



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตชีวมวลและไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2
ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ
BIOMASS AND HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN ALGAL *Chlorella* sp.
LSD-W2 IN BIOREACTOR

ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤษ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๐
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ การผลิตชีวมวลและไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

แหล่งเงิน ทุนสนับสนุนงานวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน คณะวิทยาศาสตร์ สจล

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุหน่วยงานต้นสังกัด

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษภูมิ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ศ.ดร.อรรณ อินเจริญศักดิ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นหนทางหนึ่งสำหรับการส่งเสริมการผลิตชีวมวลและการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร จากการศึกษาพบว่าการขาดแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่ายชนิดนี้ได้ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร Tris acetate phosphate (TAP) ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 17.4 มิลลิโมลาร์ และแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 7.5 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ก่อนนำเซลล์ไปชักนำในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ และมีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2 ภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และปราศจากอากาศ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 78.662 ± 3.722 มิลลิลิตร เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยสูงกว่าประมาณ 19 เท่าของเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะปกติ

คำสำคัญ : ชีวมวล, การผลิตไฮโดรเจน, สาหร่ายสีเขียว, *Chlorella* sp. LSD-W2, ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

Research Title: Biomass and hydrogen production by green algal *Chlorella* sp. LSD-W2 in bioreactor

Researcher: Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch, Faculty of Science, King Mongkut Institute of Technology Ladkrabang and Prof. Dr. Aran Incharoensakdi, Faculty of Science, Chulalongkorn University

ABSTRACT

Microalgal culture system in bioreactor is one of many ways to promote biomass and hydrogen production by green algae. The objective of this research was to investigate the optimum conditions for biomass and H₂ production of unicellular green algal *Chlorella* sp. LSD-W2 in the 3.7-L Air-lift bioreactor. The result showed that the deprivation of carbon and nitrogen could inhibit cell growth and biomass production by this organism. The highest specific growth rate by *Chlorella* sp. LSD-W2 were found when cells were cultivated in Tris acetate phosphate (TAP) medium containing 17.4 mM acetic acid and 7.5 mM ammonium chloride. H₂ production by *Chlorella* sp. LSD-W2 was highest when cells were cultivated in TAP medium for 36 h followed by induction cells in nitrogen-deprived TAP medium containing 87 mM acetic acid with an initial pH of 7.2 under a continuous light intensity at 3,000 lux and anaerobic condition. Under these optimal conditions *Chlorella* sp. LSD-W2 showed the maximum H₂ accumulation with 78.662 ± 3.722 mL at 120 h of incubation time. This H₂ accumulation was approximately 19 times higher than that of cells incubated in normal TAP medium.

Keywords: Biomass, H₂ production, Green algae, *Chlorella* sp. LSD-W2, bioreactor

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การผลิตชีวมวลและไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ดำเนินงานจนสามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปี ๒๕๖๐ คณะผู้ร่วมวิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัยที่ได้ทุ่มเทกำลังกายและกำลังใจในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 พลังงานไฮโดรเจน	5
2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.....	6
2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการความร้อนเคมี.....	6
2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า	7
2.2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ	8
2.3 สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i>	8
2.4 ระยะเวลาเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว.....	11
2.5 การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว.....	12
2.6 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส.	15
2.7 ระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว	18
2.8 การผลิตชีวมวลและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบอากาศลอยตัว	21
2.9 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	23
2.9.1 แหล่งคาร์บอน.....	23
2.9.2 แหล่งไนโตรเจน.....	23
2.9.3 แหล่งซัลเฟอร์	24
2.9.4 แหล่งฟอสฟอรัส.....	24
2.9.5 แสง.....	25

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.9.6 อุณหภูมิ.....	25
2.9.7 ค่าพีเอช.....	26
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	26
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	28
3.1 สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	28
3.2 อุปกรณ์.....	28
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	29
3.4 สารเคมี.....	29
3.4.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	29
3.4.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์.....	30
3.4.3 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน.....	30
3.5 วิธีการทดลอง.....	31
3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว.....	31
3.5.2 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว.....	31
3.5.3 วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวล ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบ Air-lift.....	32
3.5.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน.....	34
3.5.5 วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift.....	35
3.5.6 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในสภาวะที่เหมาะสมเทียบกับสภาวะปกติในถังปฏิกรณ์ ชีวภาพแบบ Air-lift.....	37
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	38
4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของ สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift.....	38
4.1.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโต และการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	38
4.1.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและ การผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	46

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	
<i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร.....	51
4.2.1 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของ สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	51
4.2.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของ สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	53
4.2.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย สีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	55
4.2.4 ผลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	57
4.3 การเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในสภาวะที่เหมาะสมและสภาวะปกติ	59
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	63
เอกสารอ้างอิง	65
ภาคผนวก	72

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ข้อดีและข้อจำกัดของรูปแบบของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว.....	20
3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD))	34
4.1 ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหาร TAP-N ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2, 6, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง	54
4.2 ค่าพีเอชเริ่มต้นและค่าพีเอชหลังจากการบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ ที่ชั่วโมงต่างๆ.....	56
4.3 สภาวะที่ใช้ในการเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP และอาหาร Optimized TAP ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift	60
4.4 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 เปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> สายพันธุ์อื่นๆ ภายใต้สภาวะการเจริญและสภาวะการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	62

สารบัญรูปร่างภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 ค่าพลังงานความร้อนของเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ	6
2.2 กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า	7
2.3 องค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i>	10
2.4 การเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายสีเขียว.....	11
2.5 กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวระหว่างการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มี อากาศและการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ	13
2.6 เอนไซม์ NiFe-hydrogenase	16
2.7 เอนไซม์ FeFe-hydrogenase	17
2.8 ลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสงในรูปแบบต่างๆ	18
2.9 ลักษณะของบ่อเปิดสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว	19
2.10 ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในระบบเปิดและระบบปิด	19
2.11 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว (Air-lift bioreactor) และไดอะแกรมแสดงระบบ ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว	22
3.1 รูปร่างลักษณะของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> ไอโซเลท LSD-W2 ภายใต้ถังกลิ้ง จุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่างที่มีกำลังขยาย 1,000 เท่า	31
3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร	33
4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กรดอะซิติก โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต น้ำตาลกลูโคส และ น้ำตาลซูโครส ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ความหนาแน่นของ เซลล์ (B) และปริมาณคลอโรฟิลล์ (C).....	40
4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซิติก ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมงโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ความหนาแน่นของเซลล์ (B) และปริมาณคลอโรฟิลล์ (C)	44
4.3 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมงโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ความหนาแน่นของเซลล์ (B) และปริมาณคลอโรฟิลล์ (C)	48

สารบัญญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.4 ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0, 0.75 และ 7.5 มิลลิโมลาร์.....	52
4.5 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่มี ความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ ที่แปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.2, 7.2 และ 8.2.....	56
4.6 ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่มี ความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ และค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2 โดยแปรผันความเข้มแสงตั้งแต่ 1,000, 2,000 และ 3,000 ลักซ์.....	58
4.7 ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP และอาหาร Optimized TAP-N ภายใต้สภาวะการบ่มต่างๆ	60

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบัน ประเทศต่างๆ ทั่วโลกมีความต้องการใช้พลังงานเพิ่มสูงขึ้น พลังงานหลักที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น น้ำมันดิบ ถ่านหิน และ ก๊าซธรรมชาติ ฯลฯ ซึ่งเชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้มีอยู่ในปริมาณที่จำกัดและกำลังจะหมดไปในระยะเวลาอันใกล้นี้ นอกจากนี้ การเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลยังทำให้เกิดการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกออกสู่ชั้นบรรยากาศ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจกที่ทำให้เกิดพลังงานความร้อนสะสมในบรรยากาศของโลกมากที่สุด ดังนั้น นักวิจัยจึงจำเป็นต้องศึกษาและวิจัยเพื่อค้นหาแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงที่มีศักยภาพในการเผาไหม้สูง เป็นเชื้อเพลิงที่สะอาดและสามารถนำมาใช้ทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิลได้ พลังงานทางเลือกที่มีความน่าสนใจในการศึกษาและวิจัย ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานชีวมวล และ ก๊าซชีวภาพ รวมถึง พลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น

พลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen energy) เป็นพลังงานทางเลือกที่มีคุณสมบัติในการเผาไหม้ โดยให้ค่าพลังงานความร้อนสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพลังงานที่ได้จากเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นๆ การเผาไหม้เชื้อเพลิงไฮโดรเจนจะให้ค่าพลังงานความร้อนสูงถึง 141.65 เมกะจูลต่อกิโลกรัม (Perry, 1963) ก๊าซไฮโดรเจนยังจัดเป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด โดยเมื่อเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนจะได้ไอน้ำออกมาเป็นผลิตภัณฑ์เท่านั้น ในปัจจุบัน ไฮโดรเจน ที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ได้มาจากกระบวนการความร้อนเคมีโดยใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นวัตถุดิบ อย่างไรก็ตาม ข้อเสีย ของกระบวนการนี้ คือ การใช้พลังงานและความดันสูง อีกทั้งยังก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางอากาศ จากการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นแหล่งวัตถุดิบ ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจน จากกระบวนการทางชีวภาพจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจาก การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพเป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยปฏิกิริยาชีวเคมีในสิ่งมีชีวิตซึ่งสามารถใช้ทรัพยากรทางธรรมชาติหรือใช้วัสดุเหลือทิ้งเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจน อีกทั้งกระบวนการทางชีวภาพสามารถดำเนินการได้ภายใต้สภาวะปกติ อาทิเช่น อุณหภูมิห้อง ความดันบรรยากาศ และ พีเอชที่เป็นกลาง เป็นต้น

สิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ แบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียว และไซยาโนแบคทีเรีย เป็นต้น ในบรรดาสสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ สาหร่ายสีเขียว (Green algae) เป็นสิ่งมีชีวิตที่น่าสนใจสำหรับการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวสามารถนำเอาพลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้เป็นแหล่งพลังงานผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำให้ได้มวลชีวภาพและก๊าซไฮโดรเจนออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ และจากลักษณะของสาหร่ายสีเขียวที่มีขนาด

เล็ก มี อัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและให้ผลผลิตมวลชีวภาพที่สูง มีความสามารถใช้อินทรีย์คาร์บอนหรืออนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ รวมถึงมีลักษณะเฉพาะที่เจริญได้ดีในน้ำที่มีไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสสูง และมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างปานกลาง ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว เพาะเลี้ยงได้ง่ายในอาหารที่หลากหลาย

การผลิตไฮโดรเจนจากการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวจะเกิดขึ้น เมื่อสาหร่ายสีเขียวได้รับพลังงานแสง โมเลกุลของคลอโรฟิลล์ที่เป็นศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยา (Reaction center) ในระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้น หลังจากนั้น เกิดการคายพลังงานออกมาโดยการปลดปล่อยอิเล็กตรอนพร้อมกับการเกิดกระบวนการแตกตัวของน้ำ (Water splitting) การแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นโปรตอน อิเล็กตรอน และโมเลกุลของออกซิเจน อิเล็กตรอนจากระบบแสงสองจะถูกถ่ายทอดไปให้ตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไปเป็นลำดับจนกระทั่งถึงระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) เมื่อศูนย์กลางปฏิกิริยาในระบบแสงหนึ่งได้รับพลังงานแสง อิเล็กตรอนในระบบแสงหนึ่งจะถูกปลดปล่อยออกจากศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไปจนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) เฟอร์รีดอกซินจะส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนโดยเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นโมเลกุลของไฮโดรเจน

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวเพื่อศึกษาการผลิตชีวมวลและการผลิตไฮโดรเจนนั้น ต้องได้ผลผลิตสาหร่ายต่อพื้นที่สูงที่สุดและสามารถควบคุมสภาวะการผลิตไฮโดรเจนได้ง่าย ดังนั้น จึงต้องเลือกระบบเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อการขยายระดับการผลิต (Scale-up) โดยเพาะเลี้ยงในระบบปิดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Closed photobioreactor) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนให้เหมาะสมได้มีประสิทธิภาพ และป้องกันการปนเปื้อนของสาหร่ายสีเขียวรวมถึงจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแต่ละชนิดจะมีลักษณะรูปร่าง อัตราส่วนของพื้นที่ผิว และระบบการผสมที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องเลือกชนิดของถังปฏิกรณ์และการควบคุมระบบภายในถังให้เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว (Air-lift bioreactor) เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีระบบการผสมโดยอาศัยการให้อากาศหมุนเวียนภายในถัง ข้อดีของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift คือ มีแรงเฉือนต่ำและมีพื้นที่ผิวในการสังเคราะห์แสงมากจึงเหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายสีเขียว สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวแต่ละชนิดนั้นแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง และความสามารถในการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแต่ละชนิด ปัญหาของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ คือปริมาณออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายจะมีปริมาณสูงขึ้น ออกซิเจนจะไปยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ทำหน้าที่ผลิต

ไฮโดรเจน ดังนั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยทางเคมีและกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวอีกด้วย

งานวิจัยนี้ สนใจศึกษาปัจจัยทางเคมีและปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลในประเทศไทย โดยจะดำเนินการเพาะเลี้ยงและผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift เพื่อเป็นการขยายขนาดการผลิตชีวมวลและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift
- 2) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) การเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว เริ่มต้นจาก การแยกโคลนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 กระจายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์สาหร่ายไปเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าภายใต้การแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 3 วัน

- 2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 3 ลิตร เริ่มต้นจากการนำหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวมาปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรให้มีค่าเท่ากับ 0.1 นำเซลล์สาหร่ายไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ และควบคุมระบบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2 อัตราการไหลของอากาศ 1 ลิตรต่อนาที และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการศึกษาปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน แล้ว ทำการวิเคราะห์เจริญเติบโตของสาหร่ายโดยการวัดความขุ่นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์จากการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

- 3) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เริ่มต้นจากการนำสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต มาชักนำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจน

ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ จากนั้น ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการ ผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้นของอาหาร และความเข้มแสง ทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลและไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift
- 2) สามารถขยายขนาดการเพาะเลี้ยงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 เพื่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไปได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลังงานไฮโดรเจน

พลังงานเป็นปัจจัยพื้นฐานหนึ่งที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และจำเป็นต่อการพัฒนาทางด้านวิทยาการและเทคโนโลยี การขยายตัวทางเศรษฐกิจและ ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ พลังงานที่ใช้ในปัจจุบันมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ได้มาจากแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิล โดยเฉพาะ น้ำมัน ปิโตรเลียม ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ (IEA, 2006) เชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้มีอยู่ในปริมาณจำกัดและ คาดว่าจะขาดแคลนในอนาคต โดยดูจากข้อมูลการใช้ พลังงานของโลกที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี นอกจากนี้ การใช้พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงเหล่านี้จะปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกหลักคือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ในปริมาณมากออกสู่ชั้นบรรยากาศ และยังปล่อยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ออกไซด์ของไนโตรเจน (NOx) ไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นๆ และเขม่าควันที่เหลือจากการเผาไหม้เชื้อเพลิง ฯลฯ อันจะนำไปสู่การเกิดปรากฏการณ์เรือนกระจกที่เป็นสาเหตุหลักของภาวะโลกร้อน จากปัญหาดังกล่าว หลายประเทศทั่วโลกจึงต่างหันมาให้ความสนใจและให้ความสำคัญกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น ทำให้มีความจำเป็นที่ต้องแสวงหาแหล่งเชื้อเพลิงทางเลือกใหม่ที่มีศักยภาพสูง ซึ่งสามารถนำมาทดแทนการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลได้ แหล่งพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพสูงและสะอาด คือ พลังงานจากเชื้อเพลิงไฮโดรเจน

ก๊าซไฮโดรเจน (Hydrogen, H₂) เป็นเชื้อเพลิงชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนที่สำคัญในอนาคต เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ให้พลังงานสูง โดยให้ค่าพลังงานความร้อนจากการเผาไหม้สูงถึง 141.65 เมกะจูลต่อกิโลกรัม (Perry, 1963) ซึ่งมากกว่าค่าพลังงานความร้อนจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นๆ (รูปที่ 2.1) การเผาผลาญไฮโดรเจนทั้งจากการเผาไหม้โดยตรงหรือจากปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีในเซลล์เชื้อเพลิง จะได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นไอน้ำและได้ก๊าซออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ ทำให้ไม่ก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือก๊าซมลพิษอื่นๆ ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ก๊าซไฮโดรเจนสามารถพบได้ตามธรรมชาติ โดยมี ประมาณ 0.1 ส่วนในล้านส่วนของบรรยากาศในโลก คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย ไม่มีฤทธิ์ในการกัดกร่อนและไม่เป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์ ไฮโดรเจนมีจุดเดือดที่ต่ำมาก ถึง 20.2 เคลวิน หรือ -252.95 องศาเซลเซียส ไฮโดรเจนยังมีความไวไฟสูง โดยมีอุณหภูมิการเผาไหม้สูงถึง 3,000 องศาเซลเซียส และยังใช้พลังงานในการจุดติดไฟต่ำ ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนในอากาศที่ระดับจุดติดไฟสามารถระเบิดได้และเกิดการลุกไหม้เป็นเปลวไฟสีน้ำเงินจางๆ โดยอัตราการเผาไหม้ ก๊าซไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้มีระยะชะงักเปลวไฟสั้น ก๊าซไฮโดรเจนยังมีน้ำหนักเบากว่าอากาศ จึงสามารถแพร่กระจายในอากาศอย่างรวดเร็ว (Balat, 2008) จากคุณสมบัติข้างต้น ก๊าซไฮโดรเจนจึงจัดเป็นเชื้อเพลิงที่มีประสิทธิภาพและสามารถพัฒนาให้เป็นเชื้อเพลิงหลักได้ในอนาคต



รูปที่ 2.1 ค่าพลังงานความร้อนของเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ

ที่มา : <http://www.gasthai.com>

ในปัจจุบัน มีการนำก๊าซไฮโดรเจนไปใช้ประโยชน์ในหลายรูปแบบ เช่น การนำไฮโดรเจนไปใช้ในภาคคมนาคมขนส่งเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเผาไหม้ภายใน โดยใช้ผสมกับเชื้อเพลิงประเภทอื่นในเครื่องยนต์สันดาปภายใน การนำไฮโดรเจนไปใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการกลั่นน้ำมันเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำมัน ใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการผลิตสารเคมีและยา เป็นต้น (ธรรมบุญ, 2550) ในปัจจุบัน เครื่องยนต์สันดาปภายในที่ใช้เชื้อเพลิงไฮโดรเจนมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซล การใช้พลังงานไฮโดรเจนจะช่วยด้านความมั่นคงทางพลังงานของภาคพลังงาน โดยลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ นอกจากนี้ การเปลี่ยนเครื่องยนต์ของยานพาหนะจากระบบการเผาไหม้น้ำมันธรรมดาเป็นการเผาไหม้เชื้อเพลิงไฮโดรเจน สามารถลดการสร้างก๊าซพิษและเขม่าควันเข้าสู่แหล่งชุมชนได้

2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งได้เป็น 3 กระบวนการหลัก ดังนี้

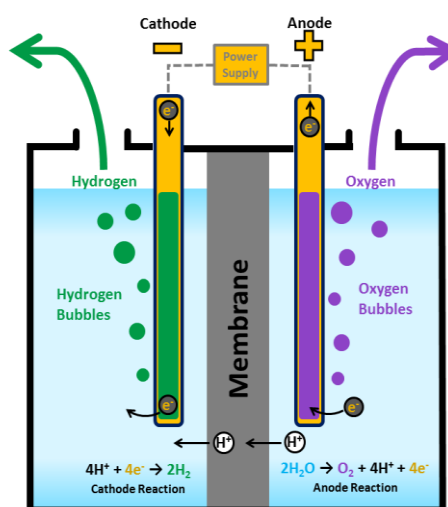
2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการความร้อนเคมี

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการความร้อนเคมี (Thermochemical process) เป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้ความร้อนในการเปลี่ยนวัตถุดิบหลักที่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน หรือ ซีวมวล เป็นต้น ไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นก๊าซผสมซึ่งประกอบด้วย ก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และ มีเทน จากนั้น จะนำก๊าซ

ผสมที่ได้มาผ่านกระบวนการทำให้ได้ไฮโดรเจนที่บริสุทธิ์ การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการความร้อนเคมีที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมสามารถแบ่งเป็น 2 กระบวนการย่อย คือ กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam reforming process) และกระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification process) กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำเป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่นิยมมากที่สุด โดยคิดเป็น 96 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรม (Wünschiers and Lindblad, 2002) แต่กระบวนการนี้มีข้อเสีย คือ การใช้อุณหภูมิและพลังงานค่อนข้างสูงในการเกิดปฏิกิริยารีฟอร์มมิง และการใช้วัตถุดิบจากก๊าซธรรมชาติหรือถ่านหินซึ่งมีอยู่ในปริมาณจำกัด และยังก่อให้เกิดปัญหามลพิษจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลอีกด้วย

2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

การผลิตไฮโดรเจนจากการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Water electrolytic process) เป็นการใช้ กระแสไฟฟ้าเพื่อแยกโมเลกุลของน้ำ ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน การแยกน้ำด้วยไฟฟ้าสามารถใช้ไฟฟ้า ที่มาจากแหล่งกำเนิดไฟฟ้าทุกชนิด ไม่ว่าจะเป็นไฟฟ้าจากแหล่งพลังงานหมุนเวียน หรือแหล่งพลังงานนิวเคลียร์ การแยกโมเลกุลของน้ำด้วยไฟฟ้าจะเกิดขึ้นในอุปกรณ์ที่เรียกว่า “อิเล็กโทรไลเซอร์ (Electrolyzer)” โดยส่งกระแสไฟฟ้าผ่านอิเล็กโทรดขั้วบวก (Anode) และอิเล็กโทรดขั้วลบ (Cathode) ไปยังน้ำที่เพิ่มคุณสมบัติการนำไฟฟ้าจากการเติมสารอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte) ไฮโดรเจนอะตอมจะเข้าไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบและออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วบวก (รูปที่ 2.2) กระบวนการผลิตนี้ใช้กระแสไฟฟ้ามากถึง 90 กิโลวัตต์ และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง แต่ มีข้อเสีย คือ ต้องการกระแสไฟฟ้าจำนวนมากในการผลิต และจะต้องทำในสภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียส (Santos and Sequeira, 2013)



รูปที่ 2.2 กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า
ที่มา : <https://www.drkrok.com/scientists-found-a-low-cost-way-to-produce-hydrogen/>

2.2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ (Biological process) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยปฏิกิริยาชีวเคมีในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหรือที่เรียกว่าจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ แบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไชยาโนแบคทีเรีย และ สาหร่ายสีเขียว เป็นต้น ก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตนี้ถูกเรียกว่า “ไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen)” จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถใช้แหล่งวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจนได้หลากหลาย เช่น น้ำ แสงแดด สารอินทรีย์ และอนินทรีย์คาร์บอน รวมถึงวัตถุดิบที่เป็นของเหลือทิ้ง เช่น กากน้ำตาล หรือ มวลชีวภาพที่ได้จากระบบบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น ถึงแม้ว่าในปัจจุบัน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมยังนิยมใช้กระบวนการความร้อนเคมี แต่แหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจนนั้น มีอยู่ในปริมาณจำกัด มีการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างกระบวนการผลิต และยังคงต้องใช้พลังงานในกระบวนการผลิตที่สูง ดังนั้น นักวิจัยจึงหันมาสนใจพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเพิ่มมากขึ้น

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน แบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก แบคทีเรียสังเคราะห์แสงผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน ไชยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวใช้เพียงแสง และน้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ในปัจจุบัน สาหร่ายสีเขียวได้รับความสนใจที่จะนำมาผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบจุลินทรีย์ชนิดอื่น คือ สาหร่ายสีเขียวสามารถใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดนั่นคือ แสงและน้ำ มาใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน และจากคุณสมบัติของสาหร่ายสีเขียวที่มีขนาดเล็ก เพาะเลี้ยงได้ง่ายทั้งในสภาวะโฟโตออโตโทรปและโฟโตเฮเทอโรโทรป มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและเพิ่มปริมาณจำนวนมากได้ โดยสามารถเจริญได้ดีในน้ำที่ค่าความเป็นกรดต่างปานกลาง ดังนั้น จึงเป็นการลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยง อีกทั้งยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทั้งบริโภคโดยตรงและใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตเป็นสีธรรมชาติ สารปฏิชีวนะ เครื่องสำอาง และยารักษาโรค ฯลฯ

2.3 สาหร่ายสีเขียว *Chlorella*

สาหร่ายสีเขียวจัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (Eukaryote) จัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Chlorophyta) สาหร่ายในดิวิชันนี้ส่วนใหญ่มีสีเขียวเหมือนหญ้า ภายในเซลล์มีระบบออร์แกเนลล์ที่ซับซ้อน มีนิวเคลียส และมีเยื่อหุ้มนิวเคลียสที่ชัดเจน การดำรงชีวิตเป็นแบบพึ่งพาตนเองโดยผลิตสารอาหารและพลังงานผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียวมีทั้งพวกที่ดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว (Unicellular) และพวกที่เซลล์เจริญรวมกันแบบหลายเซลล์ (Multicellular) เซลล์ของสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วยวงกวัดหลายชนิด ได้แก่ คลอโรพิลล์ เอ คลอโรพิลล์ บี แคโรทีนอยด์และแซนโทฟิลล์ ซึ่งทำหน้าที่ดูดซับพลังงานแสงมาใช้ในกาสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียวมีการสืบพันธุ์แบบอาศัย

เพศอย่างง่าย ๆ โดยการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่า แกมีต (Gamete) และผสมพันธุ์กัน จนได้เป็นไซโกต (Zygote) และมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแบ่งเซลล์ (Fission) การสร้างสปอร์ที่มีแฟลกเจลลา หรือ การสร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ ภายในสปอร์แรงเทียม สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์จัดเป็นสาหร่ายน้ำจืด ซึ่งเจริญอยู่ในน้ำตื้นหรือน้ำลึกที่แสงส่องถึง สาหร่ายสีเขียวบางชนิดขึ้นอยู่บน ก้อนหิน ทราบย โคลน เปลือกหอย หรือ น้ำแข็ง สาหร่ายอีกประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ที่เหลือเป็นสาหร่ายทะเล ซึ่งมักพบบริเวณน้ำตื้นตามแนวชายฝั่ง สาหร่ายสีเขียวเป็นสาหร่ายที่มีความหลากหลายมากที่สุด โดยมีการค้นพบมากถึง 450 จีนัส และสามารถระบุชนิดได้มากกว่า 7,500 สปีชีส์ (ยิวดี, 2546)

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1890 โดยนักจุลชีววิทยาชาวดัตช์ M.W. Beijerinck และได้ตั้งชื่อสาหร่ายสีเขียวชนิดนี้ว่าคลอเรลลา (*Chlorella*) ซึ่งมาจากภาษากรีกคำว่า คลอโรส (Chloros) ที่แปลว่าสีเขียว กับภาษาละติน คำว่า เอลลา (Ella) ที่แปลว่า เล็ก (Kuhl and Lorenzen, 1963) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดแรกที่ใช้ในการวิจัยตั้งแต่ในปี ค.ศ. 1950 นอกจากนี้ ได้มีการใช้เป็นแบบจำลองในโครงการอวกาศเพื่อดูความเป็นไปได้ในการใช้ทำโปรตีนเซลล์เดียว (Single cell protein) ในปี ค.ศ. 1960 ได้เริ่มมีบริษัทผลิตสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ขึ้นในประเทศไทยได้หวั่น กระบวนการผลิตสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ส่วนมากจะเพาะเลี้ยงแบบกลางแจ้งในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนภายใต้การให้แสง

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* จัดอยู่ในลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom: Plantae

Division: Chlorophyta

Class: Trebouxiophyceae

Order: Chlorellales

Family: Chlorellaceae

Genus: *Chlorella*

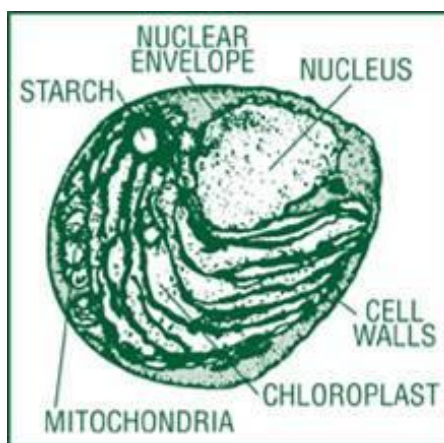
สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* มีลักษณะสำคัญดังนี้

1. ลักษณะของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella*

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่มีขนาดเล็ก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2-10 ไมโครเมตร ไม่มีแฟลกเจลลา อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรืออยู่กันเป็นกลุ่มก้อน ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างหลายแบบ เช่น ทรงกลม รูปรี หรือ รูปไข่

2. โครงสร้างเซลล์

เซลล์สาหร่าย *Chlorella* มีคลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นรูปถ้วยหรือเป็นแบบแถบข้าง (Parietal) โดยภายในคลอโรพลาสต์มีรงควัตถุที่ช่วยในการสังเคราะห์แสง คือ คลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll a) คลอโรฟิลล์ บี (Chlorophyll b) เบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) และแซนโทฟิลล์ (Xanthophyll) สาหร่าย *Chlorella* อาจมีหรือไม่มีเม็ดแป้ง (Starch grain) ไม่มีรยางค์และคอนแทรคไทล์แวคิวโอล (Contractile vacuole) มีผนังเซลล์ (Cell wall) หนาและแข็ง 3 ชั้น ผนังเซลล์ชั้นกลางหนาที่สุดประกอบด้วยเซลลูโลส (Cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ผนังเซลล์ชั้นนอกเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ซึ่งจะทำหน้าที่จับกับโลหะหนักหรือสารพิษในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว และชั้นในสุดเป็นชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 2.3) (Kumar and Singh, 1971)



รูปที่ 2.3 องค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella*

ที่มา : <http://www.halsoprofeten.com/chlorella/>

3. การสืบพันธุ์

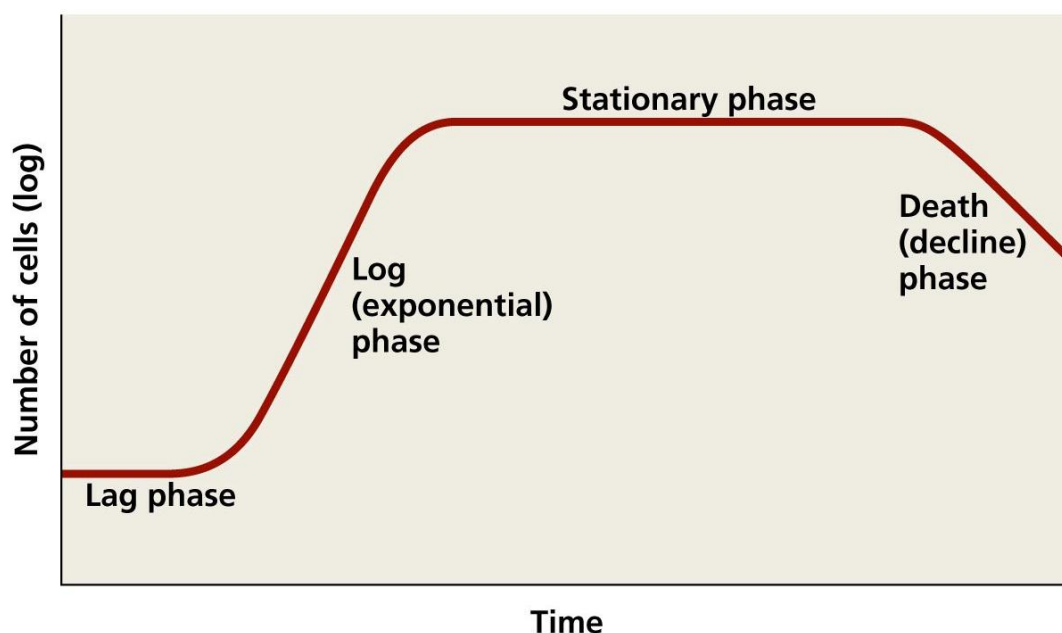
สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction) โดยการสร้างอโตสปอร์ (Autospore) ขึ้นในเซลล์แม่ โดยแต่ละครั้งของการสร้างอโตสปอร์นั้นสามารถสร้างได้จำนวน 2, 4, 6, 8 และ 16 สปอร์ แต่ละอโตสปอร์จะพัฒนาเซลล์จนเหมือนเซลล์แม่

4. แหล่งที่อยู่

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* เติบโตได้ในแหล่งที่มีความเข้มข้นของสารอาหารในช่วงกว้าง ในธรรมชาติจึงพบสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และ น้ำเสีย โดยทั่วไป สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* จะอยู่อย่างอิสระและบางสายพันธุ์สามารถอาศัยอยู่ในภายในตัวของสัตว์อื่น เช่น ฟองน้ำ ไฮดรา โปรโตซัว เป็นต้น (Kumar and Singh, 1971; Richmond, 1986)

2.4 ระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

การวัดมวลชีวภาพและการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น การนับจำนวนเซลล์ หรือการหามวลชีวภาพของสาหร่ายต่อหน่วยปริมาตรน้ำ เป็นต้น เมื่อนำเซลล์สาหร่ายจำนวนหนึ่งใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แล้วทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต จะพบว่าเซลล์สาหร่ายมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น (ธวัชชัยและคณะ, 2547) รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายจะมีลักษณะของกราฟโค้งคล้ายตัว “S” (Sigmoid curve) ซึ่งเรียกว่า เส้นโค้งการเติบโต (Growth curve) การเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้ (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 การเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายสีเขียว

ที่มา : <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%206/growth.html>

1. ระยะพัก (Lag phase) เป็นระยะแรกที่เซลล์สาหร่ายปรับตัวเข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ มีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสมที่ใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างโปรตีนและส่วนประกอบอื่นๆ ที่สำคัญของเซลล์ ในระยะท้ายของระยะพักนี้ เซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อยและพร้อมจะแบ่งตัวเพื่อเข้าสู่ระยะถัดไป ระยะเวลาในช่วง Lag phase นี้จะยาวนานขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อและปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆ

2. ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (Exponential หรือ Logarithmic phase) ในระยะนี้ สาหร่ายจะมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว มีอัตราการเพิ่มสูงสุด โดยอัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นคงที่ ในช่วงท้ายของระยะนี้ สาหร่ายจะมีอัตราการเจริญลดลง เนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการบดบังแสงซึ่งกันและกัน

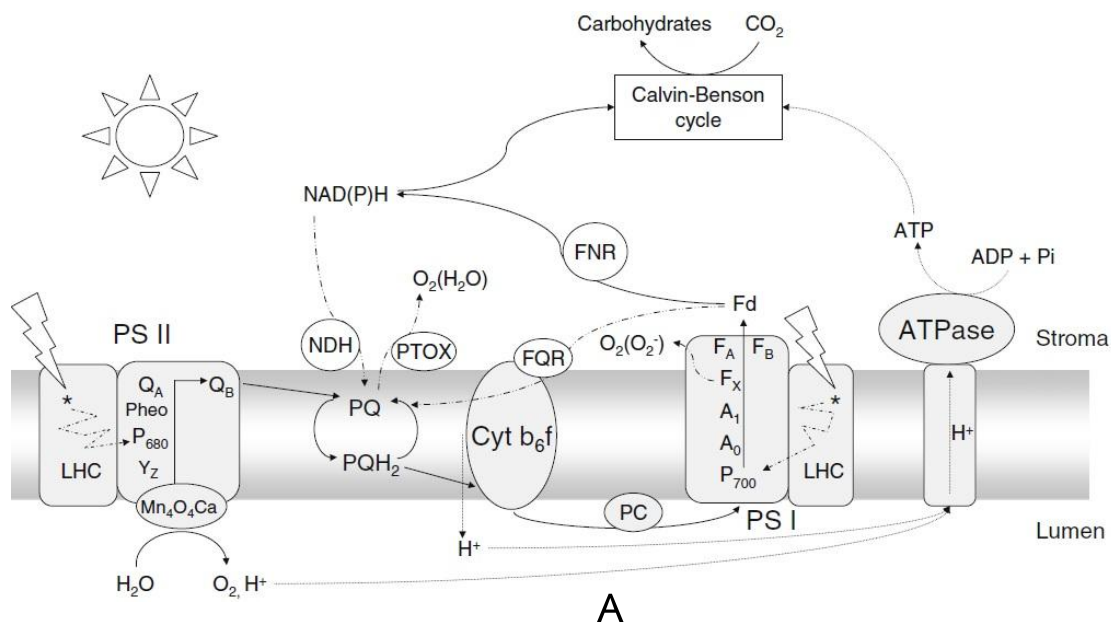
3. ระยะคงจำนวนเซลล์ (Stationary phase) เป็นระยะที่เซลล์มีจำนวนคงที่ เซลล์สาหร่ายไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก หรือ มีอัตราการเกิดเท่ากับอัตราการตายของเซลล์ องค์ประกอบบางอย่างภายในเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้จะหมดลง ทำให้เกิดการขาดธาตุอาหารที่สำคัญ นอกจากนี้ ของเสียที่เซลล์สาหร่ายสร้างขึ้นรวมถึงการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในอาหารมีผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายอีกด้วย

4. ระยะเซลล์ตาย (Death หรือ Decline phase) เป็นระยะสุดท้ายของการเจริญ มวลของสาหร่ายจะเริ่มลดลง เซลล์สาหร่ายที่มีอยู่จะตายลง เนื่องจากอาหารอาจหมดไป และมีสารพิษสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก

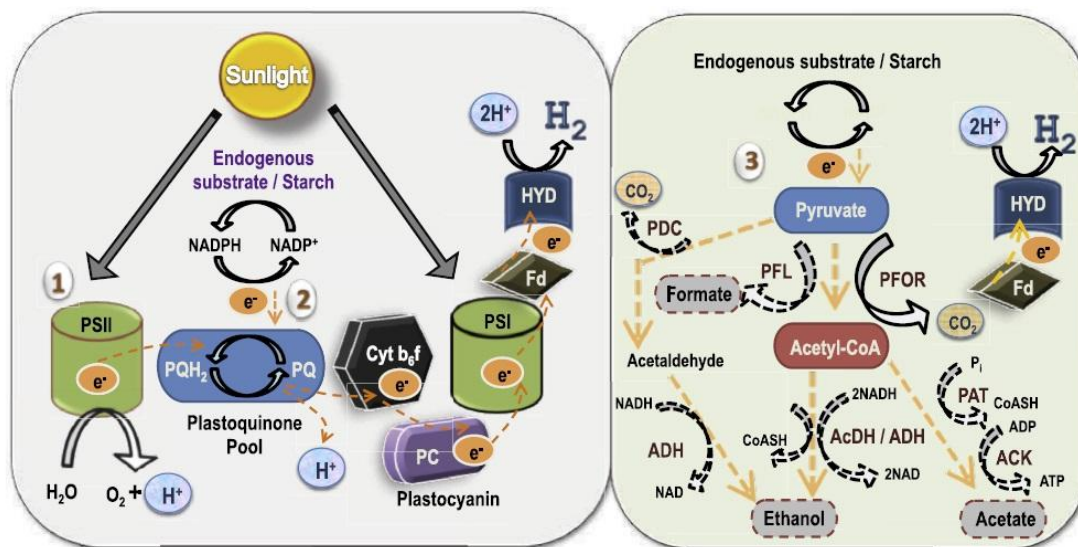
2.5 การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว

การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวถูกค้นพบมานานกว่า 70 ปีมาแล้ว โดยมีการค้นพบการผลิตไฮโดรเจนเป็นครั้งแรกในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* (Gaffron, 1939) ในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น สาหร่ายสีเขียวบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการบ่มที่ปราศจากอากาศทั้งในที่มืดและในที่ที่มีแสง สาหร่ายสีเขียวที่เป็นที่นิยมนำมาศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. เป็นต้น (Gaffron and Rubin, 1942; Healey, 1970; Skjånes *et al.*, 2008; He *et al.*, 2012; Pongpadung *et al.*, 2015) สาหร่ายสีเขียวผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ในกระบวนการสังเคราะห์แสง จะเกิดกลไกของการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสอง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโปรตอน อิเล็กตรอน และโมเลกุลของออกซิเจน อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจน ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง ดังนั้น การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน โดยการเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จึงจำเป็นต้องรักษาปริมาณของออกซิเจนให้มีความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (Ghirardi *et al.*, 1997)

การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวอย่างมีประสิทธิภาพ ทำได้โดย แบ่งระยะเวลาออกเป็น 2 ช่วง (Two-stage process) คือ ช่วงที่ 1 ช่วงของการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Aerobic condition) และช่วงที่ 2 คือ ช่วงของการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ (Anaerobic condition) (รูปที่ 2.5) (Melis *et al.*, 2000)



A



B

รูปที่ 2.5 กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวระหว่างการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (A) และการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ (B) [ATP synthase (ATPase), Cytochrome b_6/f complex (Cyt b_6/f), Ferredoxin (Fdx), Ferredoxin-NADP reductase (FNR), Light harvesting complex (LHCII), NAD(P)H-dehydrogenase (NDH), Photosystem II (PSII), Photosystem I (PSI), Plastid terminal oxidase (PTOX), Plastocyanin (PC), Plastoquinone (PQ), Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (PFOR)]

ที่มา : Antal *et al.*, 2011; Eroglu and Melis, 2016

ในช่วงการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวจะใช้พลังงานจากแสงในช่วงคลื่นที่เรียกว่า “Photosynthetically Active Radiation (PAR)” ซึ่งมีความยาวคลื่นแสงระหว่าง 400-700 นาโนเมตร เมื่อพลังงานในรูปของแสงตกกระทบบนบริเวณระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) ในคลอโรฟิลล์ หน่วยรับพลังงานแสง (Light harvesting complexes, LHC) จะทำหน้าที่ดูดซับพลังงานแสง แล้วส่งผ่านไปให้ หน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center, RC) ที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร จะเกิดการกระตุ้นให้เข้าสู่ระดับพลังงานที่สูงขึ้น และทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำไปเป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และ อิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำจะไปแทนที่อิเล็กตรอนที่สูญเสียไปในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ จากนั้น อิเล็กตรอนจากระบบแสงสองจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (Plastoquinone, PQ) ไซโตโครม บี 6 เอฟ (Cytochrome b₆f, Cyt b₆f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin, PC) และเข้าสู่ระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) ตามลำดับ เมื่อระบบแสงหนึ่งได้รับพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จะกระตุ้นการปลดปล่อยอิเล็กตรอนและส่งต่ออิเล็กตรอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป จนกระทั่ง มาถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือเฟอร์รีดอกซิน หลังจากนั้น เฟอร์รีดอกซินจะทำการขนส่งอิเล็กตรอนไปยัง NADP⁺ โดยมี เอนไซม์เฟอร์รีดอกซิน-เอ็นเอตี(พี)เอซรีดักเทส (Ferredoxin-NAD(P)H reductase, FNR) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดักชัน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น NAD(P)H จากนั้น NAD(P)H จะถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมกับ ATP ผ่านวัฏจักรเคลวิน (Calvin cycle) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น คาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสมในเซลล์สาหร่ายต่อไป (รูปที่ 2.5A)

ในช่วงการผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายจะเริ่มผลิตไฮโดรเจนเมื่อระบบเข้าสู่สภาวะที่ปราศจากอากาศด้วยการพ่นก๊าซอาร์กอนหรือไนโตรเจนเพื่อไล่อากาศหรือออกซิเจน สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนผ่าน 3 กระบวนการ ดังนี้ (1) การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis) (2) การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis) และ (3) การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark fermentation) (รูปที่ 2.5B) (Eroglu and Melis, 2016)

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง มีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเช่นเดียวกับการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวในช่วงการเจริญเติบโต เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจิเนสไม่ถูกยับยั้งจากออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินถูกส่งไปยังเอนไซม์ไฮโดรจิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจน (รูปที่ 2.5B (1)) แต่ในการผลิตไฮโดรเจนในระยะยาวด้วยกระบวนการนี้ จะถูกจำกัดจากปริมาณออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการแตกตัวของน้ำ ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง

การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม จะเกิดจากการสลายแป้งที่ถูกเก็บสะสมไว้ในขณะที่สาหร่ายมีการเจริญเติบโต โมเลกุลของแป้งจะถูกย่อยสลายผ่านวิถีไกลโคไลซิสและปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาอยู่ในโครงสร้างของ NADH จากนั้น เอนไซม์เอ็นเอดีเฮกซ์ไฮโดรจีเนส (NADH dehydrogenase, NDH) จะกระตุ้นปฏิกิริยาการสลาย NADH กลายเป็น NAD^+ โปรตอน และ อิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะถูกส่งผ่านพลาสโตควิโนนไปยังระบบแสงหนึ่ง และส่งต่อมายังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจนต่อไป (รูปที่ 2.5B (2))

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง เกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงและ ไม่มีออกซิเจน โดยแป้งจะถูกสลายไปเป็นไพรูเวต (Pyruvate) ผ่านเอนไซม์ไพรูเวต-เฟอร์รีดอกซินออกซิเดรีคเทส (Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase, PFOR) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) อะซิติล-โคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) และอิเล็กตรอนออกมา เฟอร์รีดอกซินจะรับอิเล็กตรอนและส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้ผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 2.5B (3)) (Dubini, 2011)

2.6 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase : acceptor oxidoreductase) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนในสิ่งมีชีวิต ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นไฮโดรเจน หรือเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอตและยูคาริโอต สิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอตจะพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซโตพลาสซึม ในขณะที่สิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตจะพบเอนไซม์ชนิดนี้ในคลอโรพลาสต์ โดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสส่วนใหญ่จะมีความไวต่อก๊าซออกซิเจน

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจัดจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาออกเป็น 2 ชนิด ดังนี้

1.) เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (Reversible hydrogenase)

เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (Reversible hydrogenase) หรือ เอนไซม์ไบเดรกชันนาลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน และเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ทั้งในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

2.) เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenase)

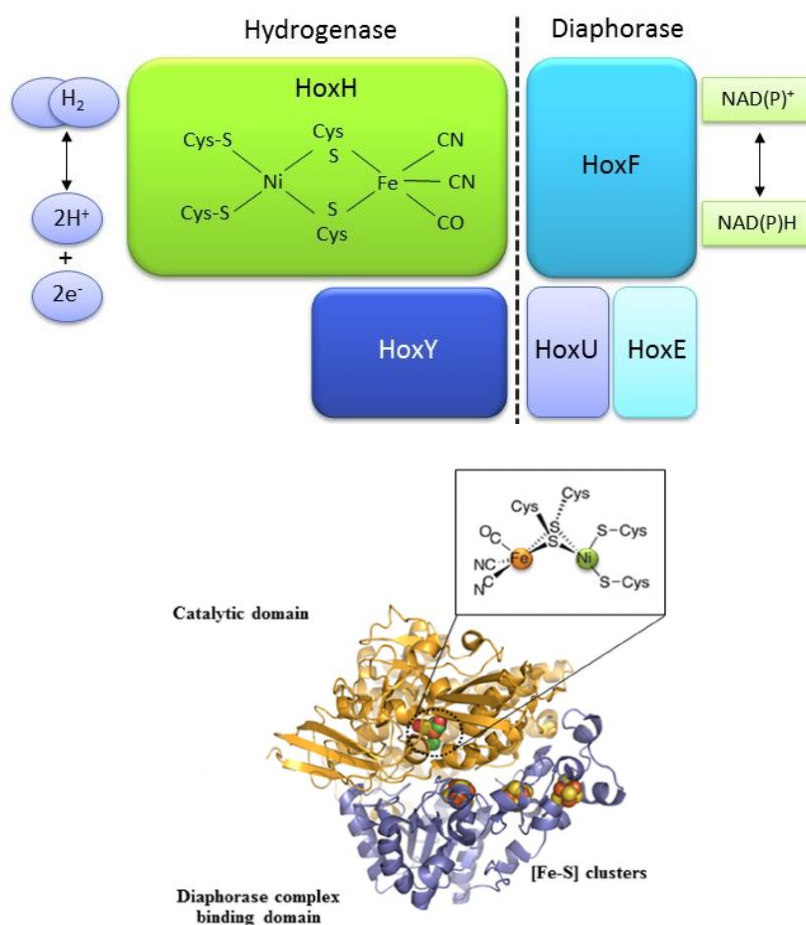
เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenase) หรือ เอนไซม์ยูนิเดรกชันนาลไฮโดรจีเนส (Unidirectional hydrogenase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน เอนไซม์ชนิดนี้จะสลายโมเลกุลของไฮโดรเจนที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ที่อาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส สามารถพบได้ทั้งใน

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไฮยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน รวมถึงไฮยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวบางชนิดที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน เช่น *Synechococcus* sp. PCC 6301 (Appel and Schultz, 1996)

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถจำแนกตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ออกเป็น 2 ชนิด ดังนี้

1.) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีนิกเกิลและเหล็กอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีนิกเกิลและเหล็กอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น (NiFe-hydrogenase) สามารถพบได้ในแบคทีเรียและไฮยาโนแบคทีเรีย เอนไซม์ชนิดนี้มีองค์ประกอบของโลหะนิกเกิลและเหล็กในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ อะตอมของเหล็ก (Fe) และนิกเกิล (Ni) จะเข้าจับกับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสบริเวณหน่วยย่อยใหญ่หรือ HoxH โดยอะตอมของเหล็กยังเชื่อมกับคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ไฮยาไนด์ (CN) และซัลเฟอร์ (S) (รูปที่ 2.6) หน่วยย่อยเล็กหรือ HoxY ประกอบด้วยคลัสเตอร์ของ $[4\text{Fe-4S}]$ เอนไซม์ไดอะเฟอรัส (Diaphorase) ประกอบด้วยโปรตีน HoxF, HoxU และ HoxE ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ไปยังบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Maness *et al.*, 2009) (รูปที่ 2.6)

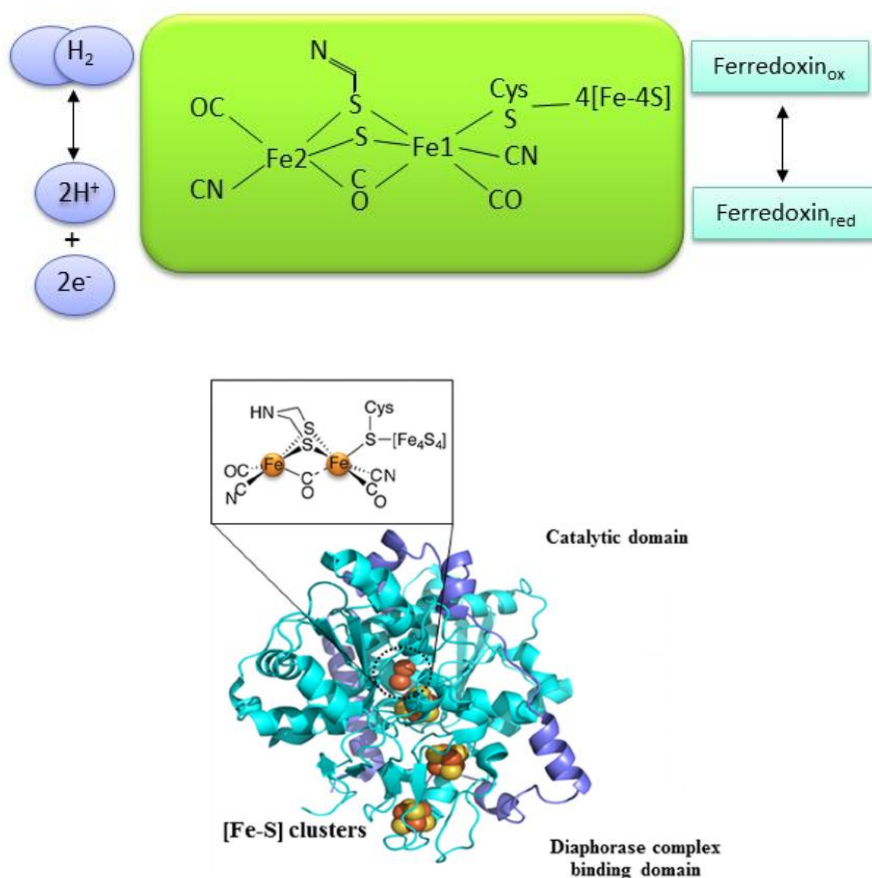


รูปที่ 2.6 เอนไซม์ NiFe-hydrogenase

ที่มา : Maness *et al.*, 2009; Khetkorn *et al.*, 2017

2.) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น (FeFe-hydrogenase) สามารถพบได้ในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียว บริเวณศูนย์กลางเร่งของเอนไซม์ ประกอบด้วยเหล็ก 2 อะตอม โดยเหล็กอะตอมจะจับกับซัลเฟอร์อะตอมของกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) นอกจากนี้ เอนไซม์ FeFe-hydrogenase ยังประกอบด้วยคลัสเตอร์ของ [4Fe-4S] ดังนั้น ซัลเฟอร์เปรียบเสมือนเป็นสะพานในการเชื่อมระหว่างอะตอมของเหล็ก นอกจากอะตอมของเหล็กจะจับกับกรดอะมิโนซิสเทอีนแล้ว เหล็กอะตอมยังจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และไซยาไนด์ (CN) (Maness *et al.*, 2009) (รูปที่ 2.7)

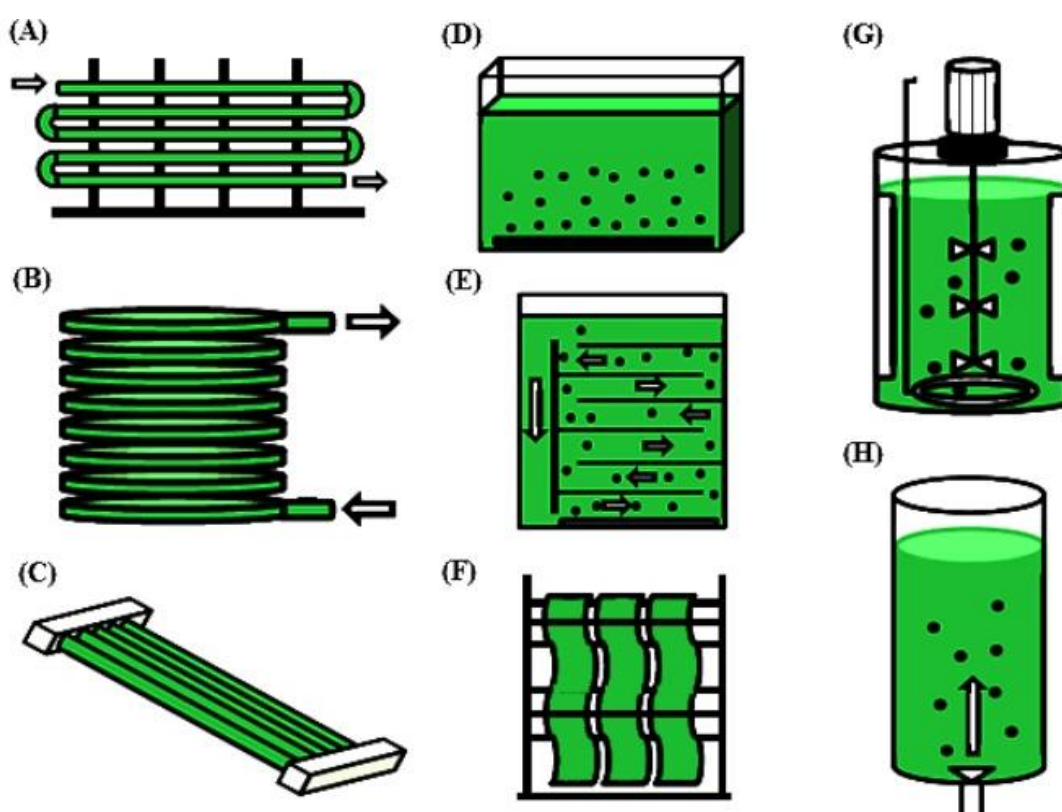


รูปที่ 2.7 เอนไซม์ FeFe-hydrogenase

ที่มา : Maness *et al.*, 2009; Khetkorn *et al.*, 2017

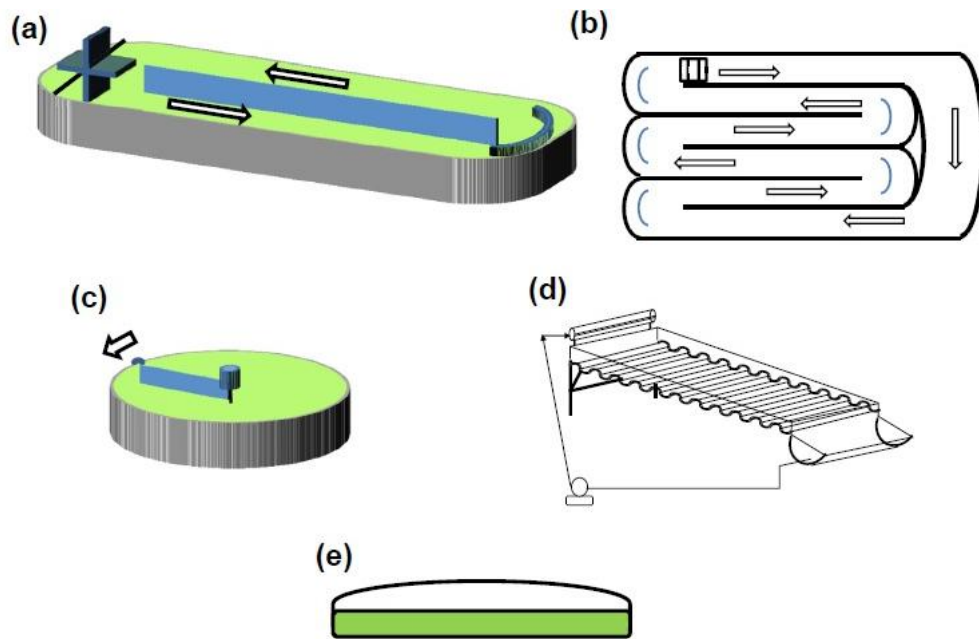
2.7 ระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว

ระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระดับห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรมที่มีการศึกษาและใช้ในปัจจุบัน สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ ได้แก่ ประเภทที่ 1 ระบบปิด (Closed system) เป็นระบบที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายภายในตัวอาคารหรือในระบบปิดที่สร้างขึ้น เช่น ระบบ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง (Photobioreactor) ซึ่งมีหลายลักษณะ เช่น แบบแนวตั้ง แนวราบ และทรงกระบอก เป็นต้น (รูปที่ 2.8) ประเภทที่ 2 คือ ระบบเปิด (Open pond) คือระบบที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อขนาดใหญ่กลางแจ้ง เช่น ระบบ Raceway เป็นต้น (รูปที่ 2.9) ระบบของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแต่ละรูปแบบมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแต่ละระบบจึงต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยง ชนิดของสาหร่าย สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มผลผลิตชีวภาพมวลของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ รวมถึงสภาพแวดล้อมของพื้นที่ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ตัวอย่างของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในระบบเปิดและระบบปิดแสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.8 ลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสงในรูปแบบต่างๆ (Photobioreactors) (Fence tubular (A), Helical tubular (B), Horizontal tubular (C), Vertical flat panel (D), Air life type (E), Accordion type (F), Stirred tank (G), Bubble column (H))

ที่มา : Khetkorn *et al.*, 2017



รูปที่ 2.9 ลักษณะของบ่อเปิดสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว (Raceway type (a), Multi-grid raceway (b), Circular type (c), Thin layer with undulating base (d) และ Covered pond (e))

ที่มา : Oncel, 2015



รูปที่ 2.10 ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในระบบเปิดและระบบปิด (Raceway pond (a), Flat-plate type (b), Inclined tubular type (c) และ Horizontal/Continuous type (d))

ที่มา : Bitog *et al.*, 2011

ตารางที่ 2.1 ข้อดีและข้อจำกัดของรูปแบบของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว (Ugwu *et al.*, 2008)

รูปแบบการเพาะเลี้ยง	ข้อดี	ข้อจำกัด
บ่อเปิด (Open ponds)	<ul style="list-style-type: none"> - เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงในเชิงธุรกิจ เนื่องจากสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตชีวมวลได้ในปริมาณมาก - ทำความสะอาดพื้นที่เพาะเลี้ยงได้ง่าย ภายหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต 	<ul style="list-style-type: none"> - ต้องควบคุมสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง - การเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานทำได้ยาก - ผลผลิตชีวมวลต่ำ - ต้องการพื้นที่ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมาก - บางสายพันธุ์ไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ในบ่อเปิด - เกิดการปนเปื้อนในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ง่าย
ถังปฏิกรณ์แบบแนวตั้ง (Vertical-column photobioreactors)	<ul style="list-style-type: none"> - ใช้พลังงานน้อย - เกิดการผสมและการเคลื่อนที่ของชีวมวลได้ดี - ควบคุมสภาวะต่างๆ ได้ง่าย เช่น อุณหภูมิ และปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง - เหมาะสำหรับการตรึงเซลล์สาหร่าย (Immobilization of algae) 	<ul style="list-style-type: none"> - พื้นที่ผิวที่แสงส่องผ่านมีน้อย - มีความยุ่งยากในการสร้างถังปฏิกรณ์ - เกิดความเค้นเฉือน (Shear stress) ต่อสาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยง - พื้นที่ผิวที่แสงส่องผ่านจะลดลงหาก ทำการเพาะเลี้ยงในสเกลที่ใหญ่ขึ้น
ถังปฏิกรณ์แบบแนวราบ (Flat-plate photobioreactors)	<ul style="list-style-type: none"> - มีพื้นที่ผิวในการสังเคราะห์แสงมาก เนื่องจากแสงส่องถึงได้ดี เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงภายนอกห้อง - เหมาะสำหรับการตรึงเซลล์สาหร่าย - ได้ผลผลิตชีวมวลในปริมาณสูง - ทำความสะอาดง่ายและค่าใช้จ่ายต่ำ - ต้องการออกซิเจนเพิ่มเติมสำหรับการเพาะเลี้ยงน้อย 	<ul style="list-style-type: none"> - ต้องการวัสดุและส่วนประกอบหลายอย่างในการสร้างถังปฏิกรณ์ที่มีขนาดใหญ่ - ควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงยาก - อาจมีการเจริญบริเวณผนังของถังปฏิกรณ์ - อาจมีผลต่อสาหร่ายบางสายพันธุ์ เนื่องจากแรงกระทำภายในถังปฏิกรณ์ (Hydrodynamic stress)
ถังปฏิกรณ์แบบทรงกระบอก หรือแบบท่อ (Tubular photobioreactors)	<ul style="list-style-type: none"> - มีพื้นที่ผิวในการสังเคราะห์แสงมาก เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงภายนอกห้อง - ได้ผลผลิตชีวมวลในปริมาณหนึ่ง - ค่าใช้จ่ายต่ำ 	<ul style="list-style-type: none"> - เกิด Gradient ของค่าพีเอช (pH) ออกซิเจน ละลายน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ ตามความยาวของถังปฏิกรณ์ - อุดตันได้ง่าย - อาจมีการเจริญบริเวณผนังถังปฏิกรณ์ - ต้องการพื้นที่มาก

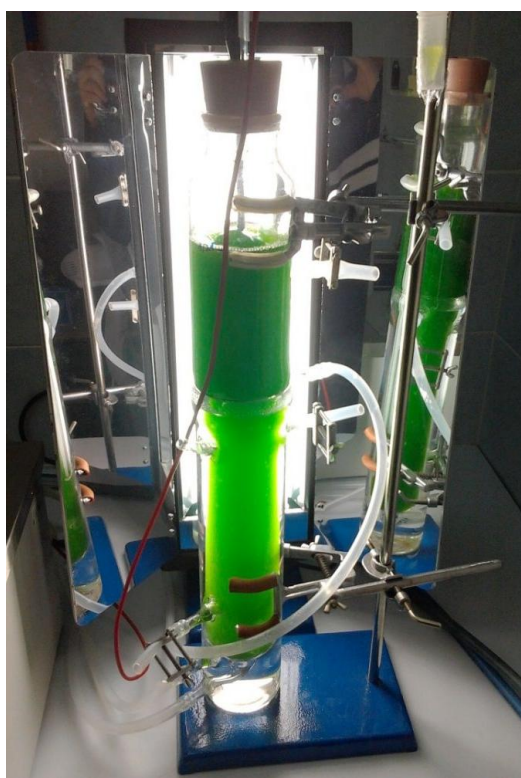
2.8 การผลิตชีวมวลและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) เป็นอุปกรณ์สำหรับการเพิ่มผลผลิตให้ได้ปริมาณสูง สามารถบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมาก และสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ตลอดกระบวนการผลิต โดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะมีระบบควบคุมสภาวะของถังหมัก เช่น อุณหภูมิ พีเอช การละลายออกซิเจน และ ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น โดยทั่วไป สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้แสงที่เป็นแหล่งพลังงาน การผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียวให้ได้ปริมาณสูงจะทำการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีลักษณะโปร่งแสง หรือที่เรียกว่า “ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง (Photobioreactor)” ซึ่งตัวถังทำมาจากวัสดุที่เป็นแก้วหรือพลาสติกใสที่แสงสามารถส่องได้ทั่วถึง

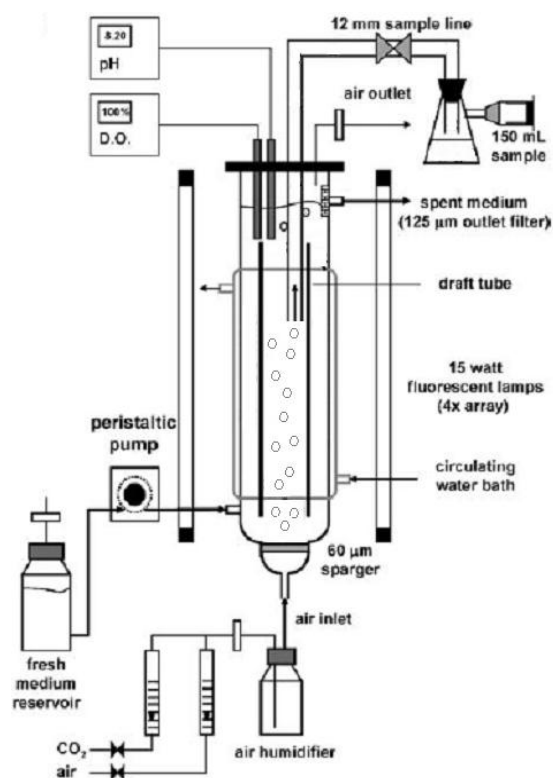
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีหลากหลายประเภท ยกตัวอย่าง เช่น ถังปฏิกรณ์แบบเขย่า (Shaking bioreactor) ถังปฏิกรณ์แบบฟองอากาศ (Bubble column bioreactor) ถังปฏิกรณ์แบบไหลเวียนภายในและภายนอก (External/internal-loop airlift bioreactor) และ ถังปฏิกรณ์แบบกวน (Stirred tank bioreactor) เป็นถังปฏิกรณ์ที่มักใช้กระบวนการหมักอย่างกว้างขวางทั้งในงานวิจัยและอุตสาหกรรม (Charles, 1985) การผลิตชีวมวลและการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเหมาะสำหรับการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนเพื่อการขยายระดับการผลิต (Scale-up) ต่อไป เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ง่าย มีระบบการผสมที่มีประสิทธิภาพ และสามารถป้องกันการระเหยของน้ำภายในระบบได้ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแต่ละชนิดจะมีลักษณะรูปร่าง อัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตร (Surface-to-volume (S/V) ratio) รวมถึงระบบการผสมที่แตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องเลือกชนิดของถังปฏิกรณ์และการควบคุมระบบภายในให้เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว นอกจากนี้ การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ยังต้องคำนึงถึงโอกาสในการรั่วไหลของก๊าซไฮโดรเจนออกสู่ภายนอกถัง การประกอบตัวถังและการใส่หัววัดต่างๆ ต้องปิดให้แน่นสนิท เนื่องจากก๊าซไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่มีน้ำหนักเบาจึงมีโอกาสเกิดการรั่วไหลของก๊าซออกนอกถังได้ (Skjånes *et al.*, 2016; Oncel, 2015) งานวิจัยนี้ได้สนใจศึกษาการผลิตชีวมวลและการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัวหรือ Air-lift photobioreactor

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว (Air-lift bioreactor) เป็นชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีระบบการผสมโดยการให้อากาศหมุนเวียนภายในถัง หลักการทำงานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้ อาศัยความแตกต่างของความถ่วงจำเพาะของของเหลวเมื่อมีอากาศผสมอยู่ในปริมาณต่างกัน การให้อากาศจะทำให้จากทางด้านล่างของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ฟองอากาศที่กระจายตัวอยู่ในของเหลวมีความถ่วงจำเพาะลดลงและจะดันตัวลอยสู่ด้านบนของถังผ่านท่อส่งผ่านอากาศ (Draft tube) (รูปที่ 2.11)

ซึ่งท่อส่งผ่านอากาศจะช่วยควบคุมการไหลวนของของเหลวในส่วนที่ให้อากาศ (Riser section) กับ ส่วนที่ไม่ให้อากาศ (Downcomer section) จากนั้น อากาศที่ละลายและกระจายตัวอยู่ในของเหลว จะถูกปลดปล่อยออกมา ทำให้ของเหลวมีความหนาแน่นสูงขึ้น และตกลงสู่ส่วนล่างของถังปฏิกรณ์ ชีวภาพผ่านทาง Downcomer ทำให้เกิดการผสมของสารแขวนลอยเซลล์กับอาหารได้ดียิ่งขึ้นและ กระจายความร้อนภายในถังได้ทั่วถึง การระบายความร้อนและการควบคุมอุณหภูมิในกระบวนการ หมักจะใช้ระบบทำความร้อนและระบบน้ำหล่อเย็นเพื่อจ่ายน้ำร้อนหรือน้ำเย็นไหลผ่านทาง Jacket บริเวณรอบถัง



A



B

รูปที่ 2.11 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว (Air-lift bioreactor) (A) และไดอะแกรมแสดง ระบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว (B)

ที่มา : <https://ub.vscht.cz/research/groups/bioprocess#>; Rorrer and Cheney, 2004

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบลอยตัวในระดับห้องปฏิบัติการมีข้อดี คือ การเกิดแรงเฉือนต่ำจึง เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับสายสีเขียว และมีพื้นที่ผิวในการสังเคราะห์แสงมาก (Skjånes *et al.*, 2016) แต่มีข้อเสีย คือ การผสมจะมีประสิทธิภาพต่ำลงตามความยาวของถังปฏิกรณ์ และเมื่อ อากาศสำหรับเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้นจะเกิดการตกตะกอนบริเวณก้นถังได้ ทำให้สารอาหารและ ออกซิเจนภายในถังกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ ส่งผลต่อการเกิดภาวะจำกัดของสารอาหารและออกซิเจน

ได้ง่าย การออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบลอยตัวนี้ไม่เอื้อต่อการนำมาใช้ผลิตไฮโดรเจน เนื่องจาก มีการตกตะกอนของเซลล์ ทำให้ต้องมีการเติมก๊าซอาร์กอนลงไปเพื่อให้เกิดการหมุนเวียนของสารแขวนลอยเซลล์ ส่งผลให้ปริมาณไฮโดรเจนที่สะสมไว้มีความเจือจาง และมีโอกาสสูงที่จะเกิดการสูญเสียก๊าซไฮโดรเจน (Skjånes *et al.*, 2016)

2.9 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตได้โดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสง และผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหมักในที่มืด โดยการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจะเกิดขึ้นในสภาวะที่มีระบบมีปริมาณออกซิเจนต่ำ การเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงหลายประการ ดังนี้

2.9.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว การหายใจของเซลล์สาหร่าย รวมไปถึงการผลิตไฮโดรเจนในระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จำเป็นต้องควบคุมปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ไม่ให้มากเกินไปจนเป็นอันตรายกับสาหร่าย เพราะ จะทำให้ค่าพีเอชลดลง แต่ต้องมีปริมาณให้เพียงพอสำหรับใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียวสามารถใช้คาร์บอนได้ทั้งในรูปของสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ แหล่งคาร์บอนในรูปอนินทรีย์สารที่สำคัญคือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณ 1-5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ของระบบเป็นระดับที่เหมาะสมกับสาหร่าย (Ugwu *et al.*, 2008) ส่วนแหล่งคาร์บอนในรูปอินทรีย์สารที่สำคัญคือ กลูโคส อะซีเตท เอทานอล อะลานีน แอสพาร์เทต ฟรักโทส กาแลคโทส ไพรูเวต และซัคซิเนต (Richmond, 1986; Hu and Gao, 2013) สาหร่ายจะตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศโดยเกิดขึ้นในวัฏจักรแคลวิน (Calvin cycle) เพื่อผลิตสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตในรูปของแป้ง ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียวสลายแป้งที่เก็บสะสมนี้ไปใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน แหล่งคาร์บอนบางชนิด เช่น อะซีเตท ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหายใจของเซลล์สาหร่าย ทำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะที่ปราศจากอากาศ ส่งผลให้ การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Melis *et al.*, 2000; Kosourov *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2011)

2.9.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดนิวคลีอิกและกรดอะมิโนทุกชนิดซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และเป็นองค์ประกอบสำคัญของหน่วยโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งในรูปของอินทรีย์สารและอนินทรีย์สาร เช่น เกลือแอมโมเนีย ไนเตรท และ ไนไตรท์ เป็นต้น สาหร่ายจะมีอัตราการเติบโตสูงเมื่อใช้ไนโตรเจนในรูปของไนเตรทหรือแอมโมเนีย สาหร่าย

บางชนิดสามารถใช้ไนโตรที่ได้นี้แต่จะใช้ได้ในความเข้มข้นต่ำ โดยไนโตรที่ความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการเติบโตของสาหร่าย ส่วนการใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าจะทำให้ค่าพีเอชของอาหารลดลง (Richmond, 1986) สำหรับการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายบางชนิดมีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นภายใต้สภาวะการไนโตรเจน (Li *et al.*, 2015) เซลล์ที่อยู่ในสภาวะการขาดไนโตรเจนจะลดปริมาณการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และลดประสิทธิภาพการดูดซับพลังงานของระบบแสงสอง (Peltier and Schmidt, 1991) การลดลงของกิจกรรมของระบบแสงสองในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนทำให้ปริมาณออกซิเจนเกิดขึ้นในระบบแสงสองลดลง (Zhang *et al.*, 2015) เมื่อปริมาณออกซิเจนในระบบลดลงจะช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจน เซลล์ที่ขาดไนโตรเจนจะทำการสะสมอาหารในรูปของแป้ง และเมื่อเหนี่ยวนำให้มีการผลิตไฮโดรเจน เซลล์จะสลายแป้งมาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับผลิตไฮโดรเจน (He *et al.*, 2012; Philipps *et al.*, 2012)

2.9.3 แหล่งซัลเฟอร์

ซัลเฟอร์เป็นธาตุที่จำเป็นต่อการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ ซัลเฟอร์ ที่ถูกเก็บไว้ภายในเซลล์ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของกรดอะมิโนเมทไธโอนีน (Methionine) และซิสเทอีน (Cysteine) ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนทุกชนิดและโปรตีน D1 ที่อยู่ในศูนย์กลางของระบบแสงสอง การขาดซัลเฟอร์ในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลยับยั้งกิจกรรมของระบบแสงสองของเซลล์ชั่วคราว ส่งผลให้อัตราการอิมตัวของแสงลดลงอย่างรวดเร็ว โดยการขาดซัลเฟอร์ส่งผลให้การสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเทอีนและเมทไธโอนีนลดลง และทำให้โปรตีน D1 ที่อยู่ในบริเวณศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของระบบแสงสองเกิดความเสียหาย เมื่อโปรตีน D1 เสียหาย จะทำให้กระบวนการซ่อมแซมระบบแสงสองเกิดความบกพร่อง จึงส่งผลยับยั้งการเกิดออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสอง ทำให้สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น (Wykoff *et al.*, 1998)

2.9.4 แหล่งฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกและฟอสโฟลิปิด ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชและสาหร่ายสีเขียว รวมถึงฟอสฟอรัสเกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจและกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ที่เป็นแหล่งให้พลังงาน คือ อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate หรือ ATP) ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว ระบบแสงสองจะดูดซับพลังงานแสง ทำให้เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากระบบแสงสองไปยังระบบแสงหนึ่ง และได้ ATP และ NADPH สำหรับใช้ในปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นคาร์โบไฮเดรต การขาดฟอสฟอรัสจึงมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายและจำกัดปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากสารตัวกลางในการถ่ายทอดพลังงานในวิถีเพนโตสฟอสเฟตมีระดับลดลง จึงนำไปสู่การลดกิจกรรมการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของระบบแสง (Photosynthetic electron

transport activity) (Brooks, 1986) แต่ในระหว่างการขาดแหล่งฟอสฟอรัสในอาหารเพาะเลี้ยง ระบบแสงหนึ่งยังคงมีการขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อผลิตเป็นพลังงานแก่เซลล์ ดังนั้น การขาดฟอสฟอรัสมีผลให้ปริมาณออกซิเจนจากระบบแสงสองลดลง และ ช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว (Wykoff *et al.*, 1998)

2.9.5 แสง

แสงเป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมภายนอกที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย เซลล์จะนำแสงมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อผลิตคาร์โบไฮเดรต การเพิ่มความเข้มแสงหรือเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสแสงต่ออัตราส่วนปริมาตรของถังปฏิกรณ์ให้เหมาะสม จึงทำให้อัตราการเจริญของสาหร่ายเพิ่มขึ้น โดย ความเข้มแสงมีผลต่อคลอโรฟิลล์และการทำงานของระบบแสงสอง (Photoinhibition) เนื่องจากความเข้มแสงสูงมีผลให้เซลล์เกิดการชักนำให้มีการสังเคราะห์สารสีในการสังเคราะห์แสง เช่น คลอโรฟิลล์ แซนโทฟิลล์ ฯลฯ เพิ่มมากขึ้น เมื่อทำการย้ายเซลล์เข้าสู่สภาวะที่เหนี่ยวนำการผลิตไฮโดรเจนภายใต้ความเข้มแสงสูง สาหร่ายจะสามารถผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยการดูดซับพลังงานแสง ทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำ เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน แต่ปริมาณแสงที่มากเกินไปจะทำให้อุณหภูมิของระบบสูง มีผลให้เซลล์สาหร่ายบางส่วนถูกทำลายและไปยับยั้งการหายใจของเซลล์ อัตราการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจึงลดลง (Laurinavichene *et al.*, 2004)

2.9.6 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากอุณหภูมิมิผลต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในกระบวนการสังเคราะห์แสง รวมถึงเอนไซม์ไฮโดรจีเนส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวอยู่ในช่วง 35-40 องศาเซลเซียส โดยเป็นช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีความเสถียร ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง การทำงานของระบบแสงสองจะถูกยับยั้ง เนื่องจากโปรตีนที่บริเวณศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยา (RC) และโปรตีนรับแสง (LHC) ในระบบแสงสองถูกทำลาย ทำให้อิเล็กตรอนจากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองไม่ได้ถูกถ่ายทอดไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และมีผลโดยตรงที่ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเสียสภาพ ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจึงลดลง เมื่อเซลล์อยู่ในอุณหภูมิสูงและไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Salvucci and Crafts-Brandner, 2004)

2.9.7 ค่าพีเอช

ค่าพีเอชเป็นสิ่งที่บอกความเป็นกรดต่างและเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากมีอิทธิพลต่อความหลากหลายของสารอนินทรีย์คาร์บอนในรูปแบบต่างๆ (Dissolved inorganic carbon ; DIC) (Zhu *et al.*, 2013) ค่าพีเอชของอาหารยังมีผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว รวมถึงมีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงพีเอชทำให้เมแทบอลิซึมของสาหร่ายเปลี่ยนแปลงไป และมีผลต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ ในระยะเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ค่าพีเอชของอาหารจะลดลง เนื่องจากสาหร่ายจะสร้างกรดคาร์บอนิกที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 ถึง 3 วัน ค่าพีเอชของอาหารจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากในระหว่างการเจริญเติบโต สาหร่ายจะใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต เมื่ออะซิเตทสลายจะได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็นไฮดรอกไซด์ (OH^-) จึงทำให้ค่าพีเอชของอาหารมีความเป็นเบสเพิ่มขึ้น (Kosourov *et al.*, 2002) โดยทั่วไปสาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงพีเอช 5.0-9.0 (Song *et al.*, 2011) แต่ค่าพีเอชที่ต่ำกว่า 5.0 จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสลดลง ส่งผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Skjånes *et al.* (2008) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกจากน้ำจืดและน้ำทะเลภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากการทดลองพบว่า วัสดุที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ได้แก่ ยาง พลาสติก และเหล็กกล้าผสมบางชนิด ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas euryale* การปรับพีเอชของอาหารโดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกลงไปผ่านทางสายยางซิลิโคนทำให้สายยางถูกกัดกร่อนและปล่อยสารประกอบที่เป็นพิษต่อเซลล์สาหร่ายลงสู่สภาวะการเพาะเลี้ยงได้ นอกจากนี้ ยังพบว่าการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่ถูกบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศอาจเกิดความคลาดเคลื่อน เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวบางสายพันธุ์มีการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm) มาคลุมหัววัดออกซิเจน (Oxygen electrode) ที่ใช้ในวัดและควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้การปรับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารภายในระบบเกิดความผิดพลาด ซึ่งมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายได้ ดังนั้น การเลือกใช้วัสดุในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นปัจจัยที่สำคัญหนึ่งสำหรับการขยายขนาดการผลิตไฮโดรเจน

Lehr *et al.* (2012) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน (Stirred tank bioreactor) ขนาด 2 ลิตร จากการทดลองพบว่า ความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน คือ ความเข้มแสง 250 และ 280 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ตามลำดับ ดังนั้น การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน จำเป็นต้องควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพภายใต้ความเข้มแสงที่เหมาะสม

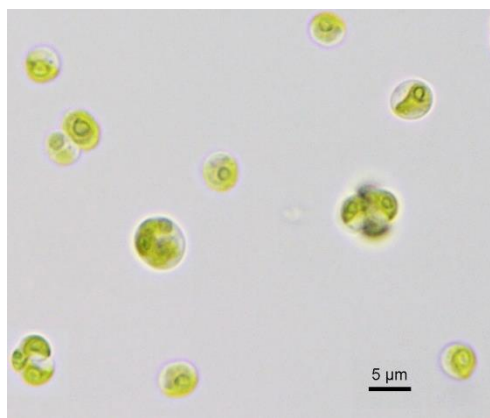
Oncel and Kose (2014) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC124 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบท่อ (Tubular bioreactor) และแบบแผ่น (Panel bioreactor) พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Tubular สามารถผลิตชีวมวลได้สูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Panel ประมาณ 11 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Tubular มีพื้นผิวในการรับแสงมากกว่า ทำให้เซลล์สาหร่ายได้รับพลังงานแสงสูงกว่าประมาณ 3.6 เท่าของถังแบบ Panel ที่ระดับความเข้มแสงที่เท่ากัน นอกจากนี้ ระบบการผสมที่มีการหมุนเวียนไปตามท่อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Tubular ทำให้เซลล์สาหร่ายสัมผัสกับอาหารเพาะเลี้ยงได้ดี แต่ จากการทดลอง สาหร่าย ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Panel ผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่า เนื่องจากลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Panel ทำให้เกิดแรงดันไฮโดรเจนออกจากตัวถังได้มีประสิทธิภาพมากกว่าถังแบบ Tubular และระบบการผสมของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Panel ยังเหมาะแก่การผลิตไฮโดรเจนอีกด้วย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้รับการอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยมีแหล่งที่มาจากน้ำทะเลของหาดแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี (Tipranee *et al.*, 2016) รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 แสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 รูปร่างลักษณะของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่างที่มีกำลังขยายภาพ 1,000 เท่า

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่าง (Bright field microscope) (Nikon, Eclipse Ci-L, Japan)
- 3.2.2 เข็มฉีดยาก๊าซ (Gas tight syringe) (Scientific Glass Engineering, Australia)
- 3.2.3 คิวเวตควอตซ์ (Quartz cuvette) (Starna scientific, StarnaTM 9/Q/10, England)
- 3.2.4 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares) (Pyrex, USA)
- 3.2.5 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)) (Hewlett-Packard, HP5890A GC, Japan)
- 3.2.6 เครื่องชั่งสาร (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)

- 3.2.7 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries, Genies2 G560, USA)
- 3.2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge™ 16M, USA)
- 3.2.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortechnik, Z38K, Germany)
- 3.2.10 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Mettler Toledo, Seven2Go S2, Switzerland)
- 3.2.11 เครื่องวัดแสง (Light meter) (Lutron, LX-1108, Thailand)
- 3.2.12 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1800, Japan)
- 3.2.13 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama, HVE-50, Japan)
- 3.2.14 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) (ESCO, SCV4A1, Singapore)
- 3.2.15 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 3.2.16 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัวขนาด 3.7 ลิตร (Air-lift bioreactor) (B.E.Marubishi (Thailand) Ltd., BIOREACTOR 3 L (AIR LIFT), Thailand) (ภาคผนวก ก)
- 3.2.17 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) (Labnet, BioPette Plus, USA)
- 3.2.18 หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร (Oak ridge centrifuge tube) (Thermo Scientific, Nalgene, USA)
- 3.2.19 หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) (Eppendorf, USA)
- 3.2.20 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) (Boeco, Neubauer improved bright line, Germany)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) pH 7.2 (Harris, 1989) (ภาคผนวก ก)

3.4 สารเคมี

3.4.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.4.1.1 กรดบอริก (H_3BO_3) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.2 กรดอะซิติก (CH_3COOH) (Ajax Finechem, Australia)
- 3.4.1.3 คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) (Mallinckrodt Baker, USA)
- 3.4.1.4 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.5 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.6 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) (Fluka, Switzerland)

- 3.4.1.7 ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) (Fluka, Switzerland)
- 3.4.1.8 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka, Switzerland)
- 3.4.1.9 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$) (British Drug Houses, England)
- 3.4.1.10 โซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.11 ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA) (Promega, USA)
- 3.4.1.12 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.13 ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีโนมีเทน ($NH_2C(CH_2OH)_3$) (Vivantis, Malaysia)
- 3.4.1.14 น้ำตาลกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) (Merck, Germany)
- 3.4.1.15 น้ำตาลซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.16 น้ำตาลฟรักโทส ($C_6H_{12}O_6$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.17 น้ำตาลมอลโทส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Merck, Germany)
- 3.4.1.18 น้ำตาลแลกโทส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Sigma, USA)
- 3.4.1.19 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.20 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.21 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.22 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.23 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (Carlo Erba, Italy)

3.4.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

เมทานอล (CH_3OH) (Analytical grade, Univar, Australia)

3.4.3 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

- 3.4.3.1 ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาร์กอน (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Praxair, Thailand)
- 3.4.3.2 ก๊าซอาร์กอนความบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Thonburiwattana Ltd., Thailand)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อ (Starter) โดยเริ่มจากการลาก (Streak) เชื้อบนอาหารแข็ง Tris-Acetate-Phosphate (TAP) (ภาคผนวก ก) นำจานอาหารแข็งไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเชื้อเจริญ จึง cấyโคลนที่เจริญบนอาหารแข็ง 1 ถึง 2 หลบ มากระจาย ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำฟลาสก์ไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และให้แสงต่อเนื่องภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 3 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสาหร่ายในแต่ละการทดลอง

3.5.2 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

3.5.2.1 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายสีเขียวที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสารละลายแบล็ค (Blank) วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวในระยะ Logarithmic โดยวิเคราะห์เป็นค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ) ตามวิธีของ Tang และคณะ (2011) ดังสมการที่ 3.1

$$\mu = \frac{\ln(X_1/X_0)}{t_1-t_0} \quad \text{สมการที่ 3.1}$$

เมื่อ μ คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)

X_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของสาหร่าย ในช่วงเวลาที่ $t=0$

X_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเพาะเลี้ยงสาหร่าย เป็นเวลา t ชั่วโมง

t_0 คือ เวลาเริ่มต้นของการเจริญ

t_1 คือ เวลาสุดท้ายของการเจริญในระยะ Logarithmic

3.5.2.2 วิธีการวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวมาวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ภาคผนวก ข) เริ่มจากการวางกระจกปิดสไลด์บนสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์บริเวณที่เป็นตาราง จากนั้น ปิเปตสารละลายเซลล์ สาหร่ายสีเขียวปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้ววางปลายปิเปตใกล้ขอบกระจกปิดสไลด์ ปล่อยสารละลายเซลล์จากปิเปตลงไปในช่องใส่ตัวอย่าง วางทิ้งไว้ 1 นาที เพื่อให้เซลล์สาหร่ายจมลงสู่พื้นสไลด์ จากนั้น นำสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด

พื้นหลังสว่าง (Nikon Eclipse Ci-L, Japan) ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า คำนวณจำนวนเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวต่อปริมาตรน้ำ 1 มิลลิลิตร ตามวิธีในภาคผนวก ข

3.5.2.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้น นำตะกอนเซลล์มา เติมน้ำกลั่นที่มีความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร นำหลอดไปปั่นในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำหลอด ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ปิดเปิด ส่วนใสออกมาใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 และ 650 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มา คำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Lee and Shen (2004) ดังสมการที่ 3.2

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = (4.0 \times A_{665}) + (25.5 \times A_{650}) \quad \text{สมการที่ 3.2}$$

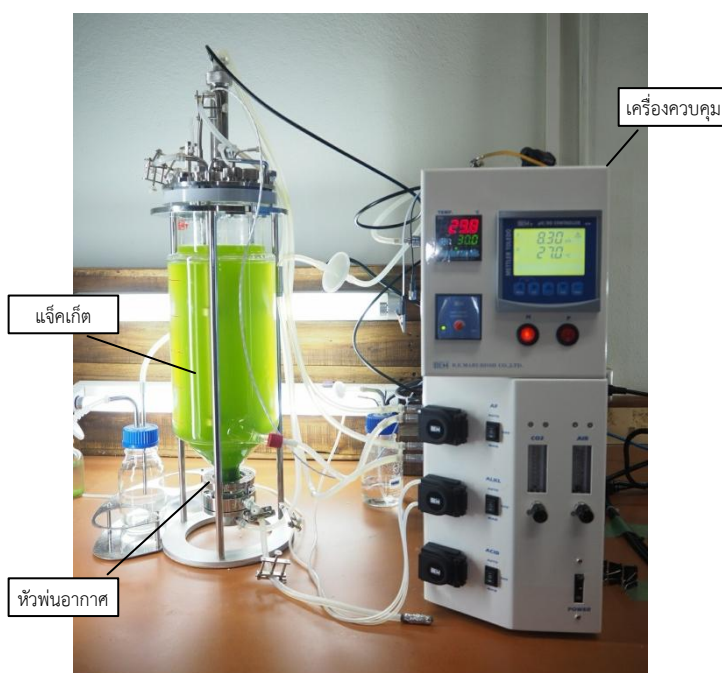
3.5.3 วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร โดยแปรผันปัจจัยทางเคมีดังต่อไปนี้ (หลักการและระบบการควบคุมการทำงานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift แสดงในภาคผนวก ค)

3.5.3.1 วิธีการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตามวิธีในหัวข้อ 3.5.1 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 3 ลิตร (คิดปริมาตรการทำงานประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของขนาดถังปฏิกรณ์ชีวภาพ) ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลองนี้คือ กรดอะซิติก โซเดียมไฮดรอกไซด์คาร์บอนเนต น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส โดยให้ความเข้มข้นของคาร์บอนอะตอมเท่ากันคือ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 3.2) และให้มีความขุ่นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ โดย ควบคุมระบบในถังปฏิกรณ์

ชีวภาพแบบ Air-lift ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2 มีอัตราการไหลของอากาศ 1 ลิตรต่อ นาที และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่มีระบบควบคุมอุณหภูมิในถังหมักด้วยชุดทำความร้อนและชุด วาล์วควบคุมอัตโนมัติ ทำให้เกิดการไหลเวียนน้ำร้อนหรือน้ำเย็นผ่านทางแจ็คเก็ต (Jacket) บริเวณ รอบถัง (รูปที่ 3.2) ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์สำหรับยปรมาตร 5 มิลลิลิตร ทุก 6 ชั่วโมงของการ เพาะเลี้ยง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 12 ชั่วโมง จนครบเวลา 120 ชั่วโมง นำ เซลล์มาวิเคราะห์การเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียวเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.5.2 เมื่อได้ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายแล้ว ทำการแปรผันความ เข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 17.4, 34.8, 87 และ 174 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร

3.5.3.2 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต และการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตามวิธีในหัวข้อ 3.5.1 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นลงในถัง ปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 3 ลิตร ที่แปรผันความ เข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0, 0.75, 7.5 และ 37.5 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้ายของ แหล่งไนโตรเจนในอาหาร TAP สูตรปกติคือ 7.5 มิลลิโมลาร์) โดยให้ความเข้มข้นจากการวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ โดยควบคุมระบบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2 มีอัตราการไหลของอากาศ 1 ลิตรต่อนาที และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.2) ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายปริมาณ 5 มิลลิลิตร ทุก 6 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 12 ชั่วโมง จนครบเวลา 120 ชั่วโมง นำเซลล์มาวิเคราะห์การเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียวเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.5.2

3.5.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ในอาหารเหลว TAP ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วกระจายเซลล์แขวนลอยลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ทำการพ่นก๊าซอาร์กอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าปริมาณออกซิเจนภายในระบบต่ำกว่า 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เพื่อ ชักนำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ จากนั้น ปิดระบบการให้อากาศ นำตัวอย่างที่ทดสอบมาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยการใส่เข็มฉีดยาก๊าซดูดก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวในขวด Vial (Headspace) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักทีวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector, GC-TCD) เทียบกับก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ในก๊าซอาร์กอน (ปริมาตรต่อปริมาตร) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟแสดงในตารางที่ 3.2 จากนั้น คำนวณอัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในภาคผนวก ง

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

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Column	Packed column 2 m; Molecular sieve 5 Å mesh 60/80
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Temperature Program	Injector temperature : 100 °C Column temperature : 50 °C Detector temperature : 100 °C
Carrier gas	Argon gas (99.999% purity)
Carrier gas flow rate	20 ml/min

3.5.5 วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร สามารถแบ่งช่วงระยะเวลาออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP สูตรที่เหมาะสมต่อการเจริญ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและออกซิเจนเพื่อผลิตชีวมวล จากนั้น ทำการย้ายเซลล์สาหร่ายเข้าสู่ช่วงที่ 2 ซึ่งเป็นช่วงการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ดำเนินการดังนี้

3.5.5.1 วิธีการศึกษาผลความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ในอาหารเหลว TAP ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการล้างและกระจายเซลล์แขวนลอยลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหารเหลว TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0, 0.75 และ 7.5 มิลลิโมลาร์ จากนั้น ชักนำให้เซลล์สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาวะไร้อากาศ โดยพ่นก๊าซอาร์กอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าปริมาณออกซิเจนภายในระบบต่ำกว่า 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แล้วปิดระบบการให้อากาศ ทำการบ่มเซลล์ภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 6, 24 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 5 วัน โดยนำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ ตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

3.5.5.2 วิธีการศึกษาผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ในอาหารเหลว TAP ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการล้างและกระจายเซลล์แขวนลอยลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหาร TAP ที่ปราศจากไนโตรเจน (TAP-N) ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 และ 87 มิลลิโมลาร์ จากนั้น ชักนำให้เซลล์สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาวะไร้อากาศ โดยพ่นก๊าซอาร์กอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ว ปิดระบบการให้

อากาศ ทำการบ่มเซลล์ภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 6, 24 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 5 วัน โดยนำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ ตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

3.5.5.3 วิธีการศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ในอาหารเหลว TAP ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างและกระจายเซลล์แขวนลอยลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน และปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.2, 7.2 และ 8.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก จากนั้น พ่นก๊าซอาร์กอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ว ปิดระบบการให้อากาศ ทำการบ่มเซลล์ภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 6, 24 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 5 วัน โดยนำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ ตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

3.5.5.4 วิธีการศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ในอาหารเหลว TAP ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการล้างและกระจายเซลล์แขวนลอยลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหาร TAP สูตรที่เหมาะสมและมีค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน จากนั้น พ่นก๊าซอาร์กอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ว ปิดระบบการให้อากาศ ทำการบ่มเซลล์ภายใต้การให้แสงต่อเนื่อง โดยแปรผันความเข้มแสงตั้งแต่ 1,000, 2,000 และ 3,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 6, 24 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 5 วัน โดยนำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ ตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

3.5.6 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในสภาวะที่เหมาะสมเทียบกับสภาวะปกติในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 จะทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายในอาหาร TAP สูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน (อาหาร Optimized TAP) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนเปรียบเทียบกับเซลล์สาหร่ายในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะปกติ เริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ในอาหารเหลว TAP ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและกระจายเซลล์แขวนลอยลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหาร TAP และอาหาร Optimized TAP จากนั้น ฟังก์ชันอาร์กอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปิดระบบการให้อากาศ ทำการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีแสงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 6, 24 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 5 วัน โดยนำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์โมลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ ตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร โดยศึกษาปัจจัยดังต่อไปนี้ 1) ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และ 2) ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

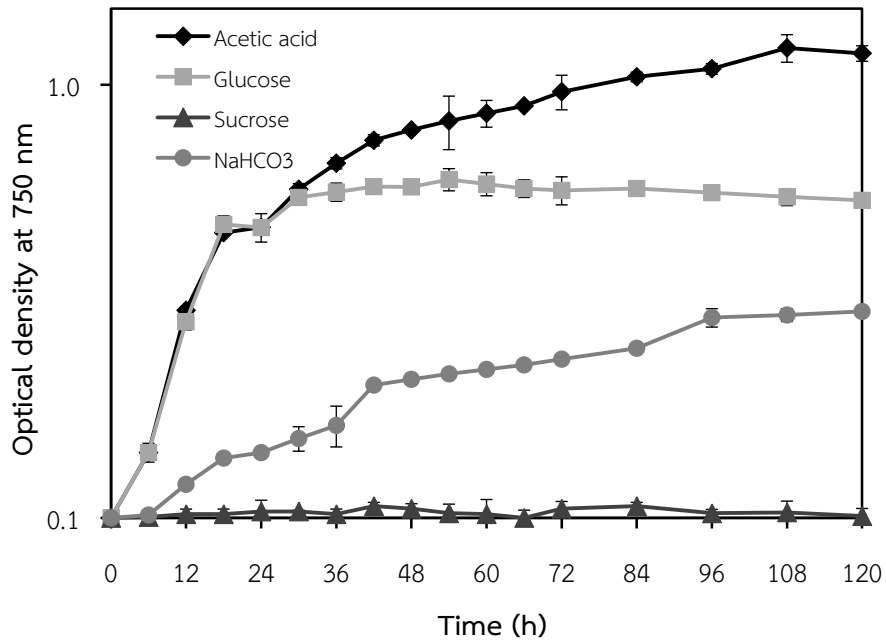
4.1.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

4.1.1.1 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

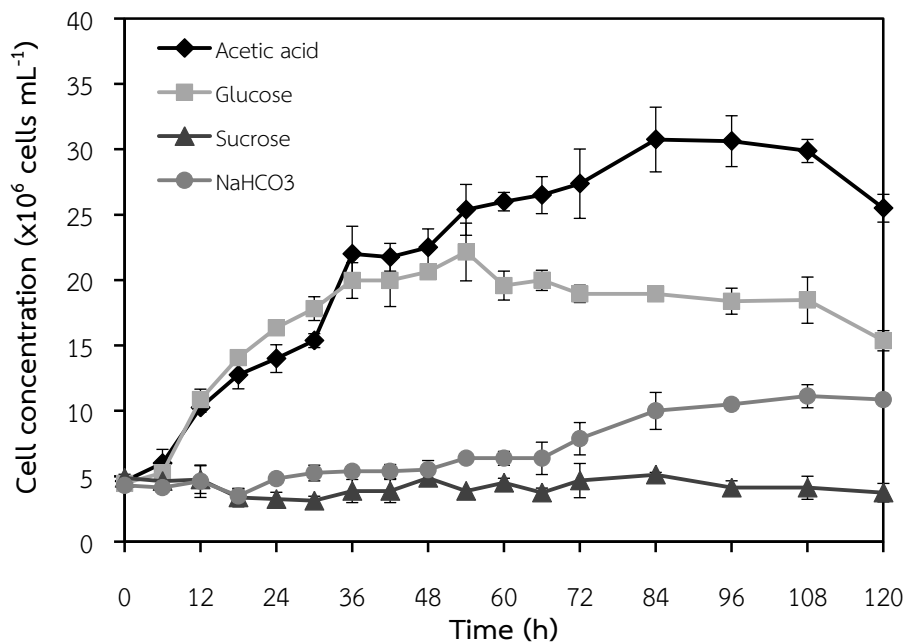
จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ตามหัวข้อที่ 3.5.3.1 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กรดอะซิติก โซเดียมไฮดรอกไซด์ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาล ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร (เท่ากับความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอะซิติกในอาหาร TAP สูตรปกติ) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์มาวิเคราะห์การเจริญเติบโตและผลิตชีวมวลของสาหร่าย โดยการวัดความขุ่นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์จากการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีกรดอะซิติกและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่สาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในอาหารที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน สาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง 120 ชั่วโมง (รูปที่ 4.1)

จากผลการวิเคราะห์ความขุ่นของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่า สาหร่าย สีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในอาหารที่มีกรดอะซิติกและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยสาหร่าย เติบโตเจริญค่อนข้างช้าใน 6 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นระยะที่สาหร่ายปรับตัวอยู่ในระยะพัก (Lag phase) จากนั้น

สาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเข้าสู่ระยะการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (Logarithmic phase) จนถึงชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตช้าลง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่สาหร่ายอยู่ในระยะเฉื่อยของเซลล์ (Late-logarithmic phase) จากการทดลองพบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.051, 0.046 และ 0.016 ต่อ ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีกรดอะซีติก น้ำตาลกลูโคส และโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ จากนั้น สาหร่ายจะเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) (รูปที่ 4.1A) จากการศึกษาความหนาแน่นเซลล์โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการเจริญเติบโตจากการนับจำนวนเซลล์สอดคล้องกับการเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 36 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น ปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3.08×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีน้ำตาลกลูโคสและโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.22×10^7 และ 5.12×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.1B) จากการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 มีปริมาณคลอโรฟิลล์สอดคล้องกับการเจริญเติบโตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และนับจำนวนเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ นอกจากนี้ สาหร่ายที่เจริญเข้าสู่ระยะคงที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ (รูปที่ 4.1C)

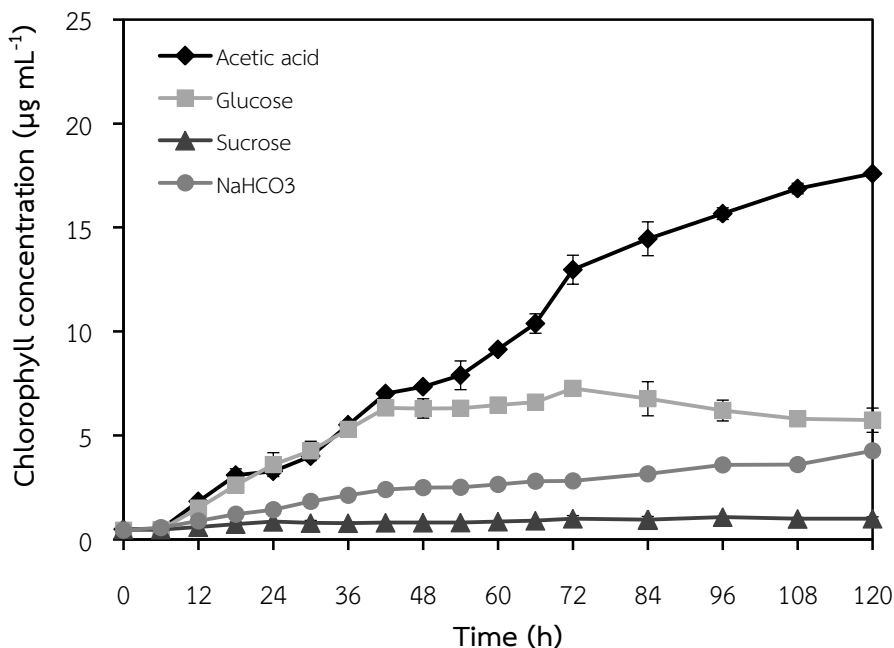


(A)



(B)

รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กรดอะซิติก โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ความหนาแน่นของเซลล์ (B) และปริมาณคลอโรฟิลล์ (C)



(C)

รูปที่ 4.1 (ต่อ) การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีแหล่งคาร์บอนได้แก่ กรดอะซิติก โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ความหนาแน่นของเซลล์ (B) และปริมาณคลอโรฟิลล์ (C)

จากผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนมีอัตราการเจริญจำเพาะและความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุด (รูปที่ 4.1A และ 4.1B) เนื่องจากกรดอะซิติกเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 2 อะตอม เมื่อแตกตัวจะได้อะซิเตต ทำให้ดูดซึมอะซิเตตเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย อะซิเตตจะถูกเร่งปฏิกิริยาการสลายเป็นอะซีติล-โคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในวัฏจักรเคลวิน (Calvin cycle) และวัฏจักรไกลออกซีเลท (Glyoxylate) ที่จำเป็นต่อการสร้างคาร์โบไฮเดรตและกระบวนการหายใจของเซลล์ รวมถึงเป็นสับสเตรทในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ (Gibbs *et al.*, 1986; Atteia *et al.*, 2013) ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้สาหร่ายที่เจริญในอาหารที่มีกรดอะซิติกมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากการทดลองยังพบว่า สาหร่ายที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีการเจริญเติบโตและความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ Logarithmic เช่นเดียวกับการใช้กรดอะซิติก เนื่องจาก สาหร่ายสามารถนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์และนำไปใช้ในปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Glucose-6-phosphate ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญของวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis) และวิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) เพื่อใช้ในการสังเคราะห์

กรดนิวคลีอิกและกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Lu *et al.*, 2011) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าดูดกลืนแสงและปริมาณเซลล์ต่ำกว่าเมื่อใช้กรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 4.1A และ 4.1B) เป็นผลมาจากประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายที่ต่ำกว่า โดยพิจารณาได้จากปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่าย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสมีค่าต่ำกว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เมื่อใช้กรดอะซีติก (รูปที่ 4.1C) จากการทดลองยังพบอีกว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการเจริญเติบโตต่ำ เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่มีคาร์บอน 12 อะตอม จึงต้องถูกย่อยให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน ดังนั้น สาหร่ายดูดซึมน้ำตาลซูโครสได้ช้ากว่าน้ำตาลกลูโคส ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ รายงานวิจัยที่พบว่า โซเดียมอะซิเตทหรือน้ำตาลกลูโคสช่วยเร่งอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sorokiniana* GXNN01 (Qiao and Wang, 2009) และ *Chlorella vulgaris*, *Chlorella minutissima* และ *Chlorella pyrenoidosa* (Sharma *et al.*, 2016) และมีรายงานวิจัยพบว่า สาหร่าย *Chlorella vulgaris* สังเคราะห์คลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นเมื่อใช้กรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน (Unit, 2013)

โดยปกติแล้ว สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกที่ใช้อินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน และภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิกที่ใช้อนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองเมื่อใช้โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตซึ่งเป็นอนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสามารถใช้อนินทรีย์คาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ ทั้งนี้โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตจะถูกเปลี่ยนเป็น Glyceraldehyde-3-phosphate สำหรับใช้เป็นสับสเตรทของปฏิกิริยาในวัฏจักรเคลวิน เพื่อใช้ในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน แต่อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่า สาหร่ายจะใช้อนินทรีย์คาร์บอน คือ กรดอะซีติกหรือน้ำตาลกลูโคสสำหรับการเจริญเติบโตได้ดีกว่าการใช้อนินทรีย์คาร์บอน จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า กรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ดังนั้น ในการทดลองต่อไป จะทำการศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2

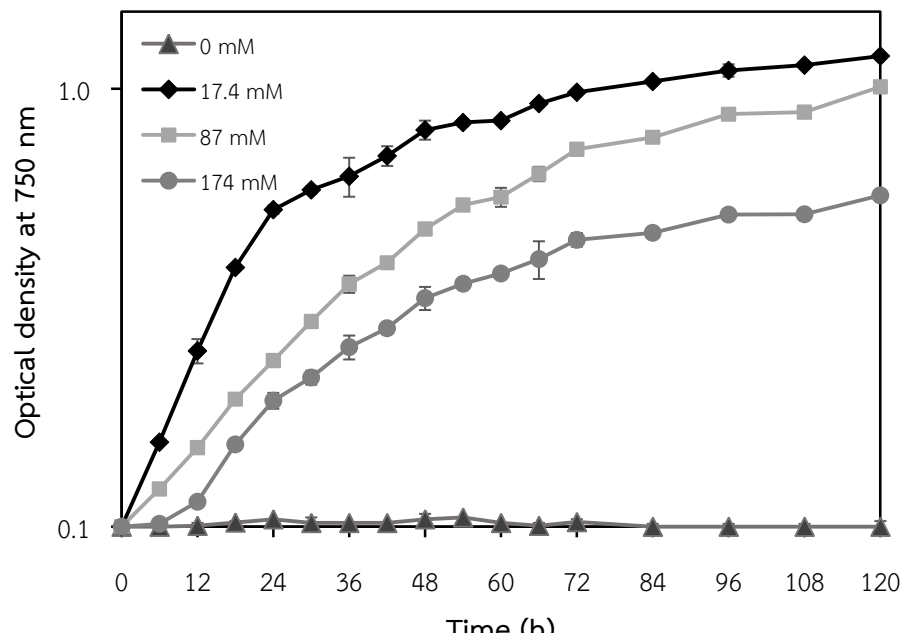
4.1.1.2 ผลของความเข้มข้นของกรดอะซีติกต่อการเจริญเติบโตและการผลิต

ชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

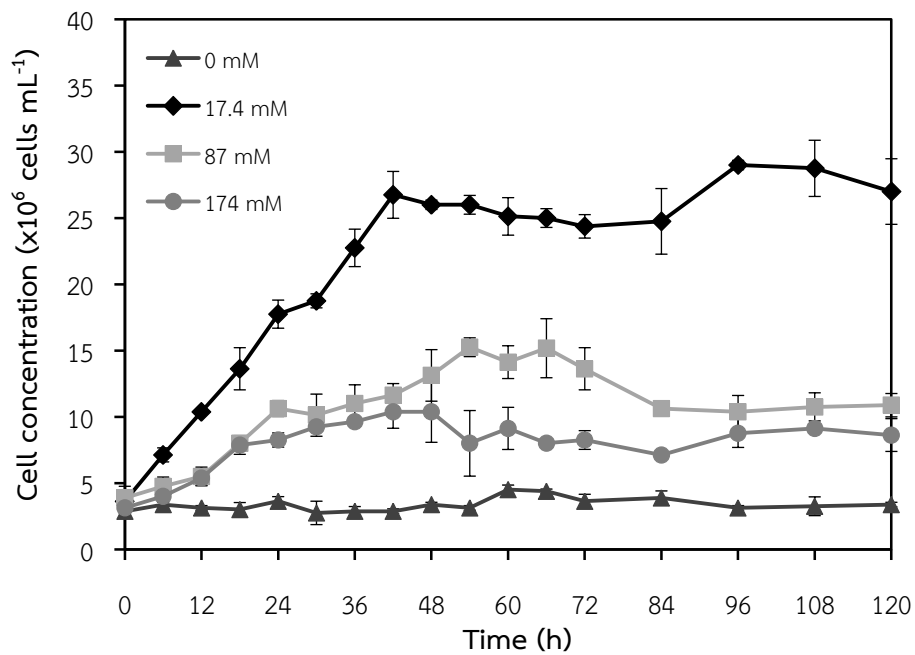
จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ที่แปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอะซีติกเท่ากับ 0, 17.4, 87 และ 174 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอะซีติกในอาหาร TAP สูตรปกติคือ 17.4 มิลลิโมลาร์) ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงตามหัวข้อที่ 3.5.3.2 ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์เป็น

เวลา 120 ชั่วโมง นำตัวอย่างเซลล์มาวิเคราะห์การเจริญเติบโตและผลิตชีวมวลของสาหร่าย โดยการวิเคราะห์ความขุ่นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์จากการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์ มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด แต่การเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซีติกเป็น 87 และ 174 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายลดลง ในขณะที่สาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดแหล่งคาร์บอนหรือมีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 0 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.2)

จากผลการวิเคราะห์ความขุ่นเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์ มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเซลล์สาหร่ายจะเข้าสู่ระยะ Logarithmic ตั้งแต่ 42 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง และมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.050 ต่อชั่วโมง หลังจากนั้น เซลล์จะมีการเจริญช้าลงและเข้าสู่ระยะ Stationary ในขณะที่สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเพิ่มขึ้นเป็น 87 และ 174 มิลลิโมลาร์ มีการปรับตัวในช่วงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากนั้น จะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเข้าสู่ระยะ Logarithmic และเข้าสู่ระยะ Stationary ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สาหร่ายมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.033 และ 0.030 ต่อชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 และ 174 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.2A) เมื่อวิเคราะห์ความหนาแน่นเซลล์พบว่า สาหร่ายมีการเจริญเติบโต จากการนับจำนวนเซลล์สอดคล้องกับการเจริญเติบโตจากการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ โดยสาหร่ายมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.9×10^7 , 1.5×10^7 และ 1.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4, 87 และ 174 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.2B) เมื่อพิจารณาถึงปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์ มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดและเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดยเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ Stationary (รูปที่ 4.2C)

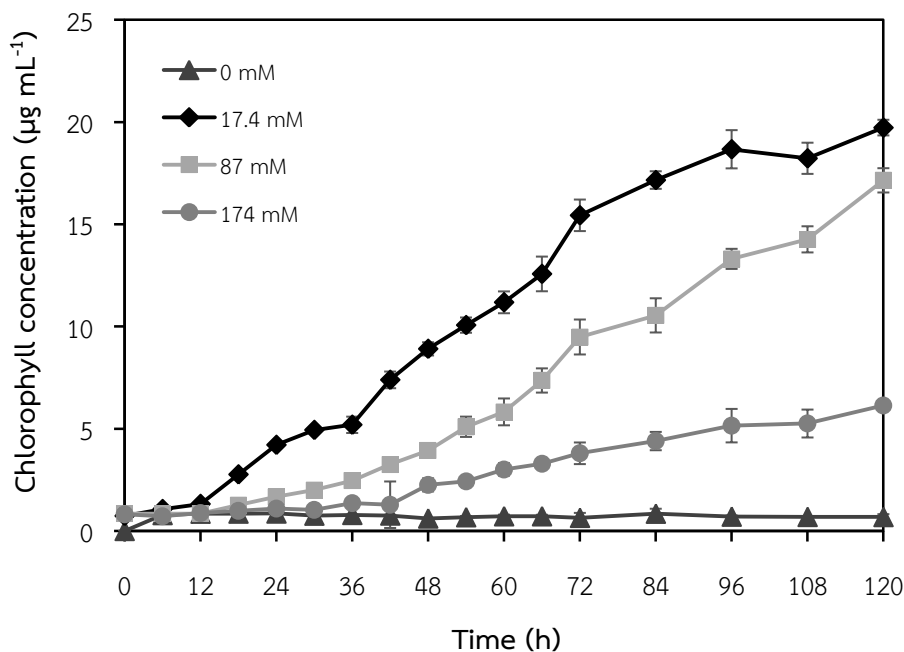


(A)



(B)

รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ความหนาแน่นของเซลล์ (B) และปริมาณคลอโรฟิลล์ (C)



(C)

รูปที่ 4.2 (ต่อ) การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ความหนาแน่นของเซลล์ (B) และปริมาณคลอโรฟิลล์ (C)

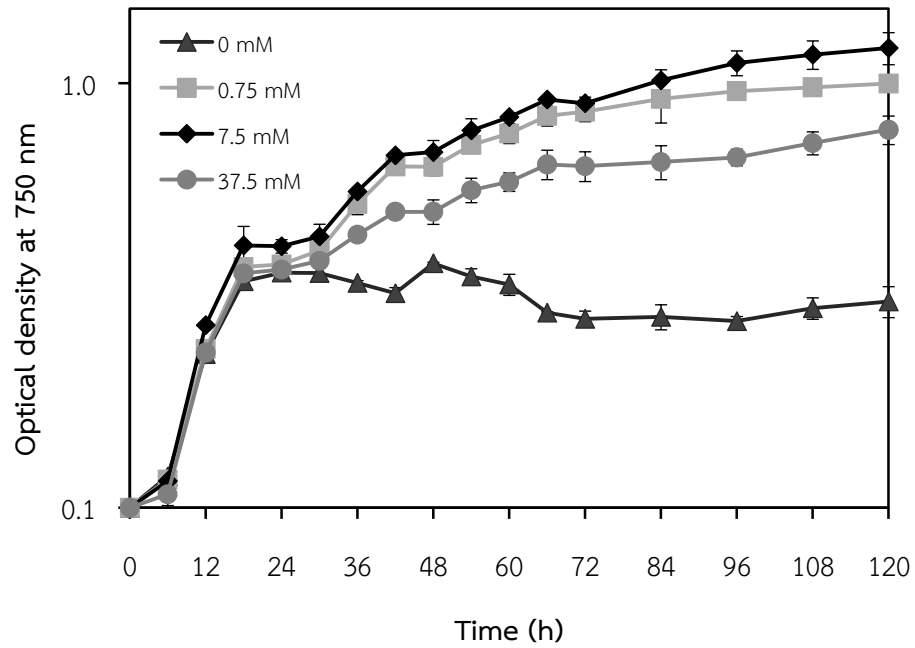
จากผลการศึกษาการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติกต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift พบว่า สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของกรดอะซีติกในอาหาร TAP สูตรปกติ เพียงพอ และเหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ทั้งนี้เนื่องจากกรดอะซีติกเป็นอินทรีย์คาร์บอนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต โดยสาหร่ายจะดูดซึมอะซีเตตที่ได้มาจากการแตกตัวของกรดอะซีติกในอาหารและเปลี่ยนเป็นอะซีติล-โคเอนไซม์เอ เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นของกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ (Gibbs *et al.*, 1986; Atteia *et al.*, 2013) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ปราศจากกรดอะซีติกพบว่า สาหร่ายไม่มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลอง ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นระบบปิดที่ไม่มีการป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ระบบ จึงทำให้ ภายใต้สภาวะการขาดแหล่งคาร์บอน สาหร่ายไม่สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ในการทดลองนี้ยังพบว่า อาหารที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกสูง คือ 87 และ 174 มิลลิโมลาร์ มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะต่ำกว่าประมาณ 1.7 เท่า เปรียบเทียบกับอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ ทั้งนี้เป็นเพราะว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกสูง ส่งผลให้เกิดโฟมมากขึ้นในถังปฏิกรณ์และมีผลต่อค่าพีเอชของอาหารลดลง จึงทำให้การเจริญของ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ลดลง นอกจากนี้ การเจริญเติบโตของสาหร่ายถูกยับยั้ง จากความเข้มข้นของสับสเตรทที่มาก และส่งผลต่อการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสง สอง (Heifetz *et al.*, 2000) เมื่อพิจารณาจากผลการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลง จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่เพิ่มขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella zofingiensis* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Vertical tubular ที่พบการเกิดโฟมภายในระบบและค่าพีเอชลดลงเมื่อ เพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซีติก (Huo *et al.*, 2018) จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า ความเข้มข้น ของกรดอะซีติกในอาหาร TAP สูตรปกติ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย สีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจะทำการศึกษาความเข้มข้นของแหล่ง ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2

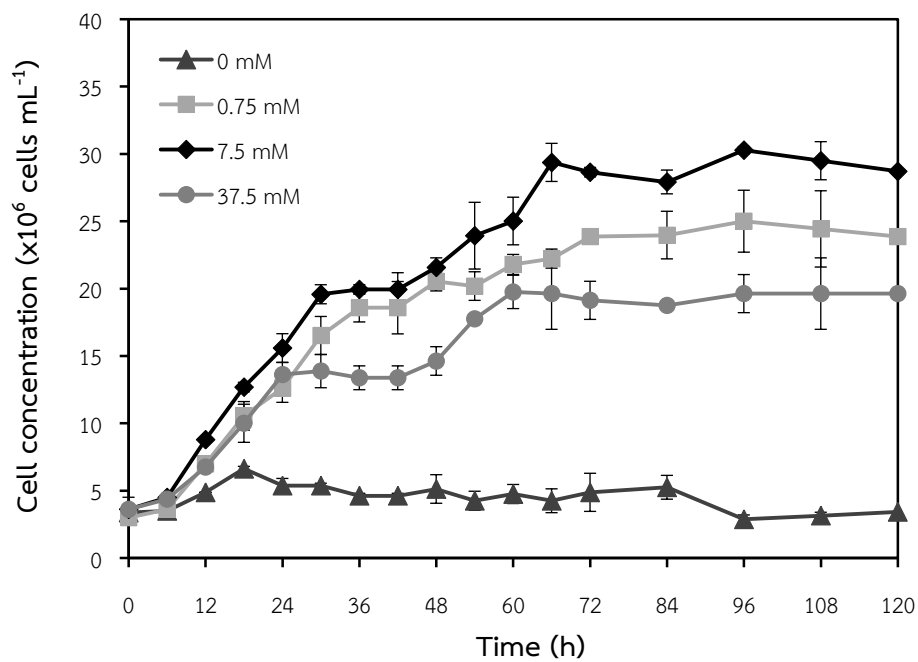
4.1.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวล ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ที่แปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนียมคลอไรด์ เท่ากับ 0, 0.75, 7.5 และ 37.5 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนียมคลอไรด์ในอาหาร TAP สูตรปกติคือ 7.5 มิลลิโมลาร์) ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงตามหัวข้อที่ 3.5.3.2 ทำการเก็บ ตัวอย่างเซลล์เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นำตัวอย่างเซลล์มาวิเคราะห์การเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวล ของสาหร่าย โดยการวัดความขุ่นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโน เมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์จากการนับจำนวนเซลล์ด้วย ฮีมาไซโตมิเตอร์ และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ไม่ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร TAP ที่ปราศจากแอมโมเนียมคลอไรด์ ถึงแม้ว่าจะพบค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบปริมาณคลอโรฟิลล์ เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.3 A-C) แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายสีเขียวจำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนสำหรับการสังเคราะห์ คลอโรฟิลล์ ในขณะที่สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 สามารถเจริญได้ในอาหาร TAP ที่มี แอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.75, 7.5 และ 37.5 มิลลิโมลาร์ โดยพบว่าสาหร่ายมีระยะเวลาใน การปรับตัวในช่วง Lag phase เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้น สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น อย่างรวดเร็วเข้าสู่ระยะ Logarithmic และเข้าสู่ระยะ Stationary ในชั่วโมงที่ 18 จากการวิเคราะห์ อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp.

LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 7.5 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.049 ต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0, 0.75 และ 37.5 มิลลิโมลาร์ โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.046, 0.047 และ 0.042 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.3A) แต่หลังจากชั่วโมงที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 7.5 มิลลิโมลาร์ รองลงมาคือ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.75 และ 37.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์พบว่า ในช่วงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง เซลล์ สาหร่ายจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีแหล่งไนโตรเจน และยังพบว่า สาหร่ายที่เจริญในอาหาร TAP สูตรปกติที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 7.5 มิลลิโมลาร์ มีจำนวนเซลล์สูงสุด ตามด้วย 0.75 และ 37.5 มิลลิโมลาร์ โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3.0×10^7 , 2.5×10^7 และ 2.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.3B) จากผลการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ส่งผลให้สาหร่ายมีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น โดยปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงอย่างชัดเจนในอาหารที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.75 มิลลิโมลาร์ และสาหร่ายไม่สามารถสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ได้ในสภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจน (รูปที่ 4.3C) ซึ่งสอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตอื่นๆ

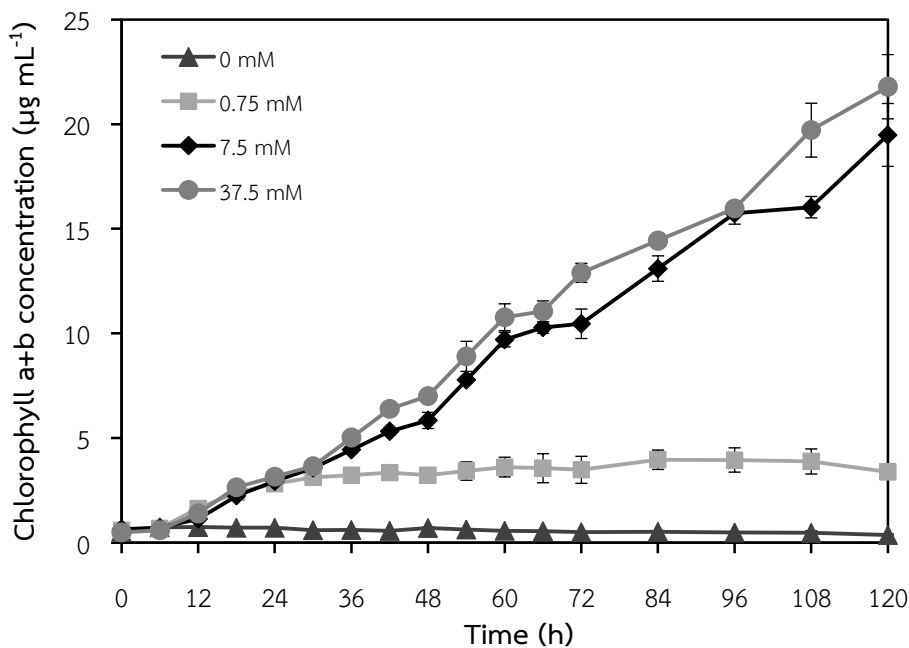


(A)



(B)

รูปที่ 4.3 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (B) และความหนาแน่นของเซลล์ (C)



(C)

รูปที่ 4.3 (ต่อ) การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ความหนาแน่นของเซลล์ (B) และปริมาณคลอโรฟิลล์ (C)

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0 ถึง 37.5 มิลลิโมลาร์ พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 7.5 มิลลิโมลาร์ แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดแอมโมเนียมคลอไรด์ (รูปที่ 4.3A และ 4.3B) แสดงให้เห็นว่า แหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 โดยในการทดลองนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่สำคัญและจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก และหน่วยโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ จากผลการทดลองพบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.75 มิลลิโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เพียง 0.75 มิลลิโมลาร์เพียงพอต่อการเจริญและการสังเคราะห์โปรตีน โดยปกติ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP จะมีกรดอะซิติกเป็นอินทรีย์คาร์บอนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต ซึ่งกรดอะซิติกไม่ได้อยู่ในปริมาณที่จำกัด ดังนั้น สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 จึงสามารถเจริญเติบโตได้ แม้เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำ เมื่อ สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารละลายอาหารเพิ่มขึ้น จะทำให้เกิดการใช้คาร์บอนในกระบวนการ

สังเคราะห์แสงมากขึ้น สารต่างๆ จะถูก ใช้ในการสร้างคาร์โบไฮเดรตมากกว่าใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน มีรายงานพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะการจำกัดไนโตรเจนในระยะยาว สาหร่ายจะใช้ไนโตรเจนที่ถูกเก็บสะสมไว้ มาใช้ในการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์โปรตีน (Lourenço *et al.*, 1998; Negi *et al.*, 2016) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาผลของธาตุไนโตรเจนต่อการเจริญของสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* ซึ่งพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของธาตุไนโตรเจนสูงขึ้นในระดับหนึ่งส่งผลให้สาหร่ายเริ่มมีการเจริญเติบโตทันที และสาหร่ายจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ หากขาดธาตุไนโตรเจน (Nigam *et al.*, 2011) เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* Y-019 ในอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน ทำให้ปริมาณเซลล์ลดลง 2.5 เท่าเมื่อเทียบกับของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร TAP (Deng *et al.*, 2011)

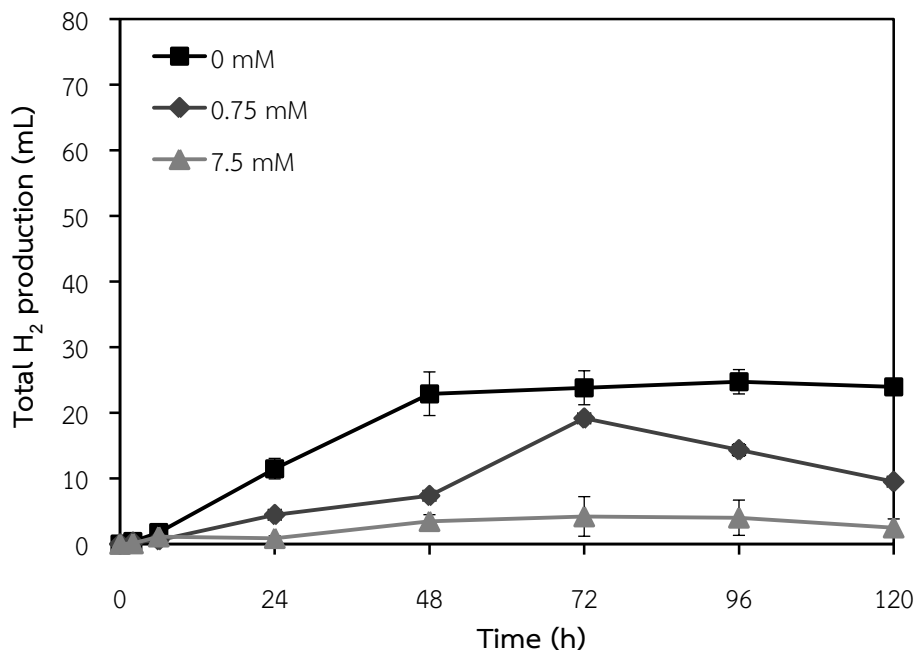
จากการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ในอาหาร TAP (รูปที่ 4.3C) อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ที่มากเกินไป ทำให้การเจริญของสาหร่ายลดลง ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญของหน่วยโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ ดังนั้น การเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร TAP จะทำให้สาหร่ายมีการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะการขาดไนโตรเจนจะมีปริมาณการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ลดลง นอกจากนี้ การขาดไนโตรเจนยังส่งผลให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มไทลาคอยด์เกิดความเสียหาย ส่งผลให้สาหร่ายมีประสิทธิภาพการดูดซับพลังงานของระบบแสงลดลง (Peltier and Schmidt, 1991) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานที่พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sorokiniana* ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง เมื่ออยู่ในสภาวะการขาดไนโตรเจน (Negi *et al.*, 2016) จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 คือ 7.5 มิลลิโมลาร์ ดังนั้น อาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 17.4 มิลลิโมลาร์และมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 7.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับในอาหาร TAP สูตรปกติ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในการทดลองต่อไป จึงนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงการเจริญเติบโตในระยะ Logarithmic มาศึกษาปัจจัยที่ผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตรต่อไป

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ได้ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจนดังนี้ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้นของอาหาร และความเข้มแสง

4.2.1 ผลความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงล้างและกระจายเซลล์ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0, 0.75 และ 7.5 มิลลิโมลาร์ จากนั้น ทำการชักนำให้เซลล์สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาวะปราศจากอากาศ โดยพ่นก๊าซอาร์กอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปิดระบบการให้อากาศ ทำการบ่มเซลล์ภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0 มิลลิโมลาร์ หรืออาหาร TAP ที่ปราศจากไนโตรเจน (TAP-N) มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.75 และ 7.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.4) จะเห็นได้ว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-N มีการผลิตไฮโดรเจนคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการบ่ม โดยมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 24.729 ± 1.858 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการบ่มเซลล์ ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มอาหาร TAP ในความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.75 มิลลิโมลาร์ มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด 19.155 ± 3.016 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 72 ของการบ่มเซลล์ หลังจากนั้นการผลิตไฮโดรเจนจะลดลง (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0, 0.75 และ 7.5 มิลลิโมลาร์

จากรายงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่า แหล่งไนโตรเจนมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Chlorella* (He *et al.*, 2012; Pongpadung *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015) จากการทดลองพบว่า การจำกัดและการขาดไนโตรเจนช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ให้ โดยสาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น เมื่ออยู่ในสภาวะที่จำกัดแหล่งไนโตรเจนในอาหาร TAP หรือมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.75 มิลลิโมลาร์ และสาหร่ายผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อบ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากไนโตรเจน (รูปที่ 4.4) เนื่องจากธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก และยังเป็นองค์ประกอบสำคัญของคลอโรฟิลล์ เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ปราศจากไนโตรเจน เซลล์มีการสังเคราะห์โปรตีน สำหรับดูดซับพลังงานแสง และโปรตีนศูนย์กลางปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสงลดลง (Peltier and Schmidt, 1991) จึงส่งผลให้โครงสร้างการปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองเกิดความเสียหาย (Zhang *et al.*, 2014) เมื่อกิจกรรมของระบบแสงสองของสาหร่ายลดลง ปริมาณออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำลดลงด้วย ออกซิเจนที่เหลืออยู่ในระบบบางส่วนจึงถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจ (Cournac *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2015) ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่ถูกยับยั้งจากออกซิเจน และส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจนสูงขึ้น นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* มีการตอบสนองต่อการขาดแหล่งไนโตรเจน โดยการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์โดยการสะสมแป้ง (Zhu *et al.*, 2014) เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะปราศจากอากาศ เซลล์จะ สลายแป้งมาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน ดังนั้น ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 จึง

เพิ่มขึ้นภายหลังการบ่มในสภาวะการขาดไนโตรเจนและเซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงในระยะยาว เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการจำกัดไนโตรเจน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้นในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* IOAC707S เมื่อบ่มภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจน (Li *et al.*, 2015) จากการทดลองสรุปได้ว่า การขาดแหล่งไนโตรเจนช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ให้สูงกว่าในสภาวะการจำกัดแหล่งไนโตรเจนและแหล่งไนโตรเจนปกติ ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจะทำการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ในสภาวะการขาดไนโตรเจน

4.2.2 ผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

Chlorella sp. LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงล้างและกระจายเซลล์ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน หรือ TAP-N ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 และ 87 มิลลิโมลาร์ จากนั้น ชักนำให้เซลล์สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนในสภาวะปราศจากอากาศ โดยพ่นก๊าซอาร์กอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปิดระบบการให้อากาศ ทำการบ่มเซลล์ภายใต้ ต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซีติกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ ทำให้ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 เพิ่มขึ้น โดยมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 55.388 ± 3.626 มิลลิลิตร เมื่อบ่มในสภาวะที่ปราศจากไนโตรเจนเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.1) ซึ่งสูงกว่าประมาณ 2 เท่าของผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นของกรดอะซีติกในอาหารสูตรปกติ) โดยมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 25.609 ± 2.013 มิลลิลิตร เมื่อบ่มในสภาวะที่ปราศจากไนโตรเจนเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2, 6, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ผลผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร)	
	ความเข้มข้นของกรดอะซีติก (ไมโครโมลาร์)	
	17.4	87
2	0.384 ± 0.036	0.595 ± 0.023
6	1.782 ± 0.053	3.565 ± 0.020
24	9.677 ± 0.461	10.312 ± 0.459
48	21.351 ± 2.194	23.618 ± 2.807
72	23.816 ± 1.831	35.783 ± 3.712
96	25.609 ± 2.013	46.255 ± 3.950
120	23.972 ± 0.785	55.388 ± 3.626

จากการทดลอง สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อบ่มในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนและมีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 4.1) เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซีติกเป็นการเพิ่มจำนวนอิเล็กตรอนและโปรตอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ โดยกรดอะซีติกจะแตกตัวเป็นโปรตอนและอะซีเตท อะซีเตทจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl CoA) และเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid (TCA) cycle) และวัฏจักรไกลออกซีเลท (Glyoxylate cycle) โดยระหว่างกระบวนการจะมีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมา เมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ อิเล็กตรอนที่มีมากภายในเซลล์จึงถูกส่งไปยังเฟอร์ริดอกซิน และส่งต่อไปให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้สาหร่ายมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Atteia *et al.*, 2013; Jurado-Oller *et al.*, 2015) นอกจากนี้ผลผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซีติก อาจเป็นผลมาจากการลดลงของปริมาณออกซิเจนภายในเซลล์ เนื่องจากกรดอะซีติกถูกใช้ป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหายใจของเซลล์สาหร่ายในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก ทำให้มีการหายใจสูงขึ้น ออกซิเจนในระบบจึงลดลง (Melis and Happe, 2001; Jurado-Oller *et al.*, 2015) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะซีเตท ทำให้อัตราการหายใจของสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* สูงขึ้น และส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นด้วย (Wang *et al.*, 2011)

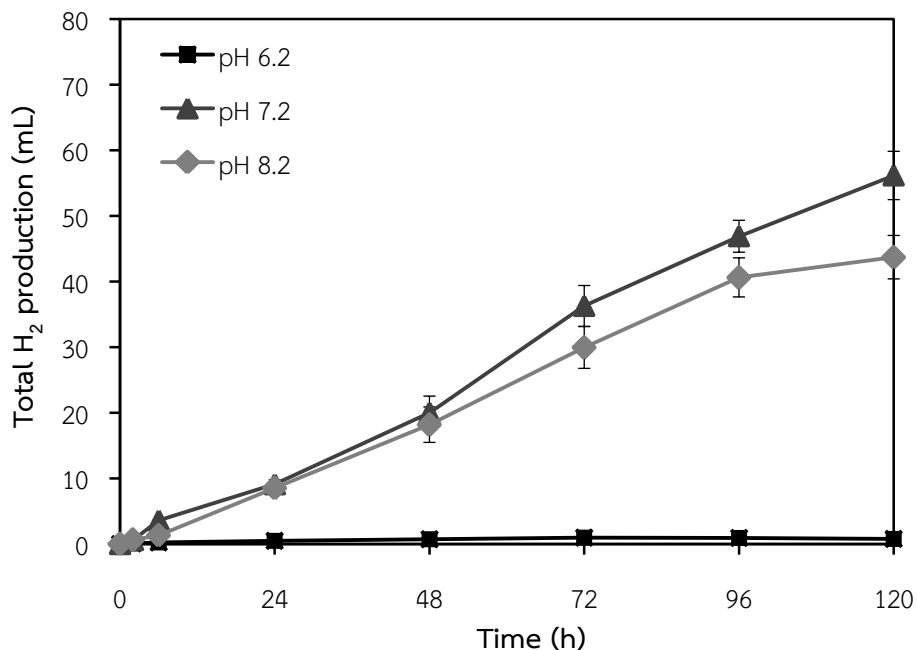
จากการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนในอาหาร TAP ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สามารถสรุปได้ว่า อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน และมีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่

เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และตั้งชื่อสูตรอาหารที่เหมาะสมนี้ว่าอาหารสูตรเหมาะสม (Optimized TAP) ในการทดลองต่อไป จึงนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ หรืออาหาร Optimized TAP มาศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ต่อไป

4.2.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

Chlorella sp. LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงล้างและกระจายเซลล์ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ (อาหาร Optimized TAP) โดยแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.2, 7.2 และ 8.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก จากนั้น ชักนำให้เซลล์สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาวะปราศจากอากาศ โดยพ่นก๊าซอาร์กอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปิดระบบการให้อากาศ ทำการบ่มเซลล์ภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่มีความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็นกลางเท่ากับ 7.2 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 8.2 ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มในอาหารที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 6.2 มีการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุดอย่างเห็นได้ชัดตลอดระยะเวลาการบ่มเซลล์ (รูปที่ 4.5) เซลล์ที่บ่มในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 และ 8.2 จะมีการสะสมไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 120 โดยพบว่าเซลล์ที่บ่มในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 มีผลผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 56.164 ± 3.677 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.5) จากการทดลองยังพบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารระหว่างการบ่มตลอดระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยค่าพีเอชของอาหารจะเพิ่มขึ้นจากค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 0.4 ถึง 0.8 (ตารางที่ 4.2)



รูปที่ 4.5 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ ที่แปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.2, 7.2 และ 8.2

ตารางที่ 4.2 ค่าพีเอชเริ่มต้นและค่าพีเอชหลังจากการบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ ที่ชั่วโมงต่างๆ

พีเอชของอาหาร ในชั่วโมงที่	พีเอชเริ่มต้น		
	6.2	7.2	8.2
0	6.21 ± 0.02	7.20 ± 0.03	8.20 ± 0.02
2	6.25 ± 0.01	7.22 ± 0.02	8.25 ± 0.01
6	6.28 ± 0.02	7.29 ± 0.02	8.34 ± 0.02
24	6.33 ± 0.02	7.35 ± 0.01	8.61 ± 0.03
48	6.46 ± 0.03	7.59 ± 0.02	8.70 ± 0.01
72	6.50 ± 0.01	7.73 ± 0.01	8.86 ± 0.02
96	6.55 ± 0.02	7.81 ± 0.01	8.93 ± 0.02
120	6.62 ± 0.02	7.99 ± 0.02	9.01 ± 0.01

จากการศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม คือ พีเอช 7.2 (รูปที่ 4.5) โดยหลังจากการบ่มเซลล์เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พีเอชของอาหารจะเพิ่มขึ้นเป็น 7.99 (ตารางที่ 4.2) พีเอชที่เพิ่มขึ้นในช่วงการผลิตไฮโดรเจน อาจเนื่องมาจากการที่กรดอะซีติกที่ละลายอยู่ในอาหารเกิด

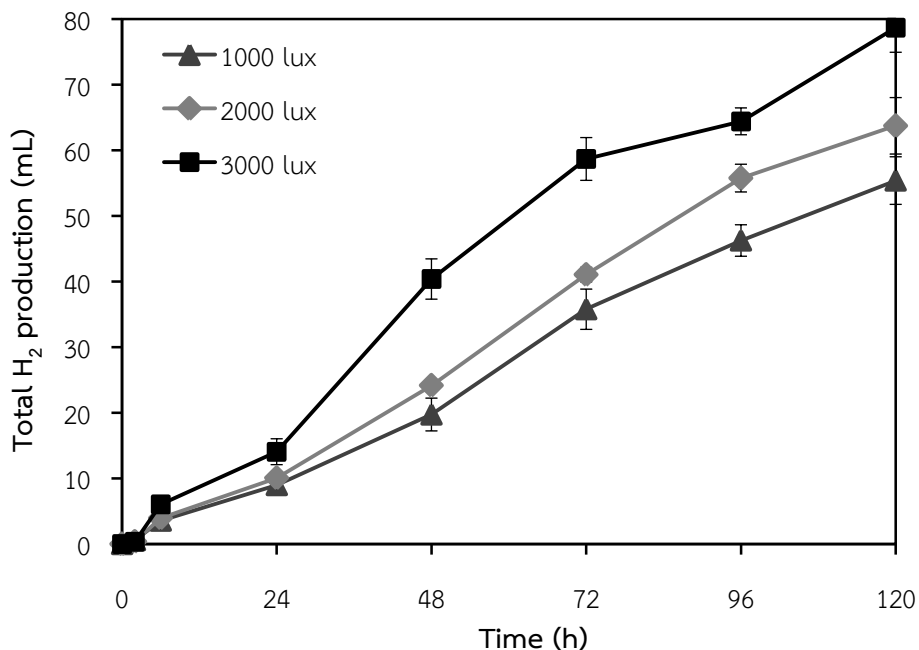
การแตกตัวไดอะซีเตทไอออน (CH_3COO^-) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้เป็นไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงมีค่าเป็นเบสมากขึ้นหรือพีเอชสูงขึ้น (Kosourov *et al.*, 2003; Skjånes *et al.*, 2008) นอกจากนี้ พีเอชเริ่มต้น 7.2 ยังอยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง ซึ่งเหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว (Kosourov *et al.*, 2003) และมีผลทำให้ระยะเวลาการปรับตัวเข้าสู่กระบวนการผลิตไฮโดรเจนเร็วขึ้น (Antal *et al.*, 2016)

จากการทดลองพบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ผลิตไฮโดรเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อบ่มในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 6.2 ทั้งนี้เนื่องมาจากการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสภาวะที่มีพีเอชเป็นกรด นอกจากนี้ พีเอชต่ำยังส่งผลให้โปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์สาหร่าย มีประจุเปลี่ยนไป และอาจ เสียสภาพได้ จึงส่งผลให้การอยู่รอดของเซลล์สาหร่ายลดลง (Kosourov *et al.*, 2003) เช่นเดียวกันกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่าย อาจถูกยับยั้ง เมื่อบ่มในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นในช่วง เบส (Kosourov *et al.*, 2003) ทั้งนี้พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของสาหร่าย จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายได้ โดยที่พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 คือ 7.2 ดังนั้นจึงนำสาหร่ายสีเขียวที่บ่มในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 มาศึกษาปัจจัยของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.2.4 ผลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp.

LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงล้างและกระจายเซลล์ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหาร Optimized TAP ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 7.2 จากนั้น ชักน้ำให้เซลล์สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนในสภาวะปราศจากอากาศ โดยการพ่นก๊าซอาร์กอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปิดระบบการให้อากาศ ทำการบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ ความเข้มแสงตั้งแต่ 1,000, 2,000 และ 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น เมื่อบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะความเข้มแสงเพิ่มขึ้น โดยเซลล์ที่บ่มภายใต้สภาวะการให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 78.662 ± 3.722 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.6) ซึ่งสูงประมาณ 1.4 เท่าของผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของเซลล์ที่บ่มภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่มี ความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2 ภายใต้ ความเข้มแสง 1,000, 2,000 และ 3,000 ลักซ์

จากการศึกษาความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนพบว่า การเพิ่มความเข้มแสงทำให้สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น โดยสาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ภายใต้สภาวะความเข้มแสงเท่ากับ 3,000 ลักซ์ (รูปที่ 4.6) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เซลล์มีความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น (Kim *et al.*, 2006) คลอโรฟิลล์จะดูดซับพลังงานแสงและผลิตอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้น อิเล็กตรอนจะถูกปลดปล่อยออกมาจำนวนมาก และจะถูกถ่ายทอดผ่านตัวรับอิเล็กตรอนต่างๆ ไปยังเฟอร์รีดอกซิน เพื่อส่งต่อไปให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส ใช้สำหรับการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ ในช่วงเริ่มต้นของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเมื่อบ่มภายใต้ความเข้มแสงต่ำ (รูปที่ 4.6) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจะถูกกระตุ้นที่ความเข้มแสงสูงได้เร็วกว่าที่ความเข้มแสงต่ำ (Oncel and Sukan 2011; Antal *et al.*, 2016) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานที่พบว่า การเพิ่มความเข้มแสงในช่วงการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* IOAC707S ที่บ่มในสภาวะการขาดไนโตรเจน จะส่งผลให้เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Li *et al.*, 2015)

จากการทดลองพบว่า การเพิ่มความเข้มแสงให้สูงถึง 3,000 ลักซ์ จะทำให้การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift สูงขึ้น (รูปที่ 4.6) ทั้งนี้การได้รับแสงในปริมาณที่เหมาะสมจะมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายในถังปฏิกรณ์

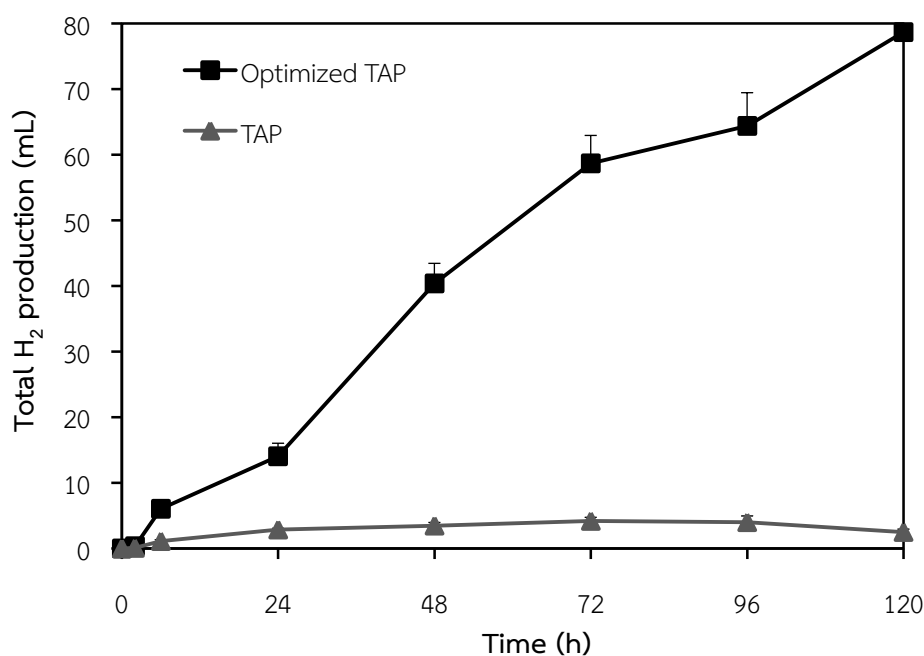
ชีวภาพ ซึ่งขึ้นอยู่กับ พื้นที่การรับแสงของถังปฏิกรณ์ และสิ่งกีดขวางการรับแสงของเซลล์ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วย (Oncel and Sukan 2011) เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ในระดับขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร พบว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสูงสุดภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีหรือประมาณ 2,000 ลักซ์ (Puangplub and Phunpruch, 2017) ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ จากการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร คือ บ่มในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน (TAP-N) ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2 และบ่มภายใต้สภาวะความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

4.3 การเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในสภาวะที่เหมาะสมและสภาวะปกติ

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงล้างและกระจายเซลล์ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหาร 2 ชนิด คือ อาหาร TAP สูตรปกติ และ อาหารสูตรที่เหมาะสม (อาหาร Optimized TAP) โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนเทียบกับสภาวะปกติ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร Optimized TAP ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร 7.2 ภายใต้สภาวะการให้แสงต่อเนื้อที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นประมาณ 19 เท่าของเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะปกติ (รูปที่ 4.7) โดยเซลล์ที่บ่มในอาหาร Optimized TAP ภายใต้สภาวะการบ่มที่เหมาะสม มีผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 120 ของการบ่มเซลล์ ซึ่งมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 78.662 ± 3.722 มิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์แทบจะไม่ผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มในอาหาร TAP (รูปที่ 4.7)

ตารางที่ 4.3 สภาวะที่ใช้ในการเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP และอาหาร Optimized TAP ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

สภาวะและความเข้มข้นของสาร	ชนิดของอาหาร	
	TAP	Optimized TAP
ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ (mM)	7.5	0
ความเข้มข้นของกรดอะซีติก (mM)	17.4	87
พีเอชเริ่มต้นของอาหาร	7.2	7.2
ความเข้มแสง (Lux)	1000	3000
อุณหภูมิ (°C)	30	30



รูปที่ 4.7 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP และอาหาร Optimized TAP-N ภายใต้สภาวะการบ่มต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร Optimized TAP ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะปกติมากถึง 19 เท่า (รูปที่ 4.7) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายให้สูงขึ้นอย่างชัดเจนคือ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของกรดอะซีติก และความเข้มแสง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ปัจจัยและสภาวะที่นำมาศึกษาเหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตไฮโดรเจน และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร อย่างมีนัยสำคัญ

จากการเปรียบเทียบผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 กับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* สายพันธุ์อื่นๆ ในสภาวะการเจริญและสภาวะการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ สามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 4.4 จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า แหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Chlorella* โดยการจำกัดแหล่งไนโตรเจนร่วมกับการขาดซัลเฟอร์ ทำให้สาหร่ายมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (He et al., 2012) จากการเปรียบเทียบพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเช่นเดียวกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella protothecoides* ในรายงานของ He และคณะ (2012) สำหรับความเข้มแสงเป็นอีกปัจจัยสำคัญหนึ่งที่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift เช่นเดียวกับการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella protothecoides* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Cylindrical reactor vessel และสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC124 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank reactor (Oncel and Sukan, 2009; Lehr et al., 2012) ทั้งนี้ยังไม่พบการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift เช่นกัน

ตารางที่ 4.4 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 เปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* สายพันธุ์อื่นๆ ภายใต้สภาวะการเจริญและสภาวะการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	สภาวะการเจริญ	สภาวะการผลิตไฮโดรเจน	ชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	อัตราการผลิต/ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด	เอกสารอ้างอิง
<i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	TAP medium (7 mM NH ₄ Cl, 17.4 mM Acetic acid), 1,000 Lux (30 μmol photons m ⁻² s ⁻¹), 30 °C, pH 7.2	TAP-N medium (87 mM Acetic acid), Initial pH 7.2, 3,000 Lux (90 μmol photons m ⁻² s ⁻¹), 30 °C,	Air-lift photobioreactor (3.7 L)	78.66 mL	This study
<i>Chlorella protothecoides</i>	TAP medium (0.35 mM NH ₄ Cl), 25 - 35 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ (light:dark = 14:10), 25 °C, pH 7.3	TAP-S medium (0.35 mM NH ₄ Cl), Continuous light of 40 - 50 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ , 25 °C	Cylindrical reactor vessel (650 mL)	2.19 mL L ⁻¹ h ⁻¹ 233.7 mL L ⁻¹	He <i>et al.</i> , 2012
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC124	TAP medium, 40 μE m ⁻² s ⁻¹ , 27 °C, pH 7.2, 3% (v/v) CO ₂	TAP-S medium, Continuous light of 140 μE m ⁻² s ⁻¹ , 3% (v/v) CO ₂	Continuously stirred type photobioreactor (2.5 L)	73.5 mL	Oncel and Sukan, 2009
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	TAP medium, 250 μE m ⁻² s ⁻¹ , 5% (v/v) CO ₂ , 25 °C, pH = 7.0	TAP-S medium, 270 μE m ⁻² s ⁻¹ , 5% (v/v) CO ₂ , 25 °C	Stirred tank bioreactor (2 L)	650 mL g dry biomass ⁻¹	Lehr <i>et al.</i> , 2012
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC124	TAP medium, 3% (v/v) CO ₂ , 27 °C, pH = 7.7	TAP-S medium, 150 μE m ⁻² s ⁻¹	Tubular bioreactor	40 mL	Oncel and Kose (2011)
	TAP medium, 3% (v/v) CO ₂ , 27 °C, pH = 7.7	TAP-S medium, 150 μE m ⁻² s ⁻¹ (75 μE m ⁻² s ⁻¹ from two side)	Panel bioreactor	70 mL	

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร สรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1) จากการศึกษาปัจจัยทางเคมีที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร จากการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร วิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ศึกษา สรุปได้ดังนี้

1.1) ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 คือ กรดอะซิติก โดยมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.051 ต่อชั่วโมง และมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3.08×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

1.2) การเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซิติกทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายถูกยับยั้ง โดยความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 คือ 17.4 มิลลิโมลาร์ และสาหร่ายไม่มีการเจริญเติบโตในสภาวะการขาดแหล่งคาร์บอน

1.3) ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 คือ 7.5 มิลลิโมลาร์ หรือเท่ากับความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ในอาหาร TAP สูตรปกติ และในสภาวะการจำกัดแหล่งไนโตรเจนและการขาดแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์อย่างเห็นได้ชัด

2) จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ สรุปได้ดังนี้

2.1) การขาดแหล่งไนโตรเจนช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ให้สูงขึ้น โดยสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่ขาดไนโตรเจนมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 19.155 ± 3.016 มิลลิลิตร

2.2) ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 คือ 87 มิลลิโมลาร์ โดยมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 55.388 ± 3.626 มิลลิลิตร

2.3) พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 คือ 7.2

2.4) การเพิ่มความเข้มแสงทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สูงขึ้น โดยความเข้มแสงที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนคือ 3,000 ลักซ์

2.5) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด เมื่อบ่มเซลล์ในอาหารสูตรที่เหมาะสม (อาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87.5 มิลลิโมลาร์) และสภาวะที่เหมาะสม (ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2 และความเข้มแสง 3,000 ลักซ์) โดยมีผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 78.662 ± 3.722 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 120 ของการบ่มเซลล์ โดยมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า 19 เท่าของเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะปกติ

เอกสารอ้างอิง

- ธรรมบุญ ศรีทะวงศ์. 2550. “ผลิตพลังงานไฮโดรเจนโดยกระบวนการเร่งปฏิกิริยาเคมี.” วารสารส่งเสริมและเทคโนโลยี. 34(195) : 136-143.
- ธวัชชัย เอกสันติ ยุพิน ศาลางาม วนิตา แสงทอง อุไรวรรณ สวัสดิ์ และกมลวรรณ ตีเลิศ . 2547. “จุลชีววิทยาในทางสาธารณสุข.” คณะพลศึกษาภาควิชาสุขศึกษา มหาวิทยาลัยศรีนครินทร - วิโรฒ.
- ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546. **สาหร่ายวิทยา (Phycology)**. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Antal, T.K., Krendeleva, T.E. and Rubin, A.B. 2011. “Acclimation of green algae to sulfur deficiency: underlying mechanisms and application for hydrogen production.” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89: 3-15.
- Antal T.K., Kukarskikh, G.P., Volgusheva, A.A., Krendeleva, T.E., Tyystjärvi, E. and Rubin, 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.
- Appel, J. and Schulz, R. 1996. “Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)-dehydrogenase (complex I).” *Biochimica et Biophysica Acta*. 1298 : 141-147.
- Atteia, A., Lis, V.R., Tielens, A. G. and Martin, W. F. 2013. “Anaerobic energy metabolism in unicellular photosynthetic eukaryotes.” *Biochimica et Biophysica Acta*. 1827 : 210-223.
- Balat, M. 2008. “Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 33 : 4013-4029.
- Bitog, J.P., Lee, I.B., Lee, C.G., Kim, K.S., Hwang, H.S., Hong, S.W., Seo, I.H., Kwon, K.S. and Mostafa, E. 2011. “Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: a review.” *Computers and Electronics in Agriculture*. 76(2) : 131-147.
- Brooks, A. 1986. “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 : 221-237.
- Charles, M. 1985. “Fermentation scale-up: Problems and possibilities. *Trends in Biotechnology*. 3(6) : 134-139.
- Cournac, L., Redding, K., Ravenel, J., Rumeau, D., Josse, E.-M., Kuntz, M. and Peltier, G. 2000. “Electron flow between PSII and oxygen in chloroplasts of PSI deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration.” *The Journal of Biological Chemistry*. 275(23) : 17256-17262.
- Deng, X., Fei, X. and Li, Y. 2011. “The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*.” *African Journal of Microbiology Research*. 5(3) : 260-270.
- Dubini, A. 2011. “Green energy: Biofuel production from *Chlamydomonas reinhardtii*.” *The Biochemical Society : Bioenergy*. 20-23.
- Eroglu, E. and Melis, A. 2016. “Microalgal hydrogen production research.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 41 : 12772-12798.
- Gaffron, H. 1939. “Reduction of CO₂ with H₂ in green plants.” *Nature*. 143 : 204-205.
- Gaffron, H. and Rubin, J. 1942. “Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae.” *The Journal of General Physiology*. 26 : 219-240.
- Ghirardi, M.L., Togasaki, R.K. and Seibert, M. 1997. “Oxygen sensitivity of algal H₂-production.” *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 63 : 141-151.
- Gibbs, M., Gfeller, R. P. and Chen, C. 1986. “Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: III. Photoassimilation of acetate.” *Plant Physiology*. 82 : 160-166.
- Harris, E.H. 1989. **The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use.** San Diego : Academic Press.
- Healey, F.P. 1970. “Hydrogen evolution by several algae.” *Planta*. 91 : 220-226.
- Heifetz, P.B., Förster, B., Osmond, C.B., Giles, L.J. and Boynton, J.E. 2000. “Effects of Acetate on Facultative Autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* Assessed by Photosynthetic Measurements and Stable Isotope Analyses.” *Plant Physiology*. 122(4) : 1439-1446.
- He, M.L., Li, L. and Liu, J.G. 2012. “Isolation of wild microalgae from natural water bodies for high hydrogen producing strains.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 37 : 4046-4056.

- He, M., Li, L., Zhang, L. and Liu, J. 2012. "The enhancement of hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides* exposed to nitrogen limitation and sulfur deprivation." *International journal of hydrogen energy*, 37(22) : 16903-16915.
- Hu, H. and Gao, K. 2003. "Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources." *Biotechnology letters*. 25(5) : 421-425.
- Huo, S., Wang, Z., Zhu, S., Shu, Q., Zhu, L., Qin, L. and Dong, R. 2018. "Biomass accumulation of *Chlorella zofingiensis* G1 cultures grown outdoors in photobioreactors." *Frontiers in Energy Research*, 6 : 49.
- IEA. 2006. "World energy outlook 2006." International Energy Agency, OECD Publication Service, OECD, Paris.
- Jurado-Oller, J.L., Dubini, A., Galván, A., Fernández, E. and González-Ballester, D. 2015. "Low oxygen levels contribute to improve photohydrogen production in mixotrophic non-stressed *Chlamydomonas* cultures." *Biotechnology for biofuels*. 8, 149.
- Khetkorn, W., Rastogi, R.P., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., Madamwar, D., Pandey, A. and Larroche, C. 2017. "Microalgal hydrogen production - A review." *Bioresource Technology*. 243 : 1194-1206.
- Kim, J.P., Kang, C.D., Park, T.H., Kim, M.S., and Sim, S.J. 2006. "Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture." *International Journal of Hydrogen Energy*. 31 : 1585-1590.
- Kosourov, S., Tsygankov, A., Seibert, M. and Ghirardi, M.L. 2002. "Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of culture parameters." *Biotechnology and Bioengineer*. 78 : 731-740.
- Kosourov, S., Seibert, M. and Ghirardi, M.L. 2003. "Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures." *Plant and Cell Physiology*. 44(2) : 146-155.
- Kuhl, A. and Lorenzen, H. 1963. Methods in cell physiology. In: D. M. Prescott (Ed.), **Handling and culturing of *Chlorella***. New York : Academic Press. 1-183.
- Kumar, H.D. and Singh, H.N. 1971. **A Textbook on Algae**. London : Van Nostrand Reinhold Publishing Co.

- Laurinavichene, T., Tolstygina, I. and Tsygankov, A. 2004. "The effect of light intensity on hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*." *Journal of biotechnology*. 114(1) : 143-151.
- Lee, Y. K. and Shen, H. 2004. Basic Culturing Techniques. In: Richmond, A. (Ed.), **Handbook of microalgal culture**. Oxford, UK : Blackwell Science. 40-56.
- Lehr, F., Morweiser, M., Sastre, R.R., Kruse, O. and Posten, C. 2012. "Process development for hydrogen production with *Chlamydomonas reinhardtii* based on growth and product formation kinetics." *Journal of Biotechnology*. 162 : 89-96.
- Li, L., Zhang, Litao. and Liu, Jianguo. 2015. "The enhancement of hydrogen photoproduction in marine *Chlorella pyrenoidosa* under nitrogen deprivation." *International Journal of Hydrogen Energy*. 40 : 14784-14789.
- Lourenço, S.O., Barbarino, E., Marquez, U.M.L. and Aidar, E. 1998. "Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: basis for the calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Phycology*. 34(5), 798-811.
- Lu, J., Sheahan, C. and Fu, P. 2011. "Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production." *Energy & Environmental Science*. 4 : 2451-2466.
- Maness, P.C., Yu, J., Eckert, C., and Ghirardi, M. G. 2009. "Photobiological hydrogen production-prospects and challenges. *Microbe*. 4(6) : 275-280.
- 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*." *Journal of Plant Physiology*. 122 : 127-135.
- Melis, A. and Happe, T. 2001. "Hydrogen production green algae as a source of energy." *Plant Physiology*. 127 : 740-748.
- Negi, S., Barry, A. N., Friedland, N., Sudasinghe, N., Subramanian, S., Pieris, S. and Sayre, R. 2016. "Impact of nitrogen limitation on biomass, photosynthesis, and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana*." *Journal of applied phycology*. 28(2) : 803-812.
- Nigam, S., Rai, M. P., & Sharma, R. 2011. "Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa*." *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 7(3), 124-129.

- Oncel, S. and Kose, A. 2014. "Comparison of tubular and panel type photobioreactors for biohydrogen production utilizing *Chlamydomonas reinhardtii* considering mixing time and light intensity." *Bioresource Technology*. 151 : 265-270.
- Oncel, S. and Sukan, V.F. 2009. "Photo-bioproduction of hydrogen by *Chlamydomonas reinhardtii* using a semi-continuous process regime." *International Journal of Hydrogen Energy*. 34(18), 7592-7602.
- Oncel, S. and Sukan, V.F. 2011. "Effect of light intensity and the light: dark cycles on the long term hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by batch cultures." *Biomass and Bioenergy*. 35(3) : 1066-1074.
- Oncel, S.S. 2015. Chapter 11 - Biohydrogen from Microalgae, Uniting Energy, Life, and Green Future. In: Kim, S.K. (Ed.), **Handbook of marine microalgae**. New York : Academic Press. 159-196.
- Perry, J.H. 1963. **Chemical engineers handbook**. New York : McGraw-Hill.
- Peltier, G. and Schmidt, GW. 1991. "Chlororespiration: an adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 : 4791-4795.
- Philipps, G., Happe, T. and Hemschemeier, A. 2012. "Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Planta*. 235(4) : 729-745.
- Pongpadung, P., Liu, J., Yokthongwattanad, K., Techapinyawat, S. and Juntawong, N. 2015. "Screening for hydrogen-producing strains of green microalgae in phosphorus or sulphur deprived medium under nitrogen limitation." *ScienceAsia*. 97-107.
- Puangplub, A. and Phunpruch, S. 2017. "Effects of light intensity and light pattern on hydrogen production by unicellular green alga *Chlorella* sp. LSD-W2." In *Proceeding of the 7th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products and The 12th Asian Biohydrogen & Biorefinery Symposium*. Khon Kaen: Pullman Khon Kaen Raja Orchid Khon Kaen. 157-163.
- Qiao, H. and Wang, G. 2009. "Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01." *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27(4) : 762.

- Richmond, A. 1986. **Handbook of microalgal mass culture**. Boca Raton, Florida : CRC Press. 528.
- Rorrer, G.L., Cheney, D.P. 2004. "Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds." *Aquacultural engineering*. 32 : 11-41.
- Salvucci, M.E. and Crafts-Brandner, S.J. 2004. "Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis." *Physiologia Plantarum*. 120 : 179-186.
- Santos, D.M.F. and Sequeira, C.A.C. 2013. "Hydrogen production by alkaline water electrolysis." *Quimica Nova*. 36(8) : 1176-1193.
- Sharma, A. K., Sahoo, P. K., Singhal, S. and Patel, A. 2016. "Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp." *3 Biotech*. 6(2) : 116.
- Skjånes, K., Knutsen, G., Kallqvist, T. and Lindblad, P. 2008. "H₂ production from marine and fresh water species of green algae during sulfur starvation and considerations for bioreactor design." *International Journal of Hydrogen Energy*. 33 : 511-521.
- Skjånes, K., Andersen, U., Heidorn, T. and Borgvang, S.A. 2016. "Design and construction of a photobioreactor for hydrogen production, including status in the field." *Journal of Applied Phycology*. 28 : 2205-2223.
- 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.
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X. and Zhong, J. 2011. "CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels." *Bioresource technology*. 102(3) : 3071-3076.
- Tinpranee, N., Incharoensakdi, A. and Phunpruch, S. 2016. "Hydrogen production by unicellular green alga *Chlorella* sp. LSD-W2 isolated from seawater in Thailand." *KKU Research Journal*. 22(1) : 256-266.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H. and Uchiyama, H. 2008. "Photobioreactors for mass cultivation of algae." *Bioresource Technology*. 99 : 4021-4028.
- Unit, A.B. 2013. "Growth of the green alga *Chlorella vulgaris* as affected by different carbon sources." *Life science journal*. 10(1).

- Wang, H., Fan, X., Zhang, Y., Yang, D. and Guo, R. 2011. "Sustained photo-hydrogen production by *Chlorella pyrenoidosa* without sulfur depletion." *Biotechnology Letters*. 33 : 1345-1350.
- Wünschiers, R. and Lindblad, P. 2002. "Hydrogen in education a biological approach." *International Journal of Hydrogen Energy*. 27 : 1131-1140.
- 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*." *Journal of Plant Physiology*. 117 : 129-139.
- Zhang, L.T., He, M.L. and Liu, J.G. 2014. "The enhancement mechanism of hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides* under nitrogen limitation and sulfur deprivation." *International Journal of Hydrogen Energy*. 39 : 8969-8976.
- Zhang, L.T., He, M.L., Liu, J.G. and Li, L. 2015. "Role of the mitochondrial alternative oxidase pathway in hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides*." *Planta*. 241 : 1005-1014.
- Zhu. J., Rong, J. and Zong, B. 2013. "Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel." *Chinese Journal of Catalysis*. 34(1) : 80-100.
- Zhu, S., Wang, Y., Huang, W., Xu, J. and Yuan, Z. 2014. "Enhanced accumulation of carbohydrate and starch in *Chlorella zofingiensis* induced by nitrogen starvation." *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 174(7) : 2435-2445.
- [Online]. Available : <http://www.gasthai.com>
- [Online]. Available : <https://www.drkrok.com/scientists-found-a-low-cost-way-to-produce-hydrogen/>
- [Online]. Available : <http://www.halsoprofeten.com/chlorella/>
- [Online]. Available: <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%206/growth.html>
- [Online]. Available : <https://ub.vscht.cz/research/groups/bioprocess#>
- [Online]. Available : [ww.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/files/TmBcVklThu30003.pdf](http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/files/TmBcVklThu30003.pdf)

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP) (Harris, 1989)

อาหาร TAP 1 ลิตร ประกอบด้วย

2X Filner's Beijernicks Solution	25	มิลลิลิตร
1M Potassium phosphate	1	มิลลิลิตร
Trace mineral solution	5	มิลลิลิตร
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	2.42	กรัมต่อลิตร
Glacial acetic acid	1	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 7.2 สำหรับอาหารแข็งให้เติมอะการ์ 15 กรัมต่อ 1 ลิตรของอาหาร

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

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

ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Disodium EDTA) 5 กรัม
ละลายในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคน ปรับพีเอชเท่ากับ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 5 โมลาร์ แล้วเติมสารตามด้านล่างตามลำดับ

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

ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนประกอบ 1M Potassium phosphate

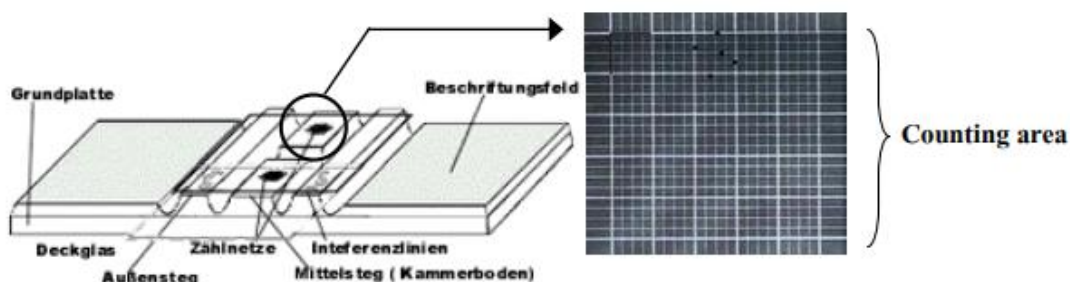
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (ความเข้มข้น 1 โมลาร์)	20	มิลลิลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (ความเข้มข้น 1 โมลาร์)	30	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ความหนาแน่นของสาหร่ายสีเขียว

การวิเคราะห์ความหนาแน่นของสาหร่ายสีเขียว จะใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์เป็นอุปกรณ์นับจำนวนเซลล์สาหร่ายสีเขียว บนสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์มีตารางสี่เหลี่ยม 2 ตาราง อยู่พื้นที่ตรงกลางสไลด์ โดยแต่ละตารางจะมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร (รูป จ 1)



รูป ข 1 สไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์

ที่มา : www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/files/TmBcVklThu30003.pdf

การนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

1) นับเซลล์สาหร่ายสีเขียวบนช่องสี่เหลี่ยมกลางตาราง (25 ช่องใหญ่ ซึ่งภายในตารางขนาดเล็กรวม 16 ช่อง) (รูป จ 2) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายภาพ 400 เท่า

2) นับเซลล์ในช่อง 1, 2, 3, 4 และ 5 แสดงดังรูป จ 2 ซึ่งแต่ละช่องมีความกว้างและความยาวเท่ากับ 0.2 มิลลิเมตร และความลึกของพื้นที่ที่นับเท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร

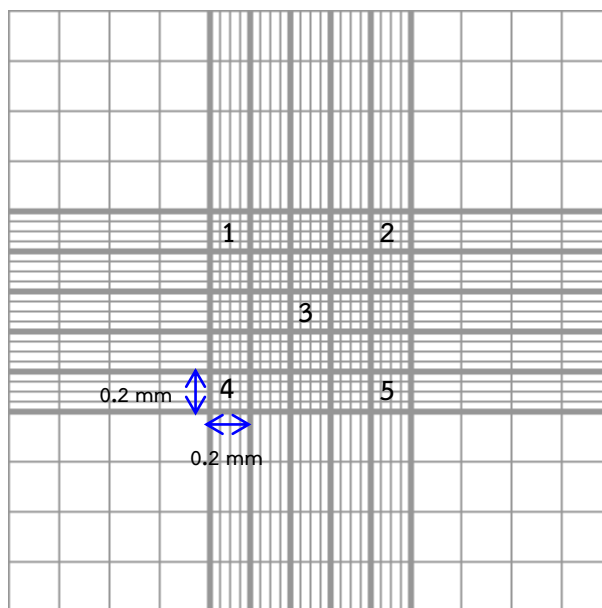
ดังนั้น ปริมาตรสารละลายเซลล์แต่ละช่อง = $0.2 \times 0.2 \times 0.1$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร
 = 4×10^{-4} ลูกบาศก์มิลลิเมตร
 = 4×10^{-6} ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ 4×10^{-6} มิลลิลิตร

3) นำค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์สาหร่ายสีเขียวในช่อง 1, 2, 3, 4 และ 5 มาหารปริมาตรของสารละลายเซลล์แต่ละช่อง จะได้หน่วยเป็นเซลล์สาหร่ายสีเขียวต่อมิลลิลิตร

4) หาค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์สาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ตาราง

หมายเหตุ : ถ้าเซลล์สาหร่ายสีเขียวทับเส้น ให้เลือกนับแบบใดแบบหนึ่งต่อไปนี้

- นับสาหร่ายบนเส้นแนวนบนและเส้นแนวขวา ไม่นับเส้นแนวซ้ายและเส้นแนวล่าง หรือ
- นับสาหร่ายบนเส้นแนวล่างและเส้นแนวซ้าย ไม่นับเส้นแนวขวาและเส้นแนวนบน



รูป ข 2 พื้นที่ตารางและตำแหน่งช่องสำหรับการนับเซลล์สำหรับยีสี่เขี้ยวบนสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์

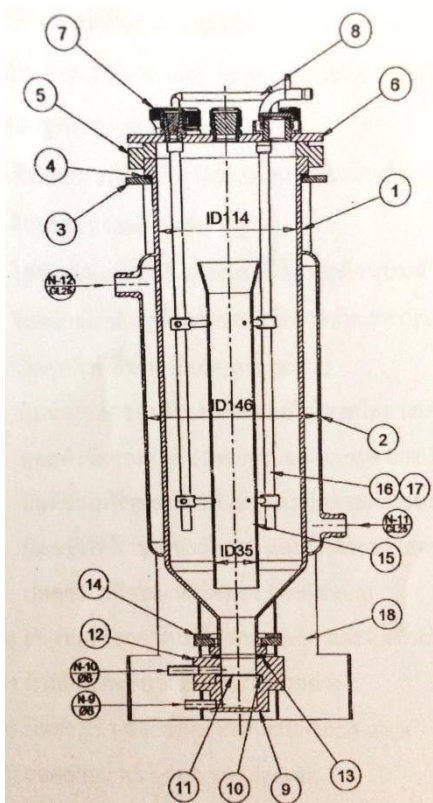
ภาคผนวก ค

หลักการและระบบการควบคุมการทำงานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร

1. ลักษณะทั่วไป

ชุดถังปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถควบคุมอุณหภูมิ และปริมาณการให้อากาศแก่ถังเลี้ยงเซลล์ได้

2. ถังเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วยส่วนต่างๆ



รูปที่ ค 1 ส่วนประกอบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร (1. Shell 2. Jacket 3. Fixing Ring 4. Gasket Support 5. Gasket Vessel 6. Head Plate 7. Fixing Nut 8. Handle 9. Bubble Case 10. Gasket 11. Bubbler 12. Loose Flange 13. Gasket 14. Fixing Ring 15. Tube 16. Sampling Pipe 17. Thermoresistance Bulb Case 18. Leg)

ถังเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย (รูปที่ ค 1)

2.1 ถังเลี้ยงเซลล์มีลักษณะเป็นผนังสองชั้น (Jacket vessel)

2.2 บริเวณฝาปิดด้านบน (Upper head plate) มีช่อง (ports) สำหรับใส่หัววัดต่างๆ เช่น หัววัดอุณหภูมิ หัววัดความเป็นกรด-ด่าง ระดับฟอง การละลายของออกซิเจน และสำหรับการเติมกรดต่าง สารต้านการเกิดฟอง สารอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ และช่องเก็บตัวอย่างขณะทำการทดลอง (รูปที่ ค 2)

- 2.3 ควบคุมทางเข้าออกของน้ำสำหรับหมุนวนเพื่อควบคุมอุณหภูมิระหว่างการหมักผ่าน jacket vessel
- 2.4 มีชุดการให้อากาศในถังหมัก บริเวณด้านล่างของถัง
- 2.5 มีชุด Draft tube จำนวน 1 ชุด
- 2.6 ระบบระบายอากาศ (Exhaust system) อากาศในถังหมักจะถูกระบายผ่านตัวกรองอากาศขนาดรูกรองไม่เกิน 0.2 ไมครอน ที่ติดอยู่กับ Condenser ซึ่งติดตั้งด้านบนของบริเวณฝาปิดด้านบน เพื่อป้องกันการสูญเสียปริมาณอาหารไปกับการระเหย

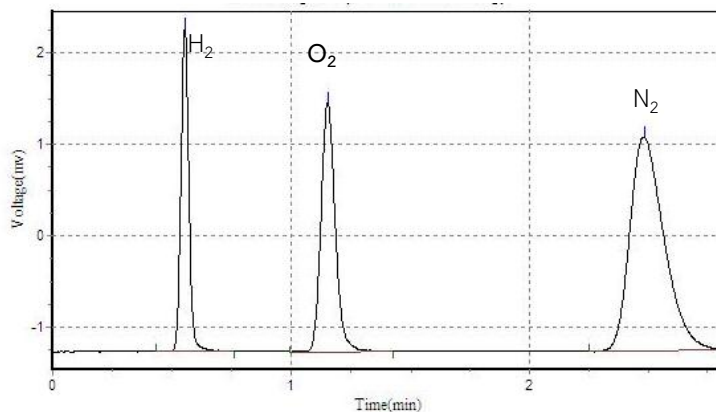


รูปที่ ค 2 บริเวณฝาปิดด้านบน (Upper head plate) ที่มีช่อง (ports) สำหรับใส่หัววัดต่างๆ

3. ระบบควบคุมการทำงานของเครื่อง (Mono-mode Controller) ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ได้แก่
- 3.1 Gassing module เป็นส่วนสำหรับการจ่ายอากาศเข้าสู่ถังหมัก ผ่านทาง Rotameter ซึ่ง Rotameter สามารถวัดอัตราการไหลของอากาศได้ในช่วง 1-10 ลิตรต่ออนาที
- 3.2 Temperature module สำหรับควบคุมอุณหภูมิภายในถังเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วยระบบควบคุมอุณหภูมิสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ในช่วงระหว่าง 5 องศาเซลเซียสเหนืออุณหภูมิ น้ำหล่อเย็น จนถึง 50 องศาเซลเซียส โดยควบคุมอุณหภูมิผ่านทางระบบน้ำหล่อเย็นแบบ Jacket vessel
4. ส่วนควบคุมการทำงาน ประกอบด้วย
- 4.1 หน้าจอแสดงผลแบบ LED display สั่งงานและควบคุมการทำงานผ่านทาง Key pad จำนวน 2 หน้าจอ สำหรับแสดงค่าอุณหภูมิ
- 4.2 ควบคุมการทำงานด้วยระบบ PI control
- 4.3 สามารถสั่งงานและแสดงผลแบบ Real time
- 4.4 มี Port สามารถเชื่อมต่อกับ Data logger เพื่อเก็บข้อมูลได้ (Optional)

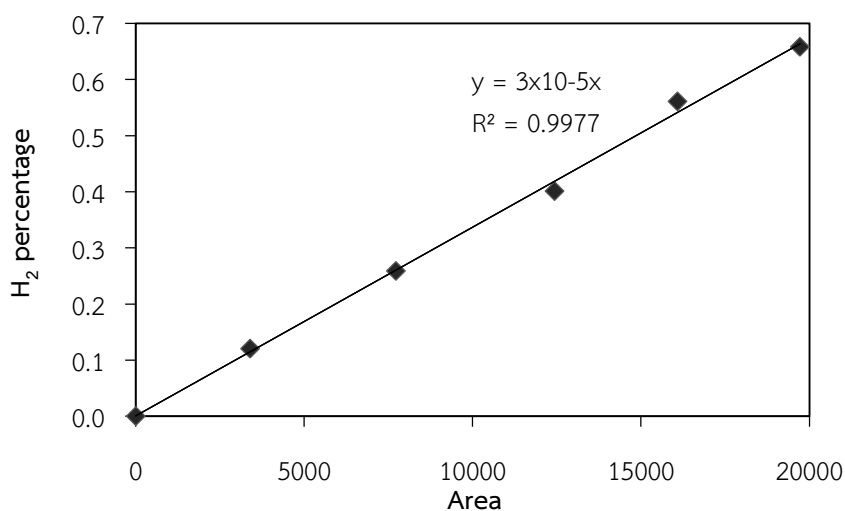
ภาคผนวก ง

โครมาโตแกรมของก๊าซไฮโดรเจน



Results					
Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		0.557	3451.875	8193.900	19.2404
2		1.157	2693.765	11218.600	26.3428
3		2.482	2332.394	23174.400	54.4167
Total			8478.034	42586.900	100.0000

รูปที่ ง 1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของก๊าซไฮโดรเจนที่วิเคราะห์จากเครื่อง GC-TCD



รูปที่ ง 2 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของไฮโดรเจน (เปอร์เซ็นต์)

การคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

- นำพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ (%H₂) จากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ง 2)
- นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ มาเปรียบเทียบกับปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร โดยคิดเทียบจากพื้นที่ของช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift จะได้หน่วยเป็นมิลลิลิตรไฮโดรเจน หรือ mLH₂