alga *Tetraspora* sp. CU2551 for biohydrogen production

Researcher: Asst.Prof.Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj **Faculty:** Science **Department:** Biology

Co-researcher: Asst.Prof.Dr. Saranya Phunpruch **Faculty:** Science **Department:** Biology

ABSTRACT

The green alga *Tetraspora* sp. CU2551 has previously been identified and characterized as a photosynthetic microorganism with high potential for H₂ production. In this study, the production enhancement was optimized by immobilization technique using calcium alginate as a matrix. Several immobilization parameters were optimized for enhancing hydrogen production. The results showed that the optimal immobilization conditions were 2.80-3.35 mm bead diameter, 0.125 mg cell dry wt/mL alginate and 4% (w/v) of final alginate concentration. Incubation under aerobic and anaerobic conditions yielded the hydrogen gas as 0.0923 ± 0.0036 and 1.7766 ± 0.0567 $\mu\text{molH}_2/\text{mg cell dry wt/h}$, respectively. Then, the immobilized cells were tested for hydrogen production in S-deprived medium (TAP-S) and the result reveals the H₂ production yields increased as 1.2 folds when compared to TAP medium. Furthermore, the experiments were extended to repeat the use of immobilized cells in TAP-S medium. The results showed that immobilized cells could be used at least for 3 production cycles under anaerobic condition. The maximal H₂ production from first 2 cycles reached 7.6823 ± 0.8792 mL H₂/25 mL medium. This production yield was about 6 times higher compared to H₂ from cell suspension. However, when incubated the immobilized cells under aerobic condition, immobilized cells were able to be reused for at least 6 cycles. The maximal total H₂ production within 6 cycles reached 11.3231 ± 0.9283 mL H₂/25 mL medium. This production was about 38 times higher compared H₂ from cell suspension and 1.4-2 times higher than H₂ yield from other microalgae.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภท เงินอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

นายเชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 พลังงานไฮโดรเจน	7
2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน	10
2.2.1 กระบวนการทางความร้อนเคมี	11
2.2.2 กระบวนการไฟฟ้าเคมีของน้ำ	11
2.2.3 กระบวนการทางชีวภาพ	12
2.3 สาหร่ายสีเขียว	15
2.4 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	15
2.4.1 เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน	15
2.4.2 กระบวนการแยกด้วยแสงแบบทางตรง	16
2.4.3 กระบวนการแยกด้วยแสงแบบทางอ้อม	17
2.4.4 กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การเพิ่มศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน	18
2.5.1 การปรับสภาวะเซลล์ในอาหารที่ขาดธาตุอาหารหลัก	18
2.5.2 การตรึงเซลล์	21
2.5.3 การนำเซลล์ที่ผลิตไฮโดรเจนแล้วกลับมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่	28
2.6 การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	30
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	37

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 จุลสาหร่าย	40
3.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย	40
3.3 สารเคมี	40
3.4 อุปกรณ์	42
3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	44
3.6 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	46
3.6.1 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสีเขียวแบบเซลล์อิสระ	46
3.6.2 วิธีการศึกษาผลของความขุ่นเซลล์ (OD ₇₃₀) ของเซลล์อิสระ	47
3.6.3 วิธีการศึกษาผลของศึกษาผลของความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD ₇₃₀)	47
3.6.4 วิธีการศึกษาผลของความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD ₇₃₀)	47
3.6.5 วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยอัลจิเนต	47
3.6.6 วิธีการศึกษาผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต ..	49
3.6.7 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนต	50
3.6.8 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ใช้ในการตรึงเซลล์	50
3.6.9 วิธีการศึกษาผลการขาดธาตุอาหารหลักต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง	50
3.6.10 วิธีการศึกษาการนำสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ที่ถูกตรึง	
ด้วยอัลจิเนตและผลิตไฮโดรเจนแล้วกลับมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7	วิธีการวิเคราะห์เพิ่มเติม	52
3.7.1	วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง	52
3.7.2	วิธีการติดตามกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรจีเนส.....	52
3.7.3	วิธีการหาปริมาณออกซิเจนสุทธิจากระบบสังเคราะห์แสงที่ 2	53
3.8	วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ	53

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1	ผลของความขุ่นเซลล์ (OD ₇₃₀) ต่อการผลิตไฮโดรเจนในระบบเซลล์อิสระ.....	54
4.2	ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดอัลจินตที่ใช้ในการตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจน .	58
4.3	ผลของความเข้มข้นของเซลล์ตรึงในอัลจินตต่อการผลิตไฮโดรเจน	60
4.4	ผลของความเข้มข้นของอัลจินตที่ใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	62
4.5	ผลของการขาดธาตุอาหารหลักที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง.....	64
4.6	ผลของการนำสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ที่ถูกตรึงด้วยอัล- จินตและหยุดผลิตไฮโดรเจนแล้วกลับมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่.....	69
4.6.1	ผลการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ในสภาวะที่ไล่อากาศ	70
4.6.2	ผลการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ในสภาวะที่มีอากาศ.....	74
4.7	การเปรียบเทียบปริมาณไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 กับ จุลสาหร่ายสายพันธุ์อื่น.....	77

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1	สรุปผลการวิจัย.....	82
5.2	ข้อเสนอแนะ	83
	บรรณานุกรม	84
	สรุปการใช้จ่ายเงิน.....	90
	ภาคผนวก ก องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	91
	ภาคผนวก ข โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน.....	99
	ภาคผนวก ค การคำนวณปริมาณไฮโดรเจน	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห่งจากค่าความชุ่นของสาหร่ายสีเขียว..... 101

ภาคผนวก จ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova..... 102

ภาคผนวก ฉ เวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเพื่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส 113

ประวัติผู้เขียน 114



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การเปรียบเทียบกระบวนการทางชีวภาพที่ใช้ในการผลิตไบโอไฮโดรเจน	14
2.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>Tetraspora</i> sp.	36
3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph-Thermal conductivity detector; GC-TCD)	46
4.1 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. ที่ถูกตรึงกับจุลสาหร่ายสายพันธุ์อื่น	80
จ-1 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาผลของความชุ่มเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนในระบบเซลล์อิสระ	102
จ-2 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาผลของความชุ่มเซลล์เริ่มต้นที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ เมื่อปรับให้ทุกสภาวะมีความหนาแน่นของเซลล์ก่อนบ่มไฮโดรเจนเท่ากับ 0.265 เท่ากัน	103
จ-3 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาผลของความชุ่มเซลล์สุดท้ายของเซลล์ใน stage I ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	104
จ-4 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการหาขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดอัลจินตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน เมื่อบ่มภายใต้สภาวะที่โล่อากาศ.....	105
จ-5 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการหาขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดอัลจินตที่เหมาะสม สำหรับการผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศ.....	106
จ-6 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการหาความเข้มข้นเซลล์ในเม็ดอัลจินตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน เมื่อบ่ม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายใต้สภาวะที่โล่อากาศ.....	107
จ-7 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการหาความเข้มข้นของเซลล์ในเม็ดอัลจินตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน เมื่อบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศ.....	108
จ-8 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการหาความเข้มข้นอัลจินตที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ผลิตไฮโดรเจน เมื่อบ่มภายใต้สภาวะที่โล่อากาศ.....	109
จ-9 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐานด้วย one way anova ของการหาความเข้มข้นอัลจินตที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ผลิตไฮโดรเจน เมื่อบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศ.....	110
จ-10 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของผลของการขาดธาตุอาหารหลักต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ในระบบเซลล์อิสระ.....	111
จ-11 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้ one way anova ของผลของการขาดธาตุอาหารต่อปริมาณออกซิเจนสุทธิที่เซลล์ปล่อยออกมาจากระบบสังเคราะห์แสงที่ 2 ...	112

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การเปรียบเทียบการใช้พลังงานในประเทศไทย	6
2.2 การเปรียบเทียบค่าพลังงานชนิดต่างๆต่อปริมาณเชื้อเพลิงน้ำหนัก 1 กิโลกรัม	8
2.3 ขั้นตอนการแปลงพลังงานวัฏจักรทั่วไป และโดยกระบวนการเซลล์เชื้อเพลิง	9
2.4 เซลล์เชื้อเพลิงชนิด PEMFC และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในขั้วแคโทดและแอโนด	10
2.5 วิธีการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	16
2.6 ความสัมพันธ์ของการถ่ายโอนอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรีย	19
2.7 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ	22
2.8 การตรึงเซลล์โดยพันธะโคเวเลนต์ในการยึดจับ	22
2.9 การตรึงเซลล์โดยการเชื่อมไขว้กัน (Crosslinking)	23
2.10 การตรึงเซลล์ด้วยการยึดจับ (entrapment)	24
2.11 การตรึงเซลล์ด้วยการห่อหุ้มเซลล์ด้วยวัสดุตรึงในรูปเม็ด (gel encapsulation)	25
2.12 โครงสร้างของอัลจินเตชนิดต่างๆ	27
2.13 กลไกการเกิดเจลของแคลเซียมอัลจินเตและวิธีการตรึงเซลล์ด้วยการห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินเต	28
2.14 วัฏจักรของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i>	29
2.15 วัฏจักรของการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย <i>M. aeruginosa</i>	29
2.16 วัฏจักรของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp.	30
2.17 ลักษณะสัญญาณของเซลล์ <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	31
2.18 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 7 ชนิด	32
2.19 เวลาที่สาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ใช้ในการเจริญเติบโตเป็นสองเท่า (doubling time) ที่อุณหภูมิและความเข้มแสงค่าต่างๆ	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.20 ผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 33

2.21 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 34

2.22 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารหลักและอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีการเติมสาร β -mercaptoethanol..... 35

2.23 ผลของความเข้มข้นต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551. 36

3.1 การแยกเชื้อด้วยวิธี streak-plate technique..... 44

3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว TAP 45

3.3 เซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ถูกตรึงด้วยอัลจินต..... 48

3.4 เม็ดอัลจินตของเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. CU2551 ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดต่างๆ ... 49

4.1 ผลของค่าความขุ่นเซลล์ที่มีต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน..... 54

4.2 ผลของค่าความขุ่นเริ่มต้น (initial OD₇₃₀) ที่มีต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน..... 56

4.3 ผลของความขุ่นเซลล์สุดท้ายของเซลล์ในขั้นการสังเคราะห์แสงต่อการผลิตไฮโดรเจน..... 56

4.4 ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดอัลจินตที่ใช้ในการตรึงเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจน 59

4.5 ผลของความเข้มข้นของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจินตที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน 61

4.6 ผลของความเข้มข้นของอัลจินตที่ใช้ในการตรึงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน 63

4.7 ผลของการขาดธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือซัลเฟอร์) ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของระบบเซลล์อิสระและระบบเซลล์ตรึง ภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศ 65

4.8 ผลของการขาดธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือซัลเฟอร์) ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 66

4.9 ผลของการขาดธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือซัลเฟอร์) ที่มีต่อปริมาณออกซิเจนจากระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 ของ *Tetraspora* sp. CU2551..... 67

4.10 ผลของการขาดธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือซัลเฟอร์) ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของระบบเซลล์อิสระและระบบเซลล์ตรึง ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ 69

4.11 ปริมาณไฮโดรเจนจากการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ผ่านวัฏจักรการผลิตแบบสองขั้นตอนของ *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจินตเทียบกับระบบเซลล์อิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมีระยะเวลาการฟัสนิวเคลียสเท่ากับ 24 ชั่วโมง ภายใต้การบ่มในสภาวะที่โล่อากาศ.....	71
4.12 การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ผ่านวัฏจักรการผลิตแบบ 2 ขั้นตอนของสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตเทียบกับระบบเซลล์อิสระ โดยมีระยะเวลาการฟัสนิวเคลียสเท่ากับ 1 ชั่วโมง ภายใต้การบ่มในสภาวะที่โล่อากาศ.....	72
4.13 การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ของ <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต เทียบกับระบบเซลล์อิสระ โดยจะเปลี่ยนอาหาร TAP-P-S และ TAP-S อันใหม่ทันทีหลังจาก จากที่เซลล์อิมมัตูในการผลิตไฮโดรเจนในรอบผลิตแรก (ไม่นำเซลล์ตรึงกลับเข้าสู่ขั้นการ สังเคราะห์แสง) ภายใต้การบ่มในสภาวะที่โล่อากาศ.....	73
4.14 การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ของ <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต เทียบกับระบบเซลล์อิสระ โดยจะเปลี่ยนอาหารอันใหม่ทันทีหลังจากที่เซลล์อิมมัตูในการผลิต ไฮโดรเจนในรอบผลิตแรก (ไม่นำเซลล์ตรึงกลับเข้าสู่ขั้นการสังเคราะห์แสง) ภายใต้การ บ่มในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic condition)	76
ข-1 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของไฮโดรเจนที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง GC-TCD.....	99
ข-2 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและปริมาณของไฮโดรเจน หน่วยไมโครโมล	99
ง-1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียว (OD_{730}) และน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	101
ฉ-1 เวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเพื่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส.....	113



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรโลก ทำให้ความต้องการทางด้านพลังงานในด้านเศรษฐกิจ สังคม รวมถึงการใช้พลังงานในชีวิตประจำวันเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ในหลายประเทศต้องพึ่งพาน้ำมันปิโตรเลียมเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานมากขึ้น จากรายงานสถานการณ์การใช้พลังงานของประเทศไทย การใช้พลังงานยังคงเพิ่มขึ้นตามการเติบโตทางเศรษฐกิจ โดยที่น้ำมันปิโตรเลียมยังคงเป็นพลังงานที่ใช้มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 51.5 ของการใช้พลังงานขั้นสุดท้าย (ศูนย์สารสนเทศข้อมูลพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2559) ซึ่งน้ำมันปิโตรเลียมจัดเป็นเชื้อเพลิงฟอสซิล ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงที่ใช้แล้วหมดไป ธรรมชาติไม่สามารถสร้างขึ้นมาทดแทนได้ภายในระยะเวลาอันสั้น อีกทั้งยังปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดปัญหาภาวะโลกร้อนหรือปรากฏการณ์แก๊สเรือนกระจก ด้วยเหตุนี้จึงนำมาสู่การหาแหล่งพลังงานทางเลือกเพื่อทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิล โดยคำนึงถึงแหล่งพลังงานที่มีความยั่งยืน ไม่ปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ให้ค่าความร้อนสูงและเป็นพลังงานสะอาด (Rashid *et al.*, 2012)

พลังงานไฮโดรเจนถือเป็นพลังงานทางเลือกอีกประเภทหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจเนื่องจากมีค่าความร้อนในระหว่างการเผาไหม้สูงถึง 141.6 เมกะจูลต่อกิโลกรัมไฮโดรเจน (Perry, 1963) อีกทั้งในกระบวนการเผาไหม้จะไม่มีการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) แต่จะปลดปล่อยน้ำ (H₂O) ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์แทน ด้วยเหตุนี้พลังงานไฮโดรเจนจึงจัดเป็นพลังงานสะอาดและเป็นพลังงานที่ยั่งยืน (Laurinavichene *et al.*, 2006) สำหรับการผลิตไฮโดรเจนนั้นส่วนใหญ่จะผลิตโดยการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลผ่านกระบวนการสตีมนิฟอร์มมิง (steam reforming) ซึ่งยังคงเป็นการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลที่มีอยู่อย่างจำกัดเป็นสารตั้งต้นอยู่ อีกทั้งกระบวนการนี้ยังใช้อุณหภูมิและความดันที่สูงนำมาซึ่งค่าใช้จ่ายในการผลิตที่สูงขึ้น และยิ่งไปกว่านั้นในกระบวนการผลิตยังคงปลดปล่อยแก๊สเรือนกระจกซึ่งเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมออกสู่บรรยากาศ ด้วยเหตุนี้ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา นักวิจัยทั่วโลกจึงหันมาให้ความสนใจในการศึกษาการผลิตพลังงานไฮโดรเจนจากจุลชีพต่างๆ และเรียกไฮโดรเจนที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพว่า ไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen)

จุลชีพที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย แบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ ไชยานแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว โดยจุลชีพแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลชีพที่ใช้ในกระบวนการผลิต ในบรรดากลุ่มจุลชีพที่กล่าวมาข้างต้น การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวจะมีข้อได้เปรียบกว่าจุลชีพชนิดอื่น เนื่องจากใช้ต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า เพราะใช้สารตั้งต้นเพียง 2 อย่าง นั่นคือ น้ำและพลังงานแสงจากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งสารตั้งต้นดังกล่าวต่างเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างไม่จำกัด (Eroglu *et al.*, 2011) อีกทั้งสาหร่ายสีเขียวยังมีความสามารถในการตรึง CO₂ ในบรรยากาศได้ดี จึงสามารถช่วยลดปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากชั้นบรรยากาศได้อีกทางหนึ่ง โดยสาหร่ายสีเขียวที่สนใจจะทำการศึกษานั้นคือสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากงานวิจัยของ เชิด

ศักดิ์และคณะ (2554) โดยจากงานวิจัยรายงานว่า สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต ไม่ว่าการณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถผลิตไฮโดรเจนด้วยอัตราการผลิตที่สูงกว่า สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่น เช่น สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* (Chochois *et al.*, 2010) ถึง 72–92 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ให้มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนที่สูงยิ่งกว่าเดิม

โดยทั่วไปการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจะเป็นการผลิต ซึ่งจะผลิตผ่านกระบวนการผลิตแบบ 2 ขั้นตอน หรือ two-stage process (Guan *et al.*, 2004) โดยในขั้นแรก (stage I) คือ ขั้นตอนการสังเคราะห์แสงหรือขั้นการเจริญเติบโต จะเป็นการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารปกติที่มีธาตุอาหารทุกชนิดที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มปริมาณเซลล์ มีการให้แสง และคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นเซลล์สาหร่ายจากขั้นแรก (stage I) จะเข้าสู่ขั้นที่ 2 (stage II) หรือขั้นการผลิตไฮโดรเจน ปัญหาหลักของการผลิตไฮโดรเจนจะอยู่ที่ขั้นที่ 2 นี้ เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตไฮโดรเจน จะไม่สามารถทำงานได้เมื่อมีออกซิเจนอยู่ในระบบ ดังนั้นในการผลิตไฮโดรเจนจึงต้องทำการพ่นไล่อากาศด้วยแก๊สอาร์กอนหรือไนโตรเจน (Song *et al.*, 2011; Anjana *et al.*, 2014) เพื่อให้ระบบอยู่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน แต่อย่างไรก็ตามในระหว่างที่เซลล์สาหร่ายสีเขียวอยู่ในขั้นการผลิตไฮโดรเจน (stage II) ระบบการสังเคราะห์ที่ 2 ยังคงทำงานและจะปลดปล่อยออกซิเจนออกมาในระบบ ซึ่งมีผลไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส นอกจากนี้แล้ว ในปัจจุบันมีการผลิตไฮโดรเจนด้วยระบบเซลล์อิสระ เซลล์อาจเกิดการซ้อนทับกันเป็นชั้นๆ (cell stacking) เป็นเหตุให้ความสามารถในการส่องผ่านของแสงไปยังเซลล์เกิดได้น้อยลง เป็นผลให้การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในระบบเซลล์อิสระมีประสิทธิภาพลดลง มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการนำเทคนิคของการตรึงเซลล์มาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว เช่น ในงานวิจัยของ Kosourov และคณะ (2009) ได้ทำการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* พบว่า การตรึงเซลล์จะสามารถช่วยลดอัตราการแพร่และจำกัดปริมาณของแก๊สออกซิเจนในอากาศไปสู่เซลล์ ซึ่งเป็นการลดโอกาสที่ออกซิเจนจะไปยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เป็นผลทำให้เอนไซม์สามารถที่จะผลิตไฮโดรเจนได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า การตรึงเซลล์จะสามารถช่วยลดการเกิด cell stacking ทำให้เซลล์สามารถสัมผัสแสงและมีประสิทธิภาพในการใช้แสงที่ดีขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นยังมีรายงานว่า การตรึงเซลล์สามารถที่จะช่วยลดการสูญเสียเซลล์ไปในขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารใหม่ได้ สามารถเปลี่ยนอาหารได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการปั่นเหวี่ยง ทำให้สะดวกและประหยัดเวลามากยิ่งขึ้น (Laurinavichene *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2011)

การตรึงเซลล์จุลชีพเพื่อการผลิตแก๊สไฮโดรเจนนั้น สามารถที่จะทำการตรึงเซลล์ได้ทั้งจากการใช้วัสดุสังเคราะห์และพอลิเมอร์ธรรมชาติ โดยวัสดุสังเคราะห์ที่มีการนำมาตรึงเซลล์นั้นคือ อะลูมินัมโบโลซิลิเกต (Laurinavichene *et al.*, 2006) และ ซิลิกา (Hahn *et al.*, 2007) โดยเป็นการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ผลการวิจัยพบว่า การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยการใช้ซิลิกา จะไม่มีผลช่วยเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเมื่อเทียบกับระบบเซลล์อิสระ ส่วนการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วย อะลูมินัม โบโลซิลิเกต พบว่า เซลล์ของสาหร่ายสีเขียวที่ถูกตรึงจะมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้ดีขึ้นและ เซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ยาวนานขึ้น 4 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับระบบเซลล์อิสระ แต่อย่างไรก็ตามการตรึงเซลล์ด้วย อะลูมินัม โบโลซิลิเกต ยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องของราคาวัสดุที่มีราคาแพง ดังนั้นจึงนำมาสู่การหาวัสดุตรึงเซลล์ชนิดใหม่ที่จะมีราคาถูกและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวได้

การตรึงเซลล์ด้วยวัสดุที่เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากราคาถูก ง่าย และไม่เป็นพิษ โดยพอลิเมอร์ธรรมชาติที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ คือ อะการ์และอัลจิเนต ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ก็ได้มีการตรึงเซลล์สำหรับสายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ด้วยอัลจิเนต (Kosourov *et al.*, 2009; Antal *et al.*, 2016; Eleftherios *et al.*, 2016) และตรึงเซลล์สำหรับสายสีเขียว *Chlorella* sp. ด้วยอะการ์ (Song *et al.*, 2011) รวมทั้งยังมีการตรึงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya perelegans* ทั้งด้วยอะการ์และอัลจิเนต (Anjana *et al.*, 2014) โดยจากงานวิจัยดังกล่าวล้วนแล้วแต่รายงานผลตรงกันว่า การตรึงเซลล์ด้วยอะการ์และอัลจิเนตสามารถที่ช่วยให้เซลล์สำหรับสายสีเขียวผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตราคงที่และขยายระยะเวลาการผลิตให้ยาวนานมากขึ้น อีกทั้งยังมีการรายงานถึงการนำเซลล์ที่ตรึงและผลิตไฮโดรเจนไปแล้วกลับมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ ซึ่งพบว่าเซลล์สามารถที่จะกลับมาผลิตไฮโดรเจนได้ซ้ำอีกครั้งสูงสุดถึง 6 รอบ (Song *et al.*, 2011)

สำหรับสายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ได้มีการทำการศึกษาค้นคว้าผลของการเลือกวัสดุตรึงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งพบว่า วัสดุตรึงอัลจิเนตเป็นวัสดุตรึงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด (นภิศ และคณะ, 2560) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะทำการตรึงเซลล์สำหรับสายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ด้วยอัลจิเนต เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน โดยจะทำการเปรียบเทียบและแปรผันสภาวะที่ใช้ในการตรึงเซลล์ ไม่ว่าจะเป็น ขนาดของเซลล์ที่ถูกตรึง ความเข้มข้นของเซลล์ที่ถูกตรึง ความเข้มข้นของอัลจิเนต และ ผลของการขาดธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือซัลเฟอร์) เทียบกับระบบเซลล์อิสระ และเมื่อเซลล์ผลิตไฮโดรเจนคงที่แล้วก็สนใจที่จะนำเซลล์กลับเข้าสู่ขั้นสังเคราะห์แสง (stage I) อีกครั้ง เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่จากการใช้เซลล์เดิม

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. CU2551 ในแคลเซียมอัลจิเนต
- 2) ศึกษาจำนวนรอบของการนำเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. CU2551 กลับมาใช้ซ้ำใหม่

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ศึกษาปัจจัยเบื้องต้นที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

1.1) ศึกษาผลของของความขุ่นเซลล์ (OD_{730}) ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากสายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนนั้นจะต้องมีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง ดังนั้นการศึกษานี้จะทำการเลี้ยงสายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแปรผันค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD_{730}) ตั้งแต่ 0.005 ถึง 0.10 ทำการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด จะนำเซลล์สำหรับสายสีเขียวไปวัดค่าความขุ่นสุดท้าย (final OD_{730}) ของเซลล์ในขั้นการสังเคราะห์แสง (stage I) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ที่เหลือไปบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยวัดปริมาณแก๊สไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟโดยใช้ TCD เป็นตัวตรวจวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2) ศึกษาผลของความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยจะแปรผันค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) ตั้งแต่ 0.005 ถึง 0.10 ทำการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจะทำการปรับค่าความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD₇₃₀) ของเซลล์ใน stage I ให้มีค่าที่กำหนด ทำการบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และวัดความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟที่มี TCD เป็นตัวตรวจวัด

1.3) ศึกษาผลของความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD₇₃₀) ของเซลล์ใน stage I ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยจะทำการเลี้ยงเซลล์อายุ 24 ชั่วโมง โดยใช้ค่าความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 ทำการแปรผันค่าความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD₇₃₀) ของเซลล์ใน stage I เป็น 0.1 ถึง 1.0 จากนั้นทำการบ่มและวัดความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟที่มี TCD เป็นตัวตรวจวัด

2) ศึกษาการปรับสภาวะการตรึงเซลล์สำหรับสี่เขียวด้วยอัลจินเต ได้แก่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดอัลจินเต ความเข้มข้นของเซลล์ที่ตรึงในสารละลายอัลจินเต ความเข้มข้นของอัลจินเต และผลของการขาดธาตุอาหารที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ

2.1) ทำการศึกษาผลของขนาดวัสดุตรึงอัลจินเตต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน ด้วยการนำเซลล์สำหรับสี่เขียวที่มีอายุ 24 ชั่วโมง มาทำการตรึงเซลล์โดยใช้ความเข้มข้นของอัลจินเตคือ 4 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของเซลล์ที่ตรึงต่ออัลจินเตคือ 1 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อมิลลิเมตรของอัลจินเต ทำการผลิตเม็ดอัลจินเตและใช้ตะแกรงร่อน เพื่อคัดขนาดวัสดุตรึงอัลจินเตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางในช่วง 1.70-2.00, 2.00-2.36, 2.36-2.80, 2.80-3.35 และมากกว่า 3.35 มิลลิเมตร วิเคราะห์ปริมาณของไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟที่มี TCD เป็นตัวตรวจวัด

2.2) ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของเซลล์ที่ตรึงต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน ด้วยการนำเซลล์สำหรับสี่เขียวที่มีอายุ 24 ชั่วโมง มาทำการตรึงเซลล์โดยใช้ความเข้มข้นของอัลจินเตคือ 4 เปอร์เซ็นต์ และขนาดของวัสดุตรึงอัลจินเตที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 ทำการผลิตเม็ดอัลจินเต โดยจะแปรผันความเข้มข้นของเซลล์ที่ตรึงเป็น 0.125 ถึง 10 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อมิลลิเมตรของอัลจินเต วิเคราะห์ปริมาณของไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ที่มี TCD เป็นตัวตรวจวัด

2.3) ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของอัลจินเตที่มีต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน ด้วยการนำเซลล์สำหรับสี่เขียวที่มีอายุ 24 ชั่วโมง มาทำการตรึงเซลล์โดยใช้ขนาดของวัสดุตรึงอัลจินเตที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 และความเข้มข้นของเซลล์ที่ตรึงที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 ทำการผลิตเม็ดอัลจินเต โดยจะทำการแปรผันความเข้มข้นของอัลจินเตเป็น 1 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของอัลจินเตที่ใช้ในการตรึงเซลล์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณของไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ที่มี TCD เป็นตัวตรวจวัด

2.4) ทำการศึกษาผลการขาดธาตุอาหารของเซลล์ตรึง โดยจะทำการแปรผันชนิดของอาหารที่เลี้ยงเซลล์ที่ขาดธาตุอาหารหลักทั้งหมดเป็น full factorial (TAP-N, TAP-P, TAP-S, TAP-N-P, TAP-N-S, TAP-P-S, TAP-N-P-S) โดยหลังจากเลี้ยงสาหร่ายใน stage I ครบ 24 ชั่วโมงจะทำการตรึงเซลล์โดยใช้สภาวะการตรึงเซลล์ที่เหมาะสมทั้งหมดจากข้อ 2.1 ถึง 2.3 ทำการถ่ายโอนเซลล์สำหรับสี่เขียวลงสู่อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารหลักชนิดต่างๆที่ทำการแปรผัน นำไปบ่มในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณของไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ โดยใช้ TCD เป็นตัวตรวจวัด

3) ศึกษาการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ โดยใช้สภาวะในการตรึงเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารหลักที่เหมาะสมจากข้อ 2 โดยเมื่อเซลล์ตรึงอิมมัวในการผลิตไฮโดรเจนแล้ว จะทำการย้ายเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ไปสู่อาหาร TAP ปกติที่มีธาตุอาหารหลักครบถ้วน เพื่อให้เซลล์มีสภาพของเมแทบอลิซึมกลับสู่สภาวะเดิม โดยจะทำการแปรผันระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์เป็น 24, 1, และ 0 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้ายเซลล์ไปสู่อาหารที่ขาดธาตุอาหารหลักที่เหมาะสมอีกครั้งเพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจน อันจะเป็นการเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ที่ตรึงเอาไว้แต่เดิม ทำการทดลองเพื่อหาจำนวนรอบที่เซลล์สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำเพื่อการผลิตไฮโดรเจน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนของ *Tetraspora* sp. CU2551 ให้สูงมากยิ่งขึ้น
- 2) สามารถที่จะเพิ่มปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว จากการนำเซลล์ที่ตรึงแล้วกลับมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่

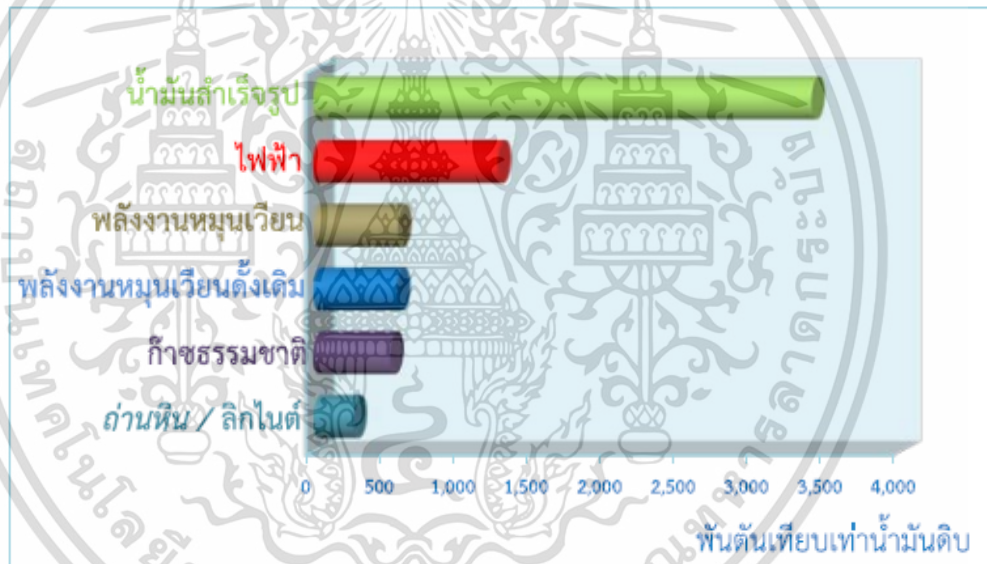


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันการใช้พลังงานมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปีตามความเจริญของสังคมโลก โดยพลังงานหลักเป็นพลังงานฟอสซิลที่มาจาก น้ำมัน ถ่านหิน และแก๊สธรรมชาติ จากรายงานสถานการณ์พลังงานของประเทศไทย (ศูนย์สารสนเทศข้อมูลพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2559) พบว่า น้ำมันปิโตรเลียมเป็นเชื้อเพลิงที่มีการใช้มากที่สุดโดยคิดเป็นร้อยละ 51.5 ของพลังงานขั้นสุดท้ายทั้งหมด โดยพลังงานส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในการคมนาคมและการขนส่ง รองลงมาคือใช้ในอุตสาหกรรม ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การเปรียบเทียบการใช้พลังงานในประเทศไทย

ที่มา : ศูนย์สารสนเทศข้อมูลพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (2559)

จากการใช้พลังงานฟอสซิลที่เพิ่มสูงขึ้นนี้จึงก่อให้เกิดปัญหาหลายประการ ประการแรกคือ ประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย ต่างอยู่ในสภาพขาดความมั่นคงทางด้านพลังงาน (Energy security) เพราะไม่มีแหล่งพลังงานฟอสซิลทั้ง 3 ชนิดเป็นของตนเอง พลังงานจึงถูกควบคุมโดยต่างประเทศ อีกทั้งพลังงานฟอสซิลเป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป ธรรมชาติไม่สามารถที่จะสร้างขึ้นมาทดแทนได้ภายในเวลาอันสั้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลาอันสั้น ประการที่สองคือ เกิดผลกระทบต่อทางเศรษฐกิจ (Economic development) ที่สัมพันธ์โดยตรงกับความเป็นอยู่ที่ดีขึ้นของประชากรโลก เนื่องจากพลังงานฟอสซิลมีราคาสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และประการสุดท้ายคือ การเกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการเกิดภาวะโลกร้อน การเผาไหม้เชื้อเพลิงที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบนั้น จะทำให้เกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นด้วยเสมอ เช่น การเผาไหม้น้ำมันเบนซิน ดีเซล ถ่านหิน และแก๊สธรรมชาติ เป็นต้น ซึ่งแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีการปลดปล่อยออกมานั้นก็เป็นแก๊สหลักที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดภาวะโลกร้อน จากปัญหาดังที่กล่าวมาจึงนำมาสู่การหาแหล่งพลังงานทดแทนแหล่งใหม่ที่เหมาะสมโดยจะต้องมีราคาไม่แพง การเกิดมาทดแทนใช้เวลาไม่มาก กระบวนการผลิตเพื่อให้ได้พลังงานต้องใช้เวลาไม่นาน เป็นพลังงานสะอาดและมาจากแหล่งที่พบได้ทั่วไป (รัชนิกร, 2554) ซึ่งมีพลังงานทางเลือกชนิดหนึ่งที่สามารถตอบโจทย์คุณสมบัติของพลังงานทางเลือกแหล่งใหม่ที่ต้องการได้ค่อนข้างจะสมบูรณ์โดยพลังงานชนิดนั้นก็คือ พลังงานไฮโดรเจน

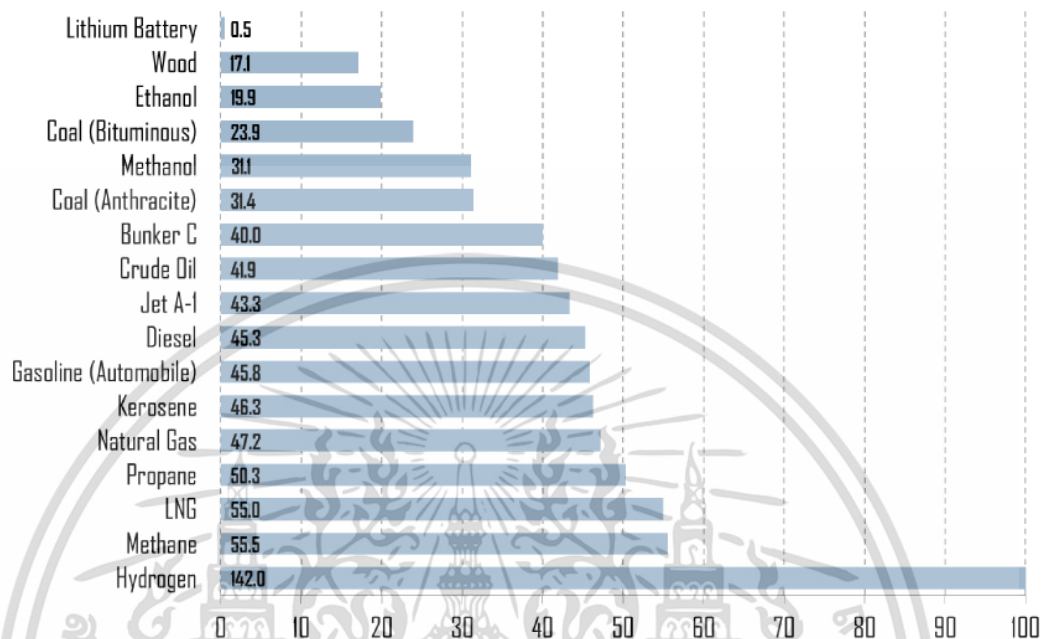
2.1 พลังงานไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นองค์ประกอบของน้ำ (H_2O) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีมากที่สุดบนโลก นอกจากนี้ยังเป็นธาตุที่รวมอยู่ในโมเลกุลของสารประกอบอื่นๆ เช่น สารประกอบจำพวกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปิโตรเลียมที่มีความสำคัญสำหรับการพัฒนาทางเศรษฐกิจของประเทศ คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน คือ เป็นธาตุที่มีน้ำหนักเบากว่าอากาศถึง 14 เท่า สามารถลอยกระจายไปในอากาศได้อย่างรวดเร็วและไม่ตกค้างบนพื้นดิน ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย มีความสะอาดสูง ไม่เป็นพิษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการใช้งานเชื้อเพลิงไฮโดรเจนจะปลดปล่อยเพียงแค่น้ำและความร้อนออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ แต่ไม่มีการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์หรือแก๊สมลภาวะอื่นๆออกสู่บรรยากาศ นอกจากนั้นแล้วไฮโดรเจนยังมีจุดติดไฟที่สูงและมีจุดเดือดที่ต่ำ โดยมีจุดติดไฟที่ 570 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นค่าที่สูงมากเมื่อเทียบกับแก๊สโซลีน ส่วนจุดเดือดของไฮโดรเจนนั้นจะต่ำมากถึง -253 องศาเซลเซียส และด้วยเหตุที่ว่า ไฮโดรเจนมีน้ำหนักเบากว่าอากาศมาก เมื่อมีการรั่วของไฮโดรเจนเกิดขึ้น ไฮโดรเจนจะกระจายตัวขึ้นสู่บรรยากาศอย่างรวดเร็ว และเมื่อเกิดการเผาไหม้ เปลวไฟจะขึ้นข้างบนและหมดไปอย่างรวดเร็ว โดยการเผาไหม้จะเกิดขึ้นเร็วมากและมีการแผ่รังสีความร้อนในระดับต่ำ ซึ่งแตกต่างจากเบนซินและดีเซล โดยไอของเบนซินและดีเซลจะหนักกว่าอากาศทำให้มีการลุกไหม้อยู่นานกว่า ดังนั้นพลังงานไฮโดรเจนจึงถือเป็นพลังงานที่มีความอันตรายน้อยกว่าเมื่อเทียบกับพลังงานชนิดอื่นๆ

นอกจากข้อดีหลายประการของพลังงานไฮโดรเจนดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น พลังงานไฮโดรเจนยังประสิทธิภาพในการให้พลังงานได้สูงเมื่อเทียบกับพลังงานชนิดอื่น โดยจะให้ค่าพลังงานต่อการใช้ไฮโดรเจน 1 กิโลกรัมสูงถึง 141.6 เมกะจูล (Perry, 1963) ซึ่งให้ค่าพลังงานสูงกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงถึง 3 เท่า (รูปที่ 2.2) โดยพลังงานไฮโดรเจนสามารถใช้งานได้ทั้งเป็นเชื้อเพลิงในการเผาไหม้และให้ความร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์หรือการเชิงงานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้โดยไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกมา หรือใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงโดยปฏิกิริยาทางเคมีแล้วเกิดกระแสไฟฟ้า ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ทั้งในการขับเคลื่อนรถ ผลิตกระแสไฟฟ้า อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ขนาดเล็กและอื่นๆ



รูปที่ 2.2 การเปรียบเทียบค่าพลังงานชนิดต่างๆต่อปริมาณเชื้อเพลิงน้ำหนัก 1 กิโลกรัม

ที่มา : <http://people.hofstra.edu/geotrans/Eng/ch8en/conc8en/energycontent.html>.

เมื่อกล่าวถึงเซลล์เชื้อเพลิง ขณะนี้การใช้เซลล์เชื้อเพลิงในผลิตกระแสไฟฟ้าก็กำลังได้รับความนิยมเช่นกัน เนื่องจากเซลล์เชื้อเพลิงเป็นกระบวนการเปลี่ยนพลังงานเคมีของเซลล์เชื้อเพลิงไปเป็นพลังงานไฟฟ้าโดยกลไกทางเคมีไฟฟ้า ที่สามารถแปรรูปพลังงานเคมีไปเป็นพลังงานไฟฟ้าได้จากหลายแหล่ง โดยผ่านเพียงขั้นตอนเดียวซึ่งไม่มีความยุ่งยากและซับซ้อน ในขณะที่ปัจจุบันกระบวนการแปรรูปพลังงานจะเป็นการแปรรูปพลังงานเคมีไปเป็นพลังงานความร้อนก่อน จากนั้นทำการเปลี่ยนพลังงานความร้อนไปเป็นพลังงานกลและค่อยเปลี่ยนพลังงานกลไปเป็นพลังงานไฟฟ้า (รูปที่ 2.3) โดยปกติในธรรมชาติการเปลี่ยนแปลงพลังงานในทุกๆขั้นตอนจะมีการสูญเสียพลังงานอยู่แล้ว โดยเฉพาะขั้นตอนของการเปลี่ยนพลังงานเคมีไปเป็นพลังงานความร้อน ดังนั้นกระบวนการแปรรูปพลังงานเคมีไปเป็นพลังงานไฟฟ้าด้วยวิธีนี้จึงมีการสูญเสียพลังงานค่อนข้างมาก เนื่องจากกระบวนการแปรรูปจะต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอนซึ่งมีความยุ่งยากซับซ้อน อีกทั้งพลังงานเคมีที่จะใช้ในการแปรรูปไปเป็นพลังงานไฟฟ้ามักจะเป็นเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม ซึ่งผลของการแปรรูปที่ได้จึงมักจะได้ ความร้อน คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์ ในขณะที่กระบวนการใช้เซลล์เชื้อเพลิง ผลจากการแปรรูปพลังงานเคมีจะมีเพียงความร้อนและน้ำเท่านั้น นั่นหมายความว่ากระบวนการเซลล์เชื้อเพลิงจะมีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่ากระบวนการผลิตเครื่องยนต์แบบใช้ความร้อน (สำนักวิจัยค้นคว้าพลังงาน, 2554)

เชื้อเพลิง (พลังงานเคมี) → พลังงานความร้อน → พลังงานกล → พลังงานไฟฟ้า
(การแปลงพลังงานโดยวัฏจักรทั่วไป เช่นที่ใช้ในโรงไฟฟ้า)

เชื้อเพลิง (พลังงานเคมี) → พลังงานไฟฟ้า
(กระบวนการเซลล์เชื้อเพลิง)

รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการแปลงพลังงานวัฏจักรทั่วไป และโดยกระบวนการเซลล์เชื้อเพลิง

ที่มา : สำนักวิจัยค้นคว้าพลังงาน (2554)

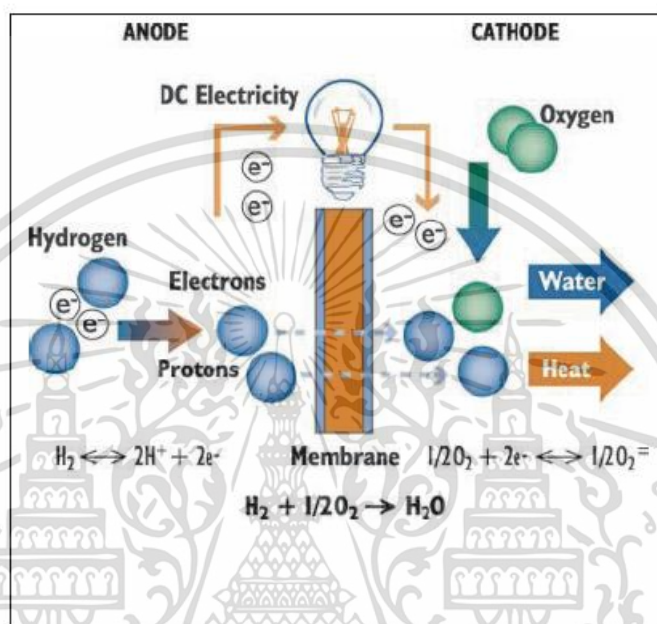
เซลล์เชื้อเพลิงที่มีใช้งานในปัจจุบันนั้น แต่ละชนิดจะมีโครงสร้างและปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมีที่แตกต่างกัน แต่เซลล์เชื้อเพลิงที่กำลังได้รับนิยมคือ เซลล์เชื้อเพลิงแบบเมมเบรนแลกเปลี่ยนโปรตอน หรือ Proton Exchange Membrane Fuel Cell, PEMFC) เนื่องจากเป็นเซลล์เชื้อเพลิงที่มีขนาดกะทัดรัด เริ่มทำงานได้รวดเร็ว ให้พลังงานสูงเมื่อเทียบกับน้ำหนัก สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิต่ำ และอายุการทำงานยาวกว่าเซลล์เชื้อเพลิงประเภทอื่น ซึ่งเป็นที่นิยมสูงสุดในการนำมาใช้เป็นต้นกำลังในภาคคมนาคมขนส่ง โดยหลักการเปลี่ยนพลังงานเคมีให้เป็นพลังงานไฟฟ้านั้นสามารถทำได้โดย การใช้เซลล์ไฟฟ้าเคมีชนิดกัลวานิกส์มาเป็นอุปกรณ์ในการทำให้เกิดปฏิกิริยากันระหว่างแก๊สไฮโดรเจนและแก๊สออกซิเจน (O_2) ซึ่งแก๊สออกซิเจนได้มาจากการผ่านอากาศเข้าไปในเซลล์ แก๊สไฮโดรเจนจะทำปฏิกิริยาที่ขั้วแอโนดเพื่อให้อิเล็กตรอนและไฮโดรเจนไอออน (H^+) อิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ผ่านวงจรภายนอกและให้ไฟฟ้ากระแสตรงออกมา ขณะเดียวกันไฮโดรเจนไอออนจะแพร่ผ่านสารอิเล็กโทรไลต์เพื่อไปทำปฏิกิริยากับแก๊สออกซิเจนและอิเล็กตรอนจากวงจรภายนอกที่ขั้วแคโทด แล้วได้สารผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อนเกิดขึ้น (รัชนิกร, 2554) สมการการเกิดปฏิกิริยาเคมีแสดงดังสมการที่ (1), (2) และ (3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาที่ขั้วแอโนด : $2\text{H}_2 \longrightarrow 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ สมการที่ (1)

ปฏิกิริยาที่ขั้วแคโทด : $\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ สมการที่ (2)

ปฏิกิริยาของเซลล์ : $2\text{H}_2 + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ สมการที่ (3)



รูปที่ 2.4 เซลล์เชื้อเพลิงชนิด PEMFC และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในขั้วแคโทดและแอโนด

ที่มา : รัชนิกร (2554)

2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน

การผลิตไฮโดรเจนเมื่อพิจารณาจากวัตถุดิบเป็นหลักแบ่งออกเป็น 3 แหล่งหลักๆ คือ จากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น แก๊สธรรมชาติ ถ่านหิน น้ำมันปิโตรเลียม จากแหล่งพลังงานหมุนเวียน เช่น ชีวมวล และน้ำ เป็นต้น และจากพลังงานนิวเคลียร์ แนวคิดหลักที่ใช้ในกระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจน คือ การแยกไฮโดรเจนอะตอมออกจากสารตั้งต้นและแหล่งให้แก๊สไฮโดรเจนจะเป็นตัวกำหนดกระบวนการที่ใช้ในการผลิต ในปัจจุบันกระบวนการผลิตได้แยกออกเป็น 3 กระบวนการหลักคือ กระบวนการทางความร้อนเคมี กระบวนการไฟฟ้าเคมี และกระบวนการทางชีวเคมี โดยกระบวนการที่ได้นั้นต้องให้ผลคุ้มค่ากับการลงทุนและไม่ยุ่งยากซับซ้อนจนเกินไปเพื่อลดต้นทุนการผลิต ซึ่งกระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 กระบวนการทางความร้อนเคมี (Thermal chemical process)

ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้โดยวิธีทางเคมีโดยใช้ความร้อน มีวัตถุดิบหลักที่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น แก๊สธรรมชาติ ถ่านหิน ชีวมวล เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือแก๊สสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย ไฮโดรเจน คาร์บอนมอนอกไซด์ น้ำ และมีเทน จากนั้นจะผ่านกระบวนการเพิ่มเติมเพื่อทำให้ได้ไฮโดรเจนที่บริสุทธิ์ขึ้น ซึ่งการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการความร้อนเคมี ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (Steam Reforming) กระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification)

กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนในเชิงพาณิชย์ที่นิยม คือ Steam reforming โดยมีสารตั้งต้นเป็นแก๊สธรรมชาติ เอทานอลหมักจากวัสดุธรรมชาติ เป็นต้น ปัจจุบันร้อยละ 95 ของแก๊สไฮโดรเจนที่ผลิตหรือ 9,000,000 ตัน ผลิตในประเทศสหรัฐอเมริกาและใช้แก๊สธรรมชาติเป็นวัตถุดิบ หรือเรียกกระบวนการนี้ว่า Steam Methane Reformation (SMR) เนื่องจากมีเทนเป็นส่วนประกอบหลักของแก๊สธรรมชาติ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนที่สำคัญคือ 1) นำแก๊สธรรมชาติทำปฏิกิริยา reforming กับไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูงๆ(อาจจะมีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งร่วมด้วย)เพื่อให้ได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO) และแก๊สไฮโดรเจน (ดังสมการที่ 4 และ 5 ในขั้นที่ 1) จากขั้นตอนที่ 1 จะเห็นว่ามี CO เกิดขึ้นร่วมด้วย ดังนั้นจะมีการนำไอน้ำเข้ามาทำปฏิกิริยากับ CO อีกครั้งเพื่อให้ได้แก๊สไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น ดังแสดงในขั้นที่ 2 ปฏิกิริยานี้เรียกว่า Water-Gas Shift reaction (WGS) (รัชนิกร, 2554)



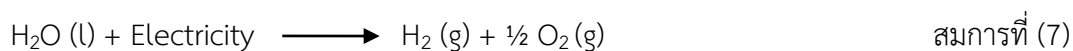
ส่วนกระบวนการแก๊สซิฟิเคชันหรือบางครั้งเรียกว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบบางส่วนหรือ Partial Oxidation เป็นเทคนิคที่เกิดขึ้นโดยจำเป็นต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งกล่าวง่าย ๆ ก็คือ เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ความร้อนในการผลิตแก๊สไฮโดรเจน โดยทั่วไปแล้วสารตั้งต้นที่นิยมใช้มักเป็นสารประกอบทางอินทรีย์ เช่น แก๊สมีเทน เอทานอล และชีวมวล โดยทั่วไปปฏิกิริยานี้มักทำที่อุณหภูมิสูงกว่า 700 องศาเซลเซียส โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มักจะเป็น แก๊สไฮโดรเจนและแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์หรือ CO อย่างไรก็ตามปฏิกิริยานี้ยังให้สารผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำมันดิน (Tar) และเขม่าเกิดขึ้นในปริมาณที่มากกว่าปฏิกิริยาสตีมรีฟอร์มมิ่ง (Steam reforming)

2.2.2 กระบวนการไฟฟ้าเคมีของน้ำ (Electrolysis of water)

เป็นกระบวนการทางไฟฟ้าเคมีผ่านกระแสไฟฟ้าลงในน้ำ ซึ่งรู้จักกันดีในชื่อ ปฏิกิริยาการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้าหรือ Electrolysis reaction กระแสไฟฟ้านี้จะทำให้เกิดการแตกตัวของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอมออกจากกัน แล้วอะตอมชนิดที่เหมือนกันจะเกิดการรวมตัวกัน ให้แก๊สไฮโดรเจนและแก๊สออกซิเจน ดังแสดงในสมการที่ (7) และรูปที่ 5



เมื่อพิจารณาการได้มาซึ่งแก๊สไฮโดรเจนโดยวิธีนี้กระแสไฟฟ้าที่ใช้ในปฏิกิริยาได้มาจากแหล่งพลังงานตั้งต้นอื่นถ้าจะนำแก๊สไฮโดรเจนนี้มาเป็นเชื้อเพลิงในการผลิตกระแสไฟฟ้าโดยใช้เซลล์เชื้อเพลิงพบว่า ค่าพลังงานไฟฟ้าที่ได้นั้นยังไม่คุ้มค่ากับต้นทุนในการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้าดังกล่าว เพราะราคาต้นทุนเกือบทั้งหมดของกระบวนการนี้ขึ้นกับมูลค่าของพลังงานไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกสลายน้ำ ถึงแม้ว่าแหล่งให้แก๊สไฮโดรเจนนี้จะใช้เพียงน้ำซึ่งมีมากในโลกก็ตาม กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากน้ำนี้จึงจำเป็นต้องได้รับการวิจัยและพัฒนาต่อไป เพื่อลดมูลค่าและต้นทุนในระหว่างการผลิต นอกจากนั้นต้องพิจารณาถึงแหล่งให้พลังงานไฟฟ้าเบื้องต้นด้วย ถ้ามาจากแหล่งที่ใช้แล้วหมดไป เช่น แก๊สธรรมชาติ ถ่านหิน หรือน้ำมันปิโตรเลียม ย่อมไม่เหมาะสม ควรจะเป็นแหล่งที่สามารถเกิดมาทดแทนใหม่ได้เร็วเช่น พลังงานไฟฟ้าจาก ลม แสงอาทิตย์ หรือพลังน้ำ เป็นต้น จึงจะทำให้กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

2.2.3 กระบวนการทางชีวภาพ

กระบวนการนี้เป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหรือจุลินทรีย์ ไฮโดรเจนที่ผลิตได้จะถูกเรียกว่า ไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen)

จุลินทรีย์เกือบทุกชนิดมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน ไม่ว่าจะเป็น สาหร่ายสีเขียว ไชยานแบคทีเรีย แบคทีเรีย และแบคทีเรียสีม่วงหรือแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็มีทั้งข้อดีและข้อด้อยที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และเมื่อพิจารณาข้อมูลในตารางจะเห็นว่า การผลิตไฮโดรเจนด้วยสาหร่ายสีเขียวมีความน่าสนใจ ด้วยเหตุผลตั้งแต่ ความรวดเร็วในระบบสังเคราะห์ด้วยแสง สาหร่ายสีเขียวสามารถนำเอาพลังงานจากแสงอาทิตย์มาใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงได้อย่างรวดเร็วกว่าพืชทดแทนอื่นๆ จึงไม่ต้องใช้ค่าใช้จ่ายในการให้อาหารและการเลี้ยงดูมาก การควบคุมอุณหภูมิและการเพาะเลี้ยงเชื้อก็สามารถทำได้ง่าย อีกทั้งสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตยังเป็นสิ่งที่มีอยู่ในธรรมชาติอย่างไม่จำกัด นั่นคือ น้ำและพลังงานแสง ส่งผลทำให้ต้นทุนที่ใช้ในการผลิตต่ำลง โดยในระหว่างกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจะไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์หรือแก๊สเรือนกระจกออกสู่บรรยากาศเลย ซึ่งนอกจากจะไม่มีแก๊สเรือนกระจกเกิดขึ้นแล้วนั้น สาหร่ายสีเขียวยังสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นแก๊สเรือนกระจกที่เป็นสาเหตุสำคัญของ

ปรากฏการณ์เรือนกระจกออกจากบรรยากาศได้อีกด้วย นอกจากนั้นแล้ว สาหร่ายสีเขียวยังมีศักยภาพเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเพิ่มจำนวนสูง สามารถเพาะเลี้ยงได้เป็นจำนวนมากโดยไม่ยุ่งยาก ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงไม่มาก และไม่มีผลกระทบต่อการเพาะปลูกพืชการเกษตรอื่นๆ โดยสามารถนำพื้นที่ที่เสื่อมโทรมมาดัดแปลงเป็นพื้นที่เพาะพันธุ์ได้ ดังนั้นในรายละเอียดส่วนต่อไปนี้จะกล่าวเฉพาะการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบกระบวนการทางชีวภาพที่ใช้ในการผลิตไบโอไฮโดรเจน

จุลินทรีย์	ปฏิกิริยาทั่วไป	ข้อได้เปรียบ	ข้อเสียเปรียบ
Green microalgae เช่น - <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> - <i>Chlorella</i> sp. - <i>Scenedesmus</i> sp.	$2\text{H}_2\text{O} + \text{Light} \longrightarrow 2\text{H}_2 + \text{O}_2$	<ul style="list-style-type: none"> - ผลิตได้ง่าย สามารถผลิตจากน้ำและแสง - ประสิทธิภาพการใช้พลังงานจากแสงแดดสูงถึง 10 เท่า เมื่อเทียบกับต้นไม้อื่นๆ 	<ul style="list-style-type: none"> - เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยออกซิเจน - ขึ้นกับปริมาณแสง ถ้าไม่มีแสง ปฏิกิริยาก็จะไม่เกิด
Blue green algae หรือ Cyanobacteria เช่น <i>Gloeocapsa alpicola</i>	$12\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2 + \text{Light} \longrightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 12\text{H}_2\text{O} + \text{Light} \longrightarrow 12\text{H}_2 + 6\text{CO}_2$	<ul style="list-style-type: none"> - ผลิตไฮโดรเจนจากน้ำ แสง และ CO_2 - สามารถใช้ CO_2 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน - สามารถตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศได้ 	<ul style="list-style-type: none"> - เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยออกซิเจน - ต้องมีการพ่น CO_2 เข้าไปทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น
Purple bacteria เช่น - <i>Rhodobacter capsulatus</i> - <i>Rhodospseudomonas capsulate</i>	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_3 + 3\text{H}_2\text{O} + \text{Light} \longrightarrow 3\text{CO}_2 + 6\text{H}_2$	<ul style="list-style-type: none"> - ไม่มีออกซิเจนที่จะยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนส - ใช้แสงแดดเป็นแหล่งพลังงาน 	<ul style="list-style-type: none"> - ประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนจะต่ำกว่าการผลิตด้วยวิธีอื่น เนื่องจากแบคทีเรียมีการผลิตเม็ดสีม่วงทำให้มีผลบดบังการกระจายของแสง
Anaerobic bacteria เช่น - <i>Clostridium</i> sp. และ rumen bacteria Facultative bacteria เช่น - <i>Escherichia coli</i> และ <i>Enterobacter</i>	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2$	<ul style="list-style-type: none"> - ไม่มีออกซิเจนที่จะยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนส - แหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้จากหลายแหล่ง เช่น ของเสียจากมูลสัตว์ - สามารถผลิตได้ทั้งวันโดยปราศจากแสง - ได้ผลพลอยได้ เช่น กรดบิวทิริก กรดไพรูวิก ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อได้ 	<ul style="list-style-type: none"> - ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้จะไม่ตรงตามทฤษฎี - แก๊สที่ได้ออกมาไม่มีเพียงไฮโดรเจน จึงต้องทำการแยกแก๊สเพื่อให้ได้ไฮโดรเจนที่บริสุทธิ์นำมาซึ่งต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น

2.3 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มของยูคาริโอต จัดอยู่ในไฟลัม Chlorophyta มีรูปร่างหลายแบบ มีทั้งเซลล์เดี่ยว (unicellular) โคลนี (colony) และเส้นสาย (filament) พวกที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคลนี มีทั้งที่เคลื่อนไหวได้และไม่ได้ พวกที่เป็นเส้นสายมีทั้งที่แตกแขนงและไม่แตกแขนง สาหร่ายสีเขียวมีนิวเคลียส 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 พวกที่มีหนวดจะมีออร์แกเนลล์ที่มีสี เรียกว่า ตา (eye spot or stigma) ทำหน้าที่รับแสงแล้วส่งไปยังหนวด

เมื่อพิจารณาสาหร่ายสีเขียวจากลักษณะทางสรีรวิทยาและขนาดของสาหร่าย สาหร่ายสีเขียวจะจัดอยู่ในกลุ่มของจุลสาหร่าย (Microalgae) ซึ่งเป็นสาหร่ายที่ไม่มีระบบท่อน้ำท่ออาหารและมองเห็นด้วยตาเปล่าไม่ชัดเจน ต้องมองด้วยกล้องจุลทรรศน์

สารสีสำหรับการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว นั้น ประกอบไปด้วย คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ที่ประกอบไปด้วย แคโรทีนและแซนโทฟิลล์ ซึ่งเป็นรงควัตถุชนิดเดียวกับที่พบในพืชชั้นสูง ส่วนผนังเซลล์ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น ชั้นในเป็นพวกเซลลูโลส ชั้นนอกเป็นพวกเพคติน อาหารสะสมส่วนใหญ่ คือ แป้งอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ซึ่งจะถูกระดมในไพรินอยด์ (pyrenoid) ที่อยู่บนคลอโรพลาสต์ ส่วนที่เหลือจะสะสมอาหารในรูปน้ำมันและกลีเซอรอล

นอกจากนั้นแล้วยังพบว่า สาหร่ายสีเขียวจะมีความพิเศษที่แตกต่างจากสาหร่ายขนาดใหญ่หรือมหาสาหร่ายทั่วไป (Macroalgae) คือ มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้ เช่น *Scenedesmus* sp. KMITL-01 (Rattana *et al.*, 2010), *Chlorella* sp. (Song *et al.*, 2011; Batyrova *et al.*, 2015), *Chlamydomonas reinhardtii* (Laurinavichene *et al.*, 2006, Melis *et al.*, 2002), *Platymonas subcordiformis* (Guan *et al.*, 2004) และ *Tetraspora* sp. CU2551 (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010)

2.4 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

2.4.1 เอนไซม์ที่ใช้ผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสพบได้ในจุลินทรีย์ทั่วไปทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต โดยสามารถจำแนกทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น 2 ชนิด คือ unidirectional หรือ uptake hydrogenase เร่งปฏิกิริยาโมเลกุลของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน และ bidirectional หรือ reversible hydrogenase เร่งปฏิกิริยาโมเลกุลของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลของไฮโดรเจน

นอกจากนี้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถแบ่งตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้อีก โดยหลักๆแล้ว สามารถแบ่งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสออกได้ 2 แบบ นั่นคือ [NiFe]- hydrogenases และ [FeFe]- hydrogenases (Allakhverdiev *et al.*, 2011)

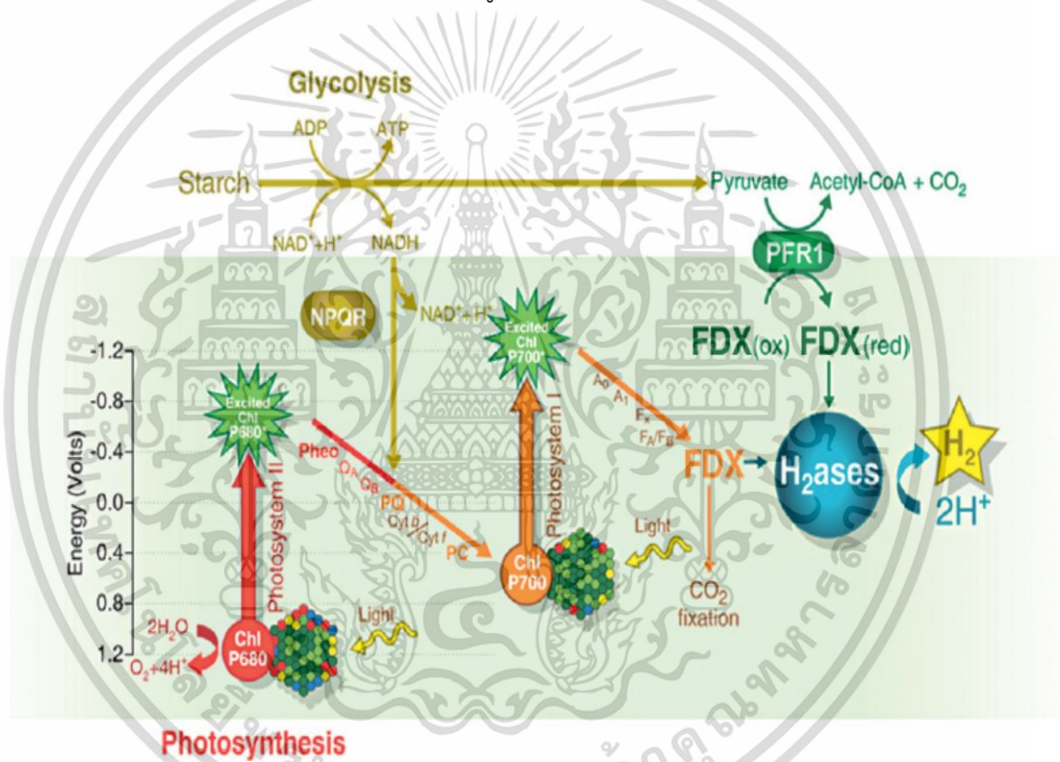
เอนไซม์ [FeFe]- hydrogenases เป็นเอนไซม์ที่มักพบในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียว ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ประกอบไปด้วยสายพอลิเพปไทด์ 1 สาย (โมโนเมอร์เอนไซม์) หรือ 2 สาย (ไดเมอร์เอนไซม์) มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 50 กิโลดอลตัน (kDa) (Eroglu *et al.*, 2011) ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีโลหะเหล็กที่จับอยู่กับซิสเทอีนเป็นลิแกนด์ หรือบางครั้งเรียกว่า Fe-S cluster หรือ HC cluster เอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนโปรตอนไปเป็นโมเลกุลของไฮโดรเจนมากที่สุด โดยจะสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน นอกจากอะตอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหล็กจะกับซีสเทอีนแล้ว ยังสามารถจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์และไซยาไนด์ได้อีกด้วย (Allakhverdiev *et al.*, 2011)

เมทาบอลิซึมของการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้แสงของสาหร่ายสีเขียวถูกค้นพบครั้งแรกโดย Hans Gaffron (Gaffron *et al.*, 1942) ได้ค้นพบความสามารถพิเศษของสาหร่ายสีเขียวในหลายสายพันธุ์ ไม่ว่าจะเป็น *Chlorella sp.*, *C. reinhardtii* และ *P. subcordiformis* การค้นพบครั้งนี้กลายเป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้แสงของสาหร่ายสีเขียวได้รับความสนใจจากนักวิจัยมากมาย จนสามารถระบุชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนได้ดังที่ได้กล่าวไปข้างต้น รวมทั้งยังสามารถอธิบายวิธีการผลิตไฮโดรเจนได้อีกด้วย สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้โดยผ่านกระบวนการผลิตได้ 3 วิธี โดย 2 วิธีจะเกิดในสภาวะที่มีแสง ได้แก่ กระบวนการแยกด้วยแสงแบบทางตรงและกระบวนการแยกด้วยแสงแบบทางอ้อม และอีก 1 วิธีจะเกิดในสภาวะที่ไม่มีแสง นั่นคือ กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง ดังแสดงในรูปที่ 2.5



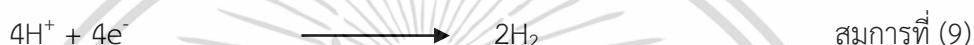
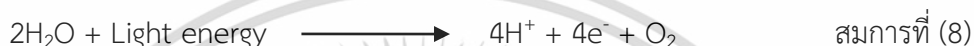
รูปที่ 2.5 วิธีการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii*
ที่มา : Dubini *et al.* (2011)

2.4.2 กระบวนการแยกด้วยแสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis)

สาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนด้วยการใช้แสงโดยใช้ระบบการสังเคราะห์แสง ผ่านระบบแสงที่ 2 (photosystem II, PSII) และระบบแสงที่ 1 (photosystem I, PSI) โดยระบบแสงทั้งสองนี้สามารถที่จะเปลี่ยนพลังงานแสงอาทิตย์มาเป็นพลังงานเคมีได้ โดยพลังงานเคมีที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการแยกโมเลกุลของน้ำออกและใช้เป็นพลังงานในการขับเคลื่อนอิเล็กตรอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย หรือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) ก่อนที่จะส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อทำการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

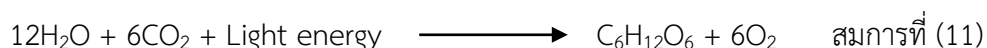
การผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการนี้จะขึ้นกับกิจกรรมของระบบแสงที่ 2 และระบบแสงที่ 1 วิธีการผลิตไฮโดรเจนจะเริ่มจาก ที่ระบบแสงที่ 2 จะเกิดการออกซิเดชันของน้ำ โมเลกุลของน้ำจะถูกแยกออก ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน ระบบจะดูดซับพลังงานแสงและเปลี่ยนเป็นพลังงานเคมี และใช้พลังงานที่ได้รับขับเคลื่อนอิเล็กตรอนผ่านตัวรับอิเล็กตรอนตัวต่างๆ ผ่านระบบแสงที่ 1 จนถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย หรือเฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin, FDX) จากนั้น FDX จะส่งอิเล็กตรอนต่อไปให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ที่ยที่สุดเอนไซม์ไฮโดรจีเนสก็จะทำการรวมอิเล็กตรอนและโปรตอนที่ได้รับจากระบบแสงที่ 2 และปลดปล่อยโมเลกุลไฮโดรเจน (Dubini *et al.*, 2011) ดังสมการที่ 9 และเมื่อมองเป็นปฏิกิริยารวมจะเห็นว่ากระบวนการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงจะมีการผลิตไฮโดรเจนดังแสดงในสมการที่ 10



แต่อย่างไรก็ตาม ความต่อเนื่องของการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้ก็ยังคงถูกจำกัดด้วยปริมาณออกซิเจนที่สะสมจากการแยกโมเลกุลของน้ำที่ระบบแสงที่ 2 โดยออกซิเจนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้ระบบการผลิตไฮโดรเจนยุติลง (Dubini *et al.*, 2011)

2.4.3 กระบวนการแยกด้วยแสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis)

การผลิตไฮโดรเจนวิธีนี้จะขึ้นกับ NADP-plastoquinone oxidoreductase (NPQR) และระบบแสงที่ 1 หรือระบบแสง PSI เท่านั้น โดยจากการที่สาหร่ายสีเขียวสามารถที่จะเกิดการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้ ซึ่งจะได้คาร์โบไฮเดรต เช่น แป้ง หรือ น้ำตาลกลูโคส เป็นผลิตภัณฑ์สะสมภายในเซลล์ ดังสมการที่ 11 ดังนั้นการผลิตไฮโดรเจนผ่านวิธีนี้จะเกิดขึ้นโดยเริ่มจาก โมเลกุลของแป้งจะเข้าสู่การย่อยสลายให้ได้ไพรูเวต (glycolytic degradation) (Dubini *et al.*, 2011) โดยเกิดผ่านวิถีไกลโคไลซิสซึ่งเกิดในคลอโรพลาสต์ จากการย่อยสลายนี้จะมีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาในรูป NADH โดยที่มี NPQR ทำหน้าที่ในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนต่อไปให้กับ Plastoquinone (PQ) จากนั้นภายใต้สภาวะที่มีการให้แสง ตัวรับอิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปที่ระบบแสง PSI เพื่อรับพลังงานอีกครั้งและใช้พลังงานที่ได้รับกระตุ้นตัวมันเองและส่งต่ออิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน ดังสมการที่ 12



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark fermentation)

กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง หรือ Dark fermentation จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง และไม่มีออกซิเจน โดยไพรูเวตจะถูกออกซิไดส์ผ่านเอนไซม์ PFR ได้ผลผลิตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ อะซิติก โคเอนไซม์ เอ และ อิเล็กตรอน โดยมี FDX ไพรูบิเล็กตรอนที่ปลดปล่อยออกมา และส่งต่อให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อทำการผลิตไฮโดรเจน แต่อย่างไรก็ตามปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยวิธีนี้ ยังคงให้ปริมาณที่น้อยอยู่เมื่อเทียบกับกระบวนการผลิตแบบใช้แสง 2 วิธีตามที่ได้กล่าวไปในข้างต้น (Dubini *et al.*, 2011)

2.5 การเพิ่มศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะถูกยับยั้งเมื่อสัมผัสกับออกซิเจน ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนจึงจำเป็นต้องทำการผลิตโดยผ่านกระบวนการผลิตแบบ 2 ขั้นตอนหรือ two-stage photosynthesis and H₂ production process (Melis *et al.*, 2002)

โดยขั้นการสังเคราะห์แสง (stage I) ของการผลิตไฮโดรเจนนั้นจะเป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารที่มีธาตุอาหารหลักครบถ้วน ในสภาวะที่มีออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ สาหร่ายสีเขียวจะเกิดการสังเคราะห์แสงปกติ ตั้งแต่การเกิดการออกซิเดชันของน้ำ การผลิตออกซิเจน (O₂-evolution) และการสะสมชีวมวล เช่น แป้งหรือน้ำตาลกลูโคส ระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์นั้นควรที่จะเลี้ยงเซลล์ให้เซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 3 - 6 ล้านเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตรของน้ำเซลล์ (Melis *et al.*, 2002) หรือจนเซลล์เข้าสู่การเจริญเติบโตในช่วงท้ายของระยะ exponential phase โดยพบว่าเซลล์ในระยะนี้จะมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน (stage II) ได้มากกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ในช่วงกลางของระยะ exponential phase (Rashid *et al.*, 2013)

ต่อมาในขั้นการผลิตไฮโดรเจน (stage II) สาหร่ายสีเขียวจะเข้าสู่โหมดของการผลิตไฮโดรเจน โดยระบบการผลิตจะถูกทำให้เข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจน ด้วยการพ่นไนโตรเจนหรือแก๊สเฉื่อย เช่น อาร์กอนลงไป

แม้ว่าการทำให้ระบบการผลิตไฮโดรเจนเข้าสู่สภาวะที่ไร้ออกซิเจนด้วยการพ่นด้วยแก๊สเฉื่อยจะสามารถทำให้สาหร่ายสีเขียวมีการผลิตไฮโดรเจนได้ แต่อย่างไรก็ตาม ภายในระบบยังคงมีออกซิเจนที่เกิดขึ้นใหม่ได้อีกจากการออกซิเดชันของน้ำที่ระบบแสงที่ 2 (PSII) ซึ่งออกซิเจนที่เกิดขึ้นสามารถที่จะไปมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ ส่งผลทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนลดลง ดังนั้นเพื่อให้การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เราจึงจำเป็นต้องยับยั้งระบบแสงที่ 2 (PSII) ไม่ให้ทำงาน เพื่อไม่ให้มีออกซิเจนเกิดขึ้นภายในระบบ โดยจากงานวิจัยต่างๆก็ได้มีการรายงานถึงการยับยั้งระบบแสงที่ 2 (PSII) ด้วยการปรับสภาวะเซลล์สาหร่ายสีเขียวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารหลัก

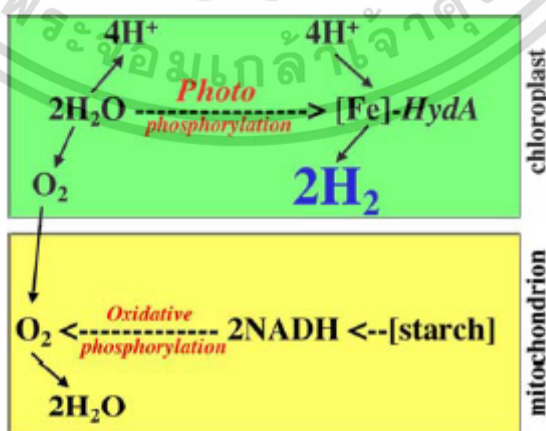
2.5.1 การปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารหลัก

การปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดซัลเฟอร์ (Sulfur-deprivation) การปรับสภาวะเซลล์สาหร่ายสีเขียวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ โดยเฉพาะในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* พบว่า การถ่ายโอนเซลล์ *C. reinhardtii* จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีธาตุซัลเฟอร์สมบูรณ์ ลงสู่อาหารเลี้ยง

เชื้อที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ ระบบจะเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจนเมื่อบ่มเป็นเวลามากกว่า 24 ชั่วโมง และ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะถูกเหนี่ยวนำให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ (Melis *et al.*, 2002)

การที่ระบบเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจน เมื่อปรับสภาวะเซลล์สำหรับสายสีเขียว *C. reinhardtii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ เนื่องจากธาตุซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบสำคัญของกรดอะมิโนซิสเทอีนและเมไทโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (protein biosynthesis) โดยเฉพาะโปรตีน D1 ซึ่งเป็นโปรตีนศูนย์กลาง (reaction center protein) ของระบบการสังเคราะห์แสง อีกทั้งยังมีผลต่อวัฏจักรการซ่อมแซมระบบการสังเคราะห์แสง (PSII repair cycle) (Mckinlay *et al.*, 2010) ส่งผลทำให้ระบบแสง PSII บางส่วนถูกยับยั้ง ทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง (oxygenic photosynthesis) ของสาหร่ายสีเขียวลดลง ในขณะที่อัตราการหายใจของเซลล์ (mitochondrial respiration) ยังเท่าเดิม การที่กิจกรรมของการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดขึ้นน้อยกว่าการหายใจของเซลล์ ก่อให้เกิดความไม่สมดุลของทั้งสองระบบ กล่าวคือปริมาณออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากระบบแสงที่ 2 เกิดขึ้นน้อยกว่าปริมาณออกซิเจนที่ถูกนำไปใช้ในการหายใจด้วยเหตุนี้ ระบบจึงเริ่มเข้าสู่สภาวะที่ไร้ออกซิเจน และเกิดการเหนี่ยวนำเอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้มีการแสดงออกถึงความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน โดยจะผลิตไฮโดรเจนเมื่อสัมผัสกับแสง ซึ่งจะเกิดขึ้นอัตโนมัติ หลังจากที่ระบบเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจนแล้ว แต่อย่างไรก็ตามการยับยั้งระบบแสงที่ 2 จะสามารถทำได้เพียงชั่วคราวเท่านั้น

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวด้วยการปรับสภาวะเซลล์สำหรับในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุซัลเฟอร์นั้น จะมีกระบวนการทางชีวเคมีที่เป็นพื้นฐานสำคัญที่เกี่ยวข้องกันอยู่ 4 วิธี ได้แก่ กระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการแคทาบอลิซึมของชีวมวลภายในเซลล์ กระบวนการหายใจระดับเซลล์ และการถ่ายโอนอิเล็กตรอนผ่านเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จนนำมาสู่การผลิตไฮโดรเจน (Melis *et al.*, 2007) ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ความสัมพันธ์ของการถ่ายโอนอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรีย

ที่มา: Melis *et al.* (2007) ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปรับสภาวะของเซลล์สาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ การเจริญเติบโตของเซลล์จะถูกจำกัดจากการที่ระบบต่างๆถูกยับยั้ง ดังที่ได้กล่าวไปแล้วในข้างต้น การที่เซลล์จะสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นั้น จำเป็นที่จะต้องได้รับพลังงานจากสารพลังงานสูงอย่างเช่น ATP โดยการผลิต ATP จะสามารถเกิดขึ้นได้จากการทำงานของออร์แกเนล 2 ชนิด นั่นคือ คลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรีย (Melis *et al.*, 2007)

ในระหว่างการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว การถ่ายโอนอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหายใจของเซลล์ จะเกิดควบคู่ไปกับกระบวนการฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation) โดยที่ระบบการสังเคราะห์แสง อิเล็กตรอนจะถูกสกัดออกจากโมเลกุลของน้ำ และถูกขับเคลื่อนผ่านตัวรับอิเล็กตรอนตัวต่างๆ และท้ายที่สุดก็จะส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อทำการผลิตไฮโดรเจน กระบวนการถ่ายโอนอิเล็กตรอน (photophosphorylation) นี้จะเกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มไทลาคอยด์ของคลอโรพลาสต์

ส่วนของโมเลกุลของออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง จะถูกขับเคลื่อนไปยังไมโทคอนเดรีย เพื่อใช้ในการหายใจของเซลล์ โดยจะเกิดควบคู่ไปกับการถ่ายโอนอิเล็กตรอน หรือ oxidative phosphorylation ของกระบวนการเผาผลาญของแป้ง โดยจากกระบวนการเผาผลาญแป้งจะมีการปลดปล่อยโมเลกุลของ CO_2 , NADH และ ATP

การปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดฟอสฟอรัส (Phosphorus - deprivation) การปรับสภาวะเซลล์สาหร่ายสีเขียวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุฟอสฟอรัสนั้น ได้มีการศึกษาในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* และ *Chlorella sp.* โดยพบว่า การถ่ายโอนเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีธาตุฟอสฟอรัสสมบูรณ์ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส สำหรับสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ระบบจะเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจน เมื่อบ่มเป็นเวลามากกว่า 100 ชั่วโมง (Batyrova *et al.*, 2012) แต่สำหรับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* ระบบจะเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจน เมื่อบ่มเป็นเวลา 300 ชั่วโมง (Batyrova *et al.*, 2015) หลังจากนั้นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะถูกเหนี่ยวนำให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้

การที่ระบบเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจน เมื่อปรับสภาวะเซลล์สาหร่ายสีเขียวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุฟอสฟอรัสนั้น เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดนิวคลีอิกหรือ DNA โดยเมื่อเซลล์สาหร่ายอยู่ในสภาวะที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส การขาดธาตุฟอสฟอรัสจะไปมีผลทำให้การแบ่งเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวหยุดลง อัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกจำกัด เนื่องจากระดับตัวกลางในวัฏจักรรีดักทีฟเพนโทสเฟสมีระดับที่ลดลง จึงนำไปสู่การลดลงของระดับตัวรับพลังงานตัวสุดท้ายส่งผลให้การถ่ายโอนอิเล็กตรอนของระบบการสังเคราะห์แสง (photosynthetic electron-transport activity) เกิดขึ้นได้น้อยลง (Brooks *et al.*, 1988) นอกจากนั้นแล้ว การที่เซลล์ขาดธาตุฟอสฟอรัสยังส่งผลต่อประสิทธิภาพการเปลี่ยนแสงให้เป็นพลังงานกระตุ้น (quantum efficiency) แก่โปรตีนในระบบแสงเกิดขึ้นได้ต่ำลงส่งผลให้ระบบแสง PSII มีพลังงานกระตุ้นไม่เพียงพอแก่การเกิดออกซิเดชันของน้ำทำให้ระบบการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเกิดขึ้นได้ต่ำลงและบางส่วนของระบบแสงจะถูกยับยั้งในเวลาต่อมา (Wykoff *et al.*, 1998) ดังนั้นในทำนองเดียวกันกับการปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ เมื่อระบบแสงถูกยับยั้ง การบ่มจะเริ่มเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจน ส่งผลทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ แต่อย่างไรก็ตามการยับยั้งระบบแสง PSII ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดฟอสฟอรัสจะเกิดขึ้นได้ช้ากว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ (Batyrova *et al.*, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

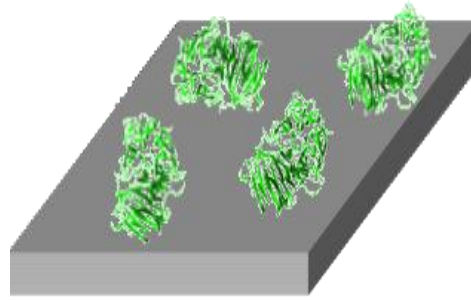
การปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดไนโตรเจน (Nitrogen - deprivation) การปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุไนโตรเจนนั้น ได้มีการศึกษาในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) โดยทำการปรับสภาวะเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุไนโตรเจน พบว่าสาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ด้วยอัตราการผลิตที่สูงกว่าการปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนสมบูรณ์ เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของ DNA และกรดอะมิโนทุกชนิด โดยกรดอะมิโนจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน การแบ่งเซลล์ และวัฏจักรการซ่อมแซมระบบการสังเคราะห์แสง (PSII repair cycle) ดังนั้นเมื่อเซลล์สาหร่ายสีเขียวอยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน กระบวนการต่างๆที่กล่าวมาทั้งหมดจะหยุดลง ส่งผลทำให้บางส่วนของระบบแสงที่ 2 (PSII) ถูกยับยั้ง ปริมาณออกซิเจนในระบบเกิดขึ้นได้น้อยลง และเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีขึ้น (Wykoff *et al.*, 1998)

2.5.2 การตรึงเซลล์ (Immobilization)

สืบเนื่องจากการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวแบบเซลล์อิสระ จะเกิดปัญหาจากการที่ต้องถ่ายโอนเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีธาตุอาหารหลักครบถ้วนใน stage I ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารหลัก ใน stage II โดยการถ่ายโอนเซลล์นั้นจะต้องผ่านขั้นตอนของการปั่นเหวี่ยง ซึ่งจะมีการสูญหายของเซลล์อย่างเลี่ยงไม่ได้ มีความยุ่งยากและเสียเวลา ดังนั้นปัญหาของการผลิตไฮโดรเจนแบบเซลล์อิสระจึงสามารถแก้ไขได้ด้วยการใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ โดยทั่วไปการตรึงเซลล์จุลสาหร่ายนั้น สามารถแบ่งได้หลักๆ 2 แบบ คือ การตรึงเซลล์แบบอยู่นิ่งและการตรึงเซลล์แบบไม่อยู่นิ่ง (Garrido *et al.*, 2008)

2.5.2.1 การตรึงเซลล์แบบอยู่นิ่งหรือ Passive immobilization คือการตรึงเซลล์โดยที่จุลินทรีย์จะยึดเกาะและเจริญเติบโตบนตัวกลาง โดยเซลล์จะถูกตรึงโดยการยึดเกาะอยู่กับที่บนตัวกลาง ซึ่งตัวกลางจะอยู่นิ่งอยู่ตลอดเวลา แบ่งออกได้หลักๆ 2 วิธี คือ

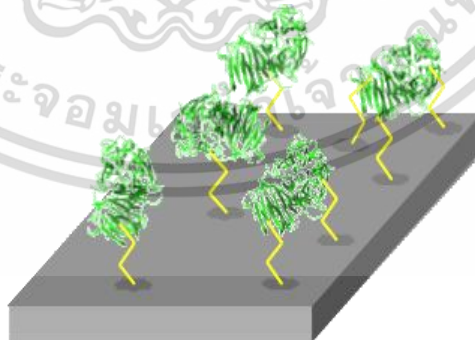
การตรึงเซลล์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ (Adsorption) จุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะในกลุ่มของจุลสาหร่าย จะมีความสามารถในการยึดเกาะบนพื้นผิวของวัสดุ และสามารถเจริญเติบโตบนวัสดุที่ยึดเกาะได้ ซึ่งการยึดเกาะนี้เป็นการยึดจับด้วยแรงทางกายภาพหรือเกาะแบบหลวมๆ (รูปที่ 2.7) ดังนั้นในกรณีที่ใช้ในการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวเพื่อผลิตไฮโดรเจน เซลล์สามารถที่จะหลุดออกจากตัวกลางที่ยึดเกาะได้ (Garrido *et al.*, 2008, Urrutia *et al.*, 1995) ทำให้อาจเกิดการสูญเสียเซลล์ไประหว่างการเปลี่ยนอาหารอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จึงไม่เหมาะที่จะใช้ในการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวเพื่อผลิตไฮโดรเจน



รูปที่ 2.7 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ

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

การตรึงเซลล์โดยพันธะโคเวเลนต์ในการยึดจับ (Covalent binding) กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะเกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะโคเวเลนต์ของวัสดุตรึงกับเซลล์ โดยพันธะโคเวเลนต์จะเกิดขึ้นระหว่างหมู่ฟังก์ชันของสารเคมีของวัสดุที่ใช้ตรึงกับหมู่ฟังก์ชันของโครงสร้างผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ โดยพันธะโคเวเลนต์นี้จะเกิดขึ้นอย่างคงที่และเหมาะสม ส่วนใหญ่แล้วพันธะโคเวเลนต์ที่เกิดขึ้นระหว่างผิวด้านนอกของเซลล์อาจจะเป็นสารประกอบจำพวกโปรตีนหรืออนุพันธ์ของโปรตีน ซึ่งได้แก่ หมู่อามโมเนีย (NH_2) ของกรดอะมิโนไลซีนหรืออาร์จินีน หมู่คาร์บอกซิล (COOH) ของกรดอะมิโนแอสพาทิกหรือกลูตามิก หมู่ไฮดรอกซิล (OH) ของกรดอะมิโนเซอร์รีนหรือทรีโอนีน และหมู่อัลไธดริล (SH) ของกรดอะมิโนซิสเทอีน ส่วนสารที่ใช้เป็นวัสดุตรึงนั้นส่วนใหญ่แล้วจะเป็นสารสังเคราะห์ ซึ่งหลักการเลือกวัสดุตรึงสำหรับใช้ในการตรึงเซลล์ด้วยพันธะโคเวเลนต์นั้นจะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการตรึงเซลล์ ลักษณะของการตรึงเซลล์จะแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 การตรึงเซลล์โดยพันธะโคเวเลนต์ในการยึดจับ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.5.2 การตรึงเซลล์แบบไม่อยู่นิ่ง หรือ Active immobilization คือเทคนิคการตรึงเซลล์ จุลินทรีย์กับตัวกลางที่สามารถที่เคลื่อนที่ได้ ได้แก่ การตรึงเซลล์โดยการเชื่อมโยงกัน (Crosslinking) การตรึงเซลล์ด้วยการยัดจับ (entrapment) และการตรึงเซลล์ด้วยการห่อหุ้มเซลล์ด้วยวัสดุตรึงในรูปแบบ เม็ด (gel encapsulation)

การตรึงเซลล์โดยการเชื่อมโยงกัน (Crosslinking) กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้ วัสดุตรึงจะเป็นอิสระและมีการเชื่อมต่อของเซลล์แต่ละเซลล์กับวัสดุตรึงที่ยึดจับกับเซลล์อีกเซลล์หนึ่ง โดยจะยึดจับกันเป็นโครงร่างขนาดใหญ่ในลักษณะที่เป็นการเชื่อมพันธะไขว้กัน ซึ่งจะมีโครงสร้างเป็นลักษณะ 3 มิติเชิงซ้อน และสามารถที่จะเชื่อมกันได้ทั้งแบบกายภาพและเคมีโดยทฤษฎีทางเคมีนั้น การเชื่อมโยงไขว้จะเชื่อมกันโดยพันธะโคเวเลนต์ระหว่างเซลล์ โดยจะเชื่อมกับสารที่มีหมู่ฟังก์ชัน 2 ตำแหน่งหรือมากกว่า เช่น กลูตารอลดีไฮด์และทูลูอินไดไอโซไซยาเนต แต่สารเหล่านี้มีความเป็นพิษสูงจึงไม่นิยมที่จะนำมาใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์



รูปที่ 2.9 การตรึงเซลล์โดยการเชื่อมโยงกัน (Crosslinking)

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

ส่วนกระบวนการเชื่อมโยงทางกายภาพนั้นจะเชื่อมโยงเซลล์เกิดเป็นโครงร่างที่เกาะกลุ่มกัน จึงเป็นวิธีการที่ดีสำหรับการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ และยังเป็นการเหนี่ยวนำให้เซลล์มีความหนาแน่นสูง ซึ่งการทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่มกัน (flocculation) นั้นจะต้องเติมสารเพื่อให้เกิดการเหนี่ยวนำการจับกลุ่มกันของเซลล์ สารเหล่านั้นได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์ พอลิเอทิลีนอิมิด พอลิสไตรีนซัลโฟเนตและสารฟอสเฟต กระบวนการเชื่อมโยงถือเป็นกระบวนการตรึงเซลล์ เนื่องจากเป็นกระบวนการจำกัดการเคลื่อนที่ของเซลล์และเป็นการเพิ่มความอยู่ตัวของเซลล์

การตรึงเซลล์ด้วยการยัดจับ (entrapment) กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะแตกต่างจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพและการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการตรึงเซลล์โดยวิธีการยัดจับด้วยพันธะโคเวเลนต์ตรงที่เซลล์ที่ถูกตรึงจะไม่มีเคลื่อนที่แต่มีความอิสระจากสารละลายภายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ผ่านการอนุมัติจากเจ้าของลิขสิทธิ์

โครงสร้างลักษณะตาข่ายเจล ซึ่งช่องว่างของร่างตาข่ายที่เกิดขึ้นจะถูกควบคุมโครงสร้างของเจลที่ยึดจับเซลล์อย่างแน่นเพื่อป้องกันการรั่วหลุดของเซลล์ที่ถูกตรึงและรูตาข่ายที่เกิดขึ้นจะยังช่วยให้อาหารและผลิตภัณฑ์เคลื่อนที่เข้าออกจากเซลล์ได้อย่างอิสระ ส่วนตัววัสดุที่เราใช้ตรึงนั้นสามารถที่จะทำปฏิกิริยากับสารที่เคลื่อนที่ไปมาระหว่างเซลล์ซึ่งบางที่อาจจะมีผลอย่างมากต่อกลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์หรือบางทีสถานะเช่นนี้ก็อาจจะเป็นผลดีต่อเซลล์ที่ถูกตรึง เนื่องจากวัสดุที่ตรึงสามารถที่จะป้องกันสารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ สำหรับวิธีการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้นั้นจะมีขั้นตอนและทฤษฎีการตรึงเซลล์แตกต่างกันขึ้นกับวัสดุที่ใช้ในการตรึงเช่น อัลจิเนต การก่อตัวเป็นเจลจะเกิดขึ้นโดยการทำปฏิกิริยากันระหว่างประจุบวกของสารละลายที่ใช้ในการขึ้นรูปและประจุลบของโซเดียมอัลจิเนต อะกาโรสและเจลาตินจะใช้อุณหภูมิในการขึ้นรูปและเหนียวน้ำทำให้เกิดเจลและเมื่อเย็นตัวลงก็จะสามารถขึ้นรูปเป็นเม็ดเจลได้ หรือพอลิอะคริลาไมด์ จะขึ้นรูปเป็นเจลได้โดยการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของสารอินทรีย์หรือปฏิกิริยาโฟโตเคมีคอล

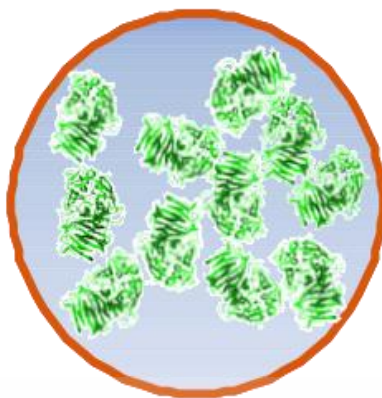


รูปที่ 2.10 การตรึงเซลล์ด้วยการยึดจับ (entrapment)

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

การตรึงเซลล์ด้วยการห่อหุ้มเซลล์ด้วยวัสดุตรึงในรูปเม็ด (gel encapsulation) กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้สามารถทำได้โดยการห่อหุ้มเซลล์ในวัสดุตรึงที่มีลักษณะเป็นเยื่อเลือกผ่านคล้ายๆกับการตรึงเซลล์ด้วยการยึดจับ (entrapment) แต่จะแตกต่างกันตรงที่เซลล์ที่ตรึงโดยวิธีนี้จะไม่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่ ซึ่งการที่เซลล์ถูกตรึงในลักษณะเม็ดยังจะทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านแผ่นเยื่อเลือกผ่านของวัสดุตรึงได้ ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กนั้นสามารถที่จะเคลื่อนที่เข้าออกจากเม็ดเซลล์ได้อย่างอิสระดังแสดงในรูปที่ 2.11 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่มีการใช้อย่างแพร่หลายและนิยมมากที่สุดคือ ซึ่งจัดเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์สำหรับเลี้ยงเพื่อการผลิตไฮโดรเจน โดยตัวกลางที่ใช้ในการตรึงสามารถเป็นได้ทั้งวัสดุสังเคราะห์ หรือพอลิเมอร์ธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 การตรึงเซลล์ด้วยการห่อหุ้มเซลล์ด้วยวัสดุตรึงในรูปแบบเม็ด (gel encapsulation)

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

วัสดุสังเคราะห์ที่ถูกนำมาใช้ในการตรึงเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวในการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ ซิลิกา (Hahn *et al.*, 2007) และอะลูมินัม โบโลซิลิเกต (Laurinavichene *et al.*, 2006) ซึ่งใช้ในการตรึงเซลล์ *C. reinhardtii* จากผลการวิจัยพบว่าเมื่อวัดการเจริญเติบโตของ *C. reinhardtii* ในระบบเซลล์อิสระเทียบกับระบบการตรึงเซลล์ด้วยซิลิกา พบว่าการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในระบบเซลล์อิสระและระบบการตรึงเซลล์มีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกัน หรือกล่าวคือการตรึงเซลล์ด้วยซิลิกาไม่ได้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของ *C. reinhardtii* ในขณะที่การตรึงเซลล์ด้วยการใช้อะลูมินัม โบโลซิลิเกต จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนมีอัตราการผลิตที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับระบบเซลล์อิสระ นอกจากนี้แล้วการตรึงเซลล์ด้วยอะลูมินัม โบโลซิลิเกตยังช่วยขยายระยะเวลาในการผลิตไฮโดรเจนให้ยาวนานมากยิ่งขึ้นถึง 4 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามอะลูมินัม โบโลซิลิเกตนั้นมีราคาแพงจึงส่งผลต่อต้นทุนในการผลิตที่สูง หากทำการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงนำมาสู่การหาวัสดุตรึงชนิดใหม่ที่มีราคาไม่แพง หาง่าย และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

การใช้พอลิเมอร์ธรรมชาติในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ เป็นเทคนิคที่ถูกใช้อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะจุลินทรีย์ในกลุ่มจุลสาหร่าย โดยพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มักถูกใช้ในการตรึงเซลล์ ได้แก่ คาราจีแนน อะการ์ และอัลจิเนต (Garrido *et al.*, 2008)

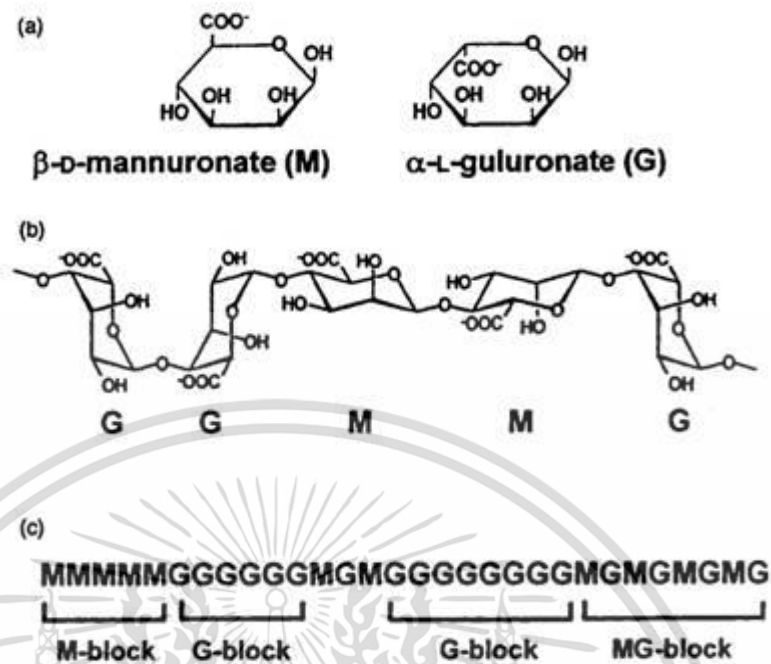
คาราจีแนน (Carrageenan) เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง เช่น สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) มีคุณสมบัติในการดูดน้ำและแขวนลอยในน้ำ คาราจีแนน จะเกิดเปลี่ยนรูปเป็นเจล เมื่อสัมผัสกับสารประกอบไอออนบวก เช่น ไอออนโลหะ เอมีน อนุพันธ์ของกรดอะมิโน และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผสมกับน้ำได้ ได้มีการใช้ แคปปา-คาราจีแนนในการตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยทำให้เป็นเจลด้วยการใช้อะลูมิเนียม ไนเตรต ($Al(NO_3)_3$) พบว่ายีสต์ที่ตรึงเซลล์แล้วสามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นจากเดิม 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการใช้ออกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคปป์-คาราจีแนน ในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย และจุลสาหร่าย 3 สามสายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri* และ *Scenedesmus quadricauda* และทำให้เป็นเจลด้วย 0.3 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ แต่อย่างไรก็ตาม ความคงทนของ แคปป์-คาราจีแนนจะน้อยกว่า แคลเซียมอัลจิเนต โดยหลังจากเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ บางส่วนของเม็ดบีดของเซลล์ที่ตรึงด้วยคาราจีแนนจะถูกทำลาย ดังนั้นแคลเซียมอัลจิเนตจึงมักจะถูกเลือกใช้ในการตรึงเซลล์แทนการใช้คาราจีแนน

อะการ์ (Agar) เป็นสารที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีแดง อะการ์สามารถเกิดเจลได้โดยไม่ต้องอาศัยสารอื่นๆช่วยในการเกิดเจล โดยเจลที่ได้จะมีสมบัติเป็น thermo-reversible gel โดยทั่วไป อุณหภูมิเกิดเจลประมาณ 35 - 40 องศาเซลเซียส มีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 85 - 90 องศาเซลเซียส อะการ์จัดเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่เหมาะสมจะใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ โดยมีการใช้อะการ์ในการตรึงเซลล์จุลสาหร่าย *M. aeruginosa* (Rashid et al., 2012), *L. perlelegans* (Anjana et al., 2014) และ *Chlorella* sp. (Song et al., 2011) เพื่อใช้ในการผลิตไฮโดรเจน พบว่าการตรึงเซลล์ด้วยอะการ์ เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ปกติ ผลิตไฮโดรเจนได้ดี และยังสามารถช่วยขยายระยะเวลาการผลิตไฮโดรเจนให้ยาวนานมากยิ่งขึ้นด้วย (Garrido et al., 2008) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบอัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ *L. perlelegans* ที่ถูกตรึงด้วยอะการ์และอัลจิเนต พบว่า การตรึงเซลล์ *L. perlelegans* ด้วยการใช้อะการ์จะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนต (Anjana et al., 2014)

อัลจิเนต (Alginate) เป็นสารที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (Phaeophyceae) มีโครงสร้างเป็น unbranched binary copolymer ของ 1, 4-b-D-manuronic acid (M) และ L-guluronic acid (G) ในโมเลกุลประกอบด้วย homopolymeric regions ของ G และ M ที่เรียกว่า G - และ M - blocks ตามลำดับ และยังมีบางส่วนของโมเลกุลเป็น MG - blocks ดังรูปที่ 2.12

สัดส่วนของ copolymer และโครงสร้างเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดสมบัติของอัลจิเนต เช่น ถ้าพอลิเมอร์มี G ในปริมาณที่สูงจะมีสมบัติเป็นเจลที่แข็งที่ความเข้มข้นของโลหะประจุบวกเฉพาะ (polyvalent metal cation) แต่ถ้าพอลิเมอร์มี M ปริมาณสูงจะมีแนวโน้มที่จะเกิดเจลที่อ่อนนุ่มและมีสถานะในการเกิดเจลที่กว้างกว่า อัลจิเนตเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีชีวิตมากที่สุด ข้อได้เปรียบหลักๆของการใช้อัลจิเนตในการตรึงเซลล์คือ ความสามารถในการซึมผ่าน โปร่งแสง คงทน อ่อนโยน และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ อัลจิเนตที่ผลิตจำหน่ายทางการค้ามีหลายอนุพันธ์จึงมีสมบัติการละลายในน้ำที่แตกต่างกัน เช่น อนุพันธ์ของเกลือ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}), โพแทสเซียมไอออน (K^+), โซเดียมไอออน (Na^+), แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) และยังสามารถผลิตในรูปแบบของ propylene glycol alginate ซึ่งได้จากปฏิกิริยาของ alginic acid กับ propylene oxide ภายใต้ความดัน

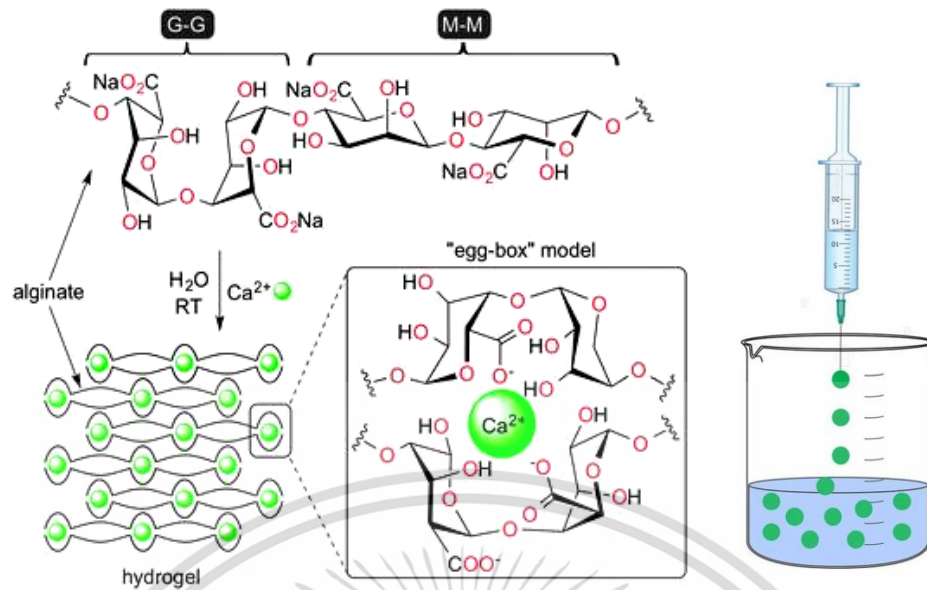


รูปที่ 2.12 โครงสร้างของอัลจินตชนิดต่างๆ
ที่มา: Phillips and Williams (2000)

อนุพันธ์เหล่านี้จะละลายได้ทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น ความหนืดของสารละลายอัลจินตที่ได้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความเข้มข้น น้ำหนักโมเลกุล และการมีโลหะประจุบวก อัลจินตโมโนชนิดมีคุณสมบัติเป็นเจลและจะเกิดเจลได้เมื่อทำปฏิกิริยากับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) โครงสร้างของเจลมีลักษณะคล้ายกล่องไข่ (egg box) โดยมี Ca^{2+} เกาะอยู่กับสายพอลิเมอร์ ดังรูปที่ 2.13 คุณสมบัติที่ดีของอัลจินตคือ ทำให้เกิด Irreversible gel ในน้ำเย็นเมื่อมี Ca^{2+} รวมอยู่ด้วย แต่ถ้าหากนำไปละลายในโซเดียมอะซิเตต โซเดียมอีดีทีเอ หรือ เฮกซะเมตาฟอสเฟต ไอออน Ca^{2+} สามารถที่จะถูกแยกออกและถูกแทนที่ด้วยแอนไอออนที่ละลายอยู่ได้

จากที่กล่าวมาทั้งหมด ถือได้ว่าอัลจินตจัดเป็นวัสดุที่เหมาะสมที่จะใช้ในการตรึงเซลล์อย่างมาก ซึ่งได้มีการใช้ในการตรึงเซลล์อย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็น การนำ *Tetraselmis suecica* มาทำการตรึงเซลล์ในเม็ดแคลเซียมอัลจินต เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตกับเซลล์อิสระด้วยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อเซลล์ที่สูงกว่าเซลล์อิสระ และยังมีการนำเอาสาหร่ายทะเล 11 สายพันธุ์มาตรึงในเม็ดแคลเซียมอัลจินตเพื่อดูถึงการเจริญเติบโต พบว่าสาหร่ายทั้ง 11 สายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ปกติ โดยเม็ดแคลเซียมอัลจินตจะมีความเสถียร โดยจะอยู่ในระบบได้นานถึง 17 วัน นอกจากนั้นแล้วยังมีการใช้แคลเซียมอัลจินตในการตรึง DNA ด้วยการใช้เทคนิค encapsulation ในน้ำมันคาโนลา (Garrido *et al.*, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.13 กลไกการเกิดเจลของแคลเซียมอัลจิเนตและวิธีการตรึงเซลล์ด้วยการหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนต

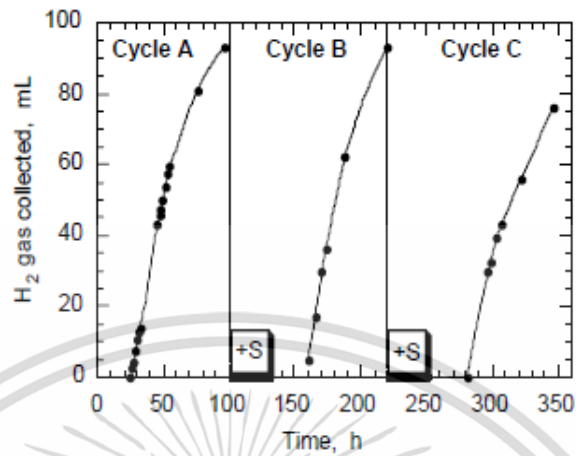
สำหรับการตรึงเซลล์จุลสาหร่ายด้วยการหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตเพื่อผลิตไฮโดรเจนนั้น ได้มีการทำการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* (Kosourov *et al.*, 2009) และไซยาโนแบคทีเรีย *L. perelegans* (Anjana *et al.*, 2014) พบว่า การตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตสามารถช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและขยายระยะเวลาในการผลิตไฮโดรเจนให้ยาวนานขึ้น นอกจากนี้แล้วยังช่วยให้สาหร่ายสีเขียวผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตราคงที่ ช่วยลดการสูญเสียเซลล์ไปในขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารใหม่ และสามารถเปลี่ยนอาหารได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ทำให้สะดวกและประหยัดเวลามากยิ่งขึ้น (Laurinavichene *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2011)

โดยทั่วไปการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตจะทำได้โดยการผสมเซลล์ที่จะตรึงลงไป ในสารละลายอัลจิเนต แล้วทำการหยดผ่านกระบอกฉีดยา โดยหยดลงไปในสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.13 การที่เซลล์สาหร่ายสีเขียวถูกหุ้มด้วยเจลอัลจิเนตนั้น จะสามารถช่วยลดอัตราการแพร่และจำกัดปริมาณของแก๊สออกซิเจนในอากาศไปสู่เซลล์ได้ (Kosourov *et al.*, 2009) เป็นผลทำให้ช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวได้

2.5.3 การนำเซลล์ที่ผลิตไฮโดรเจนแล้วกลับมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่

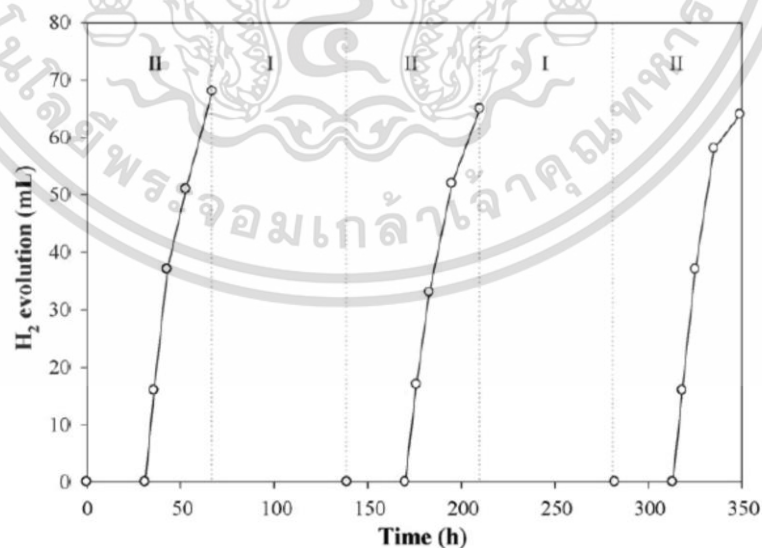
การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจะเกิดขึ้นได้ยาวนานแค่ช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น เช่น สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* จะสามารถที่จะผลิตไฮโดรเจนได้ยาวนานที่สุดคือ 100 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็หยุดผลิตไฮโดรเจน ได้มีผลการวิจัยรายงานถึงความสามารถของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวว่าสามารถที่จะผลิตไฮโดรเจนเป็นวัฏจักรเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณการผลิตไฮโดรเจนจากการใช้เซลล์เดิม ดังรูปที่ 2.14 การผลิตไฮโดรเจนแบบเป็นวัฏจักรของสาหร่ายสีเขียวสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนโหมมระหว่าง stage I และ stage II จากการมีซิลเฟอร์และไม่มีซิลเฟอร์ในระบบตามลำดับ โดยสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สามารถที่จะผลิตไฮโดรเจนเป็นวัฏจักรได้สูงสุด 3 รอบได้แก่ วัฏจักร A B และ C โดยที่เวลา 100 ชั่วโมงของวัฏจักร A และที่เวลา 160 ชั่วโมงของวัฏจักร B การผลิตไฮโดรเจนจะยุติลง ดังนั้นเซลล์จะถูกถ่ายโอนจากอาหารที่ไม่มีซิลเฟอร์ ไปยังอาหารที่มีซิลเฟอร์ หรือเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั่นคือเซลล์จะเข้าสู่ stage I เป็นผลให้ที่เวลา 100 ถึง 130 ชั่วโมง และที่ 160 ถึง 220 ชั่วโมง ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น (Melis *et al.*, 2007)



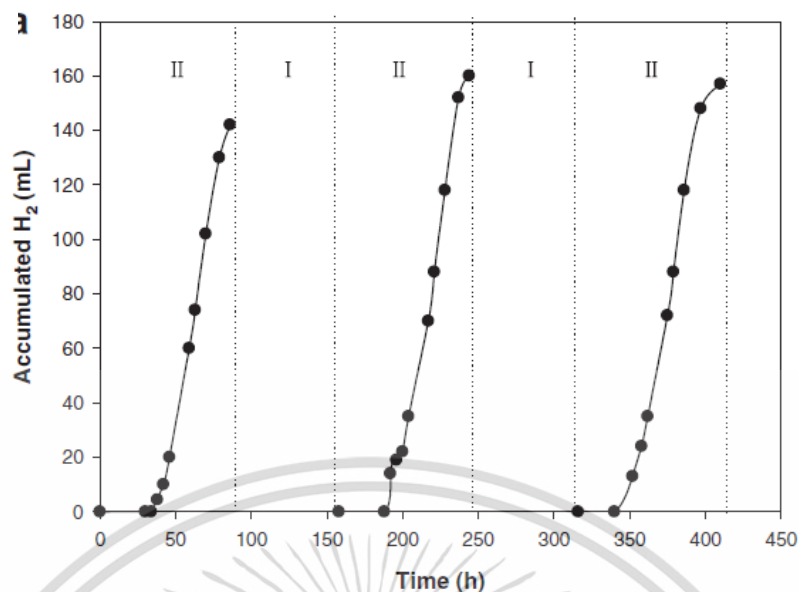
รูปที่ 2.14 วัฏจักรของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii*
ที่มา: Ghiradi *et al.* (2000)

นอกจากสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* แล้วนั้น สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* sp. และไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* (Rashid *et al.*, 2012) ก็มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนเป็นวัฏจักรได้ด้วยเช่นกัน โดยพบว่าใน *M. aeruginosa* ที่ผ่านการตรึงเซลล์ด้วยอะการ์และหยุดผลิตไฮโดรเจนแล้ว สามารถที่จะผลิตไฮโดรเจนเป็นวัฏจักรได้มากกว่า 10 รอบ ดังแสดงในรูปที่ 2.15 ส่วนสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. นั้น เซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนเป็นวัฏจักรได้สูงสุดถึง 6 รอบ ดังแสดงในรูป 2.16



รูปที่ 2.15 วัฏจักรของการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* ที่ถูกตรึง
ที่มา: Rashid *et al.* (2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.16 วัฏจักรของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ที่ถูกตรึง
ที่มา: Song *et al.* (2011)

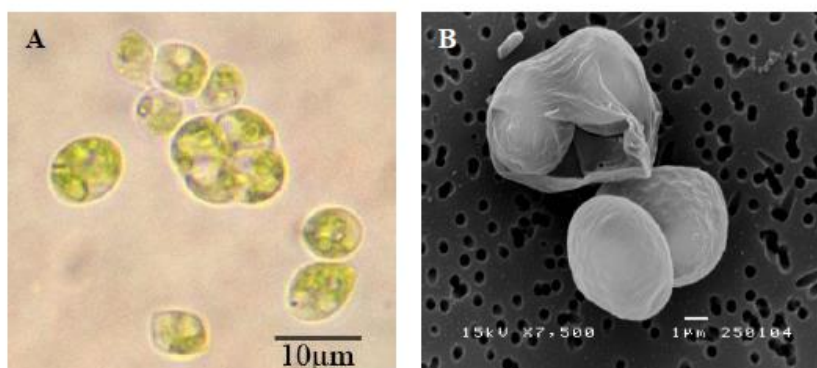
2.6 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ได้ถูกพบโดยเชิดศักดิ์และคณะ (2554) จากการคัดแยกจากแหล่งน้ำจืดในธรรมชาติและจากนาข้าวในจังหวัดปทุมธานี ซึ่งเป็นพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย โดยเมื่อจัดจำแนกสาหร่ายตามหลักอนุกรมวิธานพบว่า *Tetraspora* sp. CU2551 จัดอยู่ในไฟลัมคลอโรไฟตา (Chlorophyta) โดยอนุกรมวิธานของ *Tetraspora* sp. CU2551 สามารถแสดงได้ดังนี้

Domain Eukaryota
Kingdom Viridiplantae
Phylum Chlorophyta
Class Chlorophyceae
Order Tetrasporales
Family Tetrasporaceae
Genus *Tetraspora*

ผลจากการศึกษาสัณฐานของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า เซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 มักจะอยู่เป็นกลุ่ม ตั้งแต่ 2-4 เซลล์ แต่ส่วนใหญ่มักจะพบว่ามี 4 เซลล์ โดยเซลล์จะถูกบรรจุอยู่ในถุงใสหรือ sheath เซลล์จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6.74 ± 0.92 ไมครอน ดังแสดงในรูปที่ 2.17 และผลยืนยันจากการหาลำดับเบสดีเอ็นเอ 18S rRNA พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



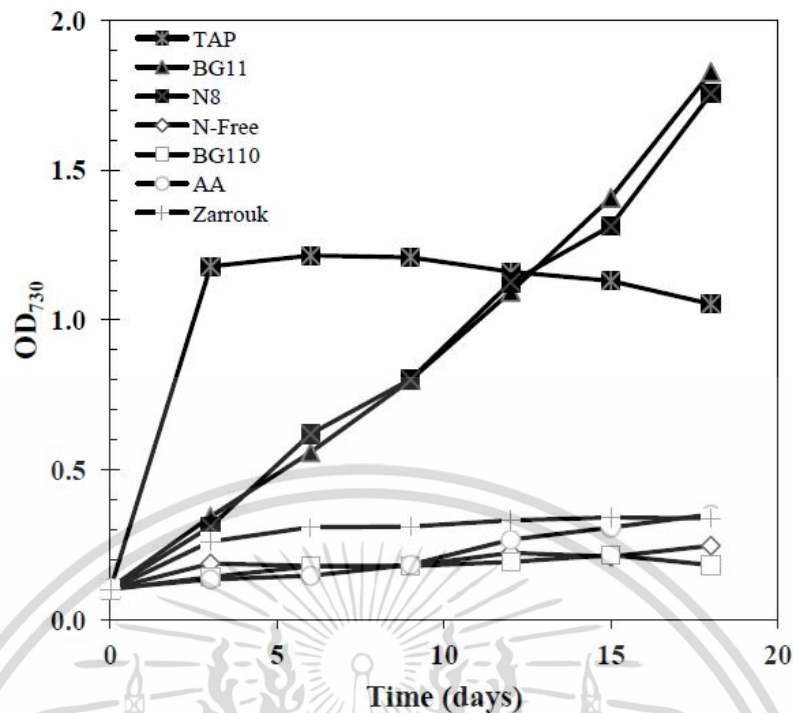
รูปที่ 2.17 ลักษณะสัณฐานของเซลล์ *Tetraspora* sp. CU2551 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (A) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (B)

ที่มา: เชิดศักดิ์และคณะ (2554)

ในแง่ของสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต เชิดศักดิ์และคณะ (2554) ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และความเข้มแสงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต

การหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด N-free, BG11, BG110, N8, TAP (tris-acetate-phosphate), AA และ Zarrouk

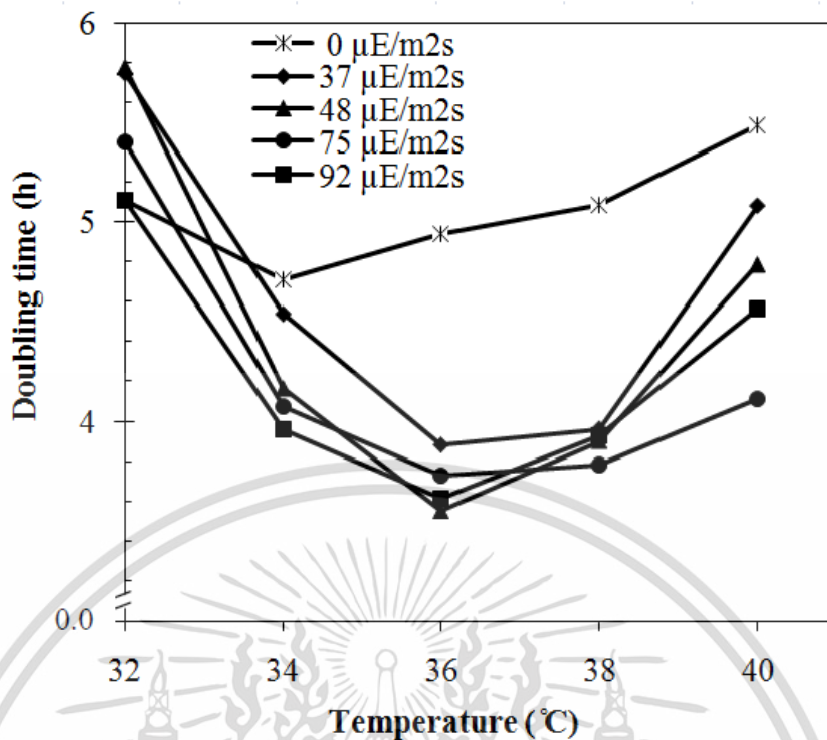
จากรูปที่ 2.18 จะเห็นว่า สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 จะใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า และจะใช้เวลาสั้นที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate หรืออาหาร TAP โดยจะใช้เวลาในการเจริญเติบโตสูงที่สุดเพียง 3 วัน ในขณะที่อัตราการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ N-free, BG110, AA และ Zarrouk จะเกิดขึ้นได้ช้ามาก ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BG11 และ N8 จะมีการเจริญเติบโตที่คล้ายกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP โดยการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 และ N8 ที่เวลา 12 วัน จะใช้เวลาในการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP เพียง 3 วันเท่านั้น ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP จึงเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551



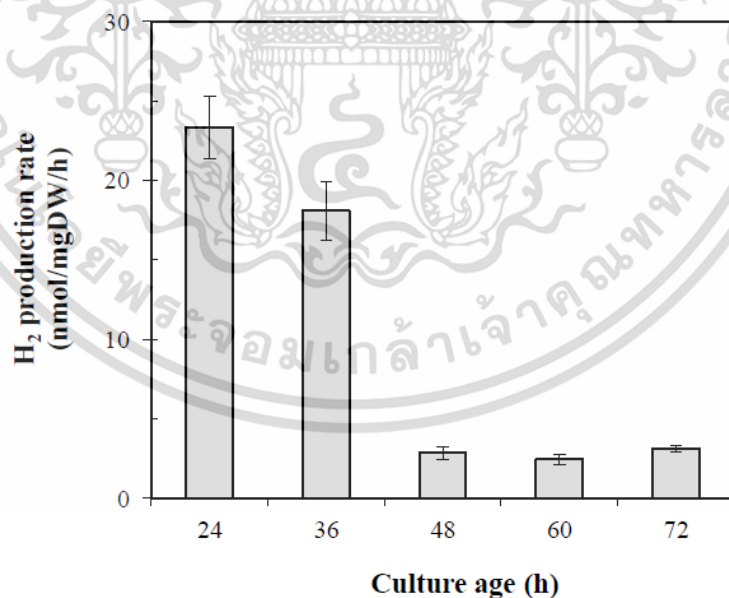
รูปที่ 2.18 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 7 ชนิด ที่มา: เชิดศักดิ์และคณะ (2554)

อุณหภูมิและความเข้มแสง ผู้วิจัยได้ทำการแปรผันค่าความเข้มแสงที่ 0-92 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที และอุณหภูมิในช่วง 32 - 40 องศาเซลเซียส ทำการเทียบกับการเจริญเติบโตของเซลล์โดยคำนวณเป็นค่า doubling time หรือเวลาที่เซลล์ใช้ในการเจริญเติบโตเป็นสองเท่า ซึ่งถ้าค่า doubling time มีค่าน้อยๆ แสดงว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตที่สูง ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 จะมีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดในอุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสภายใต้ความเข้มแสงช่วง 37-92 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ดังแสดงในรูปที่ 2.19 นอกจากนี้จากสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตแล้วนั้น ผู้วิจัยก็ได้ทำการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายด้วยเช่นกัน โดยปัจจัยที่ทำการศึกษานั้น ได้แก่ อายุเซลล์ อุณหภูมิ ความเข้มแสง และการปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารหลัก

อายุเซลล์ ผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกันทุกๆ 12 ชั่วโมง โดยเริ่มจาก 24 ชั่วโมง ถึง 72 ชั่วโมง จากนั้นก็นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่มีอายุเซลล์ที่แตกต่างกันไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน เพื่อศึกษาผลของอายุเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่มีต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีอายุเซลล์ 24 ชั่วโมงจะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงที่สุด และเซลล์ที่มีอายุมากกว่า 24 ชั่วโมงจะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ลดลง โดยอัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ที่มีอายุ 48-72 ชั่วโมงจะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.20



รูปที่ 2.19 เวลาที่เซลล์ *Tetraspora* sp. CU2551 ใช้ในการเจริญเติบโตเป็นสองเท่า (doubling time) ที่อุณหภูมิและความเข้มแสงค่าต่างๆ
ที่มา: เชิดศักดิ์และคณะ (2554)

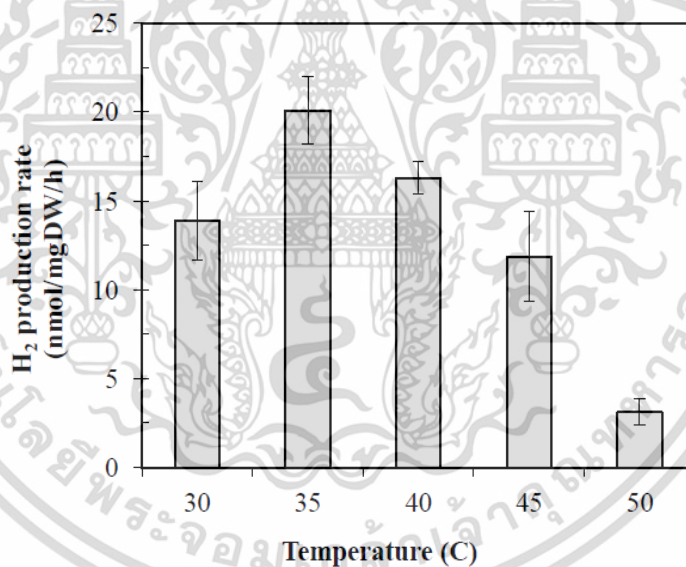


รูปที่ 2.20 ผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551
ที่มา: เชิดศักดิ์และคณะ (2554)

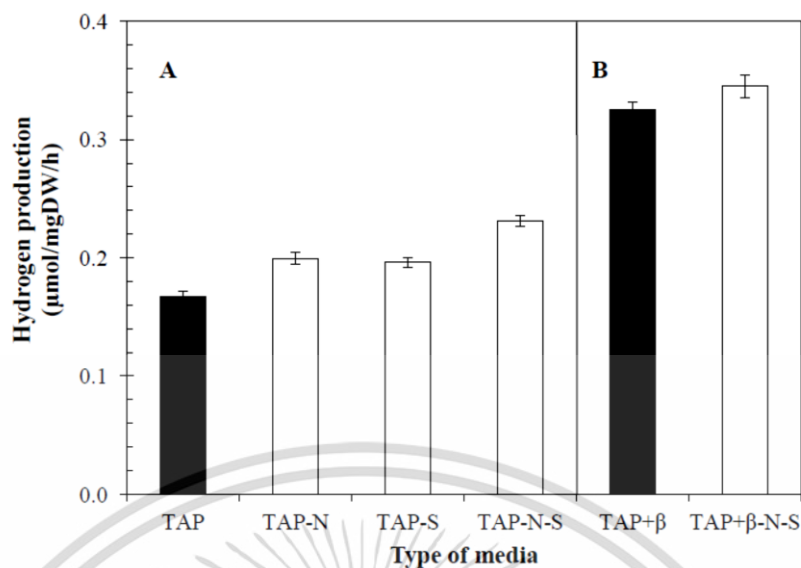
อุณหภูมิจัดทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน โดยจะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษามา นั่นคือ จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์อาหารเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเชื้อ TAP ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 37 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตร ต่อวินาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนโดยการนำขวด gas-tight vial ไปป้อนในตู้ป้อนที่มีการแปรผันอุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30-50 องศาเซลเซียส โดยจากรูปที่ 2.21 แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

การปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารหลัก ผู้วิจัยจะทำการศึกษผลของการขาดธาตุอาหารหลักต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน โดยจะเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP และเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็จะปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารหลัก โดยจะถ่ายโอนเซลล์ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารหลักต่างๆ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ (TAP-S) อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) และ อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์และไนโตรเจน (TAP-N-S) จากนั้นก็นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 2.22 โดยการปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดไนโตรเจนหรือซัลเฟอร์เพียงอย่างเดียว จะช่วยเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนให้สูงขึ้น 1.2 เท่า และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ จะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตไฮโดรเจนให้สูงขึ้น 1.5 เท่าเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีธาตุอาหารหลักครบถ้วน



รูปที่ 2.21 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551
ที่มา: เชิดศักดิ์และคณะ (2554)

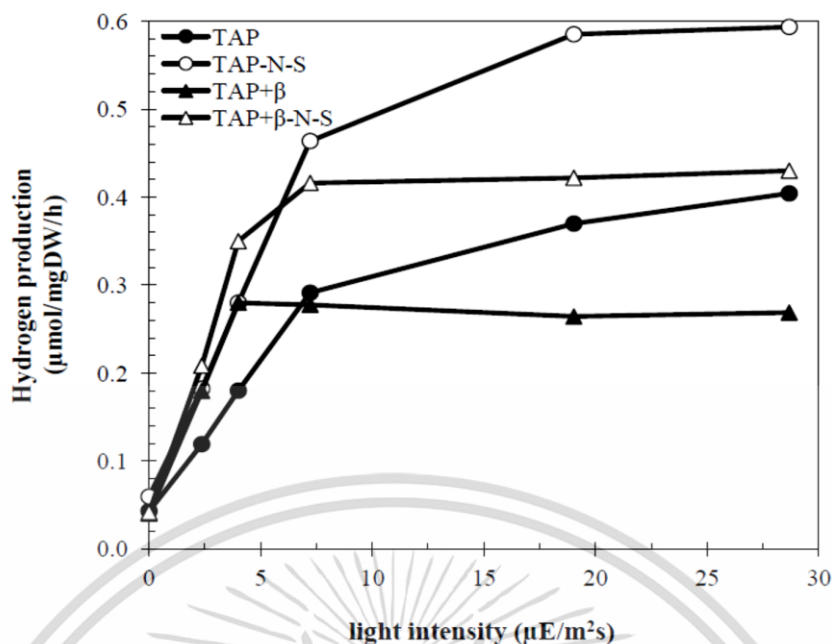


รูปที่ 2.22 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารหลักชนิดต่างๆ (A) อัตราการผลิตไฮโดรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีการเติมสารเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล (β -mercaptoethanol) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (B) ที่มา: เชิดศักดิ์และคณะ (2554)

นอกจากนั้นแล้วผู้วิจัยยังศึกษาผลของการเติมสารเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล (β -mercaptoethanol) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 2.16B) เมื่อพิจารณาที่คอลัมน์ของแผนภูมิรูปแท่งแบบทึบ จะเห็นว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในอาหาร TAP ที่มีการเติมเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล หรือ TAP+ β จะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ไม่ได้เติมสารเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล อย่างเห็นได้ชัด โดยสารเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล เป็นสารที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนหรือเป็น reducing agent ซึ่งพบว่าสามารถที่จะช่วยเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวให้อัตราการผลิตที่สูงขึ้น ดังผลการทดลองที่กล่าวไปข้างต้น และเมื่อนำเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP+ β อายุเซลล์ 24 ชั่วโมงมาถ่ายโอนเซลล์สำหรับลงสู่อาหารที่ขาดธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ หรือ TAP+ β -N-S ผลการทดลองพบว่า สารเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล จะไม่แสดงความสามารถของการเป็น reducing agent ในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว เมื่อเซลล์ถูกปรับสภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดไนโตรเจนและซัลเฟอร์

ความเข้มแสง จากการศึกษาผลการปรับสภาพเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารหลักที่ได้กล่าวไปในข้างต้น จะเห็นว่า การเติมสารให้อิเล็กตรอนอย่างเช่นสารเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล จะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงเทียบเท่ากับการปรับสภาพเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการอัตราการผลิตไฮโดรเจน โดยจะทำการปรับสภาพเซลล์สาหร่ายสีเขียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP และ TAP-N-S ที่ไม่มีการเติมเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP และ TAP-N-S ที่เติม เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล โดยจะทำการแปรผันความเข้มแสงขณะบ่มเป็นค่าต่างๆตั้งแต่ 0-29 ไมโครโวนส์ไต้นต่อตารางเมตรต่อวินาที ดังแสดงในรูปที่ 2.23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.23 ผลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่มา: เซดคักดีและคณะ (2554)

เมื่อพิจารณารูปที่ 2.23 แสดงให้เห็นว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP และ TAP-N-S ที่มีการเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล อัตราการผลิตไฮโดรเจนจะดีที่สุดในช่วงความเข้มแสงต่ำหรือ 0 - 6 ไมโครไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที ส่วนในอาหาร TAP และ TAP-N-S ที่ไม่มีการเติมเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล อัตราการผลิตไฮโดรเจนจะสูงที่สุดในช่วงที่ความเข้มแสงสูงๆ หรือ มากกว่า 6 ไมโครไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาทีขึ้นไป หรือนั่นคือ ความเข้มแสงที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาวะเซลล์ในอาหารที่ขาดธาตุอาหารหลักคือประมาณ 20 ไมโครไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที

จากผลการวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้น สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของ *Tetraspora* sp. CU2551 ได้โดยแสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

สภาวะที่เหมาะสม	อาหาร	อายุเซลล์ (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเข้มแสง (ไมโครไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที)
การเจริญเติบโต	TAP	24 ชั่วโมง	36	48 - 92
การผลิตไฮโดรเจน	TAP-N-S		35	20 (หรือ 1500 ลักซ์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Guan และคณะ (2004) ได้ทำการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *P. subcordiformis* ผ่านกระบวนการแบบ 2 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนที่สองของการผลิตไฮโดรเจนจะทำการบ่มในอาหารที่ขาดธาตุซัลเฟอร์และบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พบว่าสาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น 13 เท่าเมื่อเทียบกับอาหารปกติที่ไม่ขาดธาตุซัลเฟอร์

Tsygankov และคณะ (2006) ก็ได้ทำการผลิตไฮโดรเจนด้วยสาหร่ายสีเขียวในอาหารที่ขาดธาตุซัลเฟอร์เช่นกัน โดยใช้สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *C. reinhardtii* พบว่า เมื่อทำการบ่ม ในสภาวะที่อาหารขาดอะซีเตตหรือสารประกอบอินทรีย์ ภายใต้สภาวะที่มี CO₂ 2 เปอร์เซ็นต์ และมีความเข้มแสงต่ำ (25 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที) สาหร่ายสีเขียวจะผลิตไฮโดรเจนได้ 56.4×10^{-3} ลูกบาศก์เมตรต่อลูกบาศก์เมตรของเชื้อ (m³/m³culture) เนื่องจากออกซิเจนที่เกิดขึ้นจะถูกใช้ไปส่งผลทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนขึ้น และเมื่อทำการเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดซัลเฟอร์ และเพิ่มความเข้มแสงเป็น 110 - 120 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่ามีการผลิตออกซิเจนจะสูงขึ้น ส่งผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง

Laurinavichene และคณะ (2006) ก็ได้ทำการพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *C. reinhardtii* โดยนำเซลล์มาทำการตรึงเซลล์ด้วยอะลูมิเนียมโบโรซิลิเกต (Aluminium-borosilicate glass) และปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ ผลการทดลองพบว่า *C. reinhardtii* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ 380 มิลลิลิตร และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ 45 มิลลิลิตรต่อวัน โดยการตรึงเซลล์นอกจากจะช่วยเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *C. reinhardtii* แล้วนั้น ยังช่วยขยายระยะเวลาในการผลิตไฮโดรเจนให้สามารถผลิตได้ยาวนานขึ้นถึง 4 สัปดาห์ แต่อย่างไรก็ตามอะลูมิเนียมโบโรซิลิเกตนั้นมีราคาแพง หากทำการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้นจะไม่เหมาะสำหรับการตรึงเซลล์เนื่องจากต้องใช้ต้นทุนการผลิตสูง

Hahn และคณะ (2007) ก็ได้ทำการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *C. reinhardtii* ด้วยซิลิกา (fumed silica particles) ซึ่งเป็นวัสดุตรึงที่มีราคาถูกเมื่อเทียบกับวัสดุที่ทำจากแก้ว (glass matrix) ผลการวิจัยพบว่า เซลล์ที่ตรึงด้วยซิลิกาสามารถที่จะเจริญเติบโตได้ปกติเช่นเดียวกับเซลล์อิสระ ส่วนผลของการผลิตไฮโดรเจนนั้นพบว่า เซลล์ที่ตรึงด้วยซิลิกาจะผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตราและปริมาณการผลิตใกล้เคียงกับเซลล์อิสระ

Kosourov และคณะ (2009) ได้ทำการตรึงสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *C. reinhardtii* ด้วยฟิล์มแคลเซียมอัลจิเนต (Ca-alginate film) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม หาง่าย และมีราคาถูก โดยผู้วิจัยทำการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยใช้ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นตัดแผ่นฟิล์มให้เป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 1 เซนติเมตร x 6 เซนติเมตร พบว่าการตรึงเซลล์จะช่วยขยายระยะเวลาในการผลิตไฮโดรเจนให้ยาวนานขึ้นถึง 150 ชั่วโมง และยังช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน การตรึงเซลล์ด้วยฟิล์มแคลเซียมอัลจิเนต จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วยแยกและจำกัดออกซิเจนที่จะแพร่ผ่านวัสดุเข้ามาสู่เซลล์ จึงส่งผลทำให้สามารถป้องกันเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจากการสัมผัสกับออกซิเจนที่อยู่ในเฟสของเหลวและส่วนที่เหนือของเหลวหรือ headspace ได้

Rashid และคณะ (2009) ได้ทำการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *M. aeruginosa* ด้วยอะการ์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นทำการตัดให้เป็นทรงลูกบาศก์ขนาด 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำเซลล์ที่ตรึงไปผลิตไฮโดรเจนโดยผ่านกระบวนการแบบ 2 ขั้นตอน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การตรึงเซลล์ด้วยอะการ์ สามารถช่วยควบคุมการผลิตไฮโดรเจนให้คงที่ และช่วยทำให้การเปลี่ยนสภาวะการบ่มจาก stage I ไป stage II เพื่อถ่ายโอนเซลล์ไปยังอาหารที่ขาดธาตุซัลเฟอร์เป็นไปได้โดยง่าย ประหยัดเวลาและสะดวกมากยิ่งขึ้น โดยเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* ที่ตรึงแล้วจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ 48 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อลิตร

Maneeruttanarungroj และคณะ (2010) ได้ทำการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวจากบ่อน้ำที่จังหวัดปทุมธานีและหลังจากก็สามารถระบุสายพันธุ์ได้ว่าเป็น *Tetraspora* sp. CU2551 และเมื่อนำมาทำการศึกษาก็พบว่า *Tetraspora* sp. มีปริมาณของคลอโรฟิลล์เป็น 0.96 - 3.43 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์นี้สามารถที่จะเพิ่มจำนวนตัวเองเป็นสองเท่า และใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดเมื่อบ่มภายใต้ความเข้มแสง 48 - 92 ไมโครโอสไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที และอุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ส่วนความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวนี้ พบว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตราที่สูงถึง 17.3 - 61.7 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ($\mu\text{mol/mg Chl a/h}$) หรือ 423 - 1511 ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ($\mu\text{L/mg Chl a/h}$) เมื่อบ่มในอาหารเหลว Tris-Acetate Phosphate (TAP) ที่ขาดทั้งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ภายใต้ความเข้มแสง 20 ไมโครโอสไตนต่อตารางเมตรต่อวินาทีหรือ 1500 ลักซ์ อายุเซลล์ 24 ชั่วโมง ซึ่งอัตราการผลิตไฮโดรเจนนี้ ถือเป็นอัตราการผลิตที่สูงมากเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่น

Song และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ที่ถูกตรึงผ่านกระบวนการแบบ 2 ขั้นตอน หรือ two-stage photosynthesis and H_2 production process โดยในขั้นแรกจะบ่มเซลล์ในสภาวะที่มีออกซิเจนก่อน หลังจากนั้นขั้นตอนที่สองจะทำการบ่มในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. สามารถที่จะผลิตไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ถูกตรึงด้วยอะการ์ ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยมวลต่อปริมาตร และเมื่อทำการเติมกลูโคสจากภายนอกเพิ่มเข้าไปในช่วงเริ่มต้นของ stage II พบว่า อัตราการผลิตไฮโดรเจนจะเพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นของกลูโคสที่ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ 30 มิลลิโมลาร์ อัตราการผลิตไฮโดรเจนจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียสจะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด คือ 183 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 238 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยเซลล์ของสาหร่ายที่ยุติการผลิตไฮโดรเจนแล้วจะสามารถกลับมาผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ขึ้นต้นการตีพิมพ์แล้วการตีพิมพ์ซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซ้ำใหม่หรือเป็นวัฏจักรได้ เมื่อปล่อยให้เซลล์กลับเข้าสู่ stage I หรือ photosynthesis stage อีกครั้ง โดยจะต้องบ่มเซลล์ใน stage I เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 2 วัน เซลล์จึงกลับมา มีความสามารถผลิตไฮโดรเจนใหม่ได้อีก

Rashid และคณะ (2012) ได้ทำการตรึงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* ด้วยการใช้อะซิเตอร์ แล้วนำไปทำการผลิตไฮโดรเจนโดยผ่านกระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบ 2 ขั้นตอน โดยใน stage I จะทำการแปรผันสภาวะในการบ่มเป็น 3 สภาวะ คือ สภาวะที่ไม่มีมืด (fully dark) สภาวะที่มีแสง (fully light) และสภาวะที่มีมืดบางส่วน (partially dark conditions) โดยในแต่ละสภาวะจะมีแปรผัน pH และการเติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ผลการทดลองพบว่า การผลิตไฮโดรเจนของ *M. aeruginosa* ที่ถูกตรึงด้วยอะซิเตอร์ ภายใต้สภาวะที่มีการให้แสง จะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดถึง 490 ± 3 มิลลิลิตรต่อลิตร หรือให้อัตราการผลิต 9.42 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง โดย pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนคือ pH เท่ากับ 9 และแหล่งคาร์บอนจากภายนอกที่เหมาะสม คือ สารสกัดมอลต์ (Malt extract) โดยเวลาที่ใช้ใน stage I สามารถลดได้จาก 3 วันเหลือ 2 วันในสภาวะที่มีมืด และสภาวะที่มีแสง นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเซลล์ที่หยุดผลิตไฮโดรเจนแล้วสามารถที่จะนำกลับมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำอีกครั้งได้ ในสภาวะที่แสงเซลล์สามารถที่จะผลิตไฮโดรเจนซ้ำได้ 3 รอบ โดยที่ปริมาณไฮโดรเจนที่ได้ในแต่ละรอบจะคงที่ ในขณะที่ในสภาวะที่มีมืดและมืดบางส่วน ปริมาณไฮโดรเจนที่ได้ในแต่ละรอบจะลดลง

Anjana และ Kaushik (2014) ได้ทำการตรึงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *L. perlelegans* ด้วยอัลจินเตตและอะซิเตอร์เทียบกับเซลล์อิสระ พบว่า การตรึงเซลล์ด้วยอัลจินเตตจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตราการผลิตที่สูงและให้ระยะเวลายาวนานมากกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ตรึงด้วยอะซิเตอร์และเซลล์อิสระ โดยความหนาแน่นของเซลล์และขนาดของเซลล์ที่ตรึงจะเป็นพารามิเตอร์สำคัญสำหรับการตรึงเซลล์เพื่อการผลิตไฮโดรเจน จากงานวิจัยพบว่า ความหนาแน่นของเซลล์และขนาดของเซลล์ที่ถูกตรึงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนคือ 1 กรัม และ 1 มิลลิเมตร ตามลำดับ

Eleftherios และคณะ (2016) ได้ทำการตรึงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ด้วยอัลจินเตตความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยมวลต่อปริมาตร และ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร พบว่า เซลล์ที่ถูกตรึงในเม็ดอัลจินเตตจะมีการหลุดร่วงออกมาจากวัสดุตรึงน้อยมาก โดยเม็ดเซลล์ตรึงจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5.06 ± 0.18 มิลลิเมตร มีปริมาตรของเม็ดเซลล์ 67.8 ± 2.4 ไมโครลิตร และมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 46.3 ± 0.8 ไมโครกรัม เซลล์ของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 จะสามารถเจริญเติบโตได้ปกติเมื่อถูกหุ้มอยู่ในเม็ดอัลจินเตต โดยเซลล์จะยังมีชีวิตได้อย่างน้อย 30 วัน การละลายเจลอัลจินเตตด้วยน้ำกลั่นและอาหาร BG-11 จะมีผลต่อการสังเคราะห์แสงของเซลล์ โดยเมื่อละลายเจลอัลจินเตตด้วยอาหาร BG-11 เซลล์ของ *Synechocystis* sp. จะมีการสังเคราะห์แสงมากกว่าการละลายอัลจินเตตด้วยน้ำกลั่น อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของเซลล์ตรึง *Synechocystis* sp. คือ 5.73 ± 0.69 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์ (40.6 ± 4.9 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อ

ชั่วโมง) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 จุลสาหร่าย

สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่คัดแยกได้โดย เชิดศักดิ์และคณะ (2554)

3.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย (ภาคผนวก ก)

1. อาหาร TAP (Tris-acetate phosphate medium) pH 7.2 (Harris. *et al.*, 1989)
2. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน หรือ TAP-N
3. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส หรือ TAP-P
4. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ หรือ TAP-S
5. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส หรือ TAP-N-P
6. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ หรือ TAP-N-S
7. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์ หรือ TAP-P-S
8. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุทั้งไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์ หรือ TAP-N-P-S

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (LOBALO Chemie, India)
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Ajax Finechem Pty, Australia)
3. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
4. ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน (Tris-base) (CARLO ERBO, India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. กรดอะซิติก (CH_3COOH) (Thomas baker, Mumbai India)
6. โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (LOBALO Chemie, India)
7. ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (LOBALO Chemie, India)
8. โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) (Ajax Finechem Pty, Australia)
9. โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) (LOBALO Chemie, India)
10. เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (LOBALO Chemie, India)
11. กรดบอริก (H_3BO_3) (LOBALO Chemie, India)
12. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
13. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
14. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
15. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (CARLO ERRA, India)
16. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
17. แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
18. โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
19. คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
20. เฟอร์ริกคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (ACROS ORGANICS, USA)
21. ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2) (LOBALO Chemie, India)
22. แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
23. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (LOBALO Chemie, India)
24. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (CARLO ERRA, India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 สารเคมีสำหรับการตรึงเซลล์

1. โซเดียมอัลจิเนต (ACROS organic™, China)
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Ajax Finechem Pty, Australia)

3.3.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

1. เมทิลไวโอลเจน ไฮเดรต 98 เปอร์เซ็นต์ ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (ACROS Organics™, China)
2. โซเดียมไดไฮโอไนต์ ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$) (Sigma-Aldrich, USA)
3. ไทรทอน เอ็กซ์ 100 (Triton X-100) (ACROS ORGANICS, USA)

3.3.4 แก๊สมาตรฐานและแก๊สที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

1. แก๊สมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาร์กอน (PraxAir, Thailand)
2. แก๊สอาร์กอน ความบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์ (PraxAir, Thailand)

3.3.5 ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

แอมพลิซิลิน (Amplicilin Sodium Salt) (VWR Life science, Strongsville USA)

3.4 อุปกรณ์

1. ขวดแก้ว (gas-tight vial) ขนาด 100 มิลลิลิตรและจุกยางครอบฝาอะลูมิเนียม
2. คิวเวต (Semi-micro cuvette, path length 10 mm)
3. เตาให้ความร้อน (Hot plate)
4. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glassware)
5. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph) (HP 5890 series II, Japan)

6. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ที่ปรึกษาทางวิชาการเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated centrifuge) (Thermo Fisher, Germany)
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermo Fisher, Germany)
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
10. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) และเข็มเขี่ยเชื้อแบบกลม (loop)
11. ตู้ถ่ายเชื้อ
12. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
13. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) (JS Research INC, Korea)
14. แผ่นเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน
15. ชุดกรองสำหรับ HPLC
16. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) (Olympus, CH30, Japan)
17. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Thermo Fisher, Germany)
18. ตะแกรงร่อนเบอร์ 7-12 (Sieve No.7-12 ASTM standard)
19. เครื่องชั่งน้ำหนัก (Mettler Toledo, Switzerland)
20. ไมโครปิเปต (pipet-lite xls, Rainin Mettler Toledo, Switzerland)
21. กระบอกฉีดยา (Syringe) และเข็มฉีดยา (Hypodermic needle) (Nipro, Thailand)
22. ตัวล็อกเข็มฉีดยา (syringe valve push button, luer lock) (Sigma-Aldrich, USA)
23. เครื่อง oxygraph plus system (Hansatech instruments, United Kingdom)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

3.5.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารแข็งหรืออาหารวุ้น

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารวุ้นนั้น ขั้นตอนทั้งหมดจะทำในตู้ถ่ายเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่น ซึ่งจะทำให้ผลการทดลองผิดพลาดได้ โดยอุปกรณ์พื้นฐานที่ใช้คือ ห่วงเย็บเชื้อ และตะเกียงแอลกอฮอล์สำหรับใช้ฆ่าเชื้อโดยการเผา และจะทำการถ่ายเชื้อโดยใช้เทคนิค streak-plate ซึ่งสามารถทำได้ดังนี้

1. ใช้ห่วงเย็บเชื้อหรือ loop แตะตัวอย่างสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 และลากหรือขีด (streak) ลงบนจานเพาะเชื้อหรือ petri dish ที่มีอาหารวุ้น TAP (ภาคผนวก ก) อยู่ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น หลังจากเสร็จในระนาบแรกซึ่งจะมีสาหร่ายสีเขียวอยู่หนาแน่นที่สุด ให้นำห่วงเย็บเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดให้หมด จากนั้นขีดเชื้อจากส่วนรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงครั้งเดียว แล้วลากเป็นระนาบที่สอง 4-5 เส้นติดกัน โดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สอง จนครบทั้งจานเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งจะมีทั้งหมดประมาณ 4 ระนาบ ดังรูปที่ 3.1

2. นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ขีดเชื้อเสร็จแล้วไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เชื้อที่บริสุทธิ์ จะแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ขึ้นบนอาหารวุ้น TAP



รูปที่ 3.1 การแยกเชื้อด้วยวิธี streak-plate technique
ที่มา : Prescott (2002)

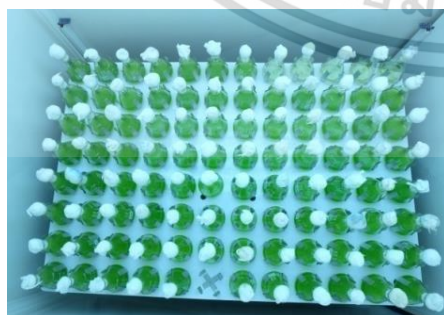
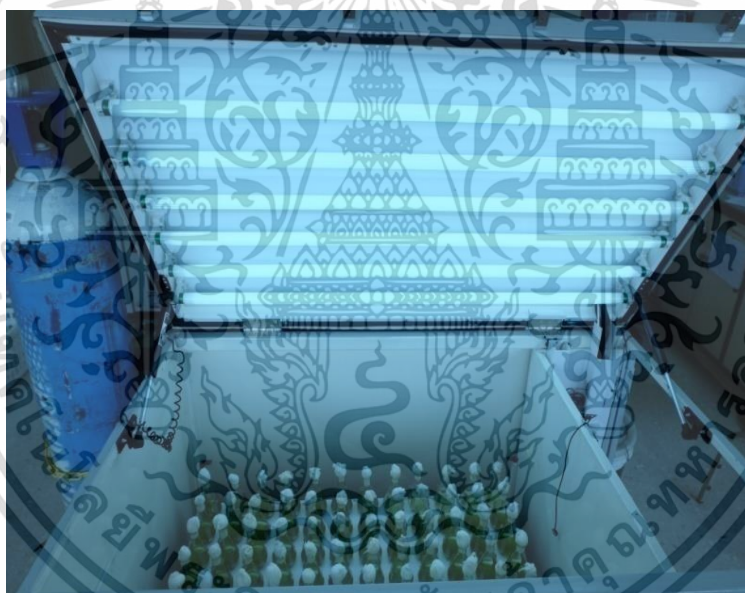
3.5.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลวนั้น ขั้นตอนทั้งหมดจะทำในตู้ถ่ายเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) เช่นกัน ซึ่งทำได้โดย เปิดจุกสำลีและเผาไฟที่ปากขวดรูปชมพูก่อน จากนั้นนำห่วงเย็บเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดง รอให้เย็น ใช้ห่วงเย็บเชื้อเลี้ยงสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สีเขียวที่อยู่บนผิวหน้าอาหารวุ้น TAP นำห้วงเชื้อเชื้อจุ่มลงไป ในอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปิดจุกสำลี จากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยสำหรับสีเขียวที่เจริญเติบโตในอาหารเหลว TAP นี้ จะถูกเรียกว่า starter ซึ่งจะถูกใช้เป็นตัวตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับสีเขียวเพื่อผลิตไฮโดรเจนต่อไป

หลังจากที่ได้ starter แล้วจะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับสีเขียวเพื่อเตรียมเซลล์สำหรับการผลิตไฮโดรเจน โดยเริ่มจากการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ใน starter ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงหรือ spectrophotometer จากนั้นนำค่าความขุ่นที่ได้มาทำการคำนวณปริมาณ starter ที่จะต้องปิเปตด้วยการเทียบบัญญัติไตรยางศ์ โดยกำหนดค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ต้องการเป็น 0.1 จากนั้นทำการปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ใน starter ตามปริมาณที่คำนวณได้ลงในอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ความเข้มแสงและอุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว TAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

3.6.1 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสีเขียวแบบเซลล์อิสระเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ตามวิธีในข้อที่ 3.5.2 นำสารแขวนลอยเซลล์มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 xg เป็นเวลา 2 นาที ทำการล้างเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ใหม่ จากนั้นถ่ายโอนสารแขวนลอยเซลล์ 25 มิลลิลิตร ด้วยการปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ลงในขวด gas-tight vial ขนาด 100 มิลลิลิตร ปิดจุกยางและครอบด้วยฝาอะลูมิเนียม โดยขั้นตอนทั้งหมดจะทำได้ในตู้ถ่ายเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ สำหรับการบ่มในสภาวะมีอากาศ (aerobic condition) สามารถนำไปบ่มในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิได้เลย แต่สำหรับการบ่มในสภาวะไร้อากาศ (anoxic condition) จะต้องทำการไร้อากาศด้วยการพ่นแก๊สอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที ก่อน จากนั้นค่อยนำไปบ่มในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียสและให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณแก๊สไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ โดยการวัดแก๊สบริเวณส่วนบนของขวด (head space) ด้วยเข็มเก็บแก๊ส ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์แก๊สไฮโดรเจนจะแสดงดังตารางที่ 3.1 หลังจากการวิเคราะห์เสร็จสิ้นจะทำการคำนวณปริมาณของแก๊สไฮโดรเจนที่ได้ โดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม โดยวิธีการคำนวณจะแสดงในภาคผนวก ค

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ เทอร์มอลคอนดักทีวิตีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal conductivity detector; GC-TCD)

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Column	Pack column 2 m; Molecular sieve 13X mesh 80/100
Detector	Thermal conductivity detector (TCD)
Temperature program	Injector temperature: 100 °C Oven temperature: 50 °C Detector temperature: 120 °C
Carrier gas	Argon flow rate 30 ml/min (99.999 %purity)

3.6.2 วิธีการศึกษาผลของความขุ่นเซลล์ (OD₇₃₀) ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในระบบเซลล์อิสระ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. ในอาหาร TAP สูตรปกติ ตามวิธีในข้อที่ 3.5.2 โดยทำการแปรผันความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเป็น 0.005 - 0.10 เมื่อเซลล์มีอายุครบ 24 ชั่วโมงจะทำการวัดค่าความขุ่นสุดท้าย (final OD₇₃₀) ของเซลล์ในขั้นการสังเคราะห์แสง (stage I) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร แล้วจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.6.1 โดยจะทำการบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงก่อนการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

3.6.3 วิธีการศึกษาผลของความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในระบบเซลล์อิสระ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. ในอาหาร TAP สูตรปกติ ตามวิธีในข้อที่ 3.5.2 โดยทำการแปรผันความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเป็น 0.005 - 0.10 เมื่อเซลล์มีอายุครบ 24 ชั่วโมงแล้วจึงจะทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.6.1 โดยจะทำการบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงก่อนการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

3.6.4 วิธีการศึกษาผลของความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD₇₃₀) ของขั้นการสังเคราะห์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในระบบเซลล์อิสระ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหาร TAP สูตรปกติ ตามวิธีในข้อที่ 3.5.2 เมื่อเซลล์มีอายุครบ 24 ชั่วโมงแล้ว จะทำการเตรียมเซลล์สาหร่ายเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนตามวิธีของระบบเซลล์อิสระในข้อ 3.6.1 โดยใช้ค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นที่ 0.1 ทำการแปรผันความขุ่นของเซลล์สุดท้ายของขั้นการสังเคราะห์แสง ตั้งแต่ 0.1 ถึง 1.0 โดยขั้นตอนทั้งหมดจะทำในตู้ถ่ายเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ บ่มเซลล์ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 4 ชั่วโมงก่อนการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

3.6.5 วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยอัลจินตเพื่อการผลิตไฮโดรเจน

การตรึงเซลล์โดยการหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินตเพื่อการผลิตไฮโดรเจนสามารถทำได้ดังนี้

1. ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว TAP ตามวิธีในข้อ 3.5.2 ละลายโซเดียมอัลจินตในน้ำกลั่น นำไปนึ่งในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส, ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 15 นาที รอให้อุ่น แล้วปรับความเข้มข้นของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายโซเดียมอัลจิเนตให้เป็น 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยการเติมสารแขวนลอยเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต โดยจะกำหนดความเข้มข้นของเซลล์ที่ตรงเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต เช่น ถ้าเตรียมโซเดียมอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร แปลว่าจะมีเซลล์สาหร่ายสีเขียว 100 มิลลิกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง โดยน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียวสามารถหาได้ด้วยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{730}) แล้วแทนค่าในสมการเส้นตรง $y = 1.791521x$ ดังแสดงในภาคผนวก ง

2. จากนั้นทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำของผสมเทลงกระบอกฉีดยาที่ต่อกับเข็ม กดก้านกระบอกเพื่อให้ของผสมเซลล์ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร ปล่อยให้ไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง เพื่อให้วัสดุตั้งจับรวมตัวกันเป็นเม็ดกลมที่แข็งแรง ดังแสดงในรูปที่ 3.3

3. ทำการชั่งน้ำหนักของเม็ดอัลจิเนตที่ได้ทั้งหมด เช่น ใน 100 มิลลิลิตรของอัลจิเนต มีเซลล์สาหร่าย 100 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง หลังจากตั้งเซลล์เสร็จแล้วนำไปชั่งน้ำหนักทั้งหมด สมมติได้ 32 กรัม นั่นคือ 32 กรัมของเม็ดอัลจิเนตจะมีเซลล์สาหร่ายสีเขียว 100 มิลลิกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนระบบเซลล์อิสระที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบจะสามารถเตรียมได้ตามวิธีในข้อที่ 3.5.2 โดยใช้ความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเป็น 0.1 เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบ 24 ชั่วโมง จะทำการปรับความหนาแน่นของสาหร่ายสีเขียวให้มีน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 3.75 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ TAP 25 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าความหนาแน่นเซลล์ที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 3.6.2



รูปที่ 3.3 เซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ถูกตรึงด้วยจินเนต

4. ถ่ายเม็ดอัลจิเนตที่หุ้มเซลล์สาหร่ายลงในขวด gas-tight vial ขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ปริมาณ 25 มิลลิลิตร โดยปริมาณเม็ดอัลจิเนตที่จะถ่ายโอนจะเทียบจากน้ำหนักเซลล์แห้งของระบบเซลล์อิสระที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ยกตัวอย่างเช่น น้ำหนักเซลล์แห้งในระบบเซลล์อิสระคือ 3.75 มิลลิกรัม ถ้า 100 มิลลิกรัม น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายจะมีในเม็ดอัลจิเนต 32 กรัม แปลว่า ถ้าต้องการเซลล์ 3.75 มิลลิกรัม จะต้องชั่งเม็ดอัลจิเนตมา 1.20 กรัม เป็นต้น

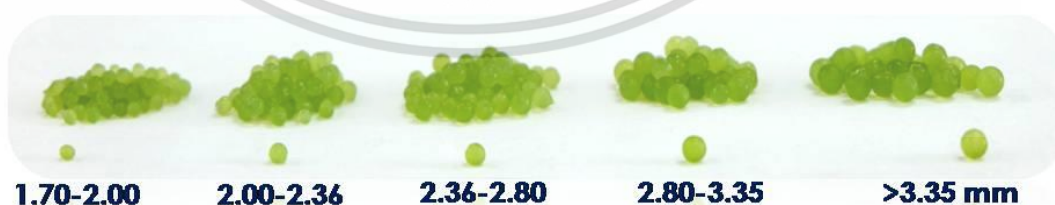
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำออกเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต หรือใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นใดได้
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. หลังจากถ่ายโอนเม็ดอัลจินเตลงในขวด gas-tight vial เรียบร้อยแล้ว ให้ปิดจุกยางและครอบด้วยฝาอะลูมิเนียม ทำการบ่มทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ สำหรับการบ่มในสภาวะมีอากาศ หลังปิดจุกยางและครอบด้วยฝาอะลูมิเนียมแล้วสามารถนำไปบ่มในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิได้เลย แต่สำหรับการบ่มในสภาวะไร้อากาศจะต้องทำการไล่อากาศด้วยการพ่นอาร์กอน (Ar) เป็นเวลา 15 นาทีก่อน จากนั้นค่อยนำไปบ่มในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียสและให้ความชื้นแสงที่ 1,500 ลักซ์

6. จากนั้นนำแก๊สบริเวณส่วนบนของขวด (head space) ไปวิเคราะห์หาปริมาณแก๊สไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ซึ่งสภาวะที่ในการวิเคราะห์แก๊สไฮโดรเจนจะแสดงดังตารางที่ 3.1 หลังจากการวิเคราะห์เสร็จสิ้นจะทำการคำนวณปริมาณของแก๊สไฮโดรเจนที่ได้ โดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม โดยวิธีการคำนวณจะแสดงในภาคผนวก ค

3.6.6 วิธีการศึกษาผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ที่ถูกตรึงในเม็ดอัลจินเตต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 เทียบกับเซลล์อิสระ

ทำการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวและเตรียมเซลล์เพื่อการผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อที่ 3.6.5 โดยกำหนดความเข้มข้นของเซลล์เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมอัลจินเต และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตเป็น 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร โดยในขั้นตอนที่ต้องกดของผสมผ่านเข็มฉีดยา ในขั้นตอนนี้จะทำการแปรผันเข็มเป็นเบอร์ต่างๆ ตั้งแต่เบอร์ 18G ถึง 30G เพื่อทำการผลิตเม็ดอัลจินเตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางในช่วง 1.70-2.00, 2.00-2.36, 2.36-2.80, 2.80-3.35 และมากกว่า 3.35 มิลลิเมตร ทำการคัดแยกขนาดเม็ดอัลจินเต ด้วยการร่อนผ่านตะแกรงร่อน (sieve) เบอร์ 6 ถึง 10 เมช จะได้เม็ดอัลจินเตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดต่างๆ ดังรูปที่ 3.4 โดยขั้นตอนทั้งหมดจะทำในตู้ถ่ายเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ทำการบ่มทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนการวิเคราะห์ไฮโดรเจน



รูปที่ 3.4 เม็ดเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. CU2551 ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดต่างๆ

3.6.7 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจินेटที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 เทียบกับเซลล์อิสระ

ทำการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวและเตรียมเซลล์เพื่อการผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อที่ 3.6.5 โดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินेटเป็น 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดอัลจินेटที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อที่ 3.6.6 โดยก่อนที่จะผสมสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายลงไปในการละลายโซเดียมอัลจินेट จะทำการเตรียมเซลล์สาหร่ายสีเขียว โดยแปรผันความเข้มข้นของเซลล์เป็นค่าต่างๆในช่วง 0.125 ถึง 10 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อ 1 มิลลิลิตรของอัลจินेट โดยจะหาน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียวจากการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{730}) แล้วแทนค่าในสมการเส้นตรง $y = 1.791521x$ (ภาคผนวก ง) ซึ่งจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งออกมาในหน่วยมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร โดยขั้นตอนทั้งหมดจะทำในตู้ถ่ายเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ทำการบ่มทิ้งในสภาวะที่มีอากาศและไล่อากาศเป็นเวลา 18 ชั่วโมงก่อนการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

3.6.8 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของอัลจินेटที่ใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 เทียบกับเซลล์อิสระ

ทำการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวและเตรียมเซลล์เพื่อการผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อที่ 3.6.5 โดยใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดอัลจินेटที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อที่ 3.6.6 และความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อที่ 3.6.7 โดยจะแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินेटในช่วง 1 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ขั้นตอนทั้งหมดจะทำในตู้ถ่ายเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ทำการบ่มทิ้งในสภาวะที่มีสภาวะที่มีอากาศและไล่อากาศ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงก่อนการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

3.6.9 วิธีการศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารหลักต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ถูกตรึง

ทำการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวและเตรียมเซลล์เพื่อการผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อที่ 3.6.5 โดยใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดอัลจินेटที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อที่ 3.6.6 ความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อที่ 3.6.7 และความเข้มข้นของอัลจินेटที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.6.8 โดยในขั้นตอนที่จะถ่ายโอนเม็ดเซลล์ตรึงอัลจินेटลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำการปรับสภาวะเซลล์โดยการแปรผันชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีอาหารหลักครบถ้วนและอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ขาดธาตุอาหารหลัก ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP-N, TAP-P, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TAP-S, TAP-N-P, TAP-N-S, TAP-P-S และ TAP-N-P-S ขั้นตอนทั้งหมดจะทำในตู้ถ่ายเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ทำการบ่มเซลล์ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ วัดปริมาณไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องจนเซลล์อิ่มตัวในการผลิตไฮโดรเจน

3.6.10 วิธีการศึกษาการนำสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ถูกตรึงด้วยอัลจินเตตและผลิตไฮโดรเจนแล้วกลับมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่

ทำการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวและเตรียมเซลล์เพื่อการผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อที่ 3.6.5 - 3.6.8 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารหลักที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.6.9 ทำการบ่มเซลล์ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ วัดปริมาณไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องจนปริมาณไฮโดรเจนคงที่ โดยหลังจากที่เซลล์ตรึงอิ่มตัวในการผลิตไฮโดรเจนแล้ว เซลล์ตรึงจะถูกนำมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ซึ่งสามารถทำได้ดังนี้

1. ถ่ายโอนเซลล์ตรึงที่ผลิตไฮโดรเจนอิ่มตัวแล้ว ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีธาตุอาหารครบถ้วน โดยการรินอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออกจากขวด gas-tight vial ทำการล้างเซลล์ตรึงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP จากนั้นก็ค่อยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ใหม่ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไปในขวด gas-tight vial ที่มีเซลล์ตรึงอยู่ ปิดจุกสำลี แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสและความเข้มแสง 1500 ลักซ์ สำหรับการบ่มในสภาวะที่ไร้อากาศจะทำการแปรผันเวลาของการปรับสภาพเซลล์ใน stage I เป็น 24, 1 และ 0 ชั่วโมง แต่สำหรับสภาวะที่มีอากาศจะทำการปรับสภาพเซลล์ใน stage I ด้วยระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากสภาวะที่ไร้อากาศ โดยในขั้นตอนนี้จะเป็นการพาเซลล์กลับสู่ stage I ของการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งเป็นสภาวะที่เซลล์จะได้รับธาตุอาหารและแสงที่สมบูรณ์ เพื่อที่เซลล์ของสาหร่ายสีเขียวจะได้กลับเข้าสู่สภาวะที่มีการสังเคราะห์แสง การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และฟื้นคืนความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนอีกครั้ง

2. เมื่อเพาะเลี้ยงเม็ดเซลล์ครบ 24 ชั่วโมง เซลล์จะเข้าสู่ stage II โดยจะถ่ายโอนเซลล์ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ขาดธาตุอาหารหลักที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.6.8 อีกครั้ง โดยการรินอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP อันเดิมออกจากขวด gas-tight vial จากนั้นก็ทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่เหมาะสม ทำการล้างเซลล์ด้วยการเทเข้าและรินออกซ้ำไปมา 3 รอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่เหมาะสมนี้ จากนั้นก็ค่อยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่เหมาะสม ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไปในขวด gas-tight vial ที่มีเม็ดเซลล์ตรึงอัลจินเตตอยู่

3. ปิดจุกยางและครอบด้วยฝาอะลูมิเนียม นำไปบ่มในตู้บ่มและวัดปริมาณไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่อง เมื่อเซลล์ตรึงมีการผลิตไฮโดรเจนอิ่มตัวแล้ว ก็จะทำกรถ่ายโอนเซลล์เข้าสู่ stage I ใหม่โดย

จะทำการทดลองข้อ 1-4 ซ้ำอีกครั้งไปเรื่อยๆ จนกว่าเม็ดเซลล์จะแตก เสื่อมสภาพ หรือไม่มีการผลิตไฮโดรเจนอีก เพื่อนับจำนวนรอบที่เม็ดเซลล์สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนซ้ำได้

3.7 วิธีการวิเคราะห์เพิ่มเติม

3.7.1 วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว TAP ตามวิธีในข้อที่ 3.5.2 จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ทำการกรองผ่านแผ่นเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน โดยทั้งก่อนและหลังการกรองจะทำการอบแผ่นเมมเบรนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ นำไปชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักที่คงที่ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสามารถหาได้จาก

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม) = น้ำหนักเมมเบรนหลังกรอง (กรัม) - น้ำหนักเมมเบรนก่อนกรอง (กรัม)

3.7.2 วิธีการติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (ดัดแปลงจาก Batyrova *et al.*, 2012)

การติดตามการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถทำได้โดยการวัดการผลิตไฮโดรเจนจากสารละลายสารเมทิลไวโอลเจนที่ถูกรีดิวซ์ด้วยสารละลายโซเดียมไดไทโอไนท์ ปริมาตรของผสมทั้งหมดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ 2 มิลลิลิตร ขั้นตอนการทดลองจะเริ่มจากการเตรียมสารละลายเมทิลไวโอลเจน ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และสารละลายไทรทอน เอ็กซ์ 100 (Triton X-100) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร โดยละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำการฉีดเมทิลไวโอลเจน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายไทรทอน เอ็กซ์ 100 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรด้วยเข็มฉีดยาที่มีตัวลือกวาล์วเข้าไปในขวด vial ปริมาตร 13 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการฟั่นไล่ออกซิเจนด้วยแก๊สอาร์กอนเป็นเวลาประมาณ 10 นาที จากนั้นฉีดสารละลายโซเดียมไดไทโอไนท์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร เข้าไปผสมกับของผสมในขวด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินม่วงเข้ม นั่นแปลว่าสารพร้อมสำหรับการใช้งานแล้ว

ขั้นตอนต่อมาจะทำการเริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยการเติมสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายสีเขียว ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการฟั่นอาร์กอนเรียบร้อยแล้ว บ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง ทำการวัดปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ หน่วยของกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะถูกคำนวณออกมาในหน่วย ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อนาที ($\mu\text{molH}_2/\text{mg dry wt}/\text{min}$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.3 วิธีการหาปริมาณออกซิเจนสุทธิที่เซลล์ปล่อยออกมาจากระบบสังเคราะห์แสงที่ 2

การหาปริมาณออกซิเจนที่ปลดปล่อยออกมาจากระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 ของสาหร่ายสีเขียวสามารถทำได้โดยการนำสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ถูกบ่มในอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะใส่อากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง oxygen plus system (Hansatech instruments, United Kingdom) โดยใช้สารละลายไอโพลีโทสเซียมคลอไรด์เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ และใช้ P.M.F.E เป็นเมมเบรน โดยก่อนทำการวิเคราะห์ จะเติมน้ำกลั่นที่มีโซเดียมไดไฮโอไนต์เพื่อกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในช่องใส่ตัวอย่าง (DW1/AD oxygen electrode chamber) หลังจากที่ช่องใส่ตัวอย่างปราศจากออกซิเจนแล้วจะทำการเติมสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่มีปริมาณเซลล์ 1 มิลลิกรัม น้ำหนักเซลล์แห้งที่ต้องการวิเคราะห์ลงไปยังช่องใส่ตัวอย่าง ปิดฝาช่องใส่ตัวอย่างโดยระวังอย่าให้เกิดฟอง วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนของตัวอย่างในที่มืด เมื่อปริมาณออกซิเจนลดลงจนคงที่ จะทำการเปิดไฟเพื่อให้โดยระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 ของสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายสีเขียวทำงาน ทำการติดตามปริมาณของออกซิเจนที่ได้ ซึ่งจะแสดงผลผ่านโปรแกรมที่เชื่อมต่อกับเครื่องโดยจะได้กราฟในลักษณะ sigmoid curve ทำการคำนวณความชันของกราฟ จะได้ปริมาณออกซิเจนในหน่วยนาโนโมลออกซิเจนต่อนาทีต่อมิลลิกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง (nmolH₂/ min /mg dry wt.)

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

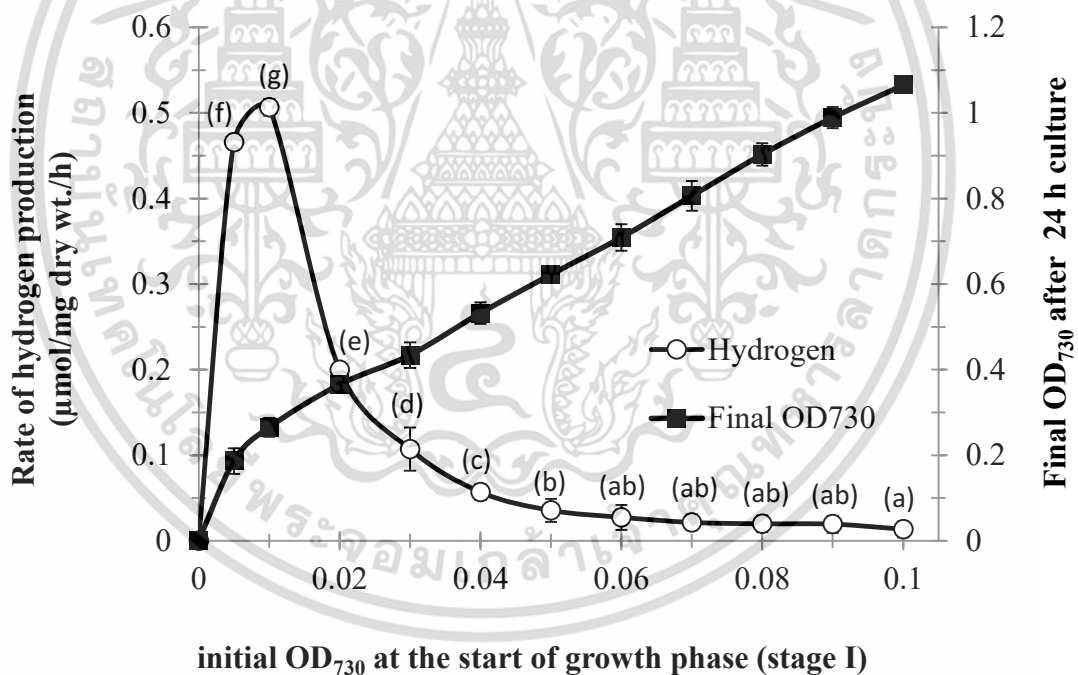
ทำการออกแบบชุดทดลองเป็นแบบปัจจัยเดียว (experimental design CRD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี one way ANOVA แล้ววัดค่าความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม IBM SPSS statistics version 23 (SPSS software, New York, USA) โดยตั้งสมมติฐานคือ ยอมรับสมมติฐาน H₀ เมื่อ p -value > 0.05 คือมีปัจจัยอย่างน้อย 1 ปัจจัยที่มีค่าไม่แตกต่างกัน และจะปฏิเสธสมมติฐาน H₀ และยอมรับสมมติฐาน H₁ เมื่อค่า p -value < 0.05 คือมีปัจจัยอย่างน้อย 1 ปัจจัยที่มีค่าที่แตกต่างกัน ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลของค่าความขุ่นเซลล์ (OD_{730}) ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในระบบเซลล์อิสระ

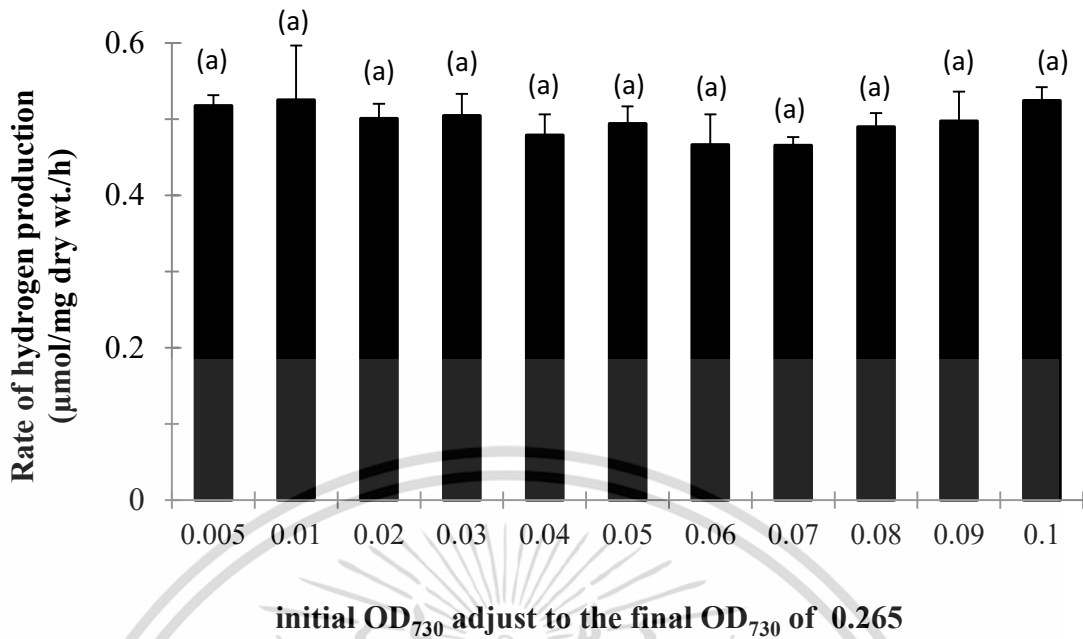
จากการศึกษาผลของความขุ่นเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนในระบบเซลล์อิสระ ด้วยการแปรผันความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD_{730}) ของเซลล์ในขั้นการสังเคราะห์แสง (stage I) ตั้งแต่ 0.005 ถึง 0.10 นำไปบ่มที่อุณหภูมิและความเข้มแสงที่เหมาะสม ทำการวัดค่าความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD_{730}) ของเซลล์ใน stage I แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.1



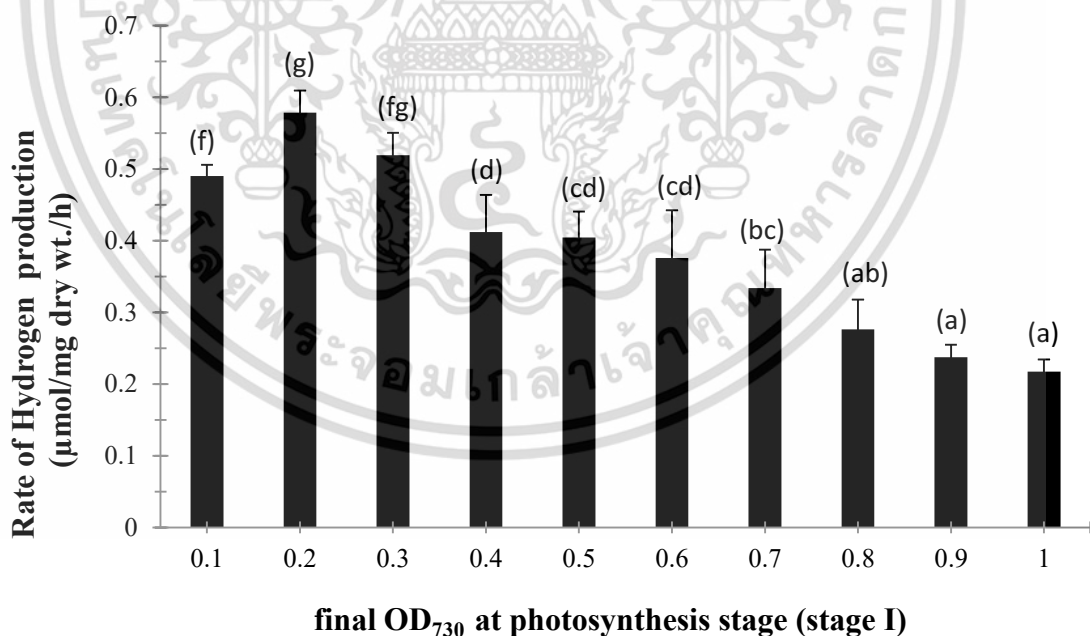
รูปที่ 4.1 ผลของค่าความขุ่นเซลล์ที่มีต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน (ตัวอักษรที่ไม่แตกต่างกัน แสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p -value < 0.05))

จากรูปที่ 4.1 จะเห็นว่าค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) จะแปรผันตรงกับค่าความขุ่นสุดท้าย (final OD₇₃₀) ของเซลล์ใน stage I นั่นคือเมื่อความขุ่นเซลล์เริ่มต้นเพิ่มขึ้น ค่าความขุ่นเซลล์สุดท้ายจะเพิ่มตาม อย่างไรก็ตาม อัตราการผลิตไฮโดรเจนจะลดลง ซึ่งพบว่า เมื่อเริ่มเลี้ยงเซลล์สำหรับสายสีเขียวด้วยความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) ที่ 0.01 และเซลล์มีการเพาะเลี้ยงไปแล้ว 24 ชั่วโมง จะได้ค่าความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD₇₃₀) เท่ากับ 0.265 จะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดที่ 0.5064 ± 0.0098 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง เนื่องจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยทั่วไปจะมี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนสังเคราะห์แสงหรือการเจริญเติบโต (stage I) และขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจน (stage II) ซึ่งจะเห็นว่าจากรูปที่ 4.1 จะมียุทธศาสตร์ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ทำการศึกษาและมีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสายสีเขียวอยู่ 2 ช่วง คือ ค่าความขุ่นเซลล์ช่วงเริ่มต้นของ stage I (initial OD₇₃₀) และค่าความขุ่นเซลล์ช่วงสุดท้ายของ stage I (final OD₇₃₀) และเพื่อทำการยืนยันว่าค่าความขุ่นเซลล์ช่วงใดที่มีผลต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสายสีเขียว ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาโดย แบบแรก จะทำการแปรผันค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) ตั้งแต่ 0.005 ถึง 0.10 จากนั้นเมื่อเซลล์ครบ 24 ชั่วโมงก็จะทำการปรับความขุ่นของเซลล์สุดท้าย (final OD₇₃₀) ให้มีค่าเท่ากันคือ 0.265 ซึ่งเป็นค่าความขุ่นเซลล์สุดท้ายที่เหมาะสมที่สุดจากรูปที่ 4.1 หลังจากนั้นทำการบ่มเซลล์เพื่อผลิตไฮโดรเจน (stage II) ซึ่งจะได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2 ส่วนแบบที่สอง จะทำเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) ที่ 0.1 เมื่อเซลล์ครบ 24 ชั่วโมง จะทำการปรับและแปรผันค่าความขุ่นสุดท้าย (final OD₇₃₀) ของเซลล์ใน stage I ตั้งแต่ 0.1 ถึง 1.0 หลังจากนั้นเซลล์จะเข้าสู่ stage II ด้วยการนำไปบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน ซึ่งจะได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.3

ผลการทดลองในรูปที่ 4.2 ชี้ให้เห็นว่า เมื่อค่าความขุ่นสุดท้ายของเซลล์ (final OD₇₃₀) เท่ากัน แต่ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) แตกต่างกัน เซลล์อิสระจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่แตกต่างกัน (p -value > 0.05) และเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์ด้วยความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) ที่เท่ากัน แต่ปรับให้เซลล์มีค่าความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD₇₃₀) ที่แตกต่างกัน เซลล์อิสระจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน (p -value < 0.05) โดยที่ค่าความขุ่นเซลล์สุดท้ายที่ 0.2 และ 0.3 จะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) ของเซลล์ใน stage I ไม่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน แต่ความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD₇₃₀) ของเซลล์ใน stage I ซึ่งเป็นช่วงต้นของการผลิตไฮโดรเจนใน stage II จะมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Tetraspora* sp. เพื่อทำการผลิตไฮโดรเจนจึงสามารถที่จะเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นค่าใดก็ได้ ดังนั้นการดำเนินการวิจัยต่อจากนี้จะเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ค่าความขุ่นเริ่มต้นเป็น 0.10 เพราะจะได้ปริมาณเซลล์ของ *Tetraspora* sp. มากกว่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นค่าอื่น



รูปที่ 4.2 ผลของค่าความขุ่นเริ่มต้น (initial OD₇₃₀) ของเซลล์ใน stage I ที่มีต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน เมื่อปรับให้ค่าความขุ่นสุดท้าย (final OD₇₃₀) ของเซลล์ใน stage I ให้มีค่าเท่ากันคือ 0.265 (ตัวอักษรที่ไม่แตกต่างกัน แสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p -value < 0.05))



รูปที่ 4.3 ผลของค่าความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD₇₃₀) ของเซลล์ในขั้นการสังเคราะห์แสง (stage I) ต่อการผลิตไฮโดรเจนในระบบเซลล์อิสระ (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p -value < 0.05))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองในรูปที่ 4.2 ซึ่งให้เห็นว่า เมื่อค่าความขุ่นสุดท้ายของเซลล์ (final OD₇₃₀) เท่ากัน แต่ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) แตกต่างกัน เซลล์อิสระจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่แตกต่างกัน (p -value > 0.05) และเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์ด้วยค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) ที่เท่ากัน แต่ปรับให้เซลล์มีค่าความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD₇₃₀) ที่แตกต่างกัน เซลล์อิสระจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน (p -value < 0.05) โดยที่ค่าความขุ่นเซลล์สุดท้ายที่ 0.2 และ 0.3 จะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) ของเซลล์ใน stage I ไม่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน แต่ความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD₇₃₀) ของเซลล์ใน stage I ซึ่งคือช่วงต้นของการผลิตไฮโดรเจนใน stage II จะมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Tetraspora* sp. เพื่อทำการผลิตไฮโดรเจนจึงสามารถที่จะเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นค่าใดก็ได้ ดังนั้นการดำเนินการวิจัยต่อจากนี้จะเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ค่าความขุ่นเริ่มต้นเป็น 0.10 เพราะจะได้ปริมาณเซลล์ของ *Tetraspora* sp. มากกว่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นค่าอื่น

การให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงเมื่อความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD₇₃₀) ของเซลล์สำหรับสายสีเขียวในขั้นการสังเคราะห์แสง (stage I) มีค่าเพิ่มขึ้นนั้น เป็นผลมาจากการบดบังของแสงจากเซลล์สำหรับด้วยกันเอง กล่าวคือ เมื่อค่าความขุ่นของเซลล์สุดท้ายมากขึ้นจะเกิดการซ้อนทับของเซลล์เป็นชั้นๆ (cell stacking) ส่งผลทำให้เซลล์ได้รับแสงไม่ทั่วถึง ความสามารถในการทะลุทะลวงของแสง (Maswana *et al.*, 2017) รวมทั้งความสามารถในการดูดกลืนแสงของรงควัตถุคลอโรฟิลล์จะลดลง (Kim *et al.*, 2005) เป็นผลให้การแยกสลายของน้ำ (water splitting) ที่ระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 เกิดขึ้นได้น้อยลง ทำให้อิเล็กตรอนและโปรตอนซึ่งเป็นสับสเตรตที่จะป้อนให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีน้อยลง อัตราการผลิตไฮโดรเจนจึงลดลงในเวลาต่อมา ซึ่งผลการทดลองในลักษณะนี้ก็ได้ถูกศึกษาพบในสายสีเขียวสายพันธุ์อื่นๆเช่นกัน ไม่ว่าจะเป็น *Chlorella* sp. (Batyrova *et al.*, 2015) หรือ *C. reinhardtii* (Batyrova *et al.*, 2012) นอกจากนั้นแล้วการที่สายสีเขียวจะผลิตไฮโดรเจนได้ดีมากน้อยแค่ไหนนั้นขึ้นกับความสมดุลของแสงที่จะได้รับต่อเซลล์ที่มีในอาหาร ซึ่งผลการทดลองในส่วนนี้ชี้ให้เห็นชัดเจนแล้วว่าที่ความขุ่นเซลล์สุดท้ายที่ 0.265 จะมีความสมดุลระหว่างเซลล์และแสงที่ส่องผ่านเหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนที่สุด ดังนั้นในการทดลองทั้งหมดต่อจากนี้ จะใช้ความขุ่นเซลล์สุดท้ายที่ 0.265 หรือคิดเป็นค่าความหนาแน่นของเซลล์ต่ออาหาร TAP ที่ใช้เป็น 3.75 มิลลิกรัม น้ำหนักเซลล์แห้งต่อ 25 มิลลิลิตรอาหาร TAP (ภาคผนวก ง)

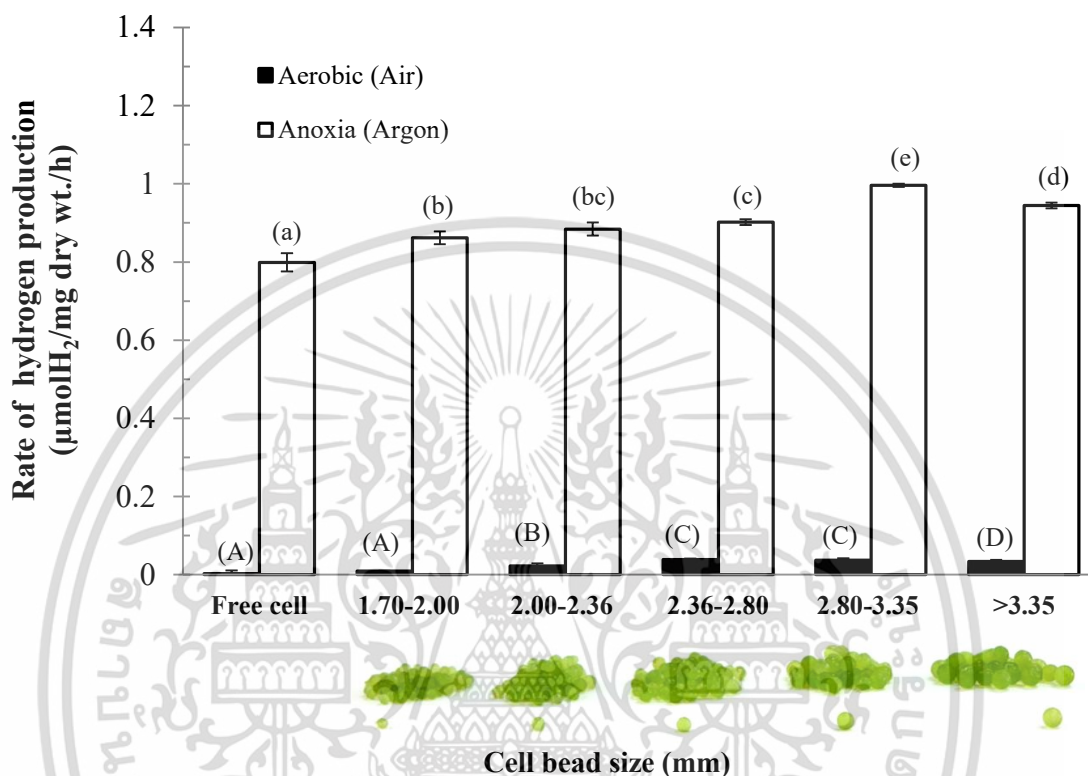
4.2 ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดอัลจินต์ที่ใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 เทียบกับเซลล์อิสระ

จากการศึกษาผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจินต์ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยทำการแปรผันขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในช่วง 1.70-2.00, 2.00-2.36, 2.36-2.80, 2.80-3.35 และมากกว่า 3.35 มิลลิเมตร และกำหนดความเข้มข้นของเซลล์เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมอัลจินต์ ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินต์เป็น 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร

ผลการทดลองในรูปที่ 4.4 เกิดจากการทำการทดลองแบบเดิมซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งผลการทดลองทั้ง 3 ครั้งล้วนแล้วแต่ให้ผลตรงกันว่า เซลล์ที่ตรึงในเม็ดอัลจินต์ขนาดใหญ่จะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ดีกว่าเม็ดอัลจินต์ขนาดเล็ก และเซลล์ตรึงที่บ่มภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าเซลล์ตรึงที่บ่มในสภาวะที่มีอากาศ เซลล์ตรึงในทุกขนาดจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่มากกว่าระบบเซลล์อิสระ โดยที่เซลล์ตรึงในเม็ดอัลจินต์ขนาด 2.80-3.35 มิลลิเมตรจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงที่สุด ซึ่งเมื่อบ่มเซลล์ตรึงในสภาวะที่ไล่อากาศและมีอากาศจะให้อัตราการผลิตคือ 0.9961 ± 0.0041 และ 0.0373 ± 0.0049 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ระบบเซลล์อิสระจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพียง 0.7992 ± 0.0232 และ 0.0112 ± 0.0021 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมงเท่านั้น ตามลำดับ สิ่งนี้ชี้ให้เห็นว่า การตรึงเซลล์ *Tetraspora* sp. ด้วยแคลเซียมอัลจินต์จะสนับสนุนให้เซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตราการผลิตที่สูงกว่าเซลล์อิสระ เมื่อพิจารณาถึงแนวโน้มของอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกันตามขนาดของเม็ดเซลล์อัลจินต์ พบว่า เม็ดเซลล์ตรึงอัลจินต์ขนาดเล็กควรที่จะช่วยให้เซลล์สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าเม็ดเซลล์ตรึงขนาดใหญ่ ด้วยเหตุที่เม็ดเซลล์ขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่มากกว่าเม็ดเซลล์ตรึงขนาดใหญ่ ดังนั้นจึงควรที่จะเอื้อให้เซลล์สามารถใช้แสงได้ในประสิทธิภาพที่สูงกว่า และนำมาซึ่งอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่มากกว่า แต่ผลการทดลองพบว่า เซลล์ตรึงในเม็ดอัลจินต์ขนาดใหญ่จะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ดีกว่าเม็ดอัลจินต์ขนาดเล็ก เหตุผลที่เป็นเช่นนี้เกิดขึ้นเนื่องจาก ขนาดของเม็ดอัลจินต์ที่มีขนาดแตกต่างกันจะมีพื้นที่ผิวของเม็ดอัลจินต์ที่ต่างกัน เซลล์ตรึงจึงสามารถสัมผัสกับแสงได้แตกต่างกันด้วย ซึ่งพื้นที่ผิวที่เซลล์ในเม็ดอัลจินต์ไปสัมผัสกับแสงจะมีผลโดยตรงต่อปริมาณอิเล็กตรอนและออกซิเจนที่เกิดจากระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 โดยผู้วิจัยได้นำเม็ดอัลจินต์ขนาดต่างๆ มาทำการคำนวณหาพื้นที่ผิวสัมผัสของเม็ดเซลล์ตรึงอัลจินต์ พบว่า ที่ขนาดของเซลล์ตรึงในช่วง 1.70-2.00, 2.00-2.36, 2.36-2.80, 2.80-3.35 และ >3.35 มิลลิเมตร (คิดพื้นที่ผิวที่รัศมีเฉลี่ย 3.85 มิลลิเมตร) เซลล์ตรึงจะมีพื้นที่ผิวสัมผัสคือ 3,668, 3,644, 2,950, 2,467 และ 2,547 ตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าเม็ดเซลล์ตรึงขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวสัมผัสที่มากที่สุด ในการที่จะให้โมเลกุลของออกซิเจนที่มีการปลดปล่อยออกมาจากระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 เข้าไปเกิดการแพร่และสัมผัสกับเซลล์ตรึงภายในเม็ดอัลจินต์ได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นเม็ดเซลล์ตรึงขนาดเล็กจึงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ต่ำกว่าเม็ดเซลล์ตรึงขนาดใหญ่ ในทำนองเดียวกัน เม็ดเซลล์ตรึงขนาดใหญ่จะมีพื้นที่ผิวสัมผัสที่จะให้โมเลกุลออกซิเจนแพร่เข้าไปสัมผัสกับเซลล์ตรึงได้น้อยกว่า การผลิตไฮโดรเจนของเม็ดเซลล์ตรึงอัลจินเตขนาดใหญ่จึงมีอัตราการผลิตที่สูงกว่า



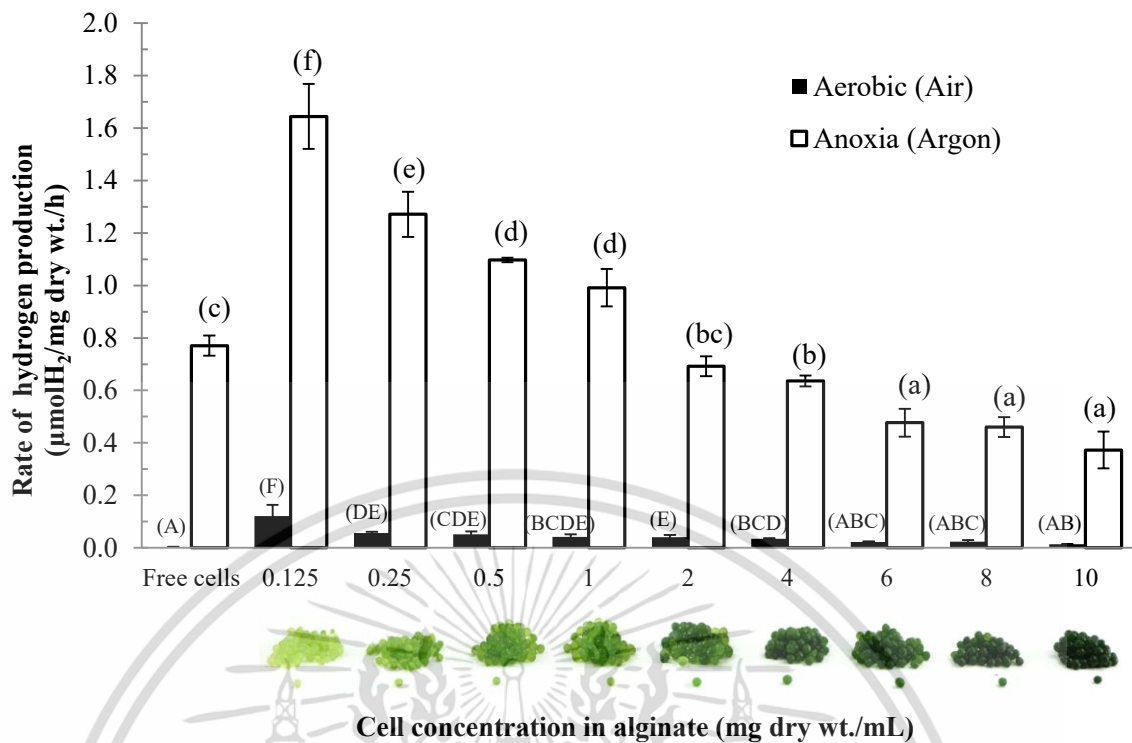
รูปที่ 4.4 ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดอัลจินเตที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p -value < 0.05))

และในการทดลอง ผู้วิจัยได้กำหนดให้ทุกขดมีเซลล์สำหรับยีสี่เขียวปริมาณเท่ากันคือ 3.75 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นจำนวนเม็ดอัลจินเตที่เกิดขึ้นจากการตรึงด้วยเม็ดขนาดใหญ่จึงมีจำนวนเม็ดน้อยกว่าระบบเม็ดเซลล์ตรึงขนาดเล็ก และด้วยจำนวนเม็ดของเซลล์ตรึงขนาดใหญ่ที่มีปริมาณน้อยกว่า จึงสามารถช่วยลดการเกิด cell stacking ทำให้แสงสามารถที่จะทะลุเข้าไปถึงเซลล์ได้อย่างทั่วถึงอย่างที่ควรจะเป็น (Maswana *et al.*, 2017) นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่าเม็ดเซลล์ตรึงขนาดเล็กจะสูญเสียประสิทธิภาพความเสถียรภาพเชิงกลไป (mechanical stability) (Bhujbal *et al.*, 2014) และจะสูญเสียแคลเซียมไอออนซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกิดพันธะเชื่อมขวางในระหว่างการขึ้นรูป (Thu *et al.*, 1996) ซึ่งสิ่งนี้จะไปมีผลทำให้ความแข็งแรงหรือความเสถียรของเม็ดเซลล์อัลจินตมีค่าลดลง จึงเป็นผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเม็ดเซลล์ตรึงขนาดเล็กมีค่าน้อยกว่าเซลล์ที่

ถูกตรึงในเม็ดอัลจินเตขนาดใหญ่ จากเหตุผลที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ตรึงที่ 2.80-3.35 มิลลิเมตร จะถูกใช้ในการทดลองส่วนต่อไป

4.3 ผลของความเข้มข้นของเซลล์ตรึงในอัลจินเตต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 เทียบกับเซลล์อิสระ

หลังจากที่ได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์เพื่อการผลิตไฮโดรเจนแล้ว ต่อไปผู้วิจัยจะทำการตรึงเซลล์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของเซลล์ที่ถูกตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยจะทำการแปรผันความเข้มข้นของเซลล์ตั้งแต่ 0.125 ถึง 10 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตรของอัลจินเต โดยใช้ความเข้มข้นของอัลจินเตเป็น 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้คือ 2.80-3.35 มิลลิเมตร ผลการทดลองพบว่า (รูปที่ 4.5) พบว่า เมื่อทำการบ่มเซลล์ตรึงภายใต้สภาวะที่โล่อากาศและมีอากาศ อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเซลล์ในเม็ดอัลจินเตสูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของเซลล์ในเม็ดอัลจินเตที่ 0.125 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตรของอัลจินเตจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ซึ่งแตกต่างจากค่าอื่นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเซลล์ตรึงที่บ่มภายใต้สภาวะโล่อากาศจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนคือ 1.6446 ± 0.1234 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง ในขณะที่ระบบเซลล์อิสระจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพียง 0.7705 ± 0.0387 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมงเท่านั้น ซึ่งจะเห็นว่า การตรึงเซลล์สามารถช่วยให้เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าการไม่ตรึงเซลล์ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และการตรึงเซลล์โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ในเม็ดอัลจินเตเป็น 0.125 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตรของอัลจินเตจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าการตรึงที่ความเข้มข้นอื่นๆถึง 23-77 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการบ่มเซลล์ในสภาวะที่มีอากาศ พบว่าเซลล์ตรึงจะผลิตไฮโดรเจนในอัตราการผลิตเท่ากับ 0.1205 ± 0.0436 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง ในขณะที่ระบบเซลล์อิสระจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเข้าใกล้ศูนย์ ซึ่งอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ได้จากเซลล์ตรึงในสภาวะที่มีอากาศนี้เป็นผลการทดลองที่ยืนยันได้ชัดเจนว่า การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยอัลจินเตสามารถที่จะช่วยจำกัดการแพร่และกีดกันโมเลกุลของออกซิเจนที่จะแพร่ผ่านเข้ามายังเซลล์ได้ ดังเช่นที่พบในการตรึงสาหร่ายสีเขียวด้วยอัลจินเตใน *C. reinhardtii* CC-124 (Kosourov *et al.*, 2009)



รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนตที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p -value < 0.05))

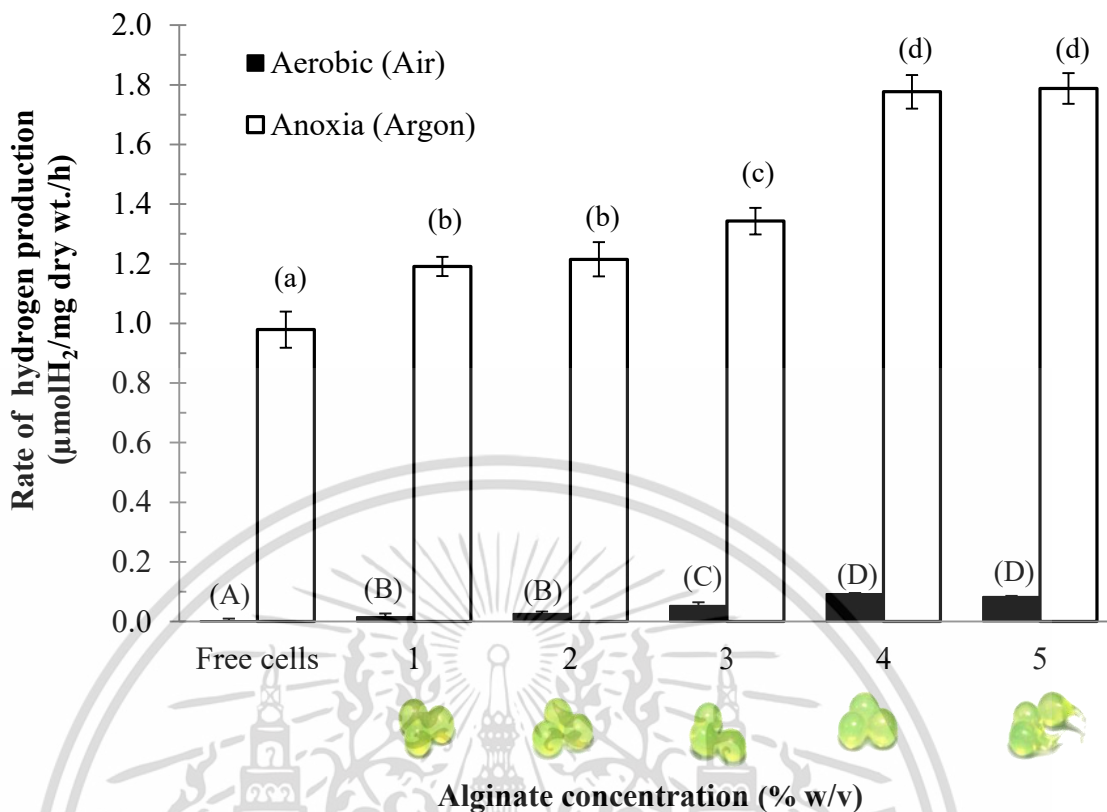
สำหรับเหตุผลของการที่อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเซลล์ในเม็ดอัลจิเนตสูงขึ้นนั้น เป็นเพราะที่ความเข้มข้นของเซลล์มากๆ จะเกิดการบดบังแสงจากเซลล์ที่อยู่บนพื้นผิวของเม็ดอัลจิเนต ทำให้เซลล์ที่อยู่ภายในแกนกลางของเม็ดได้รับแสงลดลง ดังนั้นยิ่งความเข้มข้นของเซลล์ในเม็ดอัลจิเนตมีมากขึ้น การบดบังแสงของเซลล์ก็จะมีมากขึ้น เป็นผลทำให้ระบบการสังเคราะห์ที่ 2 ได้รับแสงไม่เพียงพอที่จะใช้ในการแยกสลายโมเลกุลของน้ำ เพื่อให้ได้อิเล็กตรอนสำหรับนำไปใช้ในขั้นการผลิตไฮโดรเจน (Das *et al.*, 2001) อัตราการผลิตไฮโดรเจนจึงลดลงในเวลาต่อมา นอกจากนี้แล้ว ความเข้มข้นของเซลล์ที่มากจะไปลดความเสถียรภาพเชิงกลของเม็ดอัลจิเนต (Liouni *et al.*, 2008; Antal *et al.*, 2016) รวมทั้งทำให้เม็ดอัลจิเนตมีความพรุนเพิ่มสูงขึ้น (porosity) (Anjana *et al.*, 2014) ด้วยเหตุนี้โมเลกุลของออกซิเจนจึงสามารถแพร่ผ่านเข้าไปยังเซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดอัลจิเนตได้โดยง่าย (Kosourov *et al.*, 2009; Smidsrod *et al.*, 1990) โดยโมเลกุลออกซิเจนจะไปมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดน้อยลง ซึ่งผลการทดลองเช่นนี้มีความคล้ายคลึงกับสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 (Kosourov *et al.*, 2009) และไซยาโนแบคทีเรีย *L. pereregens* (Antal *et al.*, 2016) ที่ถูกตรึงในอัลจิเนต

4.4 ผลของความเข้มข้นของอัลจินเนตที่ใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 เทียบกับเซลล์อิสระ

หลังจากที่ได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และความเข้มข้นของเซลล์ในเม็ดอัลจินเนตที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์เพื่อการผลิตไฮโดรเจนแล้ว ต่อไปผู้วิจัยจะทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของอัลจินเนตต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยจะทำการแปรผันความเข้มข้นของอัลจินเนตตั้งแต่ 1 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร โดยใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความเข้มข้นเซลล์ในเม็ดอัลจินเนตที่ดีที่สุดจากการทดลองก่อนหน้านี้คือ 2.80-3.35 มิลลิเมตร และ 0.125 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อ มิลลิตรของอัลจินเนต ตามลำดับ ทำการศึกษาทั้งในสภาวะที่ไล่อากาศและมีอากาศ ผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของอัลจินเนตที่ใช้มีค่ามากขึ้น เซลล์ตรึงจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้น

ผลการทดลองรูปที่ 4.6 เกิดจากการทำการทดลองแบบเดิมซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งผลการทดลองทั้ง 3 ครั้งล้วนแล้วแต่ให้ผลที่ตรงกันว่า เซลล์ที่ถูกตรึงในทุกๆ ความเข้มข้นของอัลจินเนตจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าเซลล์อิสระทั้งหมด โดยที่ความเข้มข้นของอัลจินเนตที่ 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร เซลล์ตรึงจะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด รองลงมาคือความเข้มข้นอัลจินเนตที่ 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และความเข้มข้นอัลจินเนตที่ 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร จะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่น้อยที่สุด ซึ่งพบผลการทดลองในลักษณะนี้ทั้งการบ่มในสภาวะที่ไล่อากาศและมีอากาศ โดยการบ่มเซลล์ตรึงในสภาวะที่ไล่อากาศจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่มากกว่าการบ่มเซลล์ตรึงในสภาวะที่มีอากาศ

เหตุผลที่ความเข้มข้นของอัลจินเนตที่มีค่าสูง จะช่วยให้เซลล์ตรึงมีอัตราการผลิตที่สูงกว่าความเข้มข้นอัลจินเนตค่าต่ำๆ นั้น เนื่องจาก การตรึงเซลล์ด้วยอัลจินเนตจะช่วยลดอัตราการแพร่และจำกัดปริมาณการแพร่ของออกซิเจนจากอากาศไปสู่เซลล์ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งไม่เสถียรเมื่อสัมผัสกับออกซิเจน จะมีโอกาสที่สัมผัสกับออกซิเจนได้น้อยลง เป็นผลทำให้เซลล์มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น (Kosourov *et al.*, 2009) ซึ่งความเข้มข้นของอัลจินเนตจะมีความสัมพันธ์กับขนาดรูพรุนเฉลี่ยของอัลจินเนต กล่าวคือ ถ้าความเข้มข้นของอัลจินเนตมีค่ามาก ขนาดรูพรุนเฉลี่ยก็จะยิ่งมีขนาดเล็กลง (Georgia *et al.*, 2014; Simpliciano C. *et al.*, 2013) ซึ่งขนาดรูพรุนของอัลจินเนตที่มีขนาดเล็กนี้ จะไปช่วยเพิ่มการขัดขวางหรือจำกัดปริมาณการแพร่ของออกซิเจนไปยังเซลล์ที่ถูกตรึงอยู่ในเม็ดอัลจินเนตได้ โดยข้อมูลขนาดรูพรุนของอัลจินเนตที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ได้มีการทำการศึกษารายงานผลเอาไว้โดย Simpliciano C. *et al.* (2013) และ Georgia K. *et al.* (2014) โดยพบว่า เมื่อความเข้มข้นของอัลจินเนตเป็น 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เม็ดอัลจินเนตจะมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเป็น 6.50, 5.00, 4.68, 4.49 และ 3.80 นาโนเมตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p -value < 0.05) รูปภาพใต้แกน x จะแสดงถึงลักษณะของเม็ดอัลจิเนตที่ความเข้มข้นอัลจิเนตค่าต่างๆ โดยความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ 1 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ เม็ดอัลจิเนตจะมีลักษณะทรงกลม และที่ความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เม็ดอัลจิเนตจะมีลักษณะเป็นทรงกลมแต่จะมีส่วนทางต่อออกมา

โดยเมื่อความเข้มข้นของอัลจิเนตมากขึ้น ขนาดรูพรุนของเม็ดอัลจิเนตก็จะมีขนาดเล็กลง โดยที่ความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรจะมีขนาดรูพรุนเล็กที่สุด ซึ่งจะช่วยจำกัดการแพร่ของโมเลกุลออกซิเจนได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการพิจารณาขนาดรูพรุนของอัลจิเนตเทียบกับขนาดโมเลกุลของออกซิเจน จะพบว่า โมเลกุลออกซิเจนจะมีขนาดโมเลกุลเฉลี่ยในช่วง 0.347 (Niwa M. *et al.*, 1991) ถึง 0.358 นาโนเมตร (Hirschfelder *et al.*, 1954) ซึ่งจะเห็นว่าโมเลกุลของออกซิเจนนั้นจะมีขนาดเล็กกว่าขนาดรูพรุนของเม็ดอัลจิเนต ดังนั้นโมเลกุลของออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 จะสามารถที่จะแพร่ผ่านออกจากวัสดุตรึงอัลจิเนตมายังอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ภายนอกวัสดุตรึงได้ด้วย partial pressure ของออกซิเจนที่แพร่จากความเข้มข้นสูงไปยังความเข้มข้นต่ำ แต่การซ้อนทับของรูพรุนในแต่ละชั้นของลายประสานในเม็ดอัลจิเนต อาจจะยังคงมีผลช่วยลดโอกาสที่โมเลกุลออกซิเจนจะแพร่ผ่านกลับเข้าไปสัมผัสกับเซลล์

ที่ถูกตรึงในเม็ดอัลจิเนตได้อยู่ ซึ่งสิ่งนี้ถูกยืนยันด้วยผลการทดลองในรูปที่ 4.6 ว่าในสภาวะการบ่มแบบเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

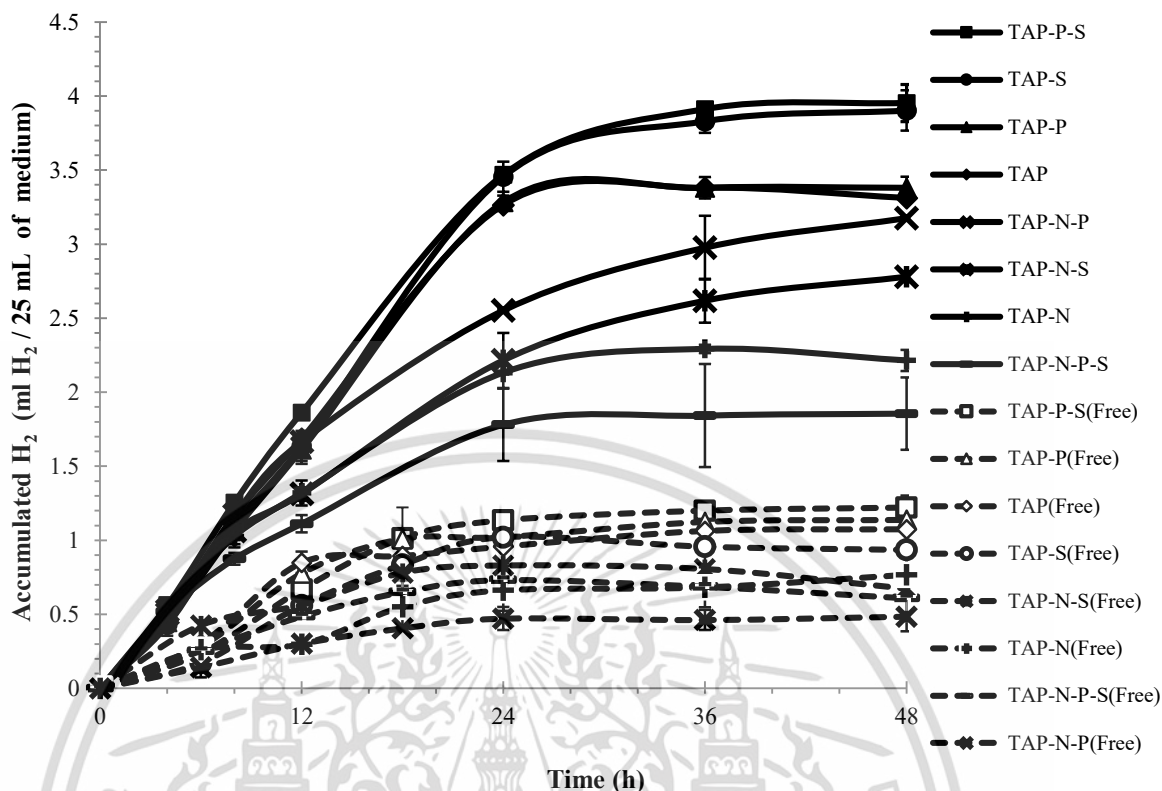
มีอากาศ ระบบเซลล์อิสระจะมีการผลิตไฮโดรเจนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งนั่นอาจเป็นเพราะโมเลกุลออกซิเจนสามารถเข้าไปสัมผัสกับเซลล์ได้โดยตรง ทำให้มีผลไปยังยังการทำงานในการผลิตไฮโดรเจนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ในขณะที่เซลล์ที่ถูกตรึงในอัลจินเตตที่ความเข้มข้นที่ 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรจะผลิตไฮโดรเจนได้ 0.0923 ± 0.0036 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอัลจินเตตที่ใช้ตรึงเซลล์นั้น สามารถที่ช่วยขัดขวางและจำกัดการแพร่ของโมเลกุลของออกซิเจนไปสู่เซลล์ได้ ส่วนในสภาวะการบ่มแบบใล่อากาศ ระบบเซลล์อิสระจะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพียง 0.7789 ± 0.0605 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจินเตตที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร จะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนอยู่ที่ 1.7766 ± 0.0567 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่มากกว่าเซลล์อิสระประมาณ 3 เท่า

จากที่กล่าวมาทั้งหมด จึงสามารถสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของอัลจินเตตที่ 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรนี้จะช่วยส่งเสริมให้เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ดีที่สุด โดยความเข้มข้นที่น้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ เซลล์จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ลดลง ดังนั้นการตรึงเซลล์เพื่อการผลิตไฮโดรเจนในงานวิจัยนี้ ความเข้มข้นของอัลจินเตตที่ 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรจะยังคงถูกใช้ในการตรึงเซลล์ในการทดลองส่วนต่อไป

4.5 ผลของการขาดธาตุอาหารหลักที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

จากผลการทดลองในส่วนก่อนหน้าทำให้ทราบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดอัลจินเตตที่ 2.80 – 3.35 มิลลิเมตร ความเข้มข้นของเซลล์อัลจินเตตที่ 0.125 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร อัลจินเตต และความเข้มข้นของอัลจินเตตที่ร้อยละ 4 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในส่วนถัดมาผู้วิจัยจึงได้นำสภาวะที่เหมาะสมที่สุดดังกล่าวนี้มาทำการตรึงเซลล์แล้วถ่ายโอนเซลล์ตรึงลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรแตกต่างกันเพื่อศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยจะทำการแปรผันชนิดของอาหารที่ขาดธาตุอาหารหลัก เป็นอาหาร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ (TAP-S) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (TAP-N-P) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ (TAP-N-S) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์ (TAP-P-S) และอาหาร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์ (TAP-N-P-S) โดยจะใช้อาหาร TAP ปกติที่มีธาตุอาหารหลักครบถ้วนเป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งผลของการขาดธาตุอาหารหลักของระบบเซลล์อิสระที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนก็จะถูกศึกษาควบคู่ไปพร้อมกับระบบเซลล์ตรึง และจะทำการศึกษาทั้งในสภาวะที่ใล่อากาศ (รูปที่ 4.7) และสภาวะที่มีอากาศ (4.10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

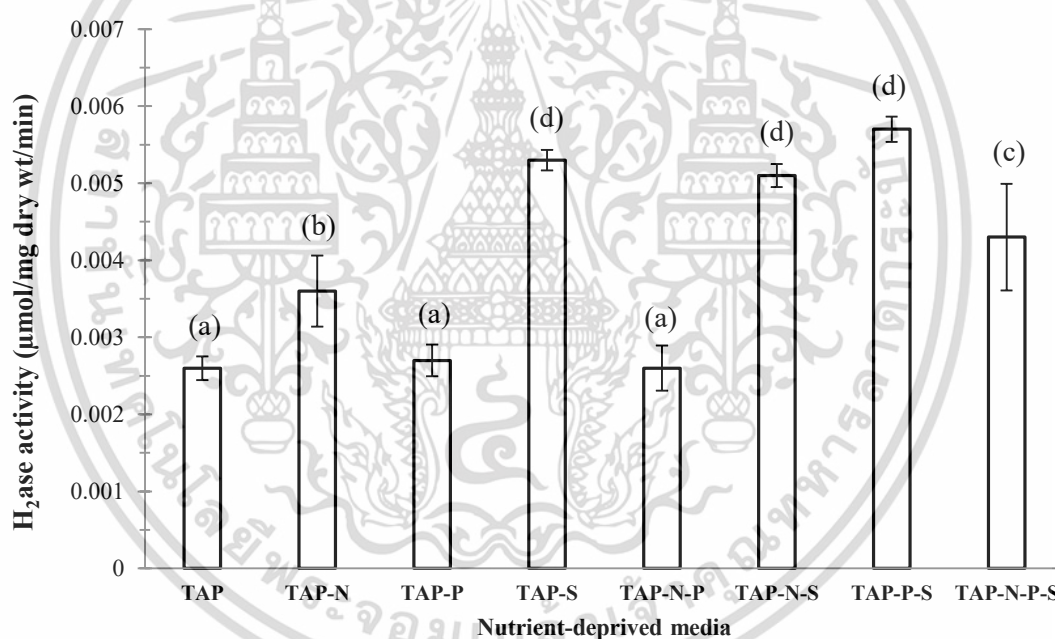


รูปที่ 4.7 ผลของการขาดธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือซัลเฟอร์) ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของระบบเซลล์อิสระและระบบเซลล์ตรึง ภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศ (anoxic condition)

รูปที่ 4.7 แสดงถึงผลของการขาดธาตุอาหารหลักที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง (เส้นทึบ) เทียบกับระบบเซลล์อิสระ (เส้นประ) ภายใต้สภาวะการบ่มที่ไล่อากาศ ผลการทดลองนี้เกิดขึ้นจากการทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ผลการทดลองที่ได้ค่อนข้างมีความน่าสนใจ เนื่องจากสภาวะที่ขาดธาตุอาหารของเซลล์ตรึงทั้งหมดจะให้ปริมาณไฮโดรเจนที่สะสมในระบบมากกว่าเซลล์อิสระ โดยในระบบเซลล์ตรึง เซลล์จะผลิตไฮโดรเจนได้นานถึง 36 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์อิสระจะผลิตไฮโดรเจนได้เพียง 24 ชั่วโมงเท่านั้น โดยเซลล์ตรึงที่อยู่ในอาหาร TAP ปกติและอาหาร TAP-P จะให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมอยู่ที่ 3.3791 ± 0.0881 และ 3.3806 ± 0.0701 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่มากที่สุดจะพบในการบ่มด้วยอาหาร TAP-P-S และ TAP-S คือ 3.9103 ± 0.0342 และ 3.8298 ± 0.0790 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ โดยทั้ง 2 ค่านี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี และเมื่อเทียบปริมาณไฮโดรเจนที่สะสมนี้กับระบบเซลล์อิสระจะพบว่า การบ่มเซลล์ตรึงใน TAP-P-S และ TAP-S จะให้ปริมาณไฮโดรเจนที่สะสมในระบบมากกว่าเซลล์ตรึงในอาหาร TAP ปกติถึง 1.2 เท่า และมากกว่าเซลล์อิสระถึง 3.5 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว นั้น โดยส่วนใหญ่จะขึ้นกับปัจจัยหลัก 3 อย่าง อย่างแรกคือความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase activity) ถ้าเอนไซม์มีกิจกรรมมาก เซลล์ก็ควรที่จะผลิตไฮโดรเจนได้ดี แต่อย่างไรก็ตามก็ต้องขึ้นกับปัจจัยหลักอย่างที่สองด้วย นั่นคือปริมาณสับสเตรตที่ป้อนเข้าเอนไซม์ ได้แก่ อิเล็กตรอนและโปรตอน และอย่างสุดท้ายก็คือปริมาณออกซิเจน ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การทำงานของเอนไซม์ โดยระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 จะเป็นตัวที่ควบคุมปริมาณของอิเล็กตรอน โปรตอน และออกซิเจน กล่าวคือ ถ้าระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 ทำงานได้ดี อิเล็กตรอนซึ่งเป็นสับสเตรตสำคัญที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนก็จะมาก แต่อย่างไรก็ตามปริมาณออกซิเจนที่เกิดขึ้นในระบบก็จะมากตามไปด้วย ในทางกลับกัน ถ้าระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 เกิดได้น้อย ปริมาณออกซิเจนซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ในระบบก็จะเกิดได้น้อย แต่ปริมาณอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นในระบบก็จะน้อยตามไปด้วย ด้วยเหตุนี้ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยก็ได้ทำการศึกษาการติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และทำการศึกษาปริมาณออกซิเจนสุทธิจากระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 ด้วย โดยปริมาณออกซิเจนสุทธินี้สามารถที่จะบอกถึงกิจกรรมของระบบการสังเคราะห์ที่ 2 ได้ในทางอ้อม

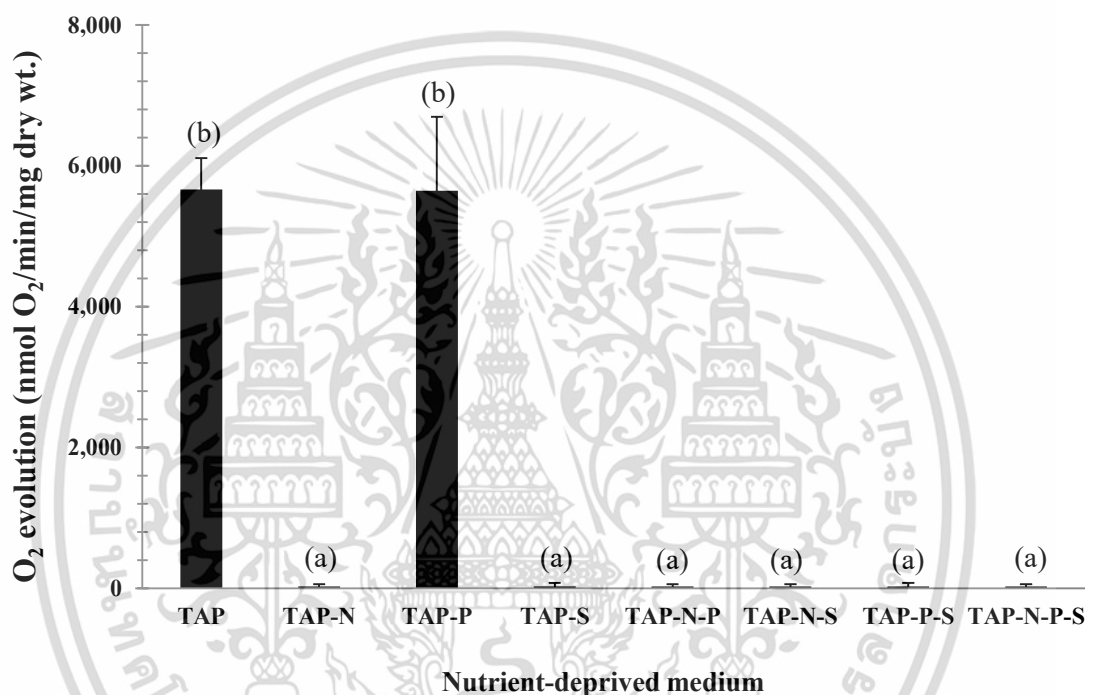


รูปที่ 4.8 ผลของการขาดธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือซัลเฟอร์) ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p -value < 0.05))

สำหรับการติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของเซลล์สาหร่ายที่อยู่ในอาหารที่ขาดธาตุอาหารหลักที่แตกต่างกัน โดยจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 5 นาที (ผลการทดลองเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแสดงในภาคผนวก ฉ-1) โดยเมื่อพิจารณาผลการทดลองรูปที่ 4.8 จะเห็นว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP จะไม่ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากเซลล์ใน

อาหาร TAP-P และ TAP-N-P แต่เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ขาดซัลเฟอร์ ไม่ว่าจะป็น TAP-S, TAP-N-S, ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TAP-P-S และ TAP-N-P-S เซลล์จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่สูงมากกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-P และ TAP-N-P โดยเฉพาะเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-P-S และ TAP-S พบว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะมีกิจกรรมในการทำงาน (hydrogenase activity) ที่มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลปริมาณไฮโดรเจนสะสม (รูปที่ 4.7) ซึ่งพบว่ามีปริมาณไฮโดรเจนสูงสุดเช่นกัน ดังนั้น จึงสามารถสามารถสรุปว่า การบ่มเซลล์ในกลุ่มอาหารที่ขาดธาตุซัลเฟอร์จะสามารถช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้



รูปที่ 4.9 ผลของการขาดธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือซัลเฟอร์) ที่มีต่อปริมาณออกซิเจนจากระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 ของเซลล์สำหรับยีสี่เขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p -value < 0.05)

รูปที่ 4.9 แสดงถึงผลของการขาดธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือซัลเฟอร์) ที่มีต่อปริมาณออกซิเจนสุทธิจากระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 โดยพบว่าเมื่อเซลล์อยู่ในอาหาร TAP-P-S, TAP-S และอาหาร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจนทั้งหมด (TAP-N, TAP-N-P, TAP-N-S และ TAP-N-P-S) ปริมาณออกซิเจนสุทธิที่เซลล์ปลดปล่อยออกมาจากกิจกรรมของการสังเคราะห์แสงที่ 2 จะมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ ระบบการสังเคราะห์แสงของเซลล์ที่บ่มอยู่ในอาหารที่ขาดธาตุอาหารดังที่กล่าวข้างต้นนี้ได้ถูกยับยั้งไปเรียบร้อยแล้ว ส่วนเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ปกติ และ TAP-P เซลล์จะมีการปลดปล่อยออกซิเจนสุทธิสูงสุด ซึ่งมีค่าไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นดูเหมือนว่าการไม่ขาดธาตุใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขาดธาตุฟอสฟอรัสเพียงอย่างเดียวจะไม่มีผลต่อการทำงานของระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 ซึ่งสอดคล้องไปกับผลของการเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหาร TAP-P ที่ไม่แตกต่างจากอาหาร TAP ปกติ ดังที่ได้เคยศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ (Maswana *et al.*, 2017)

ดังนั้นจึงสามารถกล่าวโดยสรุปได้ว่า การที่เซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. ที่บ่มในอาหาร TAP-P-S และ TAP-S สามารถผลิตไฮโดรเจนสะสมได้มากที่สุด ภายใต้สภาวะที่โล่อากาศ นั้นเป็นเพราะการขาดธาตุซัลเฟอร์จะเป็นสาเหตุทำให้ระบบการสังเคราะห์ที่ 2 บางส่วนและการผลิตออกซิเจนของเซลล์ถูกยับยั้งไป (Melis *et al.*, 2002; Melis *et al.*, 2007) ซึ่งสิ่งนี้ถูกยืนยันด้วยผลการทดลองในรูปที่ 4.9 โดยผลการทดลองนี้จะคล้ายคลึงผลการวิจัยที่ได้ทำการศึกษาในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* (Laurinavichene *et al.*, 2006; Kosourov *et al.*, 2007; Skjånes *et al.*, 2008; Tsygankov *et al.*, 2006; Kosourov *et al.*, 2009) และ *P. Subcordiformis* (Guan *et al.*, 2004) เหตุผลที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดอะมิโนซิสเทอีนและเมไทโอนีน โดยกรดอะมิโนเหล่านี้จะเป็นส่วนประกอบสำคัญของโปรตีน D1 ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญที่ทำหน้าที่เป็นศูนย์กลางในการควบคุมการทำงาน (reaction center) ของระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 (Melis *et al.*, 2002; Melis *et al.*, 2007) ดังนั้น เมื่อเซลล์ถูกบ่มในอาหารที่ปราศจากซัลเฟอร์ จะส่งผลทำให้การสังเคราะห์โปรตีน (Protein biosynthesis) ระบบการซ่อมแซมโปรตีน (Protein repair cycle) และระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 ถูกยับยั้ง เป็นผลทำให้เซลล์มีอัตราการผลิตออกซิเจนน้อยกว่าอัตราการใช้ออกซิเจนในการหายใจของเซลล์ (cellular respiration) (Tsygankov *et al.*, 2006) ด้วยเหตุนี้ สภาวะการบ่มจะเปลี่ยนเข้าสู่สภาวะที่ไร้ออกซิเจน และเหนี่ยวนำทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีการแสดงออกและมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีขึ้น (Ghirardi *et al.*, 2000; Melis *et al.*, 2000)

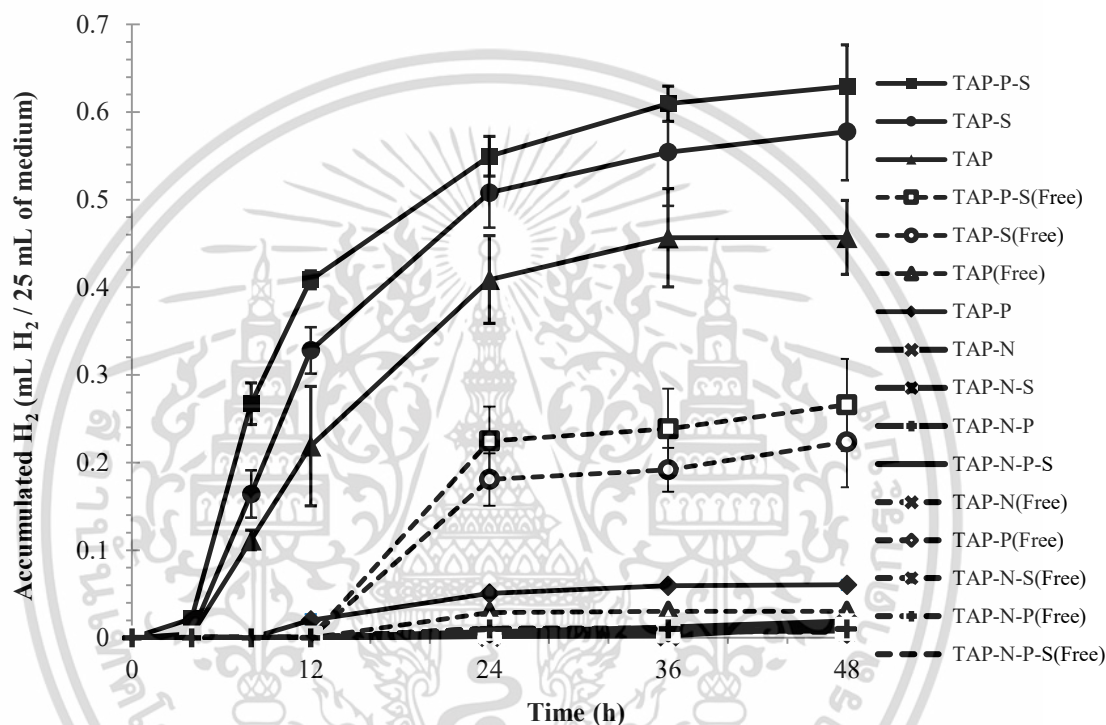
นอกจากนั้น การขาดธาตุซัลเฟอร์หรือทั้งฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์จะช่วยทำให้เมทาบอลิซึมภายในเซลล์เปลี่ยนไปในทิศทางที่ช่วยสนับสนุนให้เซลล์เกิดการสะสมแป้งได้มากขึ้น อย่างเช่น ที่พบใน *C. reinhardtii* CC-125 โดยเซลล์สาหร่ายสีเขียวจะมีการสะสมแป้งเพิ่มขึ้น 10 เท่า (Batyrova *et al.*, 2012; Melis *et al.*, 2007) ซึ่งแป้งเองก็เป็นสารตั้งต้นที่สามารถถูกสลายในกระบวนการแคทาบอลิซึมผ่านกระบวนการไกลโคไลซิสและจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เป็นผลทำให้เซลล์มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น

สำหรับการบ่มเซลล์เพื่อผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีอากาศนั้น (รูปที่ 4.10) ผลการทดลองนี้เกิดขึ้นจากการทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง โดยสภาวะที่ขาดธาตุอาหารของเซลล์ตรึงในอาหาร TAP-P-S, TAP-S และ TAP ปกติ จะให้ปริมาณไฮโดรเจนที่สะสมในระบบมากกว่าเซลล์อิสระที่บ่มในอาหาร TAP-P-S และ TAP-S ส่วนเซลล์ตรึงที่อยู่ในอาหารที่ขาดธาตุอาหารทั้งหมดนอกจากที่กล่าวนี้ จะผลิตไฮโดรเจนได้น้อยกว่าเซลล์อิสระที่บ่มในอาหาร TAP-P-S และ TAP-S โดยในระบบเซลล์ตรึงเซลล์จะผลิตไฮโดรเจนได้นานถึง 36 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์อิสระจะผลิตไฮโดรเจนได้เพียง 24 ชั่วโมงเท่านั้น เซลล์ตรึงที่บ่มในอาหาร TAP-P-S และ TAP-S จะให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่สูงที่สุดอยู่ที่

0.6096 ± 0.0201 และ 0.5543 ± 0.0615 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ปกติจะให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมอยู่เพียง 0.4566 ± 0.0560 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะเห็นว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-P-S และ TAP-S จะผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าอาหาร TAP ปกติถึง 1.3 เท่า และมากกว่าเซลล์อิสระในอาหารชนิดเดียวกันถึง 3.5 และ 2.4 เท่า ตามลำดับ ส่วนเซลล์ในอาหารที่ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N, TAP-N-P, TAP-N-S และ TAP-N-P-S) จะผลิตไฮโดรเจนได้น้อยกว่าอาหาร TAP ปกติทั้งในระบบเซลล์ที่ตรึงและระบบเซลล์อิสระ



รูปที่ 4.10 ผลของการขาดธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือซัลเฟอร์) ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของระบบเซลล์อิสระและระบบเซลล์ที่ตรึง ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (aerobic condition)

โดยจากรูปที่ 4.10 จะเห็นว่าผลของการขาดธาตุอาหารที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ที่ตรึงและเซลล์อิสระจะให้ผลไปในลักษณะเดียวกันกับการบ่มเซลล์ในสภาวะที่ไร้อากาศ ดังนั้นคำอธิบายที่เกี่ยวข้องกับผลของการขาดธาตุอาหารในส่วนนี้ทั้งหมด จะเป็นไปดังที่อธิบายไว้แล้วในข้างต้น

4.6 ผลของการนำสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนต และผลิตไฮโดรเจนแล้วกลับมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่

หลังจากที่ทราบสภาวะที่ใช้ในการตรึงเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. แล้ว ในส่วนถัดมา หลังจากเซลล์ผลิตไฮโดรเจนเอกสารนี้ อิมตัวแล้วในรอบการผลิตแรก เซลล์จะกลับเข้าสู่ขั้นการสังเคราะห์แสง (stage I) เพื่อปรับสภาพเซลล์ไม่ให้ว่การณเิดยั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยการเปลี่ยนอาหารจาก TAP-S และ TAP-P-S เป็นอาหาร TAP ปกติ ทำการแปรผันระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์ในขั้นการสังเคราะห์แสง (stage I) เป็น 24, 1 และ 0 ชั่วโมงก่อนที่จะเปลี่ยนสถานะเข้าสู่การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ใหม่ (stage II) อีกครั้ง โดยจะแปรผันระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์เฉพาะการบ่มภายใต้สภาวะที่โล่อากาศเท่านั้น โดยหลังจากที่ทราบเวลาที่เหมาะสมที่เซลล์ใช้ปรับสภาพแล้ว จึงจะทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ใหม่ในสภาวะที่มีอากาศ โดยทั้ง 2 สภาวะการบ่มจะใช้เซลล์อิสระในอาหารชนิดนั้นๆเป็นตัวเปรียบเทียบ

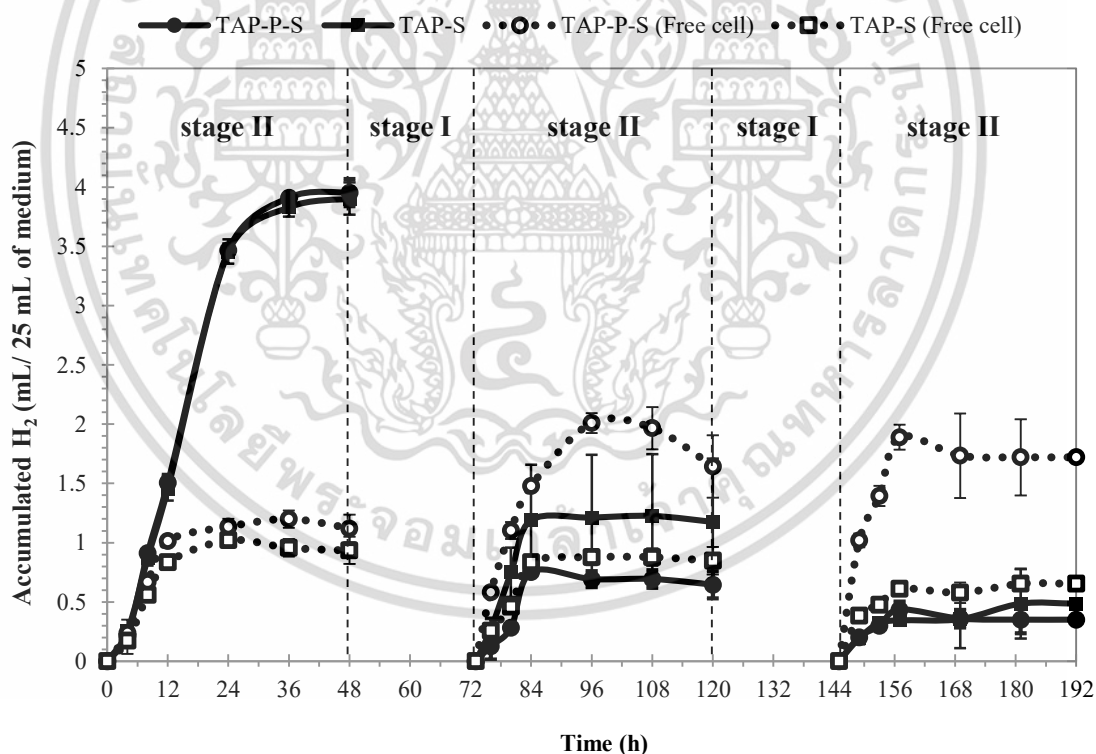
4.6.1 ผลการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ใหม่ของเซลล์ *Tetraspora* sp. ในสภาวะที่โล่อากาศ

จากการทดลองเมื่อทำการแปรผันเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพเซลล์ในขั้นการสังเคราะห์แสง (stage I) เป็น 24, 1 และ 0 ชั่วโมง ก่อนที่จะเปลี่ยนสถานะเข้าสู่การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ใหม่ (stage II) ผลการทดลองพบว่า ปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์ทั้งหมดที่ผลิตได้ของเซลล์สาหร่ายที่ถูกตรึงในอัลจินตมีค่าสูงกว่าระบบเซลล์อิสระ ทั้งการใช้ระยะเวลาฟื้นฟูเซลล์เป็น 24, 1 และ 0 ชั่วโมง

ณ ระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.11) เซลล์ตรึงที่ถูกบ่มด้วยอาหารที่ขาดซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส (TAP-P-S) จะเริ่มสูญเสียความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์เมื่อเข้าสู่การผลิตรอบที่ 2 โดยความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์จะลดลงอย่างรวดเร็วถึง 6 เท่าเมื่อเทียบกับการผลิตในรอบที่ 1 ซึ่งจะผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ไม่แตกต่างจากระบบเซลล์อิสระ สำหรับเซลล์ตรึงที่บ่มในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์เพียงอย่างเดียว (TAP-S) ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์จะลดลง 1.5 เท่าในการผลิตรอบที่ 2 ส่วนในการผลิตรอบที่ 3 ระบบเซลล์ตรึงและระบบเซลล์อิสระจะผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน โดยเซลล์ตรึงจะสามารถผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้อย่างน้อย 3 รอบจากการใช้เซลล์เต็ม และเมื่อทำการคำนวณปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์ทั้งหมดจากการผลิตซัลไฟด์ใหม่ 2 รอบ เซลล์ตรึงที่บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP-S จะให้ปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์คือ 5.0767 ± 0.6703 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนเซลล์ตรึงและระบบเซลล์อิสระที่บ่มในอาหาร TAP-P-S จะให้ปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์ทั้งหมดคือ 4.5975 ± 0.2291 และ 2.7638 ± 0.3782 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อิสระที่บ่มในอาหาร TAP-S จะผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ทั้งหมดเพียง 1.7823 ± 0.2292 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น ซึ่งจะเห็นว่าระบบเซลล์ตรึงที่บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP-S จะผลิตแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์มากกว่าระบบเซลล์อิสระเกือบ 3 เท่า ดังนั้นจึงสามารถกล่าวโดยสรุปได้ว่า ปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์ทั้งหมดที่มากที่สุดจากการฟื้นฟูเซลล์โดยใช้ระยะเวลา stage I เป็น 24 ชั่วโมงจะพบในสภาวะที่บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP-S ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.0767 ± 0.6703 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตามดูเหมือนว่าการนำเซลล์กลับเข้าสู่ขั้นการสังเคราะห์แสงที่ 24 ชั่วโมงนี้จะไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ เนื่องจากเมื่อเซลล์ถูกเปลี่ยนกลับเข้าสู่ขั้นการสังเคราะห์แสง เซลล์จะถูกเปลี่ยน

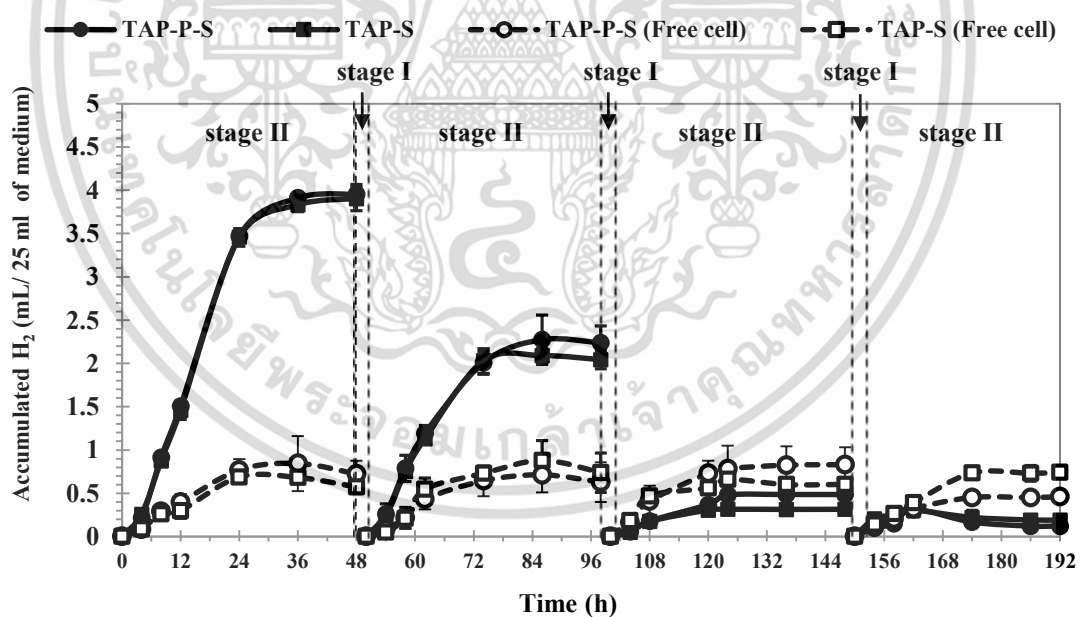
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสภาวะที่ขาดธาตุอาหารกลับเข้าสู่สภาวะที่มีธาตุอาหารอุดมสมบูรณ์ ดังนั้น เซลล์จะดูดซึมเอาธาตุอาหารที่จำเป็นจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ไปใช้ในการเจริญเติบโต ยังมีขั้นการสังเคราะห์แสงนาน เซลล์ก็ยังสามารถดูดซึมอาหารไปใช้ได้มากกว่า ทำให้เซลล์ที่ถูกตรึงในอัลจินตเกิดการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มาก เป็นผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ในเม็ดอัลจินตมีค่าสูงขึ้น โดยค่าความเข้มข้นของเซลล์ในอัลจินตที่มากขึ้น จะทำให้เกิดการบดบังแสงของเซลล์ (cell stacking) ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลต่อความมีรูพรุนของเม็ดเซลล์ตรึงอัลจินตที่เพิ่มสูงขึ้น ดังที่ได้อธิบายไปแล้วในผลการทดลองรูปที่ 4.5 นอกจากนั้นแล้ว ปริมาณของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นยังส่งผลทำให้การย่อยสลายอะซีเตตจากอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นได้รวดเร็ว ซึ่งสิ่งนี้จะไปมีผลจำกัดกระบวนการหายใจโดยใช้ออกซิเจนของเซลล์ (cellular respiration) เป็นผลให้ปริมาณออกซิเจนภายในเซลล์ (intracellular of oxygen) เพิ่มขึ้น และไปมีผลยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในภายหลัง (Kaushik *et al.*, 2011; Anjana *et al.*, 2014) ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาลักษณะของการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ของเซลล์ตรึงโดยจะทำการศึกษาโดยลดระยะเวลาของขั้นสังเคราะห์แสง (stage I) ลงจาก 24 ชั่วโมงเป็น 1 ชั่วโมง



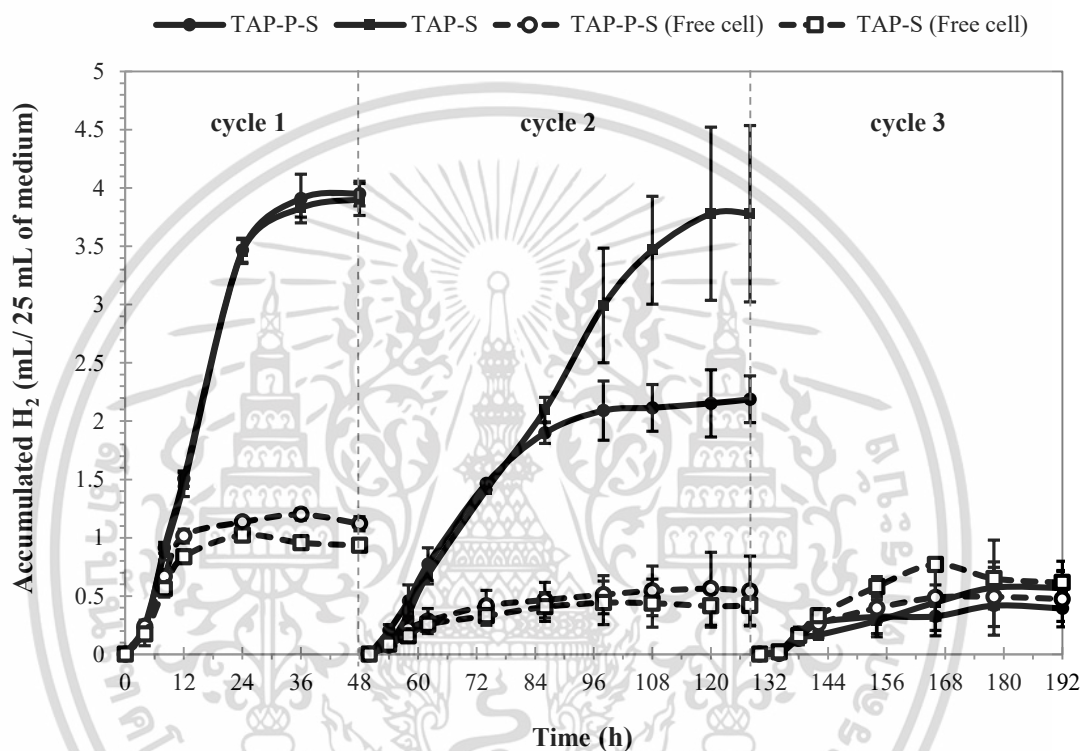
รูปที่ 4.11 การผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ผ่านวัฏจักรการผลิตแบบ 2 ขั้นตอนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจินตเทียบกับระบบเซลล์อิสระ โดยมีระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์เท่ากับ 24 ชั่วโมง ภายใต้การบ่มในสภาวะที่ไล่อากาศ

สำหรับที่ระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์ที่ 1 ชั่วโมง (รูปที่ 4.12) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์ตรึงได้กลับเข้าสู่ระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์ที่ 1 ชั่วโมง เซลล์จะมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่อย่างน้อย 4 รอบ โดยในการผลิตรอบที่ 2 เซลล์ตรึงจะผลิตไฮโดรเจนได้น้อยลงประมาณ 2 เท่าการผลิตรอบที่ 1 หลังจากนั้นในการผลิตรอบที่ 3 เซลล์ตรึงจะผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากระบบเซลล์อิสระ ปริมาณไฮโดรเจนทั้งหมดที่ได้จากการผลิต 2 รอบ จะเท่ากับ 5.9909 ± 0.2415 และ 6.1887 ± 0.3118 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-S และ TAP-P-S ตามลำดับ ซึ่งปริมาณไฮโดรเจนนี้จะมีค่าไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ปริมาณไฮโดรเจนทั้งหมดที่ได้จากระบบเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP-S และ TAP-P-S ได้เพียง 1.3105 ± 0.0441 และ 1.3504 ± 0.3828 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น ซึ่งจะเห็นว่าการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยแคลเซียมอัลจินเตนี้ สามารถช่วยเพิ่มปริมาณไฮโดรเจนได้สูงขึ้นประมาณ 4.6 เท่า เมื่อเทียบกับปริมาณไฮโดรเจนจากระบบเซลล์อิสระทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP-S และ TAP-P-S โดยที่ระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์ที่ 1 ชั่วโมง ผลของการเกิด cell stacking จะเกิดน้อยกว่าที่ระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง ดังนั้น ปริมาณไฮโดรเจนสะสมจึงมากกว่าการใช้ระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.12 ปริมาณไฮโดรเจนจากการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ผ่านวัฏจักรการผลิตแบบ 2 ขั้นตอนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจินเตเทียบกับระบบเซลล์อิสระ โดยมีระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์เท่ากับ 1 ชั่วโมง ภายใต้การบ่มในสภาวะที่ไล่อากาศ

แต่อย่างไรก็ตามการนำเซลล์ตรึงกลับเข้าสู่ขั้นการสังเคราะห์แสงซึ่งต้องได้รับอาหารที่สมบูรณ์อีกครั้งแม้เพียงระยะเวลาสั้นๆเพียง 1 ชั่วโมง เซลล์จะยังคงสามารถดูดซึมอาหารและไปมีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์ในเม็ดอัลจินเตเปลี่ยนแปลงไปในทางที่เพิ่มขึ้นอีกเช่นเดิม ไม่ต่างจากการผลิตไฮโดรเจนซ้ำด้วยการใช้ระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์หรือขั้นการสังเคราะห์แสงที่ 24 ชั่วโมงเลย ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงศึกษาผลของการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ของเซลล์ตรึงอีกครั้ง โดยจะทำการศึกษาโดยลดระยะเวลาของขั้นสังเคราะห์แสง (stage I) ลงจาก 1 ชั่วโมงเป็น 0 ชั่วโมง



รูปที่ 4.13 การผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ของ *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจินเต เทียบกับระบบเซลล์อิสระ โดยจะเปลี่ยนอาหาร TAP-P-S และ TAP-S อันใหม่ทันทีหลังจากที่เซลล์อิมตัวในการผลิตไฮโดรเจนในรอบผลิตแรก (ไม่นำเซลล์ตรึงกลับเข้าสู่ขั้นการสังเคราะห์แสง) ภายใต้การบ่มในสถานะที่โล่อากาศ

และสำหรับ ณ ระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์ที่ 0 ชั่วโมง (รูปที่ 4.13) หรือการไม่นำเซลล์ตรึงกลับเข้าสู่ขั้นการสังเคราะห์แสง (stage I) เมื่อเซลล์อิมตัวในการผลิตไฮโดรเจนในการผลิตรอบที่ 1 เซลล์ตรึงจะได้รับการเปลี่ยนอาหาร TAP-P-S และ TAP-S ใหม่ จากนั้นจะทำการพ่นอาร์กอนเพื่อนำเซลล์เข้าสู่ขั้นการผลิตไฮโดรเจนอีกครั้ง (stage II) ผลการทดลองพบว่า เซลล์ตรึงจะสามารถผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ได้อย่างน้อย 3 รอบ โดยเซลล์ตรึงที่อยู่ในอาหาร TAP-P-S จะเริ่มสูญเสียความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในการผลิตรอบที่ 2 โดยจะผลิตไฮโดรเจนได้เพียงครึ่งหนึ่งของปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ในรอบแรก และความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนจะลดลงจนเกือบจะ

หายไปเมื่อเซลล์ตรึงเข้าสู่การผลิตรอบที่ 3 โดยจะผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากเซลล์อิสระ ส่วนเซลล์ตรึงที่บ่มในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์เพียงอย่างเดียว (TAP-S) พบว่า เซลล์ตรึงจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดี ซึ่งเมื่อเซลล์ตรึงเข้าสู่การผลิตรอบที่ 2 เซลล์ตรึงสามารถที่จะผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่เท่ากับปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ผลิตได้ในการผลิตรอบแรก แต่จะใช้ระยะเวลาในการผลิตยาวนานกว่า กล่าวคือ ในรอบการผลิตแรก เซลล์ตรึงในอาหาร TAP-S จะใช้เวลาเพียง 48 ชั่วโมง (2 วัน) ในการที่จะผลิตไฮโดรเจนปริมาณ 3.9021 ± 0.1367 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และในรอบการผลิตที่ 2 จะใช้เวลาอีก 84 ชั่วโมง (3.5 วัน) ในการผลิตไฮโดรเจนปริมาณ 3.7802 ± 0.7425 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนในรอบการผลิตที่ 3 เซลล์จะสูญเสียความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนไปในลักษณะเดียวกันกับเซลล์ตรึงในอาหาร TAP-P-S โดยที่เซลล์ตรึงที่บ่มในอาหารที่ขาดธาตุซัลเฟอร์จะให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่สูงที่สุด เมื่อคำนวณปริมาณไฮโดรเจนสะสมทั้งหมดที่เซลล์ตรึงผลิตได้ใน 2 รอบ พบว่า ในเวลาการผลิตไฮโดรเจนทั้งหมด 108 ชั่วโมง เซลล์ตรึงในอาหาร TAP-S และ TAP-P-S จะผลิตไฮโดรเจนได้ 7.6823 ± 0.8792 และ 6.1405 ± 0.3057 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ในขณะที่ระบบเซลล์อิสระที่บ่มในอาหาร TAP-S และ TAP-P-S จะผลิตไฮโดรเจนสะสมทั้งหมดได้เพียง 1.4377 ± 0.1799 และ 1.6629 ± 0.3598 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ

ดังนั้นจึงสามารถกล่าวโดยสรุปได้ว่า ปริมาณไฮโดรเจนสะสมทั้งหมดที่มากที่สุดจากการฟื้นฟูเซลล์ใน 2 รอบ ด้วยการใช้เวลาฟื้นฟูเซลล์ (stage I) เป็น 24, 1 และ 0 ชั่วโมงจะพบในสถานะที่บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP-S โดยปริมาณไฮโดรเจนที่ได้จากการไม่นำเซลล์กลับเข้าสู่ขั้นการสังเคราะห์แสง (ระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์เป็น 0 ชั่วโมง) จะให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่สูงที่สุด ดังนั้นระยะเวลาการฟื้นฟูเซลล์เท่ากับ 0 ชั่วโมงจะถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลของการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ในสถานะที่มีอากาศ

4.6.2 ผลการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ของเซลล์ *Tetraspora* sp. ในสถานะที่มีอากาศ

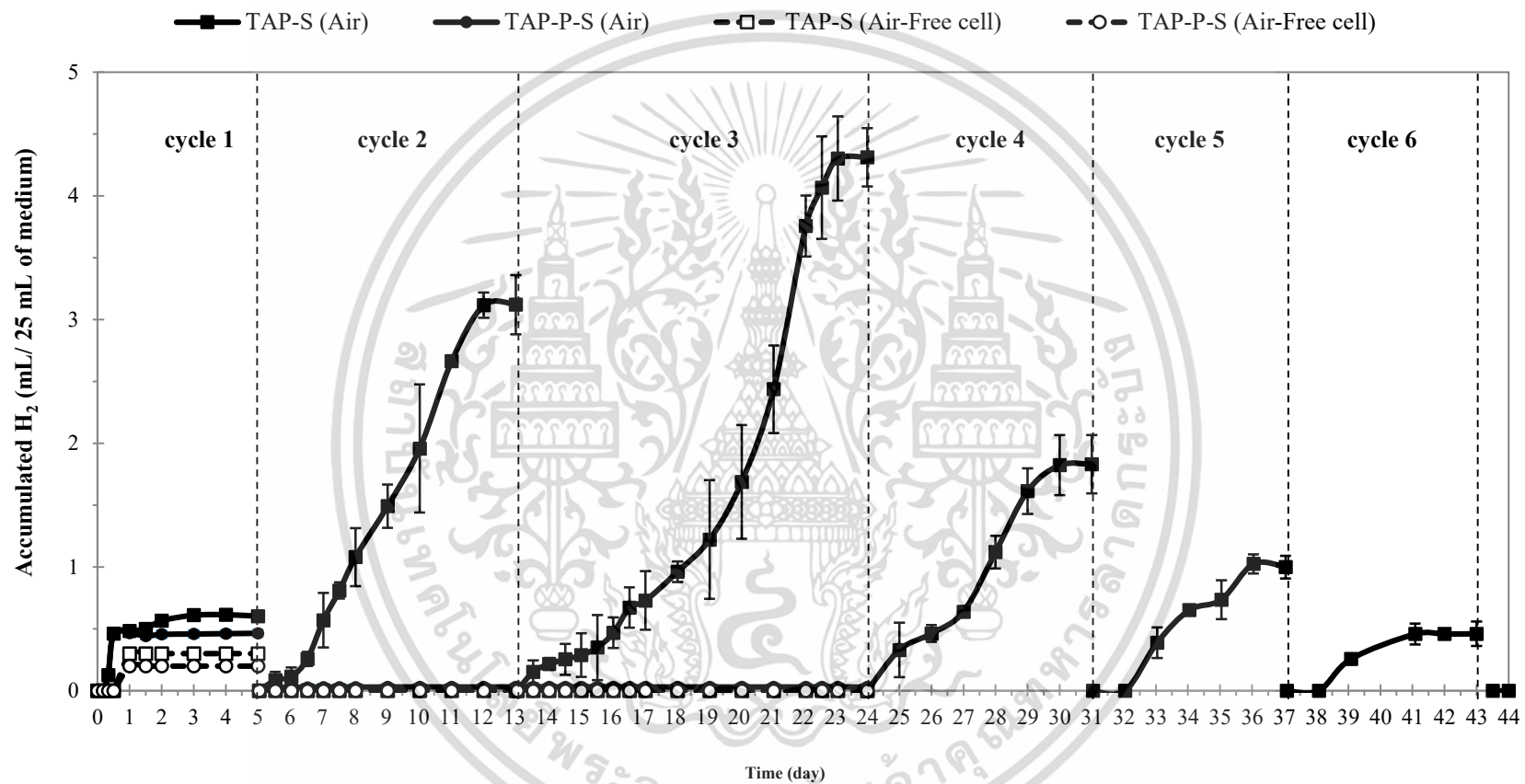
จากข้อที่ 4.6.1 พบว่าการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ของเซลล์ตรึงด้วยการไม่นำเซลล์ตรึงกลับเข้าสู่ขั้นการสังเคราะห์แสงจะช่วยให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด ดังนั้นในการศึกษาการนำเซลล์ตรึงกลับมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ในสถานะที่มีอากาศ ผู้วิจัยจะทำการศึกษการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่เฉพาะการไม่นำเซลล์ตรึงกลับเข้าสู่ขั้นการสังเคราะห์แสงเท่านั้น

ผลการทดลองในรูปที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่า เซลล์ตรึงที่บ่มในอาหารที่ขาดธาตุซัลเฟอร์เพียงอย่างเดียว (TAP-S) ภายใต้สถานะที่มีอากาศจะสามารถผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ได้ทั้งหมด 6 รอบ โดยในการผลิตรอบแรก หลังจากบ่มในอาหาร TAP-S เป็นเวลา 5 วัน เซลล์จะผลิตไฮโดรเจนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่าการฉ้อโกงทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.6023 ± 0.0274 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อเซลล์ตรึงเข้าสู่การผลิตรอบที่ 2 เซลล์จะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าการผลิตรอบแรกถึง 5.2 เท่า ณ เวลาการบ่ม 13 วัน และเมื่อเซลล์เข้าสู่การผลิตรอบที่ 3 เซลล์จะผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดถึง 4.3105 ± 0.2365 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมากกว่าการผลิตรอบแรกถึง 7.2 เท่า หลังจากนั้นเซลล์จะค่อยๆสูญเสียความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนไปเมื่อเซลล์เข้าสู่การผลิตรอบที่ 4 เป็นต้นไป และจะยุติการผลิตไฮโดรเจนไปเมื่อเซลล์เข้าสู่การผลิตรอบที่ 7 (43 วัน) ในขณะที่เซลล์ตรึงและเซลล์อิสระที่อยู่ในอาหาร TAP-P-S และเซลล์อิสระที่อยู่ในอาหาร TAP-S จะเริ่มสูญเสียความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในการผลิตรอบที่ 2 และจะสูญเสียความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนไปเมื่อเซลล์เข้าสู่การผลิตรอบที่ 3 โดยจะผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่น้อยไม่แตกต่างจากเซลล์อิสระ

ดังนั้นจึงกล่าวโดยสรุปได้ว่า การผลิตไฮโดรเจนด้วยการบ่มเซลล์ตรึงในอาหาร TAP-S ภายใต้สภาวะที่มีอากาศเป็นเวลา 43 วัน (ผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ได้ 6 รอบ) จะให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่มากที่สุดถึง 11.3231 ± 0.9283 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมากกว่าการบ่มในอาหาร TAP-P-S ถึง 22 เท่า และมากกว่าระบบเซลล์อิสระถึง 38 เท่า โดยผลการทดลองรูป 4.14 นี้เป็นสิ่งที่ช่วยยืนยันได้ว่า เจลอัลจินเตมีความสามารถที่จะกักกันโมเลกุลของออกซิเจนที่แพร่ผ่านเข้ามายังเซลล์สำหรับยีสี่เขียวได้ เป็นผลให้การผลิตไฮโดรเจนในระบบเซลล์ตรึงมีปริมาณที่มากกว่าระบบเซลล์อิสระ นอกจากนั้นแล้ว สันนิษฐานว่าการที่เซลล์ถูกบ่มในสภาวะที่ขาดธาตุซัลเฟอร์เป็นระยะเวลาสั้นจะส่งผลต่อเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ในแง่ที่จะเอื้อหนุนให้มีการสะสมแป้งภายในเซลล์มากขึ้น อย่างเช่นที่พบในสาหร่ายเขียว *C. reinhardtii* ซึ่งพบว่าเซลล์จะมีการสะสมแป้งเพิ่มขึ้น 10 เท่าเมื่อถูกบ่มในสภาวะที่ไร้ซัลเฟอร์ (Melis *et al.*, 2007; Batyrova *et al.*, 2012) โดยแป้งที่เซลล์สะสมนี้จะสามารถเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสและปลดปล่อยอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อใช้ในการผลิตไฮโดรเจน เป็นผลให้เซลล์ตรึงที่บ่มในอาหาร TAP-S สามารถที่จะผลิตไฮโดรเจนได้ดีและผลิตไฮโดรเจนซ้ำได้หลายครั้ง



รูปที่ 4.14 การผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ของ *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจินเตเทียบกับระบบเซลล์อิสระ โดยจะเปลี่ยนอาหารอันใหม่ทันทีหลังจากที่เซลล์อิมตัวในการผลิตไฮโดรเจนในรอบผลิตแรก (ไม่นำเซลล์ตรึงกลับเข้าสู่ขั้นการสังเคราะห์แสง) ภายใต้การบ่มในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic condition)

4.7 การเปรียบเทียบปริมาณไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. CU2551 กับจุลสาหร่ายสายพันธุ์อื่น

เซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ถูกตรึงด้วยเจลแคลเซียมอัลจิเนต และทำการบ่มในสภาวะที่โล่อากาศ จะให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมจากการผลิต 2 รอบ ภายในเวลา 108 ชั่วโมงจะมีค่าเท่ากับ 7.6823 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการคำนวณ ปริมาณไฮโดรเจนสะสมและอัตราการผลิตไฮโดรเจนในหน่วยต่างๆ พร้อมทั้งทำการเปรียบเทียบปริมาณ/อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงเทียบกับจุลสาหร่ายสายพันธุ์อื่น ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยพบว่า ภายใต้สภาวะการบ่มแบบโล่อากาศ เซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าระบบเซลล์อิสระถึง 51 เปอร์เซ็นต์ (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) และมากกว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่ถูกตรึงในซิลิกาถึง 37 เปอร์เซ็นต์ (Hanh *et al.*, 2007) ยิ่งไปกว่านั้น เซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. ยังสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่มากกว่า *Chlorella* sp. NIER-10003 ที่ถูกตรึงในอะการ์เล็กน้อย (Song *et al.*, 2011) โดยปราศจากการปนแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ระบบ รวมทั้งยังใช้ระยะเวลาการบ่มที่รวดเร็วกว่าเกือบครึ่ง

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ/อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. กับไซยาโนแบคทีเรีย พบว่าเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. จะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตราการผลิตที่สูงกว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya perelegans* ที่ถูกตรึงในอะการ์และอัลจิเนตถึง 98 เปอร์เซ็นต์ (Anjana *et al.*, 2014) และให้ปริมาณไฮโดรเจนที่มากกว่า *Synechocystis* sp. PCC 6803 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตเกือบ 25 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาการบ่มที่สั้นกว่าและปราศจากการปนคาร์บอนไดออกไซด์ (Eleftherios *et al.*, 2016)

เนื่องจากเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. มีถุงหุ้มใสที่หุ้มภายนอกเซลล์ค่อนข้างหนา (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) จึงทำให้ไม่สามารถที่จะสกัดคลอโรฟิลล์ด้วยเอทานอลหรือเมทานอลได้ ดังที่ได้มีการอภิปรายไว้ในงานวิจัยเกี่ยวกับ *Tetraspora* sp. ที่ได้มีการศึกษาไว้แล้วก่อนหน้านี้ (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2016) ด้วยเหตุนี้ในงานวิจัยนี้จึงคิดเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์ที่พบในสาหร่ายสีเขียวทั่วไป โดยพบว่าจะพบอยู่ในช่วงประมาณ 9.60–34.40 ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือนั่นคือเซลล์ตรึงจะผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตราการผลิต 34.37–123.17 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ ซึ่งถือได้ว่าเป็นอัตราการผลิตที่สูงมากถึง 2.8–9.9 เท่า เมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่ถูกตรึงในฟิล์มแคลเซียมอัลจิเนต (Kosourov *et al.*, 2009) และ *C. reinhardtii* L1591 – N230Y ที่ถูกตรึงในไทเทเนียมไดออกไซด์ (Stojkovic *et al.*, 2015) นอกจากนี้แล้วอัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. CU2551 นี้ยังมากกว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตถึง 2.6–9.5 เท่า (Leino *et al.*, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับเซลล์ตรึงที่บ่มในสภาวะที่มีอากาศ พบว่าในรอบการผลิตทั้งหมด 6 รอบ ภายในเวลา 1,034 ชั่วโมง (43 วัน) เซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. จะให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมในหน่วยต่างๆคือ 11.32 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือ 513.30 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร และให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนอยู่ที่ 160.22 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ 4.89–17.53 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งจากตารางจะเห็นว่า เซลล์ตรึง *Tetraspora* sp สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตราการผลิตที่มากกว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่ถูกตรึงทั้งในฟิล์มแคลเซียมอัลจิเนตที่บ่มในสภาวะที่มีอากาศเหมือนกันถึง 1–2.3 เท่า (Kosourov *et al.*, 2009) และแม้ว่าเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. จะถูกบ่มในสภาวะที่มีอากาศ แต่เซลล์ตรึงก็ยังคงสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตราการผลิตที่มากกว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* L159I-N230Y ที่ถูกตรึงในไทเทเนียมไดออกไซด์ (Stojkovic *et al.*, 2015) ที่บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนถึง 1.4 เท่า นอกจากนี้แล้ว เซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. ที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศนี้ ยังสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตราการผลิตที่มากกว่าไซยาโนแบคทีเรียที่บ่มภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจนอีกด้วย โดยพบว่า เซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. จะให้อัตราการผลิตที่มากกว่า *Anabaena* sp. PCC 7120 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตเกือบ 1–1.3 เท่า (Leino *et al.*, 2012) และมากกว่า *L. perelegans* ที่ถูกตรึงในอะการ์และอัลจิเนตถึง 8 เท่า (Anjana *et al.*, 2014)

ในแง่ของปริมาณไฮโดรเจนสะสม พบว่า แม้ว่าจะเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. จะบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศ ก็ยังคงให้ปริมาณไฮโดรเจนที่มากกว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่ถูกตรึงในซิลิกา ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนถึง 2.5 เท่า (Hanh *et al.*, 2007) และมากกว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. NIER-10003 ที่ถูกตรึงด้วยอะการ์ ภายใต้การบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ถึง 1.7 เท่า (Song *et al.*, 2011) โดยปราศจากการพ่นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ระบบ แต่จะใช้ระยะเวลาในการบ่มที่นานกว่า 784 ชั่วโมง (33 วัน) นอกจากนั้นแล้ว เซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. ที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศนี้ยังให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่มากกว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตและบ่มภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจนเกือบ 2 เท่า (Eleftherios *et al.*, 2016) โดยปราศจากการพ่นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ระบบ แต่อย่างไรก็ตาม เซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. จะใช้ระยะเวลาในการบ่มยาวนานกว่าถึง 890 ชั่วโมง (37 วัน)

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจึงสามารถที่จะสรุปภาพรวมได้ว่า เซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. ที่บ่มภายใต้สภาวะที่โล่งอากาศจะผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าระบบเซลล์อิสระถึง 6 เท่า มากกว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่นๆถึง 2-10 เท่า และมากกว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆถึง 10–50 เท่า ที่น่าสนใจไปกว่านั้น คือ เซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. ที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศ ปราศจากการพ่นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อเพิ่มการสะสมแป้งของเซลล์และแก๊สอาร์กอนหรือไนโตรเจนเพื่อไล่ออกซิเจนออกจากระบบ เซลล์ตรึงสามารถที่ผลิตไฮโดรเจนในอัตรา/ปริมาณที่มากกว่าระบบเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิสระถึง 38 เท่า และมากกว่าสารร้ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆที่บ่มในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน 1.4–2 เท่า แต่จะใช้ระยะเวลาในการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจนนานกว่าประมาณ 4-7 เท่า



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Species/strain	Conditions		Maximum yields/rate				Ref.	
	Matrix	Media	nmol/h/mg dry wt.	mL H ₂	mL/L	μmol/h/mg Chl a		
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	Anoxia	alginate	S-deprived	1,182.45	7.68(108h)	307.22(108h)	34.37–123.17	This study
	Aerobic	alginate	S-deprived	160.22	11.32(1,034h)	513.30(1,034h)	4.89–17.53	This study
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	Anaerobic	-	N-S-deprived	579.95	-	-	-	Maneeruttanarungroj <i>et al.</i> , 2010
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	Anaerobic	silica	S-deprived	-	-	209 (n.r)	-	Hanh <i>et al.</i> , 2007
<i>Chlorella</i> sp. NIER-10003	Anaerobic	agar	S-deprived	-	-	300 (250h)	-	Song <i>et al.</i> , 2011
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	Anaerobic	alginate	P-S-deprived	-	-	-	12.44	Kosourov <i>et al.</i> , 2009
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	Aerobic	alginate	P-S-deprived	-	-	-	7.61	Kosourov <i>et al.</i> , 2009
<i>C. reinhardtii</i> L159I–N230Y	Anaerobic	TiO ₂	S-deprived	-	-	-	12.50	Stojkovic <i>et al.</i> , 2015

<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Anaerobic	alginate	N-deprived	-	5.80 (144h)	-	-	-	Eleftherios <i>et al.</i> , 2016
<i>Lyngbya perelegans</i>	Anaerobic	alginate	normal	21.49	-	-	-	-	Anjana <i>et al.</i> , 2014
<i>Lyngbya perelegans</i>	Anaerobic	agar	normal	19.79	-	-	-	-	Anjana <i>et al.</i> , 2014
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	Anaerobic	alginate	N-deprived	-	-	-	-	13.00	Leino <i>et al.</i> , 2012

หมายเหตุ: n.r. = not reported



สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

เมื่อทำการศึกษาผลของค่าความขุ่นเซลล์ (OD_{730}) ที่มีต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในระบบเซลล์อิสระ พบว่า ค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial OD_{730}) ของเซลล์ในขั้นการสังเคราะห์แสง (stage I) สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ไม่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว ในขณะที่ความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD_{730}) ของเซลล์ในขั้นการสังเคราะห์แสง (stage I) จะเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการบดบังแสงหรือการได้รับแสงที่เพียงพอต่อการทำงานของระบบการสังเคราะห์ที่ 2 ซึ่งพบว่าที่ค่าความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD_{730}) เป็น 0.265 จะคำนวณได้เป็นความหนาแน่นของเซลล์ที่ 3.75 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อ 25 มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งค่านี้จะเป็นค่าที่เหมาะสมที่สนับสนุนให้เซลล์สามารถที่จะผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด

เมื่อได้ความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสม ในส่วนต่อไปก็จะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ โดยพบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดอัลจิเนตที่ 2.80-3.35 มิลลิเมตร ความเข้มข้นของเซลล์ในเม็ดอัลจิเนตที่ 0.125 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตรอัลจิเนต และ ความเข้มข้นของวัสดุตรึงอัลจิเนตที่ 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร จะเป็นค่าที่เหมาะสมที่ทำให้เซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่มากที่สุด

สภาวะดังกล่าวข้างต้นนี้จะถูกไปตรึงเซลล์เพื่อทำการศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิเคต) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง โดยมีการแปรผันการขาดธาตุอาหารหลักแบบ Full factorial อันได้แก่ TAP ปกติ, TAP-N, TAP-P, TAP-S, TAP-N-P, TAP-N-S, TAP-P-S และ TAP-N-P-S ซึ่งทำการศึกษาทั้งในสภาวะที่โล่อากาศและมีอากาศ ผลการทดลองพบว่าอาหาร TAP-S และอาหาร TAP-P-S จะช่วยสนับสนุนให้เซลล์ตรึงสามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด ซึ่งได้มากกว่าอาหาร TAP ปกติถึง 1.2 เท่า เหตุที่เป็นเช่นนี้เกิดจากการที่ระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 ทำงานได้ลดลง ทำให้มีปริมาณออกซิเจนไปรบกวนระบบน้อยลง อีกทั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีกิจกรรมการทำงานที่สูงขึ้น เป็นผลทำให้ปริมาณไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น

หลังจากที่เซลล์อิมมูทิวในการผลิตไฮโดรเจนในการผลิตรอบที่ 1 เซลล์ตรึงจะถูกถ่ายโอนเซลล์กลับเข้าสู่ขั้นการสังเคราะห์แสง โดยจะมีการแปรผันเวลาของขั้นการสังเคราะห์แสงเป็น 24, 1 และ 0 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อศึกษาเวลาของขึ้นการสังเคราะห์แสงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่มากที่สุด ซึ่งผลการทดลองพบว่า ที่ระยะเวลาของขึ้นการสังเคราะห์เป็น 0 ชั่วโมง ในอาหาร TAP-S ภายใต้สภาวะที่โล่อากาศ เซลล์ตรึงจะมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ได้ดีที่สุด โดยจะผลิตได้ทั้งหมด 3 รอบ (192 ชั่วโมง) และให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมใน 2 รอบ (108 ชั่วโมง) คือ 7.6823 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนการผลิตไฮโดรเจนซ้ำใหม่ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ ผลการทดลองค่อนข้างน่าสนใจ โดยพบว่า เซลล์ตรึงที่บ่มในอาหาร TAP-S จะผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด โดยผลิตได้ทั้งหมด 6 รอบ (1,034 ชั่วโมง หรือ 43 วัน) และให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมทั้งหมด คือ 11.3231 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเทียบปริมาณไฮโดรเจนที่ได้จากเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. กับสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ พบว่า การบ่มเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. ภายใต้สภาวะที่โล่อากาศจะผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าระบบเซลล์อิสระถึง 6 เท่า มากกว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่นๆถึง 2-10 เท่า และมากกว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆถึง 10-50 เท่า ส่วนการบ่มในสภาวะที่มีอากาศ เซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. จะสามารถผลิตไฮโดรเจนที่ในอัตรา/ปริมาณที่มากกว่าระบบเซลล์อิสระถึง 38 เท่า และมากกว่าสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆที่บ่มในสภาวะที่โล่อากาศเกือบ 1.4-2 เท่า แต่จะใช้ระยะเวลาในการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจนยาวนานกว่าประมาณ 4-7 เท่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองของการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. ในอัลจินต ให้ผลเป็นที่น่าพึงพอใจ ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณไฮโดรเจนที่ได้รับมานั้นค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นแม้ว่าจะไม่ได้พ่นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ระบบ ดังนั้น ในงานวิจัยเพิ่มเติมต่อจากนี้ควรที่จะทำการศึกษาการนำเซลล์ตรึง *Tetraspora* sp. มาทำการผลิตไฮโดรเจนซ้ำโดยมีการพ่นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ระบบ เพื่อจะเป็นส่วนช่วยเพิ่มการสะสมแบ่งของเซลล์ให้มากขึ้น รวมทั้งยังควรที่จะแปรผันระยะเวลาของการฟื้นฟูเซลล์ เพื่อหาระยะเวลาฟื้นฟูเซลล์ที่เหมาะสมที่เซลล์จะได้รับอาหารและคาร์บอนไดออกไซด์ที่สมบูรณ์ ซึ่งเป็นไปได้ว่า เซลล์ตรึงจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงยิ่งขึ้นกว่าเดิม และยังเป็นไปได้ว่าเซลล์ตรึงจะสามารถที่จะผลิตซ้ำด้วยจำนวนรอบการผลิตที่มากขึ้น นอกจากนั้นแล้ว ก็ควรที่จะทำการติดตามปริมาณของออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการบ่ม และปริมาณของแบ่งที่เซลล์สะสมและใช้ไป จนกว่าการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงจะหยุดนิ่ง

บรรณานุกรม

เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์. 2554. "การคัดกรองสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนและการปรับภาวะให้เหมาะสม เพื่อเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภิศา เปี่ยมจิตต์สกุล นัฐกานต์ ชุณหกิจ และสุदारัตน์ ภิรมย์สุด. 2560. "การเลือกวัสดุตรึงสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 เพื่อการผลิตไฮโดรเจน." โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รัชนิกร วันจันทิก. 2554. "แก๊สไฮโดรเจน : ความคาดหวังเพื่อเป็นแหล่งพลังงานที่ยั่งยืน." วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 16(1) : 131-140.

ศูนย์สารสนเทศข้อมูลพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2559. "สถานการณ์พลังงานของประเทศไทย." กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน.

สำนักวิจัยค้นคว้าพลังงาน. 2554. "คู่มือด้านความรู้พลังงานไฮโดรเจน." กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน.

Allakhverdiev, S.I. Velmurugan, T. Vladimir, D.K. Sergey, K.K. Vyacheslav, V. Klimov, S.R. Dmitry, A.L. Mamoru, M. Hiroshi, N. and Robert, C. 2011. "Photosynthetic hydrogen production." *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 11 : 101-113.

Anjana, K. and Kaushik, A. 2014. "Enhanced hydrogen production by immobilized cyanobacterium *Lyngbya perelegans* under varying anaerobic conditions." *Biomass and Bioenergy*. 63 : 54-57.

Antal, T.K. Kukarskikh, G.P. Volgusheva, A.A., Krendeleva, T.E., Tyystjärvi, E. and Rubina ,A.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.

Batyrova, K. Gavrishcheva, A. Ivanova, E. Liu, J. and Tsygankov, A. 2015. "Sustainable hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived marine green microalgae *Chlorella* sp." *International Journal of Molecular Sciences*. 16:2705-2716.

Batyrova K.A., Tsygankov, A.A. and Kosourov S.N. . 2012. "Sustained hydrogen photoproduction by phosphorusdeprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37 : 8834-8839.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bhujbal, S.V. Paredes-Juarez, G.A. Nicloub, S.P. Vosa, P. 2014. "Factors influencing the mechanical stability of alginate beads applicable for immunoisolation of mammalian cells." *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 37 : 196-208.
- Brooks, A. 1988. "Effects of phosphorus nutrition on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activation, photosynthetic quantum yield and amounts of some calvin-cycle metabolites in spinach leaves." *Australian Journal of Plant Physiology*. 13(1) : 231-237.
- Chochois, V. Constans, L. Dauville, D. Beyly, A. Soliveeres, M. and Ball, S. . 2010. "Relationships between PSII-independent hydrogen bioproduction and starch metabolism as evidenced from isolation of starch catabolism mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *International Journal Hydrogen Energy*. 35(19) : 10731-10740.
- Das, D and Veziroglu, T.N. 2001. "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature." *International Journal of Hydrogen Energy*. 26 : 13-28.
- Dubini, A. 2011. "Green energy : Biofuel production from *Chlamydomonas reinhardtii*." *The Biochemical Society : Bioenergy*. 20-23.
- Eleftherios, T. George, R. Ana Margarita, S.B. Bernardo, C. Demetrios, F.G and Giuseppe, T. 2016. "Hydrogen production by immobilized *Synechocystis* sp. PCC 6803." *International Journal of Hydrogen Energy*. 41 : 15181-15186.
- Eroglu, E. and Melis, A. 2011. "Photobiological hydrogen production: Recent advance and state of the art." *Bioresource Technology* 102 : 8403-8413.
- Gaffron, H. and Rubin, J. 1942. "Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae." *The Journal of General Physiology*. 26 : 219-240.
- Garrido, I.M. 2008. "Microalgae immobilization : Current techniques and uses." *Bioresource Technology*. 99 : 3949-3964.
- Georgia, K. David, C., Liam M. Grovera, Michael, J. Adamsa, and James, B. 2014. "Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation." *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 36 : 135-142.
- Ghirardi, M.L. Zhang, J.P. Lee, J.W., Flynn, T. Seibert, M. Greenbaum, E. and Melis, A. 2000. "Microalgae: a green source of renewable H₂." *Trends Biotechnology*. 18(12) : 506-511.

- Guan, Y. Deng, M. Yu, X. and Zhang, W. 2004. "Two-stage photo-biological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis*." *Biochemical Engineering Journal*. 19 : 69-73.
- Hahn, J.J. Ghirardi, M.L. and Jacoby, W.A. 2007. "Immobilized algal cells used for hydrogen production." *Biochemical Engineering Journal*. 37 : 75-79.
- Harris, EH (1989). **The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use**. San Diego., Academic Press.
- Hirschfelder, Curtiss. and Bird (1954). **Molecular Theory of Gases and Liquids**. New York, Wiley.
- Kaushik, A. Anjana, K. 2011. "Biohydrogen production by *Lyngbya perelegans*: influence of physico-chemical parameters." *Biomass and Bioenergy*. 35 : 1041-1045.
- Kim, J.P. Chang, D.K. Sang, J.S. Mi, S.K., Tai, H.P. Donghyun, L. Dukjoon, K. Ji-Heung, K.. Young, K.L. and Daewon, P. 2005. "Cell age optimization for hydrogen production induced by sulfur deprivation using a green alga *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 9." *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15(1) : 131-135.
- Kosourov, S.N. Patrusheva, E. Ghirardi, M.L. Seibert, M. Tsygankov, A.A. 2007. "Comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions." *Journal of Biotechnology*. 128 : 776-787.
- Kosourov, S.N. and Seibert, M. 2009. "Hydrogen photoproduction by nutrient-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized within thin alginate films under aerobic and anaerobic conditions." *Biotechnology and Bioengineering*. 102(1) : 50-57.
- Laurinavichene, T.V. Fedorov, A.S. Ghirardi, M.L. Seibert, M. and Tsygankov, A.A. 2006. "Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells." *International Journal of Hydrogen Energy*. 31 : 659-667.
- Leino, H. Kosourov, S.N. Saari, L. Sivonen, K. Tsygankov, A.A. Aro, E.M. et al. 2012. "Extended H₂ photoproduction by N₂-fixing cyanobacteria immobilized in thin alginate films." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37 : 151-161.
- Liouni, M. Drichoutis, P. and Nerantzis, E.T. 2008. "Studies of the mechanical properties and the fermentation behavior of double layer alginate–chitosan beads, using *Saccharomyces cerevisiae* entrapped cells." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24 : 281-288.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Maneeruttanarungroj, C. Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. 2010. "A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from thailand with efficient hydrogen production." *International Journal of Hydrogen Energy* 35 : 13193-13199.

Maneeruttanarungroj, C. Incharoensakdi, A. 2016. "Rapid method for DNA isolation from a tough cell wall green alga *Tetraspora* sp. CU2551." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 : 99-107.

Maswana, T. Phunpruch, S. and Maneeruttanarungroj, C. 2017. "Hydrogen production in *Tetraspora* sp. CU2551 under full-factorial N-, P-, and S-nutrients deprivation." 1584-1590. in **Proceeding of the Pure and Applied Chemistry International Conference 2017**. Bangkok: The Chemical Society of Thailand under the Patronage of Her Royal Highness Princess Chulabhorn Mahidol.

McKinlay, J.B. and Harwood, C.S. . 2010. "Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel." *Current Opinion in Biotechnology*. 21 : 244-251.

Melis, A. 2002. "Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects." *International Journal of Hydrogen Energy*. 27 : 1217-1228.

Melis, A. 2007. "Photosynthetic H₂ metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae)." *Planta*. 226 : 1075-1086.

Melis, A. Zhang, L.P. Forestier, M. Ghirardi, M.L and Seibert, M. . 2000. "Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant Physiology* 122(1) : 127-135.

Niwa, M. Yamazaki, K. and Murakami, Y. 1991. "Separation of Oxygen and Nitrogen Due to the Controlled Pore-Opening Size of Chemical Vapor Deposited Zeolite A " *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 30(1) : 38-42.

Rashid, N. Choi, W. and Lee, K. 2012. "Optimization of two-staged bio-hydrogen production by immobilized *Microcystis aeruginosa*." *Biomass and Bioenergy* 36 : 241-249.

Rashid, N. Rehman, S.M. Memon, S. Rahman, Z.U. Lee, K. and Han, J.I. 2013. "Current status, barriers and developments in biohydrogen production by microalgae." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 22 : 571-579.

Rattana, S. Junyapoon, S. Incharoensakdi, A. and Phunpruch, S. 2010. "Hydrogen production by the green alga *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 under heterotrophic conditions." 114-120 .in **Proceeding of the 8th International Symposium on Biocontrol and**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Biotechnology. Bangkok: King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang and Nong Khai Campus: Khon Kaen University.

- Simpliciano, C. Clark, L. Asi, B. Chu, N. Mercado, M. Diaz, S. Goedert, M. and Mobed-Miremadi, M. 2013. "Cross-Linked Alginate Film Pore Size Determination Using Atomic Force Microscopy and Validation Using Diffusivity Determinations." *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology*. 3 : 1-12.
- Skjånes, K. Knutsena, G. Källqvist, T. and Lindblad, P. 2008. "H₂ production from marine and freshwater species of green algae during sulfur deprivation and considerations for bioreactor design." *International Journal of Hydrogen Energy*. 33 : 511-521.
- Smidsrød, O. Skjåk-Braek, G. 1990. "Alginate as immobilization matrix for cells." *Trends in Biotechnology*. 8 : 71-78.
- Song, W. Rashid, N. Choi, W. and Lee, K. 2011. "Biohydrogen production by immobilized *Chlorella* sp. using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis." *Bioresource Technology*. 102 : 8676-8681.
- Stojkovic, D. Torzillo, G. Faraloni, C. Valant, M. . 2015. "Hydrogen production by sulfur-deprived TiO₂- encapsulated *Chlamydomonas reinhardtii* cells." *International Journal of Hydrogen Energy*. 40 : 3201-3106.
- Thu, B. Bruheim, P. Espevik, T., and Smidsrød, O. 1996. "Alginate polycation microcapsules II Some functional properties." *Biomaterials* 17 (11) : 1069-1079.
- Tsygankov, A.A. Kosourov, S.N. Tolstygina, I.V. Ghirardi, M.L. and Seibert, M. 2006. "Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions." *International Journal of Hydrogen Energy*. 31 : 1574-1584.
- Urrutia, I. Serra, J.L. and Llama, M.J. 1995. "Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilizes in polymeric foams." *Enzyme and Microbial Technology*. 17 : 200-205.
- Wykoff, D.D. Davies, J.P. Melis, A. and Grossman, A.R. 1998. "The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant Physiology*. 117 : 129-139.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปการใช้จ่ายเงิน

	งบบุคลากร	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ
ไตรมาสที่ 1 (ต.ค. 59 - ธ.ค. 59)	-	-	28,784.08
ไตรมาสที่ 2 (ม.ค. 60 - มี.ค. 60)	-	-	70,544.03
ไตรมาสที่ 3 (เม.ย. 60 - มิ.ย. 60)	-	-	105,464.55
ไตรมาสที่ 4 (ก.ค. 60 - ก.ย. 60)	78,240	-	74,361.50
รวม	78,240	-	279,154.16

รวมรายจ่าย

357,394.16



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP)

อาหารเหลว TAP 1 ลิตรจะประกอบด้วย

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	0.40	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.10	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.05	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.10	กรัม
เกลือไดโซเดียม อีดีทีเอ ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	0.05	กรัม
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน (Tris-base)	2.42	กรัม
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	1.00	มิลลิลิตร
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5.60	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.00	มิลลิกรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	11.40	มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	5.52	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.16	มิลลิกรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1.10	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.16	มิลลิกรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1.00	ลิตร

ปรับ pH เป็น 7.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารรุ้น TAP

อาหารเหลว TAP	100	มิลลิลิตร
อะการ์ อะการ์ (Agar Agar)	1.5	กรัม

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N)

อาหารเหลว TAP-N ปริมาตร 1 ลิตรจะประกอบด้วย

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.437	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.10	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.05	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.10	กรัม
เกลือไดโซเดียม อีดีทีเอ ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	0.05	กรัม
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base)	2.42	กรัม
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	1.00	มิลลิลิตร
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5.60	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.00	มิลลิกรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	11.40	มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	5.52	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.16	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2.08	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.16	มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1.00	ลิตร
-------------------------	------	------

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ขาดฟอสฟอรัส (TAP-P)

อาหารเหลว TAP-P ปริมาตร 1 ลิตร จะประกอบด้วย

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH ₄ Cl)	0.40	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0.05	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.10	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.084	กรัม
โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	0.02	กรัม
เกลือไดโซเดียม อีดีทีเอ (Na ₂ -EDTA)	0.05	กรัม
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base)	2.42	กรัม
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	1.00	มิลลิลิตร
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	5.60	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	22.00	มิลลิกรัม
กรดบอริก (H ₃ BO ₃)	11.40	มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต (MnCl ₂ ·4H ₂ O)	5.52	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.16	มิลลิกรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1.10	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	0.16	มิลลิกรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1.00	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ (TAP-S)

อาหารเหลว TAP-S ปริมาตร 1 ลิตร จะประกอบด้วย

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	0.40	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.082	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.05	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.10	กรัม
เกลือไดโซเดียม อีดีทีเอ ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	0.05	กรัม
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน (Tris-base)	2.42	กรัม
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	1.00	มิลลิลิตร
เฟอร์ริกคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	4.00	มิลลิกรัม
ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2)	10.40	มิลลิกรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	11.40	มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	5.52	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.10	มิลลิกรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1.10	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.16	มิลลิกรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1.00	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (TAP-N-P)

อาหารเหลว TAP-N-P ปริมาตร 1 ลิตร จะประกอบด้วย

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.437	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.10	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.084	กรัม
โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	0.02	กรัม
เกลือไดโซเดียม อีดีทีเอ ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	0.05	กรัม
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base)	2.42	กรัม
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	1.00	มิลลิลิตร
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5.60	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.00	มิลลิกรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	11.40	มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	5.52	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.16	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2.08	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.16	มิลลิกรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1.00	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ขาดไนโตรเจนและซัลเฟอร์ (TAP-N-S)

อาหารเหลว TAP-N-S ปริมาตร 1 ลิตร จะประกอบด้วย

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.437	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.082	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.05	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.10	กรัม
เกลือไดโซเดียม อีดีทีเอ ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	0.05	กรัม
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน (Tris-base)	2.42	กรัม
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	1.00	มิลลิลิตร
เฟอร์ริกคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	4.00	มิลลิกรัม
ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2)	10.40	มิลลิกรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	11.40	มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	5.52	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.10	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2.08	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.16	มิลลิกรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1.00	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ขาดฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์ (TAP-P-S)

อาหารเหลว TAP-P-S ปริมาตร 1 ลิตร จะประกอบด้วย

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	0.40	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.082	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.084	กรัม
โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	0.02	กรัม
เกลือไดโซเดียม อีดีทีเอ ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	0.05	กรัม
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน (Tris-base)	2.42	กรัม
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	1.00	มิลลิลิตร
เฟอร์ริกคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	4.00	มิลลิกรัม
ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2)	10.40	มิลลิกรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	11.40	มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	5.52	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.10	มิลลิกรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1.10	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.16	มิลลิกรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1.00	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ขาดไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ (TAP-N-P-S)

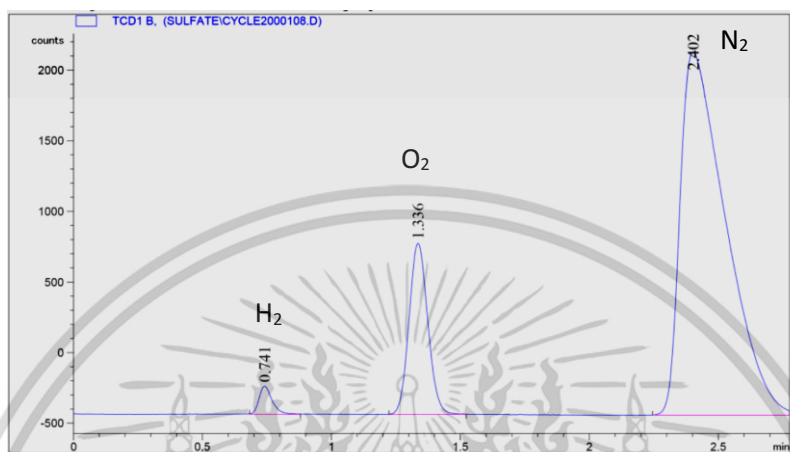
อาหารเหลว TAP-N-P-S ปริมาตร 1 ลิตร จะประกอบด้วย

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.437	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.082	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.084	กรัม
โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	0.02	กรัม
เกลือไดโซเดียม อีดีทีเอ ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	0.05	กรัม
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base)	2.42	กรัม
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	1.00	มิลลิลิตร
เฟอร์ริกคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	4.00	มิลลิกรัม
ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2)	10.40	มิลลิกรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	11.40	มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	5.52	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.10	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2.08	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.16	มิลลิกรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1.00	ลิตร

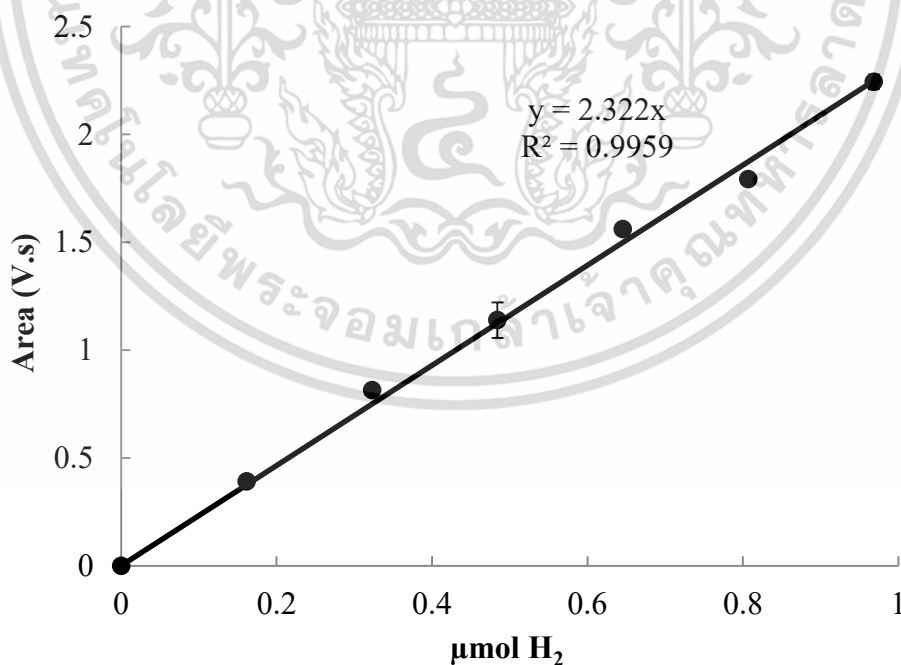
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน



รูปที่ ข-1 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของไฮโดรเจนที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง GC-TCD



รูปที่ ข-2 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและปริมาณของไฮโดรเจน หน่วยไมโครโมล ($\mu\text{mol H}_2$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การคำนวณปริมาณไฮโดรเจน

การคำนวณปริมาณไฮโดรเจนในงานวิจัยนี้จะใช้ 4 เปอร์เซ็นต์ของแก๊สไฮโดรเจนในอาร์กอนเป็นสารมาตรฐาน โดยจากรูปที่ ข-2 จะแสดงให้เห็นว่าพื้นที่ใต้กราฟและปริมาณของไฮโดรเจน มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนในแต่ละครั้งจึงสามารถที่จะคำนวณได้ โดยการเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานแบบ single point calibration ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้

1. คำนวณปริมาณไฮโดรเจนจากพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโทแกรม โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟของไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอนเป็นสารมาตรฐาน โดยคำนวณ %H ที่อยู่ใน head space ของขวด vial จากสมการข้างล่างนี้

$$\%H = \frac{\text{peak area of sample}}{\text{peak area of 4\% standard hydrogen gas}} \times 4\%$$

2. หลังจากที่ได้ %H แล้วก็จะทำการเทียบหาปริมาณของไฮโดรเจนในหน่วยลิตร โดยคิดเทียบจากพื้นที่ head space ทั้งหมดที่ใช้จริงในการทดลอง

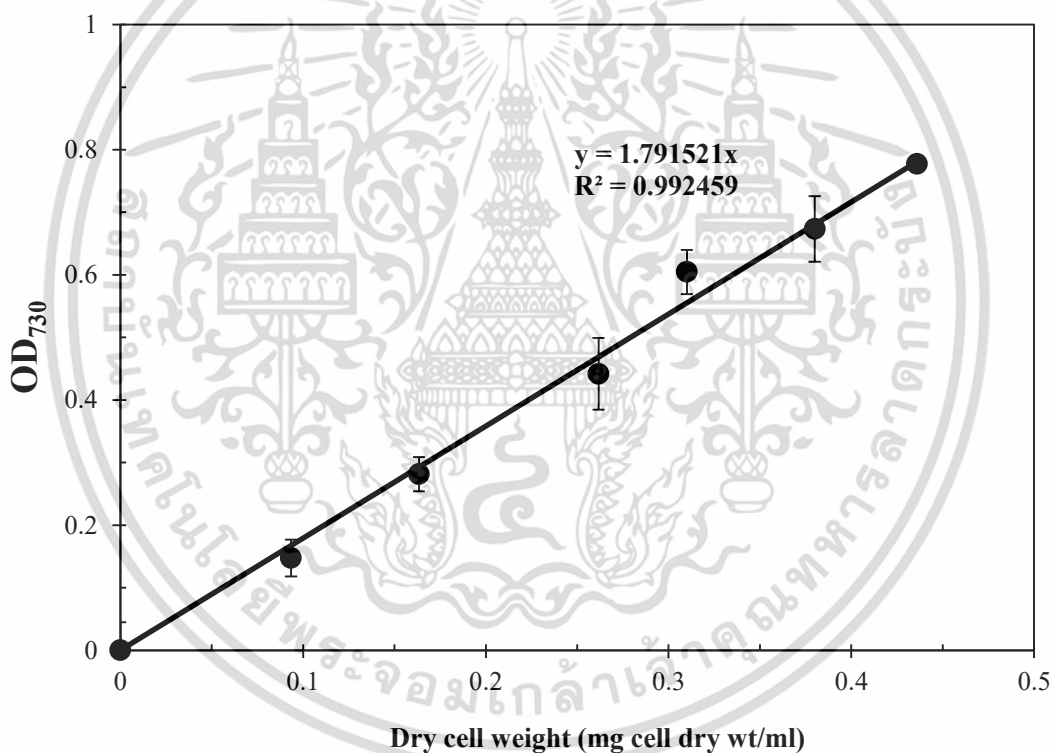
3. คำนวณจำนวนโมลของไฮโดรเจนโดยเทียบจากปริมาตรของแก๊ส ณ ความดันบรรยากาศและอุณหภูมิห้องขณะที่ทำการทดลอง (ที่สภาวะ STP แก๊ส 1 โมล จะมีปริมาตร 22.4 ลิตร ถ้าอุณหภูมิห้องขณะทำการทดลองคือ 32 องศาเซลเซียส แก๊ส 1 โมลจะมีปริมาตร 25.0956 ลิตร ซึ่งคำนวณโดยใช้สูตร $PV = nRT$ เมื่อ $P = 0.9973 \text{ atm}$, $n = 1 \text{ mol}$, $T = 305 \text{ K}$ และ $R = 82.0575 \text{ cm}^3 \cdot \text{atm} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

4. คำนวณปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ $\mu\text{mol H}_2/\text{mg dry wt.}$ (ดูการคำนวณน้ำหนักแห้งในภาคผนวก ง)

ภาคผนวก ง

การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งจากค่าความขุ่นของสาหร่าย

น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 สามารถคำนวณได้จากสมการเส้นตรง $y = 1.791521x$ เมื่อ y คือค่าการดูดกลืนแสงหรือค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียวที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และ x คือน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP



รูปที่ ง-1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียว (OD₇₃₀) และน้ำหนักเซลล์แห้ง

ภาคผนวก จ

ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova

ชุดข้อมูลที่อยู่ในกลุ่มอักษรแตกต่างกัน คือชุดข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p -value < 0.05) และชุดข้อมูลที่มีกลุ่มอักษรเหมือนกัน คือชุดข้อมูลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p -value > 0.05)

ตารางที่ จ-1 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาผลของความขุ่นเซลล์ (OD₇₃₀) ต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Tetraspora* sp. CU2551 ในระบบเซลล์อิสระ (รูปที่ 4.1)

H₂ production from vary initial OD₇₃₀

Duncan^a

initialOD ₇₃₀	N	Subset for alpha = 0.05						
		a	b	c	d	e	f	g
.100	3	.013400						
.090	3	.019367	.019367					
.080	3	.019733	.019733					
.070	3	.021300	.021300					
.060	3	.027333	.027333					
.050	3		.035400					
.040	3			.056767				
.030	3				.147133			
.020	3					.199767		
.005	3						.465600	
.010	3							.506400
Sig.		.091	.054	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-2 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของ การศึกษาผลของความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น (initial OD₇₃₀) ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ เมื่อปรับให้ทุก สภาวะมีความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายก่อนบ่มไฮโดรเจนเท่ากับ 0.265 เท่ากัน (รูปที่ 4.2)

H₂ production from vary initial OD₇₃₀ (adjust to the same final OD₇₃₀)

Duncan^a

initialOD ₇₃₀	N	Subset for alpha = 0.05
		a
.070	3	.465467
.060	3	.466700
.080	3	.490233
.040	3	.491433
.050	3	.494167
.090	3	.497467
.020	3	.501100
.030	3	.504767
.005	3	.517667
.100	3	.524567
.010	3	.525267
Sig.		.053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-3 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ในการศึกษาผลของความชุ่มเซลล์สุดท้าย (final OD₇₃₀) ของเซลล์ใน stage I (รูปที่ 4.3)

H₂ production from vary final OD₇₃₀ (start with the same initial OD₇₃₀)

Duncan^a

FinalOD ₇₃₀	N	Subset for alpha = 0.05					
		a	b	c	d	f	g
1.0	3	.217217					
.9	3	.237325					
.8	3	.275972	.275972				
.7	3		.333711	.333711			
.6	3			.375993	.375993		
.5	3			.404378	.404378		
.4	3				.412140		
.1	3					.490208	
.3	3					.519108	.519108
.2	3						.578614
Sig.		.101	.091	.051	.305	.384	.082

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-4 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการหาขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดอัลจิเนตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน เมื่อบ่มภายใต้สภาวะที่โล่อากาศ (รูปที่ 4.4)

H₂ production from vary cell bead size (Ar)

Duncan^a

size of cell bead (mm)	N	Subset for alpha = 0.05				
		a	b	c	d	e
Free cell	3	.815667				
1.70-2.00	3		.907800			
2.00-2.36	3		.931700	.931700		
2.36-2.80	3			.950267		
>3.35	3				.995200	
2.80-3.35	3					1.049433
Sig.		1.000	.070	.149	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-5 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการหาขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดอัลจิเนตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน เมื่อบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (รูปที่ 4.4)

H₂ production from vary cell bead size (O₂)

Duncan^a

size of cell bead (mm)	N	Subset for alpha = 0.05			
		A	B	C	D
Free cell	3	.002667			
1.70-2.00	3	.009200			
2.00-2.36	3		.022333		
2.80-3.35	3			.037000	
2.36-2.80	3			.038667	
>3.35	3				.053000
Sig.		.064	1.000	.613	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-6 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการหาความเข้มข้นเซลล์ในเม็ดอัลจิเนตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน เมื่อบ่มภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศ (รูปที่ 4.5)

H₂ production from vary cell concentration (Ar)

Duncan^a

Cell concentration (mg cell./mL _{alginate})	N	Subset for alpha = 0.05					
		a	b	c	d	e	f
10.000	3	.372900					
8.000	3	.460133					
6.000	3	.476800					
4.000	3		.636200				
2.000	3		.692000	.692000			
Free cell	3			.770500			
1.000	3				.991400		
.500	3				1.097300		
.250	3					1.271367	
.125	3						1.644667
Sig.		.071	.294	.146	.054	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-7 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการหาความเข้มข้นของเซลล์ในเม็ดอัลจิเนตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน เมื่อบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (รูปที่ 4.5)

H₂ production from vary cell concentration (O₂)

Duncan^a

Cellcon centration (mg cell./mLalginate)	N	Subset for alpha = 0.05					
		A	B	C	D	E	F
Free cell	3	.002067					
10.000	3	.013067	.013067				
6.000	3	.022500	.022500	.022500			
8.000	3	.023167	.023167	.023167			
4.000	3		.034767	.034767	.034767		
1.000	3		.040200	.040200	.040200	.040200	
.500	3			.051600	.051600	.051600	
.250	3				.056800	.056800	
2.000	3					.066500	
.125	3						.120533
Sig.		.149	.072	.055	.132	.075	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-8 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการหาความเข้มข้นอัลจินตที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์เพื่อผลิตไฮโดรเจน เมื่อปมภายใต้สภาวะที่โล่อากาศ (รูปที่ 4.6)

H₂ production from vary alginate concentration (Ar)

Duncan^a

alginate concentration (%w/v)	N	Subset for alpha = 0.05			
		a	b	c	d
Free cell	3	.978867			
1	3		1.191333		
2	3		1.215000		
3	3			1.343100	
4	3				1.776600
5	3				1.787533
Sig.		1.000	.583	1.000	.799

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-9 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการหาความเข้มข้นอัลจินเนตที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์เพื่อผลิตไฮโดรเจน เมื่อบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (รูปที่ 4.6)

H₂ production from vary alginate concentration (O₂)

Duncan^a

alginate concentration (%w/v)	N	Subset for alpha = 0.05			
		A	B	C	D
Free cell	3	.000067			
1	3		.015733		
2	3		.026100		
3	3			.053233	
5	3				.083100
4	3				.092267
Sig.		1.000	.116	1.000	.160

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-10 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ในการศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารหลักต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในระบบเซลล์อิสระ (รูปที่ 4.8)

H₂ase activity

Duncan^a

medium	N	Subset for alpha = 0.05			
		a	b	c	d
TAP-N-P	3	.002597			
TAP	3	.002632			
TAP-P	3	.002705			
TAP-N	3		.003604		
TAP-N-P-S	3			.004309	
TAP-N-S	3				.005126
TAP-S	3				.005292
TAP-P-S	3				.005660
Sig.		.716	1.000	1.000	.084

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-11 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ใน การศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารหลักต่อปริมาณออกซิเจนสุทธิที่เซลล์ปล่อยออกมาจากระบบการ สังเคราะห์แสงที่ 2 (รูปที่ 4.9)

O₂ evolution

Duncan^a

medium	N	Subset for alpha = 0.05	
		a	b
TAP-N	3	.000000	
TAP-S	3	.000000	
TAP-N-P	3	.000000	
TAP-N-S	3	.000000	
TAP-P-S	3	.000000	
TAP-N-P-S	3	.000000	
TAP	3		5662.908263
TAP-P	3		6000.603801
Sig.		1.000	.277

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

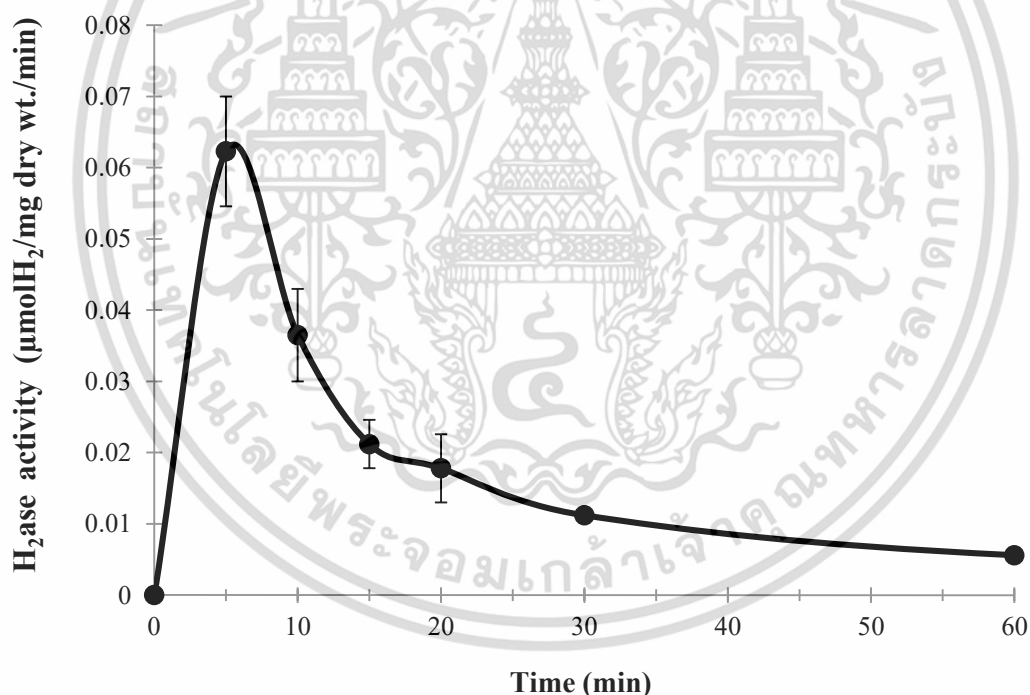
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

เวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

สำหรับการติดตามกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

จากรูปที่ ฉ-1 แสดงเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งจะเห็นว่าเวลาการทำปฏิกิริยาที่ 5 นาทีจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่สูงที่สุด ดังนั้นเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 5 นาทีจะเป็นเวลาที่เหมาะสมที่จะใช้ในการติดตามกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในงานวิจัยนี้



รูปที่ ฉ-1 เวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเพื่อติดตามกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

หมายเหตุ: ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่แสดงนี้ เป็นค่าที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

- ชื่อ-สกุล (ไทย) อาจารย์ ดร. เชตศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์
(อังกฤษ) Cherdsak Maneeruttanarungroj, Ph.D.
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 3606 00476 64 4
- การทำงาน
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
สถานที่ทำงาน สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง
จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10520
โทรศัพท์ 02-329-8400-11 โทรสาร 02-329-8412
โทรศัพท์มือถือ 084-662-6149 email: cherdsak.ma@kmitl.ac.th
- ประวัติการศึกษา
ปริญญาตรี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาเอก ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ประสบการณ์งานวิจัย
 - ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยเครื่องหมายพันธุกรรมเชิงโมเลกุล
 - ศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน
 - ศึกษากระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในจุลชีพสีเขียว

ผลงานวิจัย

- Maswanna, T., Phunpruch, S., Lindblad, P. and **Maneeruttanarungroj, C.** (2018) Enhanced hydrogen production by optimization of immobilized cells of the green alga *Tetraspora* sp. CU2551 grown under anaerobic condition. *Biomass and Bioenergy* 111:88-95.
- Sirawattanamongkol, T. and **Maneeruttanarungroj, C.** 2018. The optimization of biohydrogen production from green alga KS03. *Proceeding of the Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2018)*, Hat Yai, Songkhla, Thailand, 7-9 February, 2018, EE301-306.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. **Maneeruttanarungroj, C.** 2018. Effect of immobilization materials and shapes on biohydrogen production from green alga *Tetraspora* sp. CU2551. Proceeding of the Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2018), Hat Yai, Songkhla, Thailand, 7-9 February, 2018, EE291-295.
4. Maswana, T. and **Maneeruttanarungroj, C.** (2017) Hydrogen production by immobilized green alga *Tetraspora* sp. CU2551 in calcium alginate using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis. Proceeding of the 13th Conference Network of Thailand conference (ENETT), Chiangmai, Thailand, May31 – 2June, 2017, 1090 – 1098.
5. Maswana, T., Phunpruch, S. and **Maneeruttanarungroj, C.** (2017) Hydrogen production in *Tetraspora* sp. CU2551 under full-factorial N-, P-, and S-nutrients deprivation. Proceeding of the Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2017), Bangkok, Thailand, February 2 – 3, 2017, 1584 – 1590.
6. **Maneeruttanarungroj, M.** and Incharoensakdi, A. (2016) RNA isolation from a tough cell wall green alga *Tetraspora* sp. CU2551. Proceeding of the Science and Technology of Emerging Materials conference (STEMa2016), 19-22
7. **Maneeruttanarungroj, C.** and Phunpruch, S. (2017) Effect of pH on Biohydrogen Production in Green Alga *Tetraspora* sp. CU2551. Energy procedia 138:1085-1092.
8. **Maneeruttanarungroj, C.** and Incharoensakdi, A. (2016) Rapid method for DNA isolation from a tough cell wall green alga *Tetraspora* sp. CU2551. World journal of microbiology and biotechnology 32(6):99.
9. **Maneeruttanarungroj, C.,** Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. (2012) Sulfate permease (SulP) and hydrogenase (HydA) in the green alga *Tetraspora* sp. CU2551: Dependence of gene expression on sulfur status in the medium. Int J Hydrogen Energy 37:15105-15116.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. **Maneeruttanarungroj, C.**, Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. (2010) A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. *Int J Hydrogen Energ* 35:13193-13199.
11. Nzila, A., Rottmann, M., Chitnumsub, P., Kiara, S. M., Kamchonwongpaisan, S., **Maneeruttanarungroj, C.**, Taweechai, S., Yeung, B. K., Goh, A., Lakshminarayana, S. B., Zou, B., Wong, J., Ma, N. L., Weaver, M., Keller, T. H., Dartois, V., Wittlin, S., Brun, R., Yuthavong, Y. and Diagana, T. T. (2010) Preclinical evaluation of the antifolate QN254, 5-chloro- N060-(2,5-dimethoxy-benzyl)-quinazoline-2,4,6-triamine, as an antimalarial drug candidate. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 2603–2610.
12. Dasgupta, T., Chitnumsub, P., Kamchonwongpaisan, S., **Maneeruttanarungroj, C.**, Nichols, SE., Lyons, TM., Tirado-Rives, J., Jorgensen, WL., Yuthavong, Y. and Anderson, K.S. (2009) Exploiting structural analysis, *in silico* screening, and serendipity to identify novel inhibitors of drug-resistant *Falciparum* malaria. *ACS Chem Biol* 4:29–40.
13. Supungul, P., Tang, S., **Maneeruttanarungroj, C.**, Rimphanitchayakit, V., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon A. (2008) Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 32, 61–70.
14. **Maneeruttanarungroj, C.**, Pongsomboon, S., Wuthisuthimethavee, S., Klinbunga, S., Wilson, K.J., Swan, J., Li, Y., Whan, V., Chu, K.H., Li, C.P., Tong, J., Glenn, K., Rothschild, M., Jerry, D. and Tassanakajon, A. (2006) Development of polymorphic expressed sequence tag-derived microsatellites for the extension of the genetic linkage map of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Anim Genet* 37, 363–368.

รางวัลที่เคยได้รับ

1. 12 August 2018
รางวัลเหรียญเงินจากการประกวดผลงานนวัตกรรมสายอุดมศึกษา ประจำปี 2561 โดย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์และบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ กรุงเทพฯ
2. 25 November 2012
Best oral presentation award from Young Scientist Program (13th FAOMBM congress). Sirindhorn Science Home, NSTDA, Thailand
3. 20 April 2012
Best oral presentation award from The Science Forum 2012 (Applies Science and Technology session). Mahamakut Building, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand: April 19 – 20, 2012.
4. 03 April 2011
Outstanding presentation award from RGJ-Ph.D. Congress XII, Jomtein Palm Beach Resort Pattaya, Chonburi, Thailand.
5. 17 June 2010
Recognized as best graduate student, Chulalongkorn University, Thailand
6. 21 August 2005
The excellent graduate student award, the Prof. Dr. Tab Nilanidhi Foundation (the award was presented to the student who received the highest GPA above 3.70 in each department).
7. 13 July 2005
Outstanding Thesis Award, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้