

การคัดเลือกจุลสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงซึ่งแยกได้จาก  
น้ำตกในจังหวัดนครนายก

SCREENING OF HIGH H<sub>2</sub>-PRODUCING MICROALGAE ISOLATED  
FROM WATERFALLS IN NAKHON NAYOK PROVINCE

ชลาลย์ ศรทอง  
ทักษพร ปิยะ  
ภาคศรีณย์ ยุทธพงษ์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2558

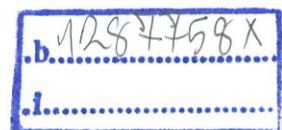
การคัดเลือกจุลสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงซึ่งแยกได้จาก  
น้ำตกในจังหวัดนครนายก

SCREENING OF HIGH H<sub>2</sub>-PRODUCING MICROALGAE ISOLATED  
FROM WATERFALLS IN NAKHON NAYOK PROVINCE



ชลาสัย           ศรทอง  
ทักษพร           ปิยะ  
ภาคศรีณย์       ยุทธพงษ์

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน.....149002  
วัน,เดือน,ปี.....1 8 S.ค. 2560



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

SCREENING OF HIGH H<sub>2</sub>-PRODUCING MICROALGAE ISOLATED  
FROM WATERFALLS IN NAKHON NAYOK PROVINCE

CHALALAI	SORNTHONG
TAKSAPORN	PIYA
PAKSARAN	YUTTAPONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงการพิเศษ การคัดเลือกจุลสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงซึ่งแยกได้จากน้ำตก  
ในจังหวัดนครนายก

Screening of High H<sub>2</sub>-Producing Microalgae Isolated from  
Waterfalls in Nakhon Nayok Province

ชื่อนักศึกษา นางสาวชลาชัย ศรทอง รหัสนักศึกษา 55051075

นางสาวทักษพร ปิยะ รหัสนักศึกษา 55051097

นางสาวภักศรัณย์ ยุทธพงษ์ รหัสนักศึกษา 55051146

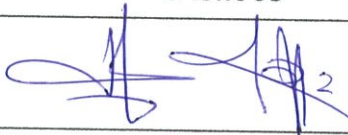


ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2558

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้  
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขา  
เทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2558

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดเลือกจุลสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงซึ่งแยกได้จากน้ำตก ในจังหวัดนครนายก Screening of High H <sub>2</sub> -Producing Microalgae Isolated from Waterfalls in Nakhon Nayok Province	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชลาชัย ศรทอง	รหัสนักศึกษา 55051075
	นางสาวทักษพร ปิยะ	รหัสนักศึกษา 55051097
	นางสาวภคศรัณย์ ยุทธพงษ์	รหัสนักศึกษา 55051146
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2558	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกฤษ์	

### บทคัดย่อ

ในปัจจุบัน พลังงานเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการดำรงชีวิต พลังงานที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล รวมถึงถ่านหิน น้ำมัน และก๊าซธรรมชาติ การเผาไหม้เชื้อเพลิงเหล่านี้จะปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกและนำไปสู่สภาวะโลกร้อน ไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียนแหล่งหนึ่งที่สามารถผลิตได้จากจุลสาหร่ายหลายชนิด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกจุลสาหร่ายจากแหล่งน้ำตกในจังหวัดนครนายกของประเทศไทย จากการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกสาหร่ายสีเขียวได้ทั้งหมด 33 ไอโซเลท โดย 3 ไอโซเลทจากน้ำตกนางรอง 9 ไอโซเลทจากน้ำตกสาริกา และ 21 ไอโซเลทจากน้ำตกวังตะไคร้ ในบรรดาสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้ทั้งหมด ไอโซเลท WTK W-3.1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $0.907 \pm 0.034$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมงในสภาวะการขาดซัลเฟอร์ จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยยีน 18S rDNA พบว่าไอโซเลท WTK W-3.1 จัดอยู่ในจีนัส *Chlorella* sp. และสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. WTK W-3.1 คือ บ่มเซลล์ที่มีอายุ 36 ชั่วโมง ในอาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร โดยให้ผลผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $1.277 \pm 0.001$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

คำสำคัญ : จังหวัดนครนายก จุลสาหร่าย ไฮโดรเจน

Title	Screening of High H <sub>2</sub> -Producing Microalgae Isolated from Waterfalls in Nakhon Nayok Province	
Students	Miss Chalalai Sornthong	Student ID 55051075
	Miss Taksaporn Piya	Student ID 55051097
	Miss Paksaran Yuttapong	Student ID 55051146
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2015	
Advisor	Asst.Prof.Dr. Saranya Phunpruch	

### Abstract

Nowadays, energy is one of important factors for everyday life. Fossil fuels, including coal, oil and natural gas, are currently the world's popular energy source. The combustion of these fuels causes the greenhouse gas emissions leading to a global warming. Hydrogen (H<sub>2</sub>) is one of the renewable energy source that can be produced by many microalgae. This research aimed to screen high H<sub>2</sub>-producing microalgae isolated from waterfalls in Nakhon Nayok province, Thailand. It was found that 33 microalgal isolates were selected; 3 isolates from Nang Rong waterfall, 9 isolates from Sarika waterfall and 21 isolates from Wang Takrai waterfall. Among them, a green algal isolate WTK W-3.1 showed the highest H<sub>2</sub> production rate with  $0.907 \pm 0.004 \mu\text{molH}_2 \text{ mg chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$  in a sulfur deprivation condition. By 18S rDNA sequencing analysis, an isolate WTK W-3.1 was identified as *Chlorella* sp. The optimal condition for H<sub>2</sub> production by *Chlorella* sp. WTK W-3.1 were incubation cells with 36 hours of age in TAP-S medium containing  $17.4 \text{ mmolC-atom L}^{-1}$  of glucose. In this optimized condition *Chlorella* sp. WTK W-3.1 gave the H<sub>2</sub> production rate with  $1.277 \pm 0.001 \mu\text{molH}_2 \text{ mg chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

**Keywords :** Nakhon Nayok province, Microalgae, Hydrogen

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ สามารถสำเร็จบรรลุวัตถุประสงค์ไปได้ดีด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษ์ ซึ่งได้กรุณาสละเวลาให้ความรู้ คำชี้แนะ และแนวทางการแก้ไขปัญหา ตลอดจนการช่วยปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ให้สมบูรณ์ในทุกด้าน ด้วยความเอาใจใส่เสมอมา โดยตลอดการทำโครงการพิเศษเล่มนี้ คณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

กลุ่มของข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการสอบโครงการพิเศษ และ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการสอบโครงการพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาตรวจสอบ และให้คำแนะนำต่างๆ ต่อโครงการพิเศษจนทำให้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และผู้ดูแลห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ความรู้ อำนวยความสะดวก และให้คำแนะนำต่างๆ ในการใช้วัสดุอุปกรณ์สำหรับการทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ ห้อง Molecular 407 ที่ให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน อีกทั้งยังคอยให้กำลังใจ และดูแลเป็นอย่างดีโดยตลอด ทำให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้กำลังใจ และคอยให้การช่วยเหลือตลอดมา

ท้ายนี้ ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการทำโครงการพิเศษนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ชลาลัย ศรทอง

ทักษพร ปิยะ

ภาคศรีณีย์ ยุทธพงษ์

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 ไฮโดรเจน.....	3
2.2 การผลิตไฮโดรเจน.....	3
2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากจุลสาหร่าย.....	4
2.3.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยการแตกตัวของน้ำทางอ้อม.....	4
2.3.2 การผลิตไฮโดรเจนโดยการแตกตัวของน้ำทางตรง.....	5
2.4 ไชยาโนแบคทีเรีย.....	6
2.5 สาหร่ายสีเขียว.....	6
2.6 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว.....	7
2.7 การคัดแยกไชยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว.....	8
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>10</b>
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....	10
3.1.1 สาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากน้ำตกนางรอง.....	10

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1.2 สาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากน้ำตกสาริกา.....	10
3.1.3 สาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากน้ำตกวังตะไคร้.....	10
3.2 สารเคมี.....	11
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	11
3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	11
3.2.3 ยาปฏิชีวนะ.....	12
3.2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์.....	12
3.2.5 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน.....	12
3.2.6 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์แหล่งคาร์บอน.....	12
3.3 อุปกรณ์.....	13
3.4 วิธีการคัดแยกเชื้อและทดสอบความบริสุทธิ์.....	13
3.5 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายและการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลสาหร่าย.....	14
3.6 การวัดปริมาณไฮโดรเจน.....	15
3.7 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์.....	15
3.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก.....	16
3.8.1 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	16
3.8.2 วิธีการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	16
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>18</b>
4.1 ผลการคัดแยกสาหร่ายและผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลสาหร่ายที่ใช้ในโครงการพิเศษ.....	18
4.2 ผลการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง.....	26
4.2.1 ผลการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงในอาหาร BG11.....	26
4.2.2 ผลการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงในอาหาร TAP.....	26
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1.....	29

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.1 ผลการศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว ไอโซเลท WTK W-3.1.....	29
4.3.2 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1.....	30
4.3.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1.....	31
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	32
เอกสารอ้างอิง.....	33
ภาคผนวก.....	35
ภาคผนวก ก.....	36
ภาคผนวก ข.....	37
ภาคผนวก ค.....	38
ภาคผนวก ง.....	39

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
3.1	สถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอล คอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (GC-TCD).....	15
4.1	จำนวนตัวอย่างจุลสารรายที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจากแหล่งน้ำ แหล่งดิน และก้อนหิน ในน้ำตกจังหวัดนครนายก.....	18
4.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และแหล่งที่มาของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 33 ไอโซเลท ที่ใช้ใน โครงการพิเศษ (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า).....	19
4.3	อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสง 2 และ 24 ชั่วโมงในอาหาร BG11, BG11 <sub>0</sub> และ BG11-S.....	27
4.4	อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสง ในอาหาร TAP, TAP-N และ TAP-S.....	28
4.5	อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 จากการแปรผันระยะเวลาของการ เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีแสง ในอาหาร TAP และ TAP-S.....	29
4.6	อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 ที่ทำการแปรผันชนิดของ แหล่งคาร์บอนในอาหาร TAP-S.....	30
4.7	อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 ที่ทำการแปรผันความเข้มข้น ของน้ำตาลกลูโคสในอาหาร TAP-S.....	31

# สารบัญรูป

รูปที่

หน้า

2.1 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง.....5

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

พลังงานถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการดำเนินชีวิตและการพัฒนาประเทศ ในปัจจุบันความต้องการในการใช้พลังงานเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยแหล่งพลังงานที่มนุษย์ใช้กันในปัจจุบันส่วนใหญ่มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น ถ่านหิน และน้ำมันดิบ ฯลฯ ซึ่งเชื้อเพลิงเหล่านี้มีอยู่ในปริมาณจำกัดที่คาดว่าจะหมดไปในอนาคต นอกจากนี้ การเผาไหม้เชื้อเพลิงเหล่านี้ยังมีการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกออกมาซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดสภาวะโลกร้อน จากสาเหตุที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ประเทศต่างๆ มีความกังวลเกี่ยวกับความยั่งยืนทางพลังงาน ทำให้เกิดการแสวงหาแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ที่เป็นพลังงานหมุนเวียน และเป็นพลังงานสะอาด (Clean energy) มาใช้ทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิล เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการในปัจจุบันและอนาคต

พลังงานไฮโดรเจน ได้รับการยอมรับว่าจะเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญอย่างมากในอนาคต เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่ให้ค่าความร้อนสูงและสะอาด เมื่อใช้กับเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) หรือเผาไหม้ในอากาศแล้วจะไม่ปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา โดยจะมีเพียงไอน้ำเป็นผลพลอยได้เท่านั้น ดังนั้น จึงไม่ส่งผลให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก พลังงานไฮโดรเจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับพลังงานดั้งเดิมได้ เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ เครื่องยนต์สันดาปภายใน ใช้ในเครื่องกังหัน และเครื่องไอพ่น เป็นต้น นอกจากนี้ ยังสามารถนำก๊าซไฮโดรเจนไปผลิตกระแสไฟฟ้าโดยป้อนเข้าเซลล์เชื้อเพลิง ดังนั้น พลังงานไฮโดรเจนจึงเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานดั้งเดิมได้ และอาจกล่าวได้ว่าพลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานในอนาคตอย่างแท้จริง

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีหลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูง การผลิตไฮโดรเจนโดยการแยกน้ำด้วยไฟฟ้า และการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพนี้เป็นวิธีที่ได้รับความสนใจอย่างสูงในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพเป็นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้จุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้เป็นก๊าซไฮโดรเจน พลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตนี้อาจเรียกว่า ไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen) สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria) ไชยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) และสาหร่ายสีเขียว (Green algae)

จุลสาหร่ายได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากจุลสาหร่ายมีกระบวนการสังเคราะห์แสงที่สามารถใช้พลังงานจากธรรมชาติที่มีอยู่ เช่น แสงอาทิตย์ และน้ำเป็นวัตถุดิบ สาหร่ายสีเขียว

สามารถผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนในที่มีแสงหรือไม่มีแสงก็ได้ สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic condition) และสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก (Photoheterotrophic condition) สำหรับในไซยาโนแบคทีเรียจะมีระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง และการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่คล้ายพืช เซลล์สามารถเจริญได้ง่ายโดยใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงาน และใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) จากอากาศเป็นแหล่งคาร์บอน คุณสมบัติเด่นของไซยาโนแบคทีเรียที่แตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นคือ ไซยาโนแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์แสง และหายใจแบบใช้ออกซิเจนในออร์แกเนลล์เดียวกัน

โครงการพิเศษนี้จึงสนใจศึกษาการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำตกในจังหวัดนครนายก พร้อมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดเลือก เพื่อนำไปสู่การปรับปรุงและพัฒนางานวิจัยทางด้านพลังงานทดแทนให้สัมฤทธิ์ผลในอนาคตต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกจุลสาหร่ายที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงซึ่งแยกได้จากน้ำตกในจังหวัดนครนายก
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่คัดเลือก

## 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

เก็บตัวอย่าง น้ำ ก้อนหิน และดินจากแหล่งน้ำตกในจังหวัดนครนายก ซึ่งได้แก่ น้ำตกนางรอง น้ำตกสาริกา น้ำตกวังตะไคร้ และ น้ำตกแก่งสามชั้น ทำการคัดเลือกจุลสาหร่ายให้บริสุทธิ์ นำจุลสาหร่ายมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมกับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกต่อไป

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบชนิดของจุลสาหร่ายที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้
2. ทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่คัดเลือก

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ไฮโดรเจน

ปัจจุบัน โลกกำลังเผชิญกับปัญหาสภาวะโลกร้อนที่เกิดจากมลพิษทางอากาศจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิล ปัญหาเชื้อเพลิงฟอสซิลที่กำลังจะหมดไปและราคาของพลังงานที่เพิ่มสูงขึ้น การกำจัดมลพิษหรือลดมลพิษดังกล่าวสามารถทำได้โดยหาแหล่งพลังงานที่ยั่งยืนแหล่งใหม่ ซึ่งเป็นพลังงานหมุนเวียนที่ให้ค่าความร้อนสูงและไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เช่น ไฮโดรเจน เป็นต้น (วิรั้งรอง, 2555)

ไฮโดรเจนเป็นหนทางสำคัญที่ถูกคาดหวังเป็นอย่างมากในการที่จะนำมาแก้ปัญหาด้านพลังงานในอนาคต เนื่องจากสามารถผลิตจากแหล่งพลังงานที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้และไม่หมดไป เช่น น้ำ ชีวมวล และแสงอาทิตย์ เป็นต้น ปัจจุบัน มีการใช้ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงอย่างแพร่หลายในประเทศอุตสาหกรรม สิ่งที่น่าสนใจสำหรับไฮโดรเจน คือ ไฮโดรเจนบริสุทธิ์เป็นเชื้อเพลิงเผาไหม้ที่สะอาดไม่ผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ (ก๊าซเรือนกระจก) หรือปล่อยก๊าซพิษ และสามารถใช้สำหรับผลิตกระแสไฟฟ้า การขนส่ง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับพลังงานดั้งเดิมได้ เช่น เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน ใช้ในเครื่องกังหัน และเครื่องไอพ่น (สมนึก, 2548) ไฮโดรเจนยังถูกนำไปใช้ในระบบผลิตกระแสไฟฟ้าที่มีประสิทธิภาพสูงอย่างเซลล์เชื้อเพลิง ซึ่งประยุกต์ใช้กับทั้งยานพาหนะและโรงไฟฟ้า โดยเซลล์เชื้อเพลิงเปลี่ยนพลังงานเคมีของเชื้อเพลิงไฮโดรเจนและออกซิเจนเป็นพลังงานไฟฟ้าได้โดยตรง โดยที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากจะผลิตผลิตภัณฑ์คือ ไฟฟ้าและน้ำ ซึ่งต่างจากเชื้อเพลิงอื่นที่มีการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (วิรั้งรอง, 2555)

### 2.2 การผลิตไฮโดรเจน

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมที่นิยมในปัจจุบัน ได้แก่ การผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติโดยผ่านกระบวนการสตีมีรีฟอร์มมิง (Steam reforming) ซึ่งใช้ความร้อนแยกไฮโดรเจนออกจากองค์ประกอบคาร์บอนในมีเทนและเมทานอล ในขั้นแรกของปฏิกิริยา เชื้อเพลิงถูกสลายไปเป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์ ปฏิกิริยาจะดำเนินต่อไปโดยเปลี่ยนคาร์บอนมอนอกไซด์และน้ำให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้ต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 200 องศาเซลเซียส อีกวิธีหนึ่งของการผลิตไฮโดรเจนคือ กระบวนการแยกสลายน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrolysis) กระแสไฟฟ้าจะทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไฮโดรเจนและ

ออกซิเจน โดยใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าในการสลายพันธะเคมีระหว่างไฮโดรเจนกับออกซิเจนเท่ากับ 1.24 โวลต์ และใช้ความดัน 14.7 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว กระบวนการนี้มีการสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำค่อนข้างสูง และจะต้องทำในสภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่า 1,371 องศาเซลเซียส ดังนั้น จึงเกิดการคิดค้นและพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต (Biohydrogen) เนื่องจากเป็นวิธีการที่สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง โดยเฉพาะการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว ซึ่งจะนำแสงมาใช้เป็นแหล่งพลังงานโดยผ่านกระบวนการทางไฟฟ้าเคมีของแสง (Photoelectrochemical process) และได้ผลผลิตเป็นไฮโดรเจน สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต

## 2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากจุลสาหร่าย

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีของชีวภาพกระทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีทางชีวภาพที่อาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชและสาหร่ายคือ การผลิตไฮโดรเจนจากการแตกตัวของน้ำแบบทางอ้อม (Indirect Biophotolysis) ซึ่งเป็นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว โดยจะแยกปฏิกิริยาออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจะใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศเป็นแหล่งคาร์บอนและแสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงาน เพื่อผลิตก๊าซออกซิเจน และน้ำตาลเก็บสะสมไว้ ขั้นที่ 2 เป็นการผลิตไฮโดรเจนจากการสลายของคาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสมไว้ในเซลล์ นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวยังสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแตกตัวของน้ำแบบทางตรง (Direct Biophotolysis) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานเปลี่ยนน้ำให้เป็นก๊าซไฮโดรเจนและออกซิเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง

### 2.3.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยการแตกตัวของน้ำทางอ้อม

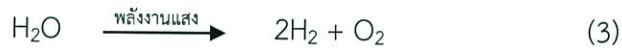
ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมักคุณสมบัติในการใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง และสามารถผลิตไฮโดรเจนและพลังงานจากกระบวนการดังกล่าว กระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนที่ย่อยออกจากกัน โดยจะแยกกระบวนการการสร้างออกซิเจน และการสร้างไฮโดรเจนออกจากกัน เนื่องจากออกซิเจนเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ผลิตไฮโดรเจน ในขั้นตอนแรกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจะใช้พลังงานแสงผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงที่หนึ่งและสองร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตเก็บสะสมเป็นชีวมวลของสาหร่าย ดังสมการที่ (1) และในขั้นตอนที่สองคาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสมไว้จะถูกนำไปใช้ในการสร้างไฮโดรเจน ดังสมการที่ (2) (Levin et al., 2004)



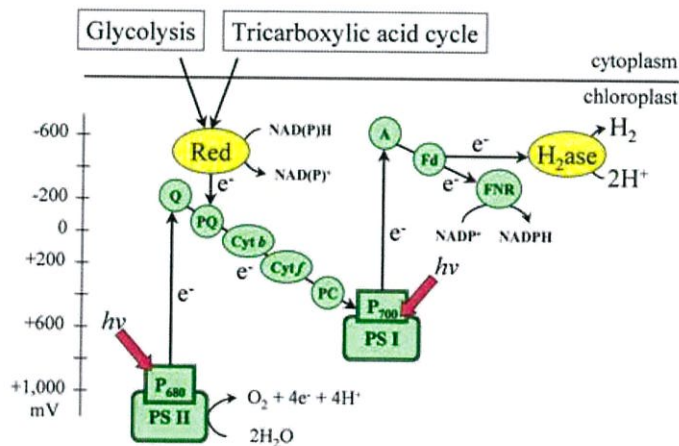
สาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนจากการแตกตัวของน้ำโดยอาศัยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อมได้ เช่น *Gloeocapsa alpicola* (Troshina et al., 2002)

### 2.3.2 การผลิตไฮโดรเจนโดยการแตกตัวของน้ำทางตรง

การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง เป็นกระบวนการที่ไ้ระบบแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) เช่น สาหร่ายสีเขียว ฯลฯ เพื่อแยกน้ำโดยการดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์โดยตรงให้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน ดังสมการที่ (3) (Ni et al., 2006)



ระบบแสงที่สอง (Photosystem II, PSII) ดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์ ทำให้น้ำแตกตัวเป็นออกซิเจน โปรตอน ( $\text{H}^+$ ) และอิเล็กตรอน ( $e^-$ ) จากนั้น อิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังเฟอร์ริดอกซิน (Fd) โดยพลังงานแสงอาทิตย์ที่ถูกดูดซับโดยระบบแสงที่หนึ่ง (Photosystem I, PSI) เฟอร์ริดอกซินที่ถูกรีดิวซ์จะส่งอิเล็กตรอนให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อสร้างไฮโดรเจน (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง  
ที่มา: Melis and Happe, 2001

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยใช้เพียงแสงและน้ำที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน และนอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวยังสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายโดยสามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปและโฟโตเฮเทอโรโทรป สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp., *Codium* sp. เป็นต้น

## 2.4 ไชยานโนแบคทีเรีย

ไชยานโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจัดอยู่ในดิวิชันไชยานโนไฟตา และเป็นโปรคาริโอตที่สามารถสังเคราะห์แสงแล้วได้ออกซิเจนออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ เนื่องจากมีรงควัตถุที่สำคัญคือ คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน ไชยานโนแบคทีเรียบางชนิดยังมีคุณสมบัติตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ไชยานโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการปรับตัวได้สูงโดยการสร้างเมือกห่อหุ้มเซลล์ หรือมีถุงลมเพื่อช่วยในการลอยตัวหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แสง จากการที่ไชยานโนแบคทีเรียมีความหลากหลายทางสรีรวิทยา สัณฐานวิทยา และการพัฒนารูปร่างต่างๆ ทำให้ไชยานโนแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย ได้แก่ หิน ดิน ทะเลทราย น้ำพุร้อน น้ำจืด น้ำทะเล เป็นต้น (Mazel et al., 1990)

ไชยานโนแบคทีเรียสามารถจัดจำแนกตามสัณฐานวิทยาได้เป็น 2 แบบ คือ แบบที่ 1 เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีที่ไม่เป็นเส้นสาย อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ เช่น *Chroococcus* sp. หรืออาจอยู่รวมกันเป็นโคโลนีแบบพาล์เมลลา เช่น *Eucapsis* sp., *Merismopedia* sp. และ *Anacystis* sp. เป็นต้น เซลล์ของไชยานโนแบคทีเรียกลุ่มนี้อาจมีรูปร่างต่างๆ กัน เช่น กลม รูปไข่ ทรงกระบอกหรือรูปไข่แบบแหลมหัวแหลมท้าย ส่วนในแบบที่ 2 เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นเส้นสาย (Filamentous form) เซลล์จะเรียงต่อกันเป็นเส้นสายเรียกว่า ตรีโคม (Trichome) เส้นสายนี้อาจจะตรงและเรียบ ไม่มีการแตกแขนง หากมีเซลล์ชนิดเดียวกันมาเรียงต่อกันเรียกว่า Homocystous form เช่น *Oscillatoria* และ *Lyngbya* เป็นต้น และหากเป็นเส้นสายที่มีเซลล์ปกติ และมีเฮเทอโรซิสต์มาเรียงสลับหรืออยู่ที่ปลายสุดของตรีโคมเรียกว่า Heterocystous form เช่น *Nostoc* และ *Anabaena* เป็นต้น ไชยานโนแบคทีเรียเส้นสายบางชนิดนั้นอาจจะมีปลายโค้งงอหรือบิดเป็นเกลียว เช่น *Arthrospira* และ *Spirulina* (ยิวดี, 2546)

## 2.5 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวมีลักษณะดังนี้คือ คลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วยรงควัตถุที่เป็นเช่นเดียวกับที่พบในพืชชั้นสูง คือ มีคลอโรฟิลล์ เอ และ คลอโรฟิลล์บี แคโรทีนอยด์ และ

แซนโทฟิลล์ สารสีรวมอยู่ในคลอโรพลาสต์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอนโดยอาจจะมี 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 อัน ซึ่งทำให้สาหร่ายสีเขียวสามารถสังเคราะห์แสงได้เช่นเดียวกับพืช สาหร่ายสีเขียวพบทั้งที่มีและไม่มีผนังเซลล์ ถ้าไม่มีผนังเซลล์ ก็จะมีเยื่อหุ้มเซลล์ Pellicle, Periplast หรือเป็นแบบ Scale

หนวด (Flagella) มีจำนวน 1, 2, 4, 8 และ 16 เส้น ลักษณะของหนวดมีหลายแบบ เช่น แบบ Acronematic, Pantonematic หรือแบบมีเกล็ดอยู่บนหนวด จุดตั้งต้นของหนวดอยู่ที่ Apical cell หรือ Subapical cell ซึ่งอาจมีความยาวที่เท่ากันหรือไม่เท่ากันก็ได้

อาหารสะสมในสาหร่ายสีเขียวจะเป็นแป้ง (Starch) ได้แก่ True starch หรือ Paramylon (แป้งที่พบในพืชชั้นสูง) โดยแป้งจะเก็บสะสมไว้ในไซโตพลาสซึม หรือคลอโรพลาสต์

รูปร่าง (Form) ของเซลล์สาหร่ายมีหลายแบบ เช่น สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว สาหร่ายกลุ่มนี้สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลัมใช้ในการโบกพัดจำนวน 2-4 เส้น ตัวอย่าง เช่น *Chlamydomonas* sp. เป็นต้น บางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้เนื่องจากไม่มีแฟลกเจลลัม เช่น *Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp. เป็นต้น สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์ต่อกันเป็นสายยาว เช่น *Ulothrix* sp., *Spirogyra* sp. เป็นต้น และสาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์เป็นกลุ่ม (Colonial form) เช่น *Volvox* sp., *Scenedesmus* sp. เป็นต้น (ลัดดา, 2542)

## 2.6 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว

Stephenson และ Stickland (1931) บัญญัติศัพท์ “Hydrogenase” ขึ้นเป็นครั้งแรกหลังการค้นพบการผลิตไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมทิลีนบลู (Methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในโพรคาริโอตและยูคาริโอต โดยสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

1. Unidirectional หรือ Uptake hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน

2. Bidirectional หรือ Reversible hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

นอกจากนี้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถแบ่งตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้เป็น 3 ชนิด (Schulz และคณะ, 1998) ดังนี้

1. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (NiFe-hydrogenase)

2. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (FeFe-hydrogenase)

3. ไฮโดรจีเนสที่ไม่พบโลหะใดเป็นองค์ประกอบในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (Metal-free hydrogenase)

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวเป็นเอนไซม์ชนิดที่บริเวณกระตุ้นประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็ก เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย มีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* (Gaffron และ Ruben, 1942), *Chlamydomonas reinhardtii* (Hartman และ Krasna, 1963), *Chlorella fusca* และ *Chlamydomonas moewusii* (Healey, 1970) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 48 กิโลดาลตัน โดยมีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนในสาหร่ายสีเขียวประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีบริเวณกระตุ้น หรือบริเวณ H-cluster ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็ก 2 อะตอม และเหล็กอะตอมจะจับเข้ากับซัลเฟอร์ในกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) และทำหน้าที่เป็น Fe-S cluster นอกจากนี้ของเหล็กที่อยู่กลางของบริเวณนี้จะจับกับซิสเทอีนแล้ว ยังจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ และไซยาไนด์อีกด้วย (Maness และคณะ, 2009)

## 2.7 การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่พบในธรรมชาติมักจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นกลุ่มก้อนโดยอาศัยอยู่ตามที่ชื้นแฉะ ผิวดิน ใต้มันฝรั่ง แต่แหล่งที่สาหร่ายเจริญได้ดีที่สุดก็คือ แหล่งน้ำ อาจอยู่เป็นอิสระหรืออยู่รวมกันกับสิ่งมีชีวิตอื่น ถ้าเป็นไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่อยู่บนผิวดินหรือก้อนหิน ในการคัดแยกจะทำการเก็บตัวอย่างจากดินหรือก้อนหินนั้นมาเก็บไว้ในที่มืด แต่ถ้าอาศัยในแหล่งน้ำ หรือบ่อน้ำ ก็ให้เก็บตัวอย่างน้ำมา 200-500 มิลลิลิตร ใส่ในขวดน้ำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 3,000-5,000 รอบต่อนาที ไซยาโนแบคทีเรียก็จะตกตะกอน แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น นำเชื้อมาเลี้ยงลงในจานที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวแต่ละชนิด และเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีแสงและอุณหภูมิที่เหมาะสม

การแยกสาหร่ายต้องการความเข้มของแสงต่ำ (น้อยกว่า 500 ลักซ์) ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย ถ้ามีการให้แสงสว่างช่วงเวลาหนึ่งและหยุดการให้แสงช่วงเวลาหลัง จะทำให้การเลี้ยงได้ผลดีกว่าการให้แสงติดกันตลอดเวลา ช่วงแสงสว่างที่นิยมใช้ คือ 12 ชั่วโมง ให้แสง 12 ชั่วโมง หยุดการให้แสง แต่บางแห่งนิยมใช้วงจรแสงสว่าง 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

He และคณะ (2012) คัดกรองจุลสาหร่ายได้ 28 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนจาก 100 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวที่แยกจากน้ำจืด

13 สายพันธุ์ สาหร่ายสีเขียวที่แยกจากน้ำทะเล 12 สายพันธุ์ และไซยาโนแบคทีเรียที่แยกจากน้ำทะเล 3 สายพันธุ์ จากการทดลองพบว่าสาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์หรือไนโตรเจน และมีการรายงานการพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดังนี้ *Parietochloris incisa*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella capsulata*, *Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis helgolandica*, *Pyramimonas* sp., *Chlorella autotrophica*, *Dunaliella apiculata*, *Tetraselmis striata* และ *Tetraselmis tetrathele* ซึ่งในจำนวนของสายพันธุ์ทั้งหมด สาหร่ายสีเขียว *C. protothecoides* สายพันธุ์น้ำจืดสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 2.93 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีไฮโดรเจนสะสมได้ถึง 123.6 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรของการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์

Pongpadung และคณะ (2015) ทำการคัดกรอง และคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ สภาวะการจำกัดไนโตรเจนและขาดซัลเฟอร์ หรือสภาวะการจำกัดไนโตรเจนและขาดฟอสฟอรัส และนำสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกมาจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA และลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสาหร่ายที่มีการผลิตไฮโดรเจนสูง คือ *Chlorella sorokiniana* KU204 โดยสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 46 มิลลิลิตรต่อลิตรภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ และยังสามารถผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการจำกัดไนโตรเจนและการขาดฟอสฟอรัสโดยผลิตได้เท่ากับ 69 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งสายพันธุ์ของ *Chlorella* แสดงการผลิตไฮโดรเจน ที่สูงภายใต้สภาวะการจำกัดไนโตรเจนและขาดซัลเฟอร์พร้อมกัน และในสภาวะการขาดซัลเฟอร์

Rashid และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยให้แสงที่แตกต่างกัน (1) เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (2) เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนที่จะให้แสงที่ความเข้ม 120 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (3) ให้แสงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (4) เก็บไว้ในที่มีแสงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนให้อยู่ในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ 4 สาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนรวมสูงสุดเท่ากับ  $530 \pm 5$  มิลลิลิตรต่อลิตรของอาหาร และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด 34.8 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง การเติมน้ำตาลกลูโคสในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ยังเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน โดยการใช้น้ำตาลกลูโคส 18 เท่าภายใต้สภาวะที่มีแสงบางส่วนเพื่อการเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจน

## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในโครงการพิเศษนี้มีจำนวน 33 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งน้ำ แหล่งดิน และก้อนหิน ในน้ำตกจังหวัดนครนายก คือ น้ำตกนางรอง น้ำตกลำธาร น้ำตกวังตะไคร้ และน้ำตกแก่งสามชั้น

#### 3.1.1 สาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากน้ำตกนางรองมีจำนวน 3 ไอโซเลท ดังนี้

3.1.1.1 NR ST-1 คัดแยกมาจากก้อนหินในน้ำตก

3.1.1.2 NR ST-4 คัดแยกมาจากก้อนหินในน้ำตก

3.1.1.3 NR W-6.3 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก

#### 3.1.2 สาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากน้ำตกลำธารมีจำนวน 9 ไอโซเลท ดังนี้

3.1.2.1 SLK S-2 คัดแยกมาจากดินในน้ำตก

3.1.2.2 SLK ST-1(2) คัดแยกมาจากก้อนหินในน้ำตก

3.1.2.3 SLK ST-2 คัดแยกมาจากก้อนหินในน้ำตก

3.1.2.4 SLK ST-3(2) คัดแยกมาจากก้อนหินในน้ำตก

3.1.2.5 SLK W-1 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก

3.1.2.6 SLK W-4 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก

3.1.2.7 SLK W-5 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก

3.1.2.8 SLK W-6 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก

3.1.2.9 SLK W-8.1 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก

#### 3.1.3 สาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากน้ำตกวังตะไคร้มีจำนวน 21 ไอโซเลท ดังนี้

3.1.3.1 WTK ST-6 คัดแยกมาจากก้อนหินในน้ำตก

3.1.3.2 WTK ST-1 คัดแยกมาจากก้อนหินในน้ำตก

3.1.3.3 WTK ST-2 คัดแยกมาจากก้อนหินในน้ำตก

3.1.3.4 WTK ST-4.4 คัดแยกมาจากก้อนหินในน้ำตก

3.1.3.5 WTK ST-4 คัดแยกมาจากก้อนหินในน้ำตก

3.1.3.6 WTK ST-5.2 คัดแยกมาจากก้อนหินในน้ำตก

- 3.1.3.7 WTK ST-7.1 คัดแยกมาจากก้อนหินในน้ำตก
- 3.1.3.8 WTK ST-8 คัดแยกมาจากก้อนหินในน้ำตก
- 3.1.3.9 WTK W-1 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก
- 3.1.3.10 WTK W-2 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก
- 3.1.3.11 WTK W-3.1 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก
- 3.1.3.12 WTK W-4.1 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก
- 3.1.3.13 WTK W-4 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก
- 3.1.3.14 WTK W-5.1 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก
- 3.1.3.15 WTK W-5 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก
- 3.1.3.16 WTK W-6.1 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก
- 3.1.3.17 WTK W-7.1 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก
- 3.1.3.18 WTK W-9.6 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก
- 3.1.3.19 WTK W-9 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก
- 3.1.3.20 WTK W-10 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก
- 3.1.3.21 WTK W-1.4 คัดแยกมาจากน้ำในน้ำตก

## 3.2 สารเคมี

### 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Blue Green Medium (BG11) (ภาคผนวก ก)
- 3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate (TAP) (ภาคผนวก ข)
- 3.2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ค)

### 3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.2.1 กรดซิตริก (Citric Acid) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.2 กรดบอริก ( $H_3BO_3$ ) (Analytical grade, Merck, Germany)
- 3.2.2.3 กรดอะซีติก (EDM Millipore, Germany)
- 3.2.2.4 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.5 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.6 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (Fluka, Switzerland)
- 3.2.2.7 โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ( $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ) (Fluka, Switzerland)
- 3.2.2.8 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (Fluka, Switzerland)
- 3.2.2.9 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Merck, Germany)
- 3.2.2.10 โซเดียมคาร์บอเนต ( $Na_2CO_3$ ) (Carlo Erba, Italy)

- 3.2.2.11 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.12 โซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.13 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.14 ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.15 ทริส-เบส (Vivantis, Malasia)
- 3.2.2.16 เปปโตน (peptone) (Difco, USA)
- 3.2.2.17 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.18 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.19 เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท ( $\text{FeNH}_4$  citrate) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.20 แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $\text{MgCl}_2$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.21 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.22 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.23 ยีสต์เอ็กซ์แทร็ค (yeast extract) (Difco, USA)
- 3.2.2.24 ฐันอาหาร (Agar) (Difco, USA)
- 3.2.2.25 แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (Carlo Erba, Italy)

### 3.2.3 ยาปฏิชีวนะ

Cycloheximide (Sigma, Germany)

### 3.2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

เมทานอล ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (Analytical grade, Univar, Australia)

### 3.2.5 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

3.2.5.1 ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซนต์ในอาร์กอน (Thailand Industrial Gas Co. Ltd., Thailand)

3.2.5.2 ก๊าซอาร์กอน (ความบริสุทธิ์ 99.999%) (Thailand Industrial Gas Co. Ltd., Thailand)

### 3.2.6 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์แหล่งคาร์บอน

- 3.2.6.1 น้ำตาลกลูโคส ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) (Merck, Germany)
- 3.2.6.2 น้ำตาลซูโครส ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.6.3 น้ำตาลฟรักโทส ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.6.4 น้ำตาลมอลโทส ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ ) (Merck, Germany)

3.2.6.5 น้ำตาลแลกโทส ( $C_{12}H_{22}O_{12}$ ) (Sigma, USA)

3.2.6.6 โซเดียมอะซิเตท ( $CH_3COONa$ ) (Merck, Germany)

### 3.3 อุปกรณ์

3.3.1 กล้องจุลทรรศน์ชนิดถ่ายภาพได้ (Nikon Eclipse Ci-L, Japan)

3.3.2 กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)

3.3.3 ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด (National Scientific, USA)

3.3.4 เข็มฉีดยา (Gas syringe) (Scientific Glass Engineering, Australia)

3.3.5 คิวเวตควอตซ์ (Quartz cuvette) (Starna scientific Starna™ 9/Q/10, England)

3.3.6 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glassware)

3.3.7 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)) (Hewlett-Packard HP5890A GC, Japan)

3.3.8 เครื่องเขย่าแบบให้แสง (Light illumination shaker) (Gallenkamp T490811, UK)

3.3.9 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)

3.3.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)

3.3.11 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortechnik Z38K, Germany)

3.3.12 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)

3.3.13 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1601, Japan)

3.3.14 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)

3.3.15 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)

3.3.16 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)

3.3.17 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)

3.3.18 ไมโครปิเปต (Micropipette) (Labnet, USA)

### 3.4 วิธีการคัดแยกเชื้อและทดสอบความบริสุทธิ์

การคัดแยกเชื้อจะเริ่มจากการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจากแหล่งน้ำ แหล่งดิน และก้อนหิน ในน้ำตกจังหวัดนครนายก คือ น้ำตกนางรอง น้ำตกสาริกา น้ำตกวังตะไคร้ และน้ำตกแก่งสามชั้น

จากนั้น นำตัวอย่างมาใส่ลงในอาหารเหลว BG11 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่ที่มีแสง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ โดยในการเก็บตัวอย่างน้ำมีการใช้ Silk screen เป็นตัวกรองในการเก็บตัวอย่าง จากนั้น นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์เป็นจำนวน 10 ครั้ง ด้วยอาหาร BG11 แล้วจึงนำสารละลายเซลล์ที่ได้มา streak บนอาหารแข็ง BG11 จำนวน 1 ลูบต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง ซึ่งมีการเติมยาปฏิชีวนะ Cycloheximide ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร จากนั้น นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในสภาวะที่มีแสง เมื่อเชื้อมีการเจริญ นำเชื้อที่ได้มาทำการทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยการนำโคลนนี้เดี่ยวมา streak ลงบนอาหารแข็ง LB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน

### 3.5 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลสาหร่าย

เพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายบนอาหารแข็ง BG11 (ภาคผนวก ก) หรือ อาหาร TAP (ภาคผนวก ข) นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครอินส์ไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน สำหรับอาหาร BG11 และ 3 วัน สำหรับอาหาร TAP จากนั้น เมื่อสาหร่ายมีการเจริญ จึงทำการเชื้อโคลนนี้ของเชื้อบนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็น Starter โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง BG11 หรือ TAP จากนั้น เมื่อสาหร่ายเจริญ จึงทำการเชื้อโคลนนี้ของเชื้อบนอาหารแข็งมาเลี้ยงต่อในหลอดทดลองโดยเติมอาหารเหลว BG11 หรือ TAP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงโดยการให้แสง เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้น เมื่อเชื้อเจริญ นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์เป็นจำนวน 5 ครั้ง และนำสารละลายเซลล์ที่ได้มาเพาะเลี้ยงต่อในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะโฟโตออโตโทรฟ (Photoautotroph) ในอาหารเหลว BG11 และ สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟ (Photoheterotroph) ในอาหารเหลว TAP ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครอินส์ไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วันสำหรับอาหาร BG11 และเป็นเวลา 36 ชั่วโมง สำหรับอาหาร TAP เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยอาหารเพาะเลี้ยง จากนั้น นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 จากนั้น นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครอินส์ไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วันสำหรับอาหาร BG11 และเป็นเวลา 36 ชั่วโมง สำหรับอาหาร TAP ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลสาหร่าย โดยเชื้อโคลนเดี่ยวของเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง BG11 หรือ อาหาร TAP มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า และถ่ายภาพด้วยโปรแกรม NIS Elements เพื่อศึกษาลักษณะ รูปร่าง และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

### 3.6 การวัดปริมาณไฮโดรเจน

นำ Starter ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามหัวข้อ 3.5 มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 5 มิลลิลิตร (อาหาร BG11 อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (BG11<sub>0</sub>) อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ (BG11-S) อาหาร TAP อาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ขาดแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ) จากนั้น นำเซลล์ใส่ในขวดแก้วและปิดฝาขวด นำไปไล่อากาศโดยการฟองอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำขวดไปบ่มในที่มืด โดยคว่ำขวดไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนแล้ว จึงนำเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนแสดงในตารางที่ 3.1 จากนั้น คำนวณค่าการผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในภาคผนวก ง

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

Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Column	Packed SS Column 2m x 4mm OD x 3mm ID p/w Molecular sieve 5 <sup>0</sup> A 60/80 mesh
Temperature Program	Injector temperature:100 <sup>0</sup> C Column temperature:50 <sup>0</sup> C Detector temperature:100 <sup>0</sup> C
Argon Carrier gas	Flow rate 20 ml/min (99.999% purity)

### 3.7 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

นำตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวตามหัวข้อ 3.6 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ แล้วเติมเมทานอล ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้น นำตัวอย่างที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 และ 650 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Lee and Shen, 2004

### 3.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

#### 3.8.1 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจน

เตรียม Starter โดยนำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 จากนั้น นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 12, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามเวลาดังกล่าว โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ในอาหาร TAP และอาหาร TAP-S ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้น นำเซลล์ใส่ในขวดแก้วและปิดฝาขวด นำไปใส่อากาศด้วยการฟองอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที บ่มขวดในที่มืดแสง โดยคว่ำขวดไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนแล้ว จึงนำเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ และเปรียบเทียบปริมาณไฮโดรเจนที่ได้ในแต่ละช่วงเวลา

#### 3.8.2 วิธีการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

##### 3.8.2.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

เตรียม Starter โดยนำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 จากนั้น นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม (ได้จากการศึกษาในข้อ 3.8.1) ทำการเก็บเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามเวลาดังกล่าว โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ในอาหารที่ทดสอบที่เหมาะสมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้มีทั้งหมด 6 ชนิด คือ โซเดียมอะซิเตท กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส มอลโตส และแลคโตส โดยอะซิเตทจะถูกใช้เป็นแหล่งอาหารควบคุมเนื่องจากมีในสูตรอาหาร TAP

แหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดจะใช้เวลาเข้มข้นของคาร์บอนอะตอมที่มีอยู่ในแหล่งคาร์บอนจะเท่า คือ 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร นำเซลล์ใส่ในขวดแก้วและปิดฝาขวด นำไปใส่อากาศด้วยการพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที บ่มขวดในที่มืด โดยคว่ำขวดไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนแล้ว จึงนำเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ และเปรียบเทียบปริมาณไฮโดรเจนที่ได้

### 3.8.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

เตรียม Starter โดยนำเซลล์สำหรับยีสี่เชื้อที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปขยายที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโอสโตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีความการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 จากนั้น นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโอสโตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม (ได้จากการศึกษาในข้อ 3.8.1) ทำการเก็บเซลล์สำหรับยีสี่เชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามเวลาดังกล่าว โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ในอาหารที่ทดสอบที่เหมาะสมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน คือ ที่ความเข้มข้น 0, 1.74, 17.4, 34.8, 84.0, 174 และ 348 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร นำเซลล์ใส่ในขวดแก้วและปิดฝาขวด นำไปใส่อากาศด้วยการพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที บ่มขวดในที่มืด โดยคว่ำขวดไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนแล้ว จึงนำเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ และเปรียบเทียบปริมาณไฮโดรเจนที่ได้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการคัดแยกสาหร่ายและผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลสาหร่ายที่ใช้ในโครงการพิเศษ

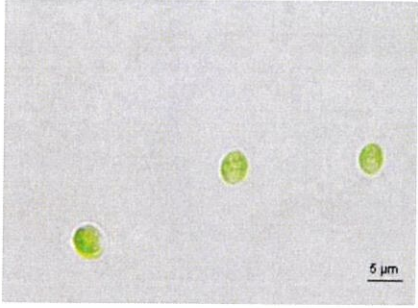
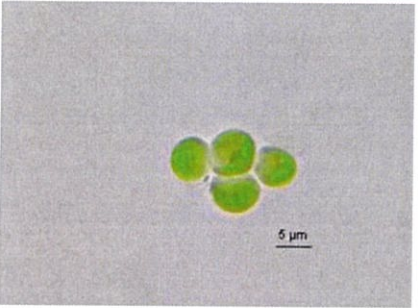
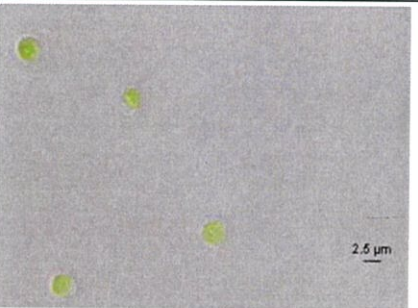
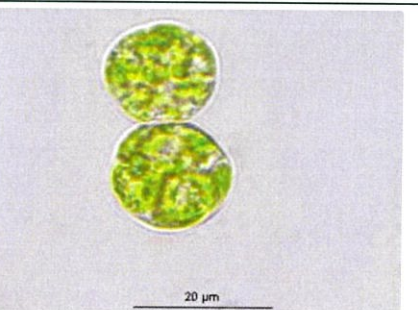

จากการเก็บตัวอย่างจุลสาหร่ายแบบสุ่มจากแหล่งน้ำ แหล่งดิน และ ก้อนหิน ในน้ำตกลจากจังหวัดนครนายก คือ น้ำตกลนางรอง น้ำตกลสาริกา น้ำตกลวังตะไคร้ และน้ำตกลแก่งสามชั้น พบว่าสามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 56 ไอโซเลท เป็นตัวอย่างจากแหล่งน้ำ 34 ไอโซเลท แหล่งดิน 6 ไอโซเลท และจากก้อนหิน 16 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.1)

จากการนำจุลสาหร่ายที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถคัดแยกจุลสาหร่ายที่บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 33 ไอโซเลท โดยเป็นสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด (ตารางที่ 4.2) จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียวที่บริสุทธิ์มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า พบว่าสาหร่ายสีเขียวมีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ เป็นเซลล์เดี่ยว สีเขียว รูปร่างค่อนข้างกลม แต่จะพบว่าสาหร่ายสีเขียวจะมีขนาดที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.2)

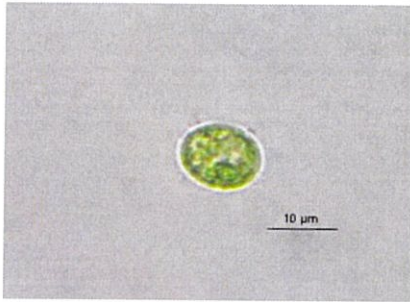
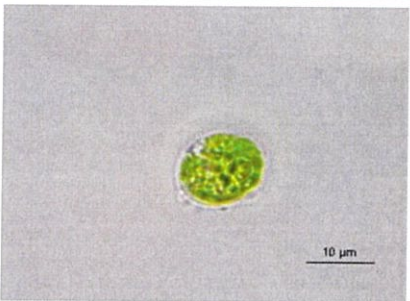
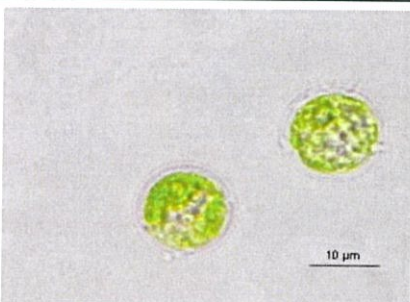


ตารางที่ 4.1 จำนวนตัวอย่างจุลสาหร่ายที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจากแหล่งน้ำ แหล่งดิน และก้อนหิน ในน้ำตกลจังหวัดนครนายก

แหล่งที่มา สถานที่	แหล่งดิน	แหล่งน้ำ	ก้อนหิน	รวม
น้ำตกลวังตะไคร้	-	13	8	21
น้ำตกลสาริกา	2	13	3	18
น้ำตกลนางรอง	3	7	5	15
น้ำตกลแก่งสามชั้น	1	1	-	2
รวม	6	34	16	56

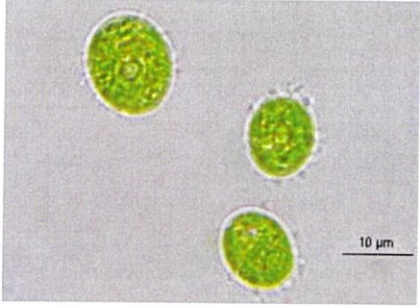
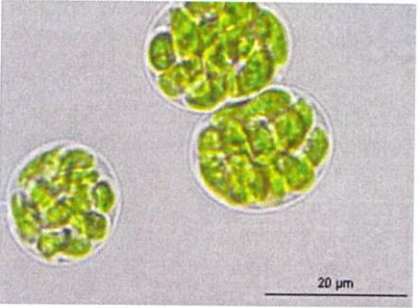
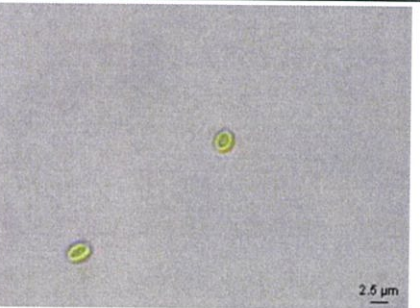
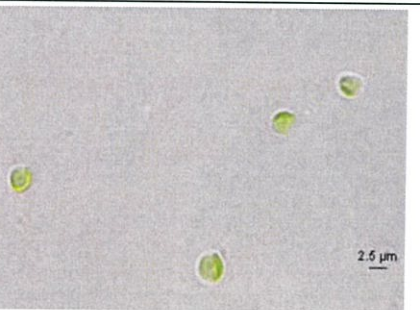
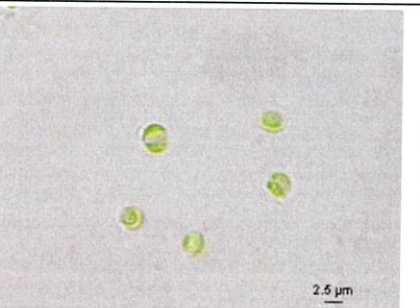
ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และแหล่งที่มาของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 33 ไอโซเลท ที่ใช้ในโครงการพิเศษ (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า)

ไอโซเลท	รูป	ลักษณะ	แหล่งที่มา
NR ST-1		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 $\mu\text{m}$	น้ำตกนางรอง
NR ST-4		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่รวมเป็นกลุ่ม เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 $\mu\text{m}$	น้ำตกนางรอง
NR W-6.3		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 $\mu\text{m}$	น้ำตกนางรอง
SLK W-1		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 20 $\mu\text{m}$	น้ำตกสาริกา
SLK W-4		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 $\mu\text{m}$	น้ำตกสาริกา

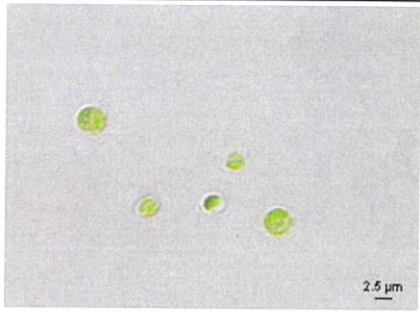
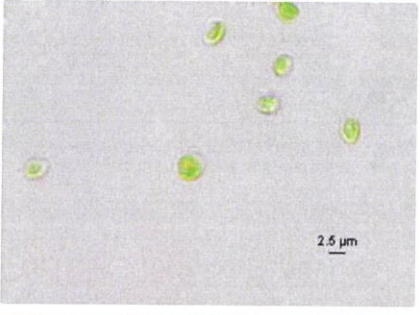
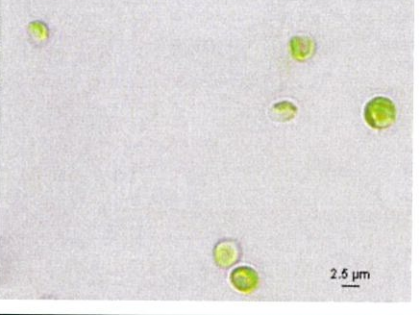
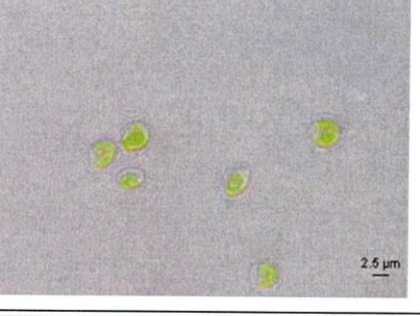
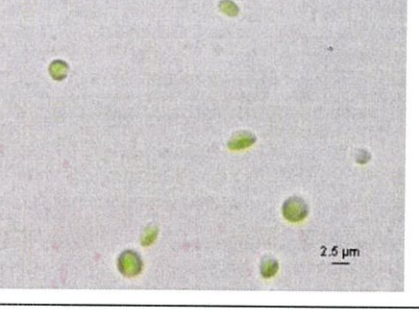
ตารางที่ 4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยา และแหล่งที่มาของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 33 ไอโซเลท ที่ใช้ในโครงการพิเศษ (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

ไอโซเลท	รูป	ลักษณะ	แหล่งที่มา
SLK W-5		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 µm	น้ำตกลสาธิต
SLK W-6		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 µm	น้ำตกลสาธิต
SLK W-8.1		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 µm	น้ำตกลสาธิต
SLK S-2		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 µm	น้ำตกลสาธิต
SLK ST-2		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่รวมเป็นกลุ่ม เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 µm	น้ำตกลสาธิต

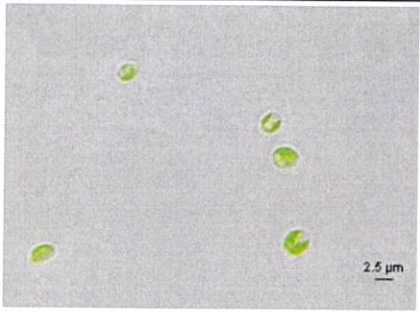
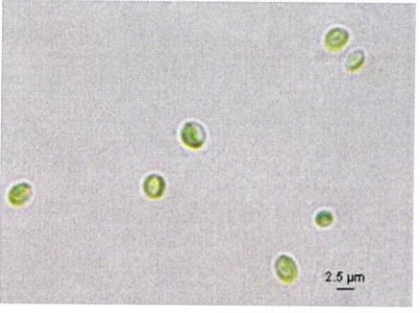
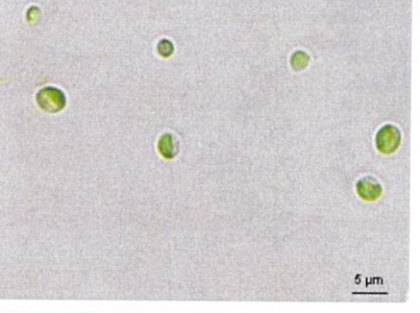
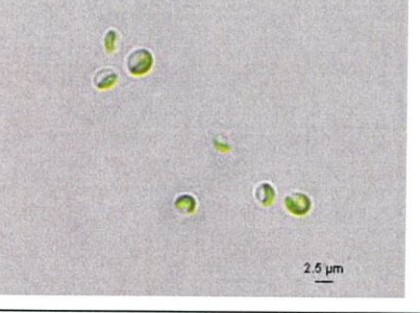
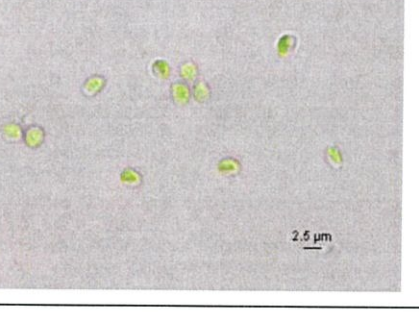
ตารางที่ 4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยา และแหล่งที่มาของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 33 ไอโซเลท ที่ใช้ในโครงการพิเศษ (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

ไอโซเลท	รูป	ลักษณะ	แหล่งที่มา
SLK ST-1(2)		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 $\mu\text{m}$	น้ำตกลำพูน
SLK ST-3		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 20 $\mu\text{m}$	น้ำตกลำพูน
WLK ST-1		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 $\mu\text{m}$	น้ำตกลำพูน
WTK ST-6		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 $\mu\text{m}$	น้ำตกลำพูน
WTK ST-2		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 $\mu\text{m}$	น้ำตกลำพูน

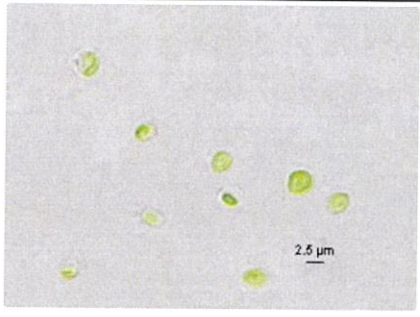
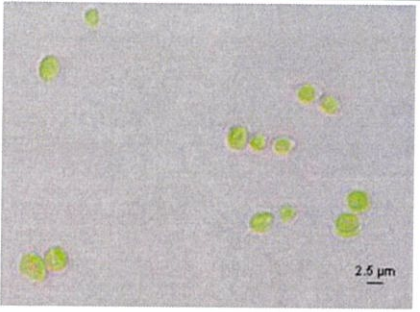
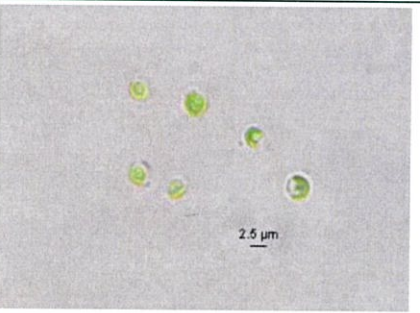
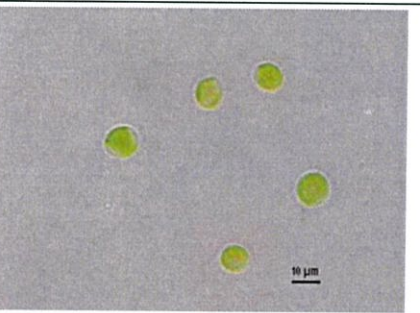
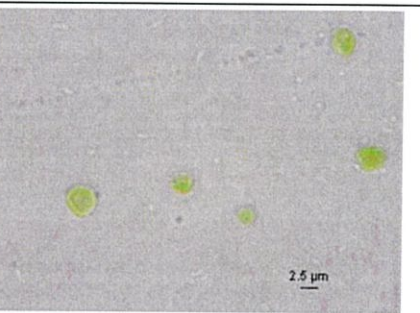
ตารางที่ 4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยา และแหล่งที่มาของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 33 ไอโซเลท ที่ใช้ในโครงการพิเศษ (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

ไอโซเลท	รูป	ลักษณะ	แหล่งที่มา
WTK ST-4.4		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm	น้ำตกวังตะไคร้
WTK ST-4		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm	น้ำตกวังตะไคร้
WTK ST-5.2		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm	น้ำตกวังตะไคร้
WTK ST-7.1		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm	น้ำตกวังตะไคร้
WTK ST-8		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm	น้ำตกวังตะไคร้

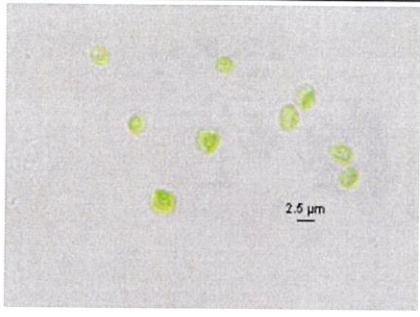
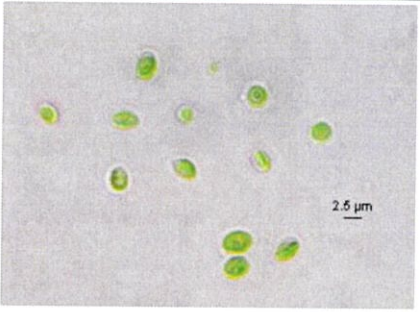
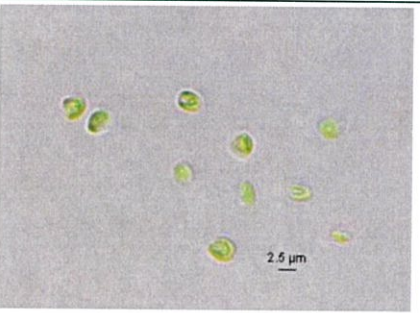
ตารางที่ 4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยา และแหล่งที่มาของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 33 ไอโซเลท ที่ใช้ในโครงการพิเศษ (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

ไอโซเลท	รูป	ลักษณะ	แหล่งที่มา
WTK W-1		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 $\mu\text{m}$	น้ำตกวังตะไคร้
WTK W-2		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 $\mu\text{m}$	น้ำตกวังตะไคร้
WTK W-3.1		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 $\mu\text{m}$	น้ำตกวังตะไคร้
WTK W-4.1		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 $\mu\text{m}$	น้ำตกวังตะไคร้
WTK W-4		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 $\mu\text{m}$	น้ำตกวังตะไคร้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยา และแหล่งที่มาของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 33 ไอโซเลท ที่ใช้ในโครงการงานพิเศษ (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

ไอโซเลท	รูป	ลักษณะ	แหล่งที่มา
WTK W-5.1		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm	น้ำตกวังตะไคร้
WTK W-5		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm	น้ำตกวังตะไคร้
WTK W-6.1		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm	น้ำตกวังตะไคร้
WTK W-7.1		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 μm	น้ำตกวังตะไคร้
WTK W-9.6		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm	น้ำตกวังตะไคร้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยา และแหล่งที่มาของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 33 ไอโซเลท ที่ใช้ในโครงการงานพิเศษ (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

ไอโซเลท	รูป	ลักษณะ	แหล่งที่มา
WTK W-9		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm	น้ำตกวังตะไคร้
WTK W-10		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm	น้ำตกวังตะไคร้
WTK W-1.4		เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm	น้ำตกวังตะไคร้

จากการเก็บตัวอย่างจุลสาหร่ายจากแหล่งน้ำ แหล่งดิน และก้อนหิน พบว่าจุลสาหร่ายส่วนใหญ่ได้มาจากแหล่งน้ำ เนื่องจากแหล่งน้ำจะมีจุลสาหร่ายจำพวกไม่ต้องพึ่งพื้ผิวสัมผัสกระจายตัวเป็นอิสระลอยตามผิวน้ำ จึงเป็นผลให้สามารถเก็บตัวอย่างได้มากกว่าแหล่งดินและก้อนหิน จากแหล่งน้ำตกทั้ง 4 แหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่างจุลสาหร่าย พบว่าน้ำตกแก่งสามชั้นมีคุณสมบัติทางเคมี หรือกายภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลสาหร่าย เพราะมีการไหลของน้ำที่ค่อนข้างแรง มีผู้คนพลุกพล่าน และไม่มีความชื้นมากพอ ซึ่งแตกต่างจากน้ำตกวังตะไคร้ น้ำตกสาริกา และน้ำตกนางรองที่มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมมากกว่า โดยขั้นตอนการคัดแยก และทำบริสุทธิ์ได้มีการใช้ยา Cycloheximide เนื่องจากมีการปนเปื้อนจำนวนมาก จึงส่งผลให้สามารถทำบริสุทธิ์ได้เพียง 33 ไอโซเลท และการใช้ยา Cycloheximide ยังส่งผลต่อไซยาโนแบคทีเรีย ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทำให้ตัวอย่างจุลสาหร่ายทั้ง 33 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จึงมีเฉพาะสาหร่ายสีเขียว

## 4.2 ผลการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง

### 4.2.1 ผลการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงในอาหาร BG11

จากการนำสาหร่ายสีเขียวจำนวน 33 ไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายในอาหาร BG11 อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (BG11<sub>0</sub>) และอาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ (BG11-S) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปรับตัวในสภาวะปราศจากอากาศในที่มีแสงเป็นเวลา 2 และ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่า สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่ไม่มีการผลิตไฮโดรเจน มีสาหร่ายสีเขียวเพียงสองชนิดเท่านั้นที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน คือ สาหร่ายสีเขียว ไอโซเลท WTK W-4.1 และ NR ST-1 ที่มีการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสีเขียวในอาหาร BG11 อาจไม่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากอาหาร BG11 เป็นอาหารที่ไม่มีแหล่งอินทรีย์คาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ส่งผลให้สาหร่ายสีเขียวเจริญเติบโตได้ช้า จากผลการทดลองมีสาหร่าย 2 ไอโซเลทที่มีการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร BG11-S ที่เป็นเช่นนี้เพราะภายใต้สภาวะอาหาร BG11-S เมื่อซัลเฟอร์ลดลงทำให้กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบทำงานได้ลดลง มีผลทำให้กระบวนการซ่อมแซมของระบบแสงที่สองทำงานลดลง การแตกตัวของน้ำก็ลดลงด้วย ส่งผลให้ออกซิเจนถูกใช้ในกระบวนการหายใจไปหมด ดังนั้น เมื่อไม่มีอากาศเกิดขึ้นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะไม่ถูกยับยั้งด้วยออกซิเจน ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการทำงานสูงขึ้นทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น

### 4.2.2 ผลการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงในอาหาร TAP

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวตามหัวข้อ 4.2.1 ซึ่งมีการเปลี่ยนชนิดของอาหารเป็นอาหาร TAP อาหาร TAP-N และอาหาร TAP-S และนำไปวัดปริมาณไฮโดรเจน พบว่า มีเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ คือ ไอโซเลท WTK W-3.1, WTK W-2 และ NR ST-1 โดยสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-S มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลทอื่น คือมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $0.907 \pm 0.034$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.4) ในอาหารทั้ง 3 ชนิดสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดในอาหาร TAP-S โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $0.907 \pm 0.034$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เนื่องจากในอาหารที่ปราศจากซัลเฟต การทำงานของระบบแสงที่สองจะถูกยับยั้ง ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำได้ เมื่อออกซิเจนที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ FeFe-hydrogenase มีปริมาณลดลงส่งผลให้เอนไซม์ทำงานได้มากขึ้น นอกจากนี้ในช่วงแรกของสภาวะการขาดซัลเฟอร์ ปริมาณของ

แป้งจะเพิ่มขึ้น และเกิดการผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น เนื่องจากแป้งจะเปลี่ยนอิเล็กตรอนเพื่อเข้าสู่กระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยแสง ดังนั้น จึงนำอาหาร TAP-S ไปใช้ในการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวโอสเลท WTK W-3.1 สำหรับการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสง 2 และ 24 ชั่วโมง ในอาหาร BG11, BG11<sub>0</sub> และ BG11-S

Isolate no.	Isolate name	Hydrogen production rate (nmolH <sub>2</sub> /mg chV/h)					
		BG11		BG11 <sub>0</sub>		BG11-S	
		2 h	24 h	2 h	24 h	2 h	24 h
1	WTK W-5.1	-	-	-	-	-	-
2	WTK W-4	-	-	-	-	-	-
3	WTK ST-2	-	-	-	-	-	-
4	WTK W-9	-	-	-	-	-	-
5	WTK W-1.4	-	-	-	-	-	-
6	WTK W-7.1	-	-	-	-	-	-
7	WTK ST-1	-	-	-	-	-	-
8	WTK ST-6	-	-	-	-	-	-
9	WTK ST-4.4	-	-	-	-	-	-
10	WTK ST-5.2	-	-	-	-	-	-
11	WTK ST-8	-	-	-	-	-	-
12	WTK W-1	-	-	-	-	-	-
13	SLK ST-2	-	-	-	-	-	-
14	SLK ST-3	-	-	-	-	-	-
15	WTK W-5	-	-	-	-	-	-
16	SLK W-1	-	-	-	-	-	-
17	WTK W-6.1	-	-	-	-	-	-
18	SLK W-4	-	-	-	-	-	-
19	SLK W-5	-	-	-	-	-	-
20	WTK W-9.6	-	-	-	-	-	-
21	NR ST-4	-	-	-	-	-	-
22	NR W-6.3	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสายร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสง 2 และ 24 ชั่วโมง ในอาหาร BG11, BG11<sub>0</sub> และ BG11-S (ต่อ)

Isolate no.	Isolate name	Hydrogen production rate (nmolH <sub>2</sub> /mg ch/h)					
		BG11		BG11 <sub>0</sub>		BG11-S	
		2 h	24 h	2 h	24 h	2 h	24 h
23	SLK W-6	-	-	-	-	-	-
24	SLK W-8.1	-	-	-	-	-	-
25	WTK W-4.1	-	-	-	-	-	0.042±0.004
26	WTK ST-4	-	-	-	-	-	-
27	WTK W-10	-	-	-	-	-	-
28	WTK W-3.1	-	-	-	-	-	-
29	WTK W-2	-	-	-	-	-	-
30	NR ST-1	-	-	-	-	-	0.120±0.005
31	SLK S-2	-	-	-	-	-	-
32	SLK ST-1(2)	-	-	-	-	-	-
33	WTK ST-7.1	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสายร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสง ในอาหาร TAP, TAP-N และ TAP-S

Isolate no.	Isolate name	Hydrogen production rate (nmolH <sub>2</sub> /mg ch/h)		
		TAP	TAP-N	TAP-S
1	WTK W-3.1	0.807±0.043	0.153±0.005	0.907±0.034
2	WTK W-2	0.401±0.002	0.150±0.002	0.678±0.003
3	NR ST-1	0.115±0.003	0.011±0.002	0.106±0.005

### 4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1

#### 4.3.1 ผลการศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1

จากการนำสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP โดยให้มีความการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้นประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและความเข้มแสง 30 ไมโครอินสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 12, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด นำเซลล์มาเก็บเกี่ยวโดยการปั่นเหวี่ยง และนำมากระจายในอาหาร TAP และอาหาร TAP-S ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้ว และนำไปใส่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที นำขวดไปบ่มที่อุณหภูมิห้องภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครอินสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $0.900 \pm 0.001$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.5) โดยชั่วโมงที่ 12 เซลล์จะอยู่ในช่วง Lag phase ซึ่งเซลล์จะผลิตไฮโดรเจนได้น้อย เนื่องจากเซลล์จะใช้เอนไซม์ต่างๆ ไปในกระบวนการแบ่งตัวและเจริญเติบโต ในชั่วโมงที่ 36 และ 48 เซลล์จะอยู่ในช่วง Mid log phase และ Late log phase ตามลำดับ สาหร่ายจึงนำพลังงานที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงมาใช้ในการเจริญของเซลล์น้อยลง ทำให้พลังงานที่เหลือจากกระบวนการดังกล่าวถูกนำไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น ส่วนชั่วโมงที่ 72 เซลล์จะอยู่ในช่วงของ Stationary phase ในช่วงนี้เซลล์จะใกล้ตายจึงนำเอาพลังงานไปใช้ในการพยายงเซลล์ทำให้ไม่มีพลังงานเหลือเยอะ ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 จากการแปรผันระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีแสง ในอาหาร TAP และ TAP-S

Hydrogen Production ( $\mu\text{molH}_2/\text{mg chl/h}$ )							
อายุเซลล์ที่ 12 h		อายุเซลล์ที่ 36 h		อายุเซลล์ที่ 48 h		อายุเซลล์ที่ 72 h	
TAP	TAP-S	TAP	TAP-S	TAP	TAP-S	TAP	TAP-S
0.075	0.237	0.339	0.900	0.309	0.660	0.033	0.057
±	±	±	±	±	±	±	±
0.012	0.003	0.002	0.001	0.090	0.009	0.003	0.006

#### 4.3.2 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1

จากการนำสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 ที่มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาเก็บเกี่ยวเซลล์ และนำมากระจายในอาหารเหลว TAP-S ที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส, ซูโครส, ฟรักโทส, มอลโทส, แล็กโทส และโซเดียมอะซิเตท ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้ว และนำไปไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที นำขวดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟพบว่า สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-S ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $1.274 \pm 0.003$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.6) น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีความสำคัญ เพราะเป็นสารตั้งต้นของการผลิตพลังงานเซลล์ของสิ่งมีชีวิตใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน นอกจากนี้ กลูโคสเป็นหนึ่งในผลผลิตหลักของการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) และเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการหายใจของเซลล์ (Cellular respiration) โดยเซลล์สาหร่ายจะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไฮโดรเจน โดยนำน้ำตาลกลูโคสเก็บสะสมเป็นคาร์โบไฮเดรตในรูปแบบ แป้ง เมื่อเข้าสู่สภาวะปราศจากอากาศ เซลล์จะสลายแป้งได้ไฟรูเวทพร้อมกับปล่อยอิเล็กตรอนออกมา อิเล็กตรอนที่ได้จะถูกนำไปใช้ผลิตไฮโดรเจน ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 ที่ทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหาร TAP-S

Condition	Hydrogen Production ( $\mu\text{molH}_2/\text{mg ch}/\text{h}$ )
TAP	$0.693 \pm 0.003$
TAP-S	$0.900 \pm 0.004$
TAP-S+Glucose	$1.274 \pm 0.003$
TAP-S+Fructose	-
TAP-S+Sucrose	$0.092 \pm 0.003$
TAP-S+Maltose	-
TAP-S+Lactose	$0.271 \pm 0.001$

#### 4.3.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1

จากการนำสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเหลว TAP-S ที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ 0, 1.74, 17.4, 34.8, 84.0, 174 และ 348 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้ว และนำไปใส่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที นำขวดไปปั่นที่อุณหภูมิห้องภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตร ต่อวินาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-S ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตรมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด คือ  $1.277 \pm 0.001$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.7) เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่ำจะกระตุ้นให้เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากจะไปเพิ่มการรีดิวซ์ NAD(P)H ในเอนไซม์ไบโตรีดักชันไนโตรเจนที่มียับยั้งสำคัญในการผลิตไฮโดรเจน ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงเซลล์จะใช้พลังงานในการขับน้ำตาลออกนอกเซลล์ จึงเป็นผลทำให้ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนลดลง (Baebprasert et al., 2010)

ตารางที่ 4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท WTK W-3.1 ที่ทำการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหาร TAP-S

Condition	Hydrogen Production ( $\mu\text{molH}_2/\text{mg ch}/\text{h}$ )
TAP-S	$0.053 \pm 0.003$
TAP-S+Glucose 1.74 mmolC/L	$0.046 \pm 0.001$
TAP-S+Glucose 17.4 mmolC/L	$1.277 \pm 0.001$
TAP-S+Glucose 34.8 mmolC/L	$1.064 \pm 0.001$
TAP-S+Glucose 84 mmolC/L	$0.608 \pm 0.001$
TAP-S+Glucose 174 mmolC/L	$0.068 \pm 0.003$
TAP-S+Glucose 348 mmolC/L	$0.053 \pm 0.002$

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำ แหล่งดิน และก้อนหิน ในน้ำตกจังหวัดนครนายก สรุปได้ดังนี้

1. จุลสาหร่ายที่แยกได้จากแหล่งน้ำ แหล่งดิน และก้อนหินในน้ำตกจังหวัดนครนายกสามารถคัดแยก และทำบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 33 ไอโซเลท โดยทั้ง 33 ไอโซเลท เป็นสาหร่ายสีเขียว และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว และกลุ่มที่ 2 มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่แบบรวมกันเป็นกลุ่ม

2. สาหร่ายสีเขียวที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร TAP-S คือ ไอโซเลท WTK W-3.1

3. ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยยีน 18S rDNA พบว่าไอโซเลท WTK W-3.1 จัดอยู่ในจีโนส *Chlorella* sp.

4. สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. WTK W-3.1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด เมื่อมีระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง ในอาหาร TAP-S โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจน  $0.900 \pm 0.001$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

5. จากการศึกษากาแฟรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในอาหาร TAP-S ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน พบว่า น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ในอาหาร TAP-S เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. WTK W-3.1 โดยมีอัตราการผลิตเท่ากับ 1.277 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

## เอกสารอ้างอิง

- ชนิษฐา หมู่โสภิญ. 2553. ไบโอดีเจนพลังงานทางเลือกใหม่. สืบค้นจาก: [http://home.kku.ac.th/uac/journal/year\\_18\\_3-4\\_2553/3.pdf](http://home.kku.ac.th/uac/journal/year_18_3-4_2553/3.pdf) [28มิถุนายน2558].
- ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546. สาหร่ายวิทยา (Phycology). พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542. แพลงก์ตอนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมนึก บุญพาไสว. 2548. เซลล์เชื้อเพลิงวิธีใช้เชื้อเพลิงในศตวรรษที่ 21. สืบค้นจาก: <http://design.ipst.ac.th/docu/photo/D006.pdf> [28 มิถุนายน 2558].
- สุธาทิพย์ ตรีพลอักษร และ นฤมล ทองไว. 2554. การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา แห่งชาติครั้งที่ 23 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน. 22-23 ธันวาคม 2554. 253-257.
- วิรัชรอง แสงอรุณเลิศ. 2555. เชื้อเพลิงไฮโดรเจนเทคโนโลยีสีเขียว. วารสารวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์. 4(4), 7-14.
- Gaffron, H. and Rubin, J. 1942. "Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae." J. Gen. Physiol. 26, 219-240.
- Hartman, H. and Krasna, A. 1963. Studies on the adaption of hydrogenase in *Scenedesmus*. J. Biol. Chem. 238, 749-757.
- He, M., Li, L. and Liu, J. 2012. Isolation of wild microalgae from natural water bodies for high hydrogen producing strains. International journal of hydrogen energy. 37, 4046-4056.
- Healey, F.P. 1970. The mechanism of hydrogen evolution in *Chlamydomonas moewusii*. Plant Physiol. 45, 153-159.
- Lee, Y. K. and Shen, H. 2004. Basic culturing techniques. In: Richmond, A. [Eds], Handbook of microalgal culture. IS Press. pp. 40-50.

- Levin, D.B., Pitt, L., Love, M. 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*. 29, 173-185.
- Maness, P.C., Yu, J., Eckert, C. and Ghirardi, M.L. 2009. Photobiological hydrogen production prospects and challenges: Efforts to scale up the capacity of green algae and cyanobacteria to use sunlight to convert water into hydrogen gas for energy use. *Microbe*. 6(4), 275-280.
- Mazel, D., Houmard, J., Castets, A. M. and Tandeau de Marsac, N. 1990. Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. *J Bacteriol* 172. 2755–2761.
- Melis, A., and Happe, T. 2001. Hydrogen production. green algae as a source of Energy. *American Society of Plant Physiologists*, 127, 740-748.
- Ni, M., Leung, D.Y.C., Leung, M.K.H., Sumathy, K. 2006. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing technology*. 87, 461-472.
- Pongpadung, P., Liu, J., Yokthongwattana, 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*. 41, 97–107.
- Rashid, N., Lee, K. and Mahmood, Q. 2011. Bio-hydrogen production by *Chlorella vulgaris* under diverse photoperiods. *Bioresource Technology*. 102, 2101–2104.
- Schulz, R., Schnackenberg, J., Stangier, K., Wünschiers, R., Zinn, T. and Senger, H. 1998. Light-dependent hydrogen production of the green algae. In: Zaborsky et al. [Eds], *BioHydrogen*. Plenum Press, New York.
- Stephenson, M, and Stickland, L.H. 1931. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *Biochem J*. 25(1), 205–214.
- Troshina, O., Serebryakova, L., Sherwmetieva, M., Lindblad, P. 2002. Production of H<sub>2</sub> by the unicellular *Cyanobacterium Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27, 1283-1289.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11

#### ส่วนประกอบ Trace metal mix 1,000 เท่า

กรดบอริก ( $H_3BO_3$ )	46.3	มิลลิโมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ )	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.77	มิลลิโมลาร์
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ( $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ )	1.61	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ( $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ )	0.17	มิลลิโมลาร์

#### ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรท ( $NaNO_3$ )	1.76	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ )	30.4	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	24.5	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric Acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ ( $Na_2EDTA$ )	279	มิลลิโมลาร์
Trace metal mix 1,000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1,000 เท่า		

#### ส่วนประกอบอาหาร BG11 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต ( $Na_2CO_3$ )	1	มิลลิลิตร
(2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)		
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	1	มิลลิลิตร
(3.05 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)		
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท ( $FeNH_4$ citrate)	1	มิลลิลิตร
(0.60 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)		

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที  
ถ้าเป็นสูตรอาหารแข็ง ให้ทำการเติมวุ้นลงไป 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารที่เตรียม

## ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP)

อาหาร TAP 1 ลิตร ประกอบด้วย

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

(ปรับพีเอช 7.2)

ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernicks Solution ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

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

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace mineral solution ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ประกอบด้วยสารละลาย  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อน และคน ปรับพีเอช 6.5 ด้วย 5 N NaOH แล้วเติมสารตามด้านล่างทีละตัว ตามลำดับ

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 ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.51	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.016	กรัม
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.073	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.016	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร แล้ว Autoclave สารละลายจะมีสีเหลืองเขียวเปลี่ยนเป็นสีม่วง หลังจากนั้นเติมสารตามด้านล่าง ตามลำดับ

20 ml 1M Stock โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (1M stock 6.8 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร)

30 ml 1M Stock ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (1M stock 8.7 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร)

ปรับพีเอช 7.2 สำหรับอาหารแข็งให้เติมวัน 1.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร

## ภาคผนวก ค

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB agar ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

เปปโตน (Peptone)	10	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทรคต์ (Yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	10	กรัม
ปรับพีเอชให้ได้ 7.4		

## ภาคผนวก ง

### วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

1. นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดสอบมาหาค่าความเข้มของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละจากกราฟมาตรฐาน
2. นำค่าความเข้มชั้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละมาเปรียบเทียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร
3. นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาเปรียบเทียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิโมลโดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาณไฮโดรเจน 1 มิลลิโมล
4. นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมงจะได้ ปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมง
5. นำปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมงที่ได้มาหารปริมาณคลอโรฟิลล์จะได้หน่วยเป็นไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง