

ซัลเฟตต่อการผลิตไฮโดรเจนจากการตรึงสาหร่ายสีเขียว
Tetraspora sp. CU2551 ในสภาวะมีอากาศ

SULFATE ON HYDROGEN PRODUCTION BY
IMMOBILIZED GREEN ALGA *Tetraspora* sp. CU2551
UNDER AEROBIC CONDITION



ศศิพิมล เทพไพฑูรย์
บุญญาอร พรมปัญญา
ประภัสสร ชำนาญหม่อ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

ซัลเฟตต่อการผลิตไฮโดรเจนจากการตรึงสาหร่ายสีเขียว

Tetraspora sp. CU2551 ในสภาวะมีอากาศ

SULFATE ON HYDROGEN PRODUCTION BY
IMMOBILIZED GREEN ALGA *Tetraspora* sp. CU2551
UNDER AEROBIC CONDITION



T149326

ศศิพิมล เทพไพฑูรย์
บุญญาอร พรหมปัญญา
ประภัสสร ชำนาญหอม

เลขที่หนังสือ.....
เลขทะเบียน.....
รับ เดือน ปี 12 ก.พ. 2561

149326

12881995

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

SULFATE ON HYDROGEN PRODUCTION BY
IMMOBILIZED GREEN ALGA *Tetraspora* sp. CU2551
UNDER AEROBIC CONDITION



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(ENVIRONMENTAL CHEMISTRY)

DEPARTMENT OF CHEMISTRY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

ซัลเฟตต่อการผลิตไฮโดรเจนจากการตรึงสาหร่ายสีเขียว

Tetraspora sp. CU 2551 ในสภาวะมีอากาศ

Sulfate on hydrogen production by immobilized green

alga *Tetraspora* sp. CU2551 under aerobic condition

ชื่อนักศึกษา

นางสาวศศิพิมล เทพไพฑูรย์ รหัสนักศึกษา 56050696

นางสาวบุญญาอร พรหมปัญญา รหัสนักศึกษา 56050715

นางสาวประภัสสร ชำนาญหอม รหัสนักศึกษา 56050721

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)

ภาควิชา

เคมี


ปีการศึกษา

2559

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี
สิ่งแวดล้อม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.เอกรัฐ เดชศรี ประธานกรรมการ	
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการ	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ซัลเฟตต่อการผลิตไฮโดรเจนจากการตรึงสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU 2551 ในสภาวะมีอากาศ Sulfate on hydrogen production by immobilized green alga <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 under aerobic condition
ชื่อนักศึกษา	นางสาวศศิพิมล เทพไพฑูรย์ รหัสนักศึกษา 56050696 นางสาวบุญญาอร พรหมปัญญา รหัสนักศึกษา 56050715 นางสาวประภัสสร ชำนาญหอม รหัสนักศึกษา 56050721
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา	เคมี
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของซัลเฟตต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 การทดลองได้ติดตามการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายนี้ในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) และ อาหาร Tris-Acetate-Phosphate ปราศจากซัลเฟต (TAP-S) ที่ปรับความเข้มข้นของซัลเฟตตั้งแต่ 0, 200, 400, 600, 800 และ 1000 μM ด้วยสารละลายโซเดียมซัลเฟต ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้นและคงที่ภายใน 24 ชม. ที่ทุกความเข้มข้นของซัลเฟต โดยความเข้มข้น 800 μM ให้ผลผลิตที่สูงสุดที่ 1.42 $\mu\text{mol}/\text{mg DW}$ (2.54 เท่าของ TAP) ความเข้มข้น 1,500 μM ลักซ์ ส่งผลให้สาหร่ายสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากทั้งอาหาร TAP และ TAP-S คิดเป็น 0.59 และ 0.59 $\mu\text{mol}/\text{mg DW}$ ตามลำดับ ความเข้มข้นของซัลเฟตที่ 600 และ 850 μM ส่งผลให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดคิดเป็น 1.34 และ 1.33 $\mu\text{mol}/\text{mg DW}$ ตามลำดับ ทดสอบการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนโดยทำการตรึงเซลล์ด้วยแอลจีเนต ผลการทดลองพบว่าสามารถนำเซลล์ตรึงมาใช้ซ้ำได้น้อย 4 รอบ โดยในรอบที่สามจะให้ผลผลิตสูงที่สุดในทุกความเข้มข้น ผลการผลิตไฮโดรเจนรวมในสี่รอบพบว่าความเข้มข้น 0 μM จะให้ผลผลิตสูงที่สุดที่ 2.34 $\text{mL}/25 \text{ mL medium}$ (1.55 เท่าของ TAP) รองลงมาคือ 850 และ 600 μM จะให้ผลผลิตที่ 2.15 และ 1.79 $\text{mL}/25 \text{ mL medium}$ คิดเป็น 1.39 และ 1.16 เท่าของ TAP ตามลำดับ

คำสำคัญ: การตรึงเซลล์ ซัลเฟต *Tetraspora* sp. CU2551 แอลจีเนต ไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Sulfate on hydrogen production by immobilized green alga <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 under aerobic condition	
Students	Ms. Sasipimol Theppaitoon	Students ID 56050696
	Ms. Bunyaon Phompanya	Students ID 56050715
	Ms. Praphatson Chamnanmo	Students ID 56050721
Degree	Bachelor of Science (Environmental Chemistry)	
Department	Chemistry	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2016	
Advisor	Dr. Cherdasak Maneeruttanarungroj	

Abstract

This special project aims to study the effect of sulfate concentration on hydrogen production enhancement using biological approach through green alga *Tetraspora* sp. CU2551. The experiments were monitored the production in Tris-Acetate-Phosphate (TAP) medium and Tris-Acetate-Phosphate without sulfate (TAP-S) medium adjusting the sulfate concentration ranging from 0, 200, 400, 600, 800 and 1000 μM using sodium sulfate. The results revealed that the production increased to the highest yield within 24 h at all concentrations where 800 μM yielding 1.42 $\mu\text{mol}/\text{mg DW}$ (2.54 folds above TAP). Light intensity at 1,500 lux resulted in H_2 production from TAP and TAP-S as 0.59 and 0.58 $\mu\text{mol}/\text{mg DW}$, respectively. Sulfate at 600 and 850 μM maximized the production yielding 1.34 and 1.33 $\mu\text{mol}/\text{mg DW}$, respectively. The experiment was extended to immobilize the algal cells in alginate. The results showed that immobilized cells could be reused for at least 4 cycles in which the maximum yield was obtained at all concentration during cycle 3. The 4-cycles production yield was maximized at 0 μM yielding 2.34 ml/25 ml medium (1.55 folds above TAP). The lower extended were from 850 and 600 μM yielding 2.15 and 1.79 ml/25 ml medium or 1.39 and 1.16 folds above TAP, respectively.

Keywords: Immobilization, Sulfate, *Tetraspora* sp. CU2551, Alginate, Hydrogen

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความช่วยเหลือ การสนับสนุน เป็นอย่างดีจากทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้อง

ขอขอบพระคุณ ดร.เชตศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่กรุณาให้ คำปรึกษา คำแนะนำ แนวคิด ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆด้วยความดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คุณธนาภรณ์ มาศวรรณ ที่ให้คำแนะนำรวมทั้งเอื้อเฟื้อด้านเอกสารข้อมูลต่างๆอัน เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการพิเศษเล่มนี้

ขอขอบคุณ คุณชัชชัย ลัทธิลักษณ์ คุณณัฐพล ไกรธรรม คุณสาคร สอนพงษ์ และคุณปราณี บุญวัฒน์ เจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ภาคเคมี สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม ที่อำนวยความสะดวกด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ตลอดจนจบโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณ ดร.กิตติศักดิ์ ชูจันทร์ และคุณรจนา จำกัด ที่ช่วยดำเนินการประสานงานด้าน เอกสารข้อมูล

ท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่มอบโอกาสในการศึกษา และมอบกำลังใจที่ดีให้ เสมอมา รวมถึงครูบาอาจารย์ผู้สอนทุกท่านที่มอบความรู้ให้กับผู้ทำโครงการพิเศษเพื่อนำความรู้มา ถ่ายทอดและพัฒนาต่อไป

ศศิพิมล เทพไพฑูรย์
บุญญาอร พรหมปัญญา
ประภัสสร ชำนาญหอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขต	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 พลังงานไฮโดรเจน.....	4
2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน	5
2.2.1 กระบวนการความร้อนเคมี (Thermo Chemical Process).....	6
2.2.2 กระบวนการไฟฟ้าเคมี (Electrolysis).....	7
2.2.3 กระบวนการชีวเคมี (Biochemical Processes).....	7
2.3 สาหร่ายสีเขียว.....	8
2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว	9
2.4.1 กระบวนการใช้แสง (light-driven process)	10
2.4.2 กระบวนการแบบไม่ใช้แสง (non light-driven process).....	12
2.5 การตรึงเซลล์ (Immobilization)	12
2.5.1 การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method).....	12
2.5.2 การเชื่อมแบบไขว้ (Cross-linking method).....	13
2.5.3 การห่อหุ้ม (Entrapping method).....	13
2.6 การนำเซลล์สาหร่ายสีเขียวเพื่อผลิตไฮโดรเจนกลับมาใช้ซ้ำ	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	18
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....	18
3.2 อาหารใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อสาหร่าย	18
3.3 สารเคมี	18
3.3.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	18
3.3.2 สารเคมีสำหรับใช้ในการตรึงเซลล์.....	19
3.3.3 ก๊าซมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน.....	19
3.3.4 ยาสำหรับยับยั้งการเกิดแบคทีเรีย.....	19
3.3.5 สารเคมีที่ใช้ในการแปรผันความเข้มข้นของซัลเฟต	19
3.4 อุปกรณ์.....	19
3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	20
3.5.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ในอาหารวุ้น	20
3.5.2 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ในอาหารเหลว	21
3.6 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551.....	22
3.6.1 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 อีสุระเพื่อศึกษาปริมาณไฮโดรเจน.....	22
3.6.2 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตต่อการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์สาหร่ายแบบอีสุระ.....	22
3.6.3 วิธีการศึกษาความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551.....	23
3.6.4 วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 เพื่อการผลิตไฮโดรเจน.....	23
3.6.5 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากการตรึงสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ด้วยแอลจีเนต.....	24
3.7 วิธีการศึกษาการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ที่ตรึงด้วยแอลจีเนต ที่ใช้งานแล้วมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำ.....	25
3.7.1 ขั้นตอนการทำเซลล์สาหร่ายเข้าสู่ Stage I.....	25
3.7.2 ขั้นตอนการทำเซลล์สาหร่ายเข้าสู่ Stage II.....	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	27
4.1 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตด้วยการเลี้ยงเซลล์แบบอิสระที่ความเข้มข้น 0 – 1000 ไมโครโมลาร์ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551.....	27
4.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตด้วยการเลี้ยงเซลล์แบบอิสระที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟต 0 – 400 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551.....	28
4.3 ผลของความเข้มข้นแสง แปรผันความเข้มข้นแสงระหว่าง 0 – 2500 ลักซ์ที่เลี้ยงแบบเซลล์อิสระที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551.....	30
4.4 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่แปรผันความเข้มข้นที่ 0 – 1000 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นแสง 1500 ลักซ์เลี้ยงแบบเซลล์อิสระ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้สาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551.....	31
4.5 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตด้วยการเลี้ยงเซลล์แบบอิสระที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟต 500 – 1000 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นแสง 1,500 ลักซ์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. CU2551.....	32
4.6 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตโดยการตรึงเซลล์ด้วยแอลจิเนต บ่มที่ความเข้มข้นแสง 1,500 ลักซ์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 โดยผลิตอย่าง ต่อเนื่องแบบมีการนำเซลล์มาใช้ซ้ำ.....	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	36
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	36
5.2 ข้อเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	40
ภาคผนวก ก ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	41
ภาคผนวก ข การคำนวณน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	43
ภาคผนวก ค การคำนวณปริมาณไฮโดรเจน	44

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

3.1	สถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์	7
-----	--	---



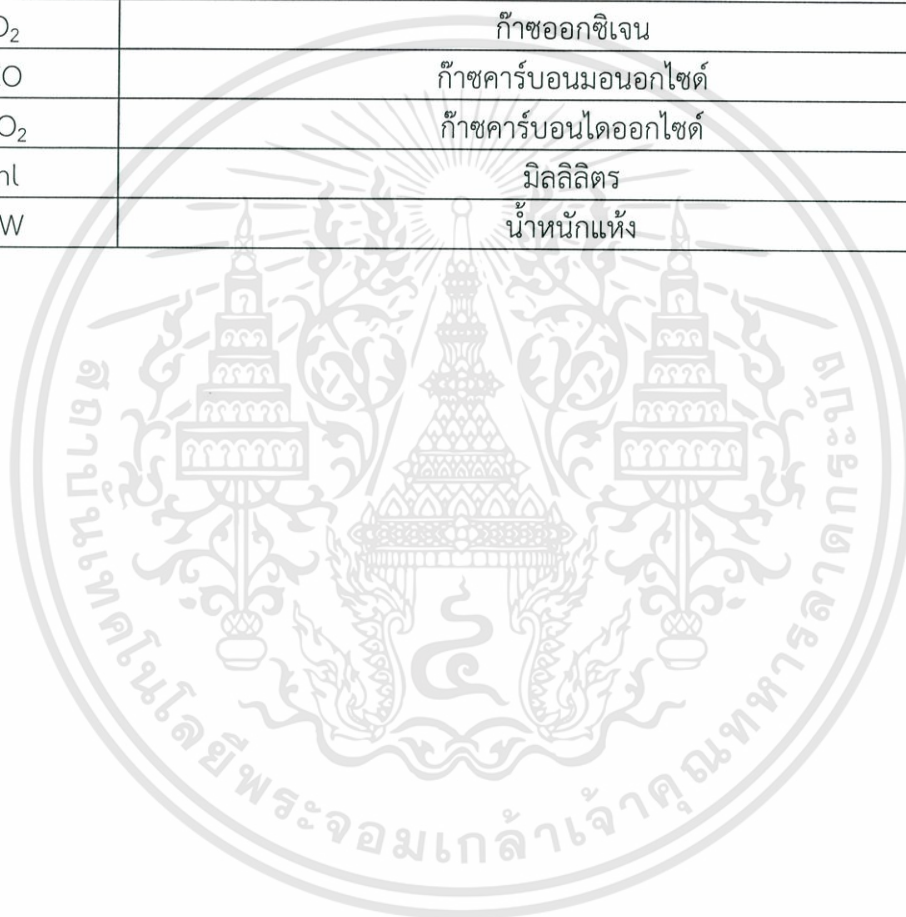
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงประโยชน์ของก๊าซไฮโดรเจน	5
2.2 ตัวอย่างเซลล์สาหร่ายสีเขียว.....	8
2.3 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง	10
2.4 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง.....	11
2.5 การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมแอลจีเนต.....	14
2.6 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i>	15
2.7 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	15
3.1 หลังจากนำอาหารวุ้นที่มีเชื้อสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ไปบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	21
4.1 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 – 1,000 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในระยะเวลาการบ่ม 7 วัน.....	28
4.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 – 400 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนครั้งที่ 1.....	29
4.3 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 – 400 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนครั้งที่ 2.....	29
4.4 ผลของความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 2,500 ลักซ์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	30
4.5 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 – 1,000 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นแสง 1,500 ลักซ์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	31
4.6 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตตั้งแต่ 500 -1,000 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นแสง 1,500 ลักซ์ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	33
4.7 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตตั้งแต่ 500 -1,000 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง.....	34
4.8 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตโดยการตรึงเซลล์สาหร่าย ด้วยแอลจีเนตบ่มที่ ความเข้มข้นแสง 1,500 ลักซ์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 แบบผลิตอย่างต่อเนื่อง โดยมีการนำเซลล์ซ้ำ.....	35
ข-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD ₇₃₀) กับน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง.....	43

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
TAP	อาหารTris Acetate Phosphate
TAP-S	อาหารTris Acetate Phosphate ที่ปราศจากซัลเฟต
μM	ไมโครโมลาร์
hr	ชั่วโมง
pH	ความเป็นกรดต่าง
H_2	ก๊าซไฮโดรเจน
O_2	ก๊าซออกซิเจน
CO	ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์
CO_2	ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
ml	มิลลิลิตร
DW	น้ำหนักแห้ง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พลังงานมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ในปัจจุบัน และมีความต้องการเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยส่วนใหญ่มนุษย์จะใช้พลังงานที่ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น ถ่านหินและน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งเชื้อเพลิงเหล่านี้ล้นแล้วแต่เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ใช้แล้วหมดไป นอกจากนั้นการใช้พลังงานเชื้อเพลิงจากฟอสซิลยังส่งผลให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย เช่น ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ก๊าซไนโตรเจนไดออกไซด์ และ ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งสารมลพิษเหล่านี้มักจะส่งผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิต อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศของโลก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของภูมิประเทศและภูมิอากาศของโลกได้อีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการก่อให้เกิดปรากฏการณ์ก๊าซเรือนกระจกซึ่งจะทำให้ชั้นบรรยากาศที่ห่อหุ้มโลกถูกทำลายลง และจะทำให้ให้อุณหภูมิโลกสูงเพิ่มมากขึ้น ดังนั้น จึงมีงานวิจัยต่างๆ ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับพลังงานทางเลือกใหม่ที่จะสามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานจากฟอสซิล โดยให้ประสิทธิภาพสูง ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการของมนุษย์ทั้งในปัจจุบันและในอนาคต เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานน้ำ พลังงานลม และ พลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น แต่เนื่องจากพลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานน้ำ และ พลังงานลม มีค่าใช้จ่ายในการผลิตที่ค่อนข้างสูง พลังงานไฮโดรเจน จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในปัจจุบัน

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากจัดเป็นพลังงานสะอาดให้พลังงานสูงซึ่งสามารถใช้ทดแทนพลังงานจากฟอสซิลได้ และได้ผลผลิตจากกระบวนการเผาไหม้คือน้ำเพียงชนิดเดียว ซึ่งล้วนแต่ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม การผลิตไฮโดรเจนมีด้วยกันหลากหลายวิธี เช่น วิธีการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ และวิธีการผลิตไฮโดรเจนทางกายภาพ เช่น การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า, วิธีการแยกสลายตัวด้วยความร้อน และกระบวนการเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง แต่วิธีการผลิตไฮโดรเจนทางกายภาพ มีต้นทุนที่ค่อนข้างสูง ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการทางชีวภาพ จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ โดยเฉพาะการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต จากการศึกษาพบว่า มีสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ เช่น ไชยาโนแบคทีเรีย แบคทีเรีย และ สาหร่ายสีเขียว ฯลฯ โดยแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการหมักเพื่อให้ได้โปรตอนและอิเล็กตรอนมากพอที่จะผลิตไฮโดรเจน ส่วนไชยาโนแบคทีเรียจะผลิตไฮโดรเจนและอิเล็กตรอน ด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับกับสาหร่ายสีเขียว ซึ่งใช้แสงและน้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิต นอกจากนั้น สิ่งมีชีวิตทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นยังสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักน้ำตาลได้อีกด้วย และพบว่า การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมีความได้เปรียบในด้านแง่เพาะเลี้ยง ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในสภาวะโฟโตออโตโทรปและโฟโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอเทอโรโทรป (สุรัตน์ดิพรและคณะ, 2555) และยังสามารถใช้พลังงานแสง ซึ่งเป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดเป็นแหล่งพลังงานได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการปรับสภาวะระบบเพื่อให้เกิดความเหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน เช่น การปรับสัดส่วนของอาหาร, การแปรผันความเข้มข้น, การแปรผันอุณหภูมิ และการตรึงเซลล์สาหร่าย เป็นต้น ซึ่งการปรับความเข้มข้นและการแปรผันอุณหภูมิ ต้องมีต้นทุนในการทำวิจัยค่อนข้างสูง และ ประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนเทียบเท่าได้กับ การปรับสภาวะอาหารและการตรึงเซลล์สาหร่าย ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ และมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน จากการศึกษาพบว่า การปรับสัดส่วนอาหารเลี้ยงสาหร่ายคู่กันกับการตรึงเซลล์สามารถทำได้ง่ายและมีประสิทธิภาพค่อนข้างสูง ซึ่งตรึงเซลล์สาหร่ายโดยใช้สารละลายโซเดียมแอลจีเนต โดยปรับสัดส่วนของอาหาร พบว่า การตรึงเซลล์สาหร่ายในอาหาร TAP (Tris-Acetate Phosphate) ที่ปราศจากซัลเฟต มีประสิทธิภาพสูงที่สุด (Anjana K., et al.2014) นอกจากนี้เพื่อลดต้นทุนและเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน ได้มีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้เซลล์สาหร่ายโดยเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ พบว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 4 รอบ โดยมีผลผลิตใกล้เคียงกัน (Jun Pyo Kim, et al. 2010) นอกจากนี้ นภิศาและคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารที่ช่วยในการค้ำจุนเซลล์ ซึ่งทำการทดลองกับเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 โดยใช้สารค้ำจุนเซลล์ทั้งสิ้น 2 ชนิด ได้แก่ Alginate salt และ Agar ผลการทดลองพบว่า Alginate ที่มีลักษณะเป็นเม็ดทรงกลมสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด

โครงการวิจัยที่ จึงได้มีความสนใจในการศึกษาการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารที่ปราศจากซัลเฟต (TAP-S) และแปรผันความเข้มข้นของแหล่งซัลเฟต และทำการตรึงเซลล์สาหร่ายโดยใช้แอลจีเนตผสมกับเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP-S ที่มีความเข้มข้นของแหล่งซัลเฟตที่เหมาะสม และเพิ่มจำนวนรอบของการผลิตไฮโดรเจน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาความเข้มข้นของซัลเฟตต่อการผลิตไฮโดรเจน จากสาหร่ายตรึง *Tetraspora* sp. CU2551
- 2) เพื่อศึกษาปริมาณไฮโดรเจนที่สามารถผลิตได้ โดยการตรึงเซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ในสภาวะความเข้มข้นของซัลเฟตที่เหมาะสม
- 3) เพื่อศึกษาจำนวนครั้งของการนำเซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 กลับมาใช้ใหม่

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ปรับสภาวะระบบโดยเลี้ยงสาหร่ายและแปรผันความเข้มข้นของแหล่งซัลเฟตช่วงระหว่าง 0 – 1000 ไมโครโมลาร์ ในอาหาร TAP-S Medium โดยใช้ TAP Medium เป็นตัวแปรควบคุม และวัดไฮโดรเจนเพื่อหาความเข้มข้นของซัลเฟตที่เหมาะสม
- 2) ตรีงเซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ด้วยร้อยละ 4 แอลจินेट โดยใช้น้ำสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP ปกติ น้ำสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด และ น้ำสาหร่ายที่เลี้ยงใน TAP-S
- 3) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ถูกตรีงโดยใช้อาหาร TAP, TAP-S ที่เติมความเข้มข้นของแหล่งซัลเฟตที่เหมาะสม และ TAP-S ในขวด Gas – tight vial
- 4) วัดไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายที่ถูกตรีงทั้ง 3 สภาวะ ทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography (GC) ด้วย Thermal Conductivity Detector (TCD) ยี่ห้อ HP8890 serie II (Japan)
- 5) นับจำนวนรอบการนำเซลล์สาหร่ายที่ถูกตรีงกลับมาใช้ใหม่

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์สาหร่ายได้สูงมากขึ้น โดยการปรับสภาวะของระบบให้เหมาะสม
- 2) ลดต้นทุนในการเตรียมเซลล์สาหร่ายใหม่ โดยการนำเซลล์สาหร่ายเดิมกลับมาใช้ใหม่
- 3) ได้องค์ความรู้ใหม่ ซึ่งสามารถนำไปใช้ต่อยอดในการศึกษาต่อไปได้ในอนาคต

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลังงานไฮโดรเจน

ในปัจจุบันการเจริญเติบโตของเมืองและการใช้พลังงานเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยพลังงานหลักเป็นพลังงานฟอสซิลที่มาจาก 3 แหล่งคือ น้ำมัน ถ่านหิน และ แก๊สธรรมชาติ ซึ่งการใช้พลังงานที่เพิ่มขึ้นนี้ ก่อให้เกิดปัญหาระดับชาติ 3 ประการ คือ ประการแรก ประเทศต่าง ๆ รวมทั้งประเทศไทย ต่างอยู่ในสภาพขาดความมั่นคงทางด้านพลังงาน (Energy security) เพราะไม่มีแหล่งพลังงานฟอสซิลทั้ง 3 ชนิดเป็นของตนเอง พลังงานถูกควบคุมโดยต่างประเทศ มีเพียง 8 ประเทศเท่านั้นเป็นเจ้าของปริมาณน้ำมันดิบ 81% ของโลก และ 6 ประเทศ เป็นเจ้าของ 70% ของแก๊สธรรมชาติสำรอง และอีก 8 ประเทศ มีปริมาณถ่านหินสำรองรวมกันถึง 89% ของโลก ประการที่สอง เกิดปัญหากระทบต่อการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจ (Economic development) เนื่องจากพลังงานฟอสซิลมีราคาสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และปัญหาประการที่สาม คือ การเกิดผลกระทบต่อการรักษาสิ่งแวดล้อมจากภาวะโลกร้อน (Environmental conservation) ที่เกิดจากแก๊สเรือนกระจกหรือแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นผลที่เกิดขึ้นจากการใช้พลังงานฟอสซิลอย่างมากมายในปัจจุบัน ดังนั้นทุกประเทศจึงจำเป็นต้องหันไปหาพลังงานชนิดอื่นๆ

การพัฒนาพลังงานทางเลือกและพลังงานทดแทนจึงเป็นสิ่งจำเป็นและมีเป้าหมายชัดเจน ไฮโดรเจนเป็นธาตุแรกในตารางธาตุ เป็นธาตุที่เบาที่สุดในโลก เนื่องจากเป็นธาตุเบาจึงสามารถลอยในอากาศได้อย่างรวดเร็วไม่มีสารตกค้าง ไม่มีกลิ่น ไม่มีสี เผาไหม้ได้ดี และมีความสะอาดสูง พลังงานไฮโดรเจนถือว่าเป็นเชื้อเพลิงในอนาคตสำหรับการเผาไหม้ที่มีประสิทธิภาพสูง สะอาด และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้เนื่องจากไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเกิดการเผาไหม้กับก๊าซออกซิเจน โดยจะมีเพียงไอน้ำเป็นผลพลอยได้ซึ่งแตกต่างจากเชื้อเพลิงอื่นๆที่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลพลอยได้ ซึ่งทำให้เกิดก๊าซเรือนกระจก (Greenhouse gas) ส่งผลกระทบต่อตรงต่อการทำให้อุณหภูมิโลกสูงขึ้น (Global warming) นอกจากนี้ยังสามารถนำก๊าซไฮโดรเจนไปผลิตกระแสไฟฟ้าโดยป้อนเข้าเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) ซึ่งขณะนี้นักวิจัยทั่วโลกให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เนื่องจากประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงมีค่าสูงกว่าอุปกรณ์ผลิตไฟฟ้าแบบอื่นๆมาก ดังนั้นพลังงานไฮโดรเจนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานดั้งเดิมได้ ประโยชน์ของพลังงานไฮโดรเจนในด้านต่างๆโดยสรุปดังนี้

1. พลังงานไฮโดรเจนไม่ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก ไม่ส่งผลกระทบต่อสภาพภูมิอากาศของโลก เนื่องจากเป็นพลังงานสะอาดและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
2. พลังงานไฮโดรเจนไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ ไม่มีการปล่อยควันหรือก๊าซใดๆทั้งสิ้น

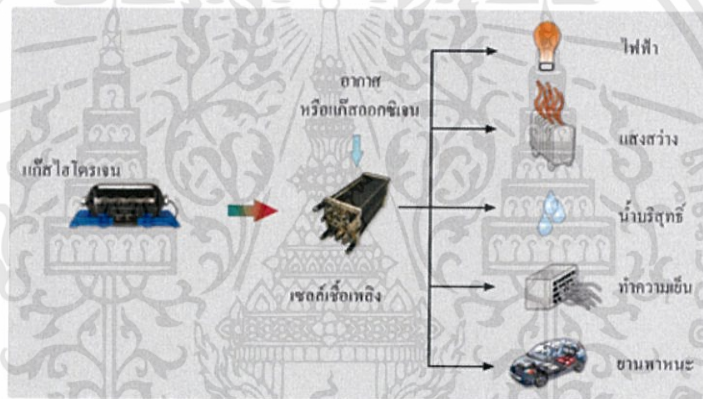
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. พลังงานไฮโดรเจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานที่ต้องใช้พลังงานดั้งเดิมได้ เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องบิน เครื่องยนต์สันดาปภายใน เครื่องกังหัน และเครื่องไอพ่น

4. ค่าพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากไฮโดรเจนจะมากกว่าค่าพลังงานเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอน และเชื้อเพลิงจากแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลและเอทานอลถึง 2.5 และ 5 เท่า ตามลำดับ

5. ก๊าซไฮโดรเจนสามารถนำไปใช้กับเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) ในการผลิตไฟฟ้า ซึ่งอยู่ระหว่างการพัฒนาและคาดว่าจะนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอนาคต

ดังที่ได้กล่าวไปข้างต้นถือว่าพลังงานไฮโดรเจนให้พลังงานสูงและสะอาดเมื่อเทียบกับพลังงานอื่นๆ ดังนั้นเมื่อใช้พลังงานไฮโดรเจนมาก คือ มีอะตอมคาร์บอนน้อยก็จะเกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์น้อยลงหรือไม่เกิดเลย ดังนั้นพลังงานไฮโดรเจนจึงเป็นที่จับตามองว่าจะสามารถเป็นพลังงานที่ยั่งยืนในอนาคตและลดปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อมได้ (ดังแสดงในรูป 2.1)



รูปที่ 2.1 แสดงประโยชน์ของก๊าซไฮโดรเจน

ที่มา : <http://kanchanapisek.or.th>

2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน

การผลิตไฮโดรเจนมีหลายวิธีสามารถพิจารณาได้จากวัตถุดิบที่นำมาใช้ ได้แก่ เชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น น้ำมัน ถ่านหินและก๊าซธรรมชาติ พลังงานหมุนเวียน และพลังงานนิวเคลียร์ เทคโนโลยีในการผลิตไฮโดรเจน สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 เทคโนโลยีหลัก ได้แก่ กระบวนการความร้อนเคมี (Thermo Chemical Process) กระบวนการไฟฟ้าเคมี (Electrolysis) และ กระบวนการทางชีวภาพ (Biochemical Processes)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 กระบวนการความร้อนเคมี (Thermo Chemical Process)

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี เป็นการให้ความร้อนในการเปลี่ยนมวลชีวภาพ ก๊าซธรรมชาติ หรือ ถ่านหิน ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซผสมที่ประกอบด้วยก๊าซไฮโดรเจน คาร์บอนมอนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำและมีเทน จากนั้น จึงทำการแยกไฮโดรเจนออกมาโดยใช้รูปแบบของการเผาไหม้ การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการความร้อนเคมีมีหลายกระบวนการ ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (Steam reforming) กระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification)

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ เป็นกระบวนการที่นิยมใช้กันแพร่หลายในเชิงพาณิชย์ เป็นกระบวนการส่งไอน้ำอุณหภูมิสูง ความดันสูงและตัวเร่งปฏิกิริยา เข้าทำปฏิกิริยากับสารไฮโดรคาร์บอนในเตาปฏิกรณ์ อุณหภูมิของไอน้ำจะใช้ประมาณ 700-1,000 องศาเซลเซียส และความดัน 3-25 บาร์ สารไฮโดรคาร์บอนที่นำมาใช้ในการทำปฏิกิริยา สามารถใช้ได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับแหล่งวัตถุดิบของแต่ละประเทศที่สามารถผลิตได้ เช่น ก๊าซธรรมชาติ ก๊าซชีวภาพ หรือเอทานอล ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจน ที่ดึงมาจากน้ำ และสารไฮโดรคาร์บอนส่วนออกซิเจน และคาร์บอนจะรวมตัวกันอยู่ในรูปก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์

ตัวอย่างปฏิกิริยาการรีฟอร์มมิ่งก๊าซธรรมชาติ (มีเทนเป็นส่วนประกอบหลัก) ด้วยไอน้ำอุณหภูมิสูง



กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่ง การรีฟอร์มมิ่งก๊าซธรรมชาติเป็นวิธีผลิตไฮโดรเจนที่นิยมใช้กันมากที่สุดในปัจจุบัน เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตต่ำ เมื่อเทียบกับการผลิตด้วยสารตั้งต้นอื่น

แก๊สซิฟิเคชัน (Gasification) เป็นเทคโนโลยีการแปรรูปชีวมวลให้เป็นพลังงานในรูปก๊าซเชื้อเพลิง (fuel gases) โดยอาศัยกระบวนการทางเคมี ความร้อนจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงในสภาวะจำกัดปริมาณอากาศ เมื่อให้ความร้อนแก่ชีวมวลร่วมกับเทคนิคการจำกัดปริมาณอากาศ หรือออกซิเจน (O₂) หรือไอน้ำ (steam) เพื่อให้เกิดสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนในสัดส่วนที่ต่ำกว่าปริมาณที่ทำให้เกิดการเผาไหม้เชื้อเพลิงอย่างสมบูรณ์ ทำให้ชีวมวลเกิดการแตกตัวเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ในรูปของแข็งและก๊าซ ซึ่งประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ก๊าซไฮโดรเจน (H₂) ก๊าซมีเทน (CH₄) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ก๊าซไนโตรเจน (N₂) และก๊าซอื่นๆ เรียกว่า producer gas

กระบวนการแก๊สซิฟิเคชันจากชีวมวลเป็นกระบวนการเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์ ดังนั้น ปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นจะมีความซับซ้อนและสามารถเกิดผลิตภัณฑ์หรือก๊าซหลายชนิดขึ้นอยู่กับลักษณะของชีวมวลและเทคนิคในการจำกัดปัจจัยต่างๆ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการนี้ไม่ได้มีเพียงแต่ก๊าซเชื้อเพลิงเท่านั้น ยังมีของแข็งและสิ่งเจือปนที่ไม่สามารถเผาไหม้ได้หมด ได้แก่ ถ่านชาร์ (char) เถ้า (ash) น้ำมันดิน (tar) และไอน้ำ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 กระบวนการไฟฟ้าเคมี (Electrolysis)

เป็นการใช้ไฟฟ้าเพื่อแยกน้ำเพื่อให้ได้ไฮโดรเจน และออกซิเจน การให้ไฟฟ้ากระแสตรงที่ขั้วไฟฟ้าของเซลล์เคมีไฟฟ้าเพื่อให้ไอออนในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เคลื่อนที่ไปเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วไฟฟ้า ปฏิกิริยาเคมีเกิดเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation Reaction) หรือ รีดักชัน (Reduction Reaction) ในทิศทางที่ไม่สามารถเกิดเองได้ถ้าไม่ให้กระแสไฟฟ้า โดยกระแสไฟฟ้าที่ให้จะต้องให้มากกว่าค่าโวลต์มาตรฐานที่ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้น เช่น การแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้าจะต้องใช้ค่าโวลต์ที่สูงกว่า 1.229 โวลต์ ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า

ขั้วแคโทด



ขั้วแอโนด



ข้อดีของการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากวิธีนี้将有ความบริสุทธิ์สูง ข้อเสีย คือค่าใช้จ่ายด้านกระแสไฟฟ้าสูงการผลิตไฮโดรเจนให้พอเพียงจากกระบวนการนี้ต้องใช้พลังงานไฟฟ้าปริมาณมาก ซึ่งอาจนำมาจากพลังงานนิวเคลียร์ และพลังงานหมุนเวียนอื่น ๆ เช่น พลังงานลม น้ำ พลังงานแสงอาทิตย์และพลังงานชีวภาพต่างๆ

2.2.3 กระบวนการชีวเคมี (Biochemical Processes)

กระบวนการนี้เป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจน ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว ไชยาโนแบคทีเรีย และแบคทีเรีย

ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจน แก๊สไฮโดรเจนที่ได้จากกระบวนการผลิตนี้เรียกว่า ไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen)

สาหร่ายสีเขียว ไชยาโนแบคทีเรีย และแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ โดยเฉพาะสาหร่ายสีเขียวจะมีลักษณะที่แตกต่างจากพืชชนิดอื่น เพราะสาหร่ายสีเขียวสามารถนำพลังงานจากแสงอาทิตย์มาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็วกว่าพืชชนิดอื่น นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงยังสามารถทำในพื้นที่ที่กำจัดไม่มีผลกระทบต่อพื้นที่การเกษตร มีการเลี้ยงดูที่ง่ายและไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย อีกทั้งยังให้ผลพลอยได้มูลค่าสูง เช่น ผลพลอยได้ที่ใช้เป็นปุ๋ย อาหารสัตว์ สารปฏิชีวนะ เครื่องสำอาง หรือแม้แต่ใช้เป็นยารักษาโรค จึงกล่าวได้ว่าสาหร่ายสีเขียวเป็นพืชที่ใช้ผลิตแก๊สไบโอไฮโดรเจนประสิทธิภาพสูงและในระหว่างกระบวนการผลิตนั้นไม่มีการปล่อยแก๊สเรือนกระจกออกสู่ภายนอกเลย

2.3 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตแบบยูคาริโอต สามารถสร้างอาหารได้เองโดยการสังเคราะห์แสง มีคลอโรพลาสต์ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ a และ b พบทั้งในน้ำจืด น้ำทะเล น้ำกร่อย และที่ชื้นแฉะ สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างหลายแบบ มีทั้งเซลล์เดี่ยว (unicell) โคลน (colony) และเส้นสาย (filament) พวกที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคลนมีทั้งที่เคลื่อนไหวได้และไม่ได้ พวกที่เป็นเส้นสายมีทั้งที่แตกแขนงและไม่แตกแขนง สาหร่ายสีเขียวมีนิวเคลียส 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 พวกที่มีหนวดจะมีออร์แกเนลล์ที่มีสีเขียวเรียกว่า ตา (eye spot or stigma) ทำหน้าที่รับแสงแล้วส่งไปยังหนวด สารสีจะอยู่ในคลอโรพลาสต์ซึ่งมีหลายแบบเช่น cup-shape (รูปถ้วย) girdle-shape (รูปเกือกม้า) reticulate (เป็นตาข่าย) spiral (ขดเป็นเกลียว) stellate (แฉกรูปดาว) และ band-shape (เป็นแถบ) และผนังเซลล์ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น ชั้นในเป็นพวกเซลล์ูโลส ชั้นนอกเป็นพวกเพคติน บางชนิดเช่น Volvox เป็นโคลน ไม่มีเซลล์ูโลส มีแต่เพคติน Desmids สามารถผลิตสารเมือก (mucilaginous substances) มาห่อหุ้มเซลล์หนวด พบเฉพาะพวกที่เคลื่อนไหวได้มีจำนวน 1, 2, 4, 8 เส้น หรือเป็นวงรอบเซลล์ มีลักษณะคล้ายไส้ (acronematic) ถ้ามีหนวดมากกว่า 2 เส้น ความยาวหนวดจะเท่ากัน ตำแหน่งของหนวดมี 2 ตำแหน่งคือ apical และ subapical cell อาหารสะสม ส่วนใหญ่คือแป้ง amylose และ amylopectin สะสมอยู่ใน pyrenoid ซึ่งอยู่บนคลอโรพลาสต์ ที่เหลือจะสะสมอาหารอยู่ในรูปน้ำมันและกลีเซอรอล (ดังแสดงในรูป 2.2) นอกจากนี้แล้วสาหร่ายสีเขียวยังมีความสามารถผลิตไฮโดรเจนได้เมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่นๆ



รูปที่ 2.2 ตัวอย่างเซลล์สาหร่ายสีเขียว
ที่มา : ธนพล กลิ่นเมืองและคณะ (2553)

2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

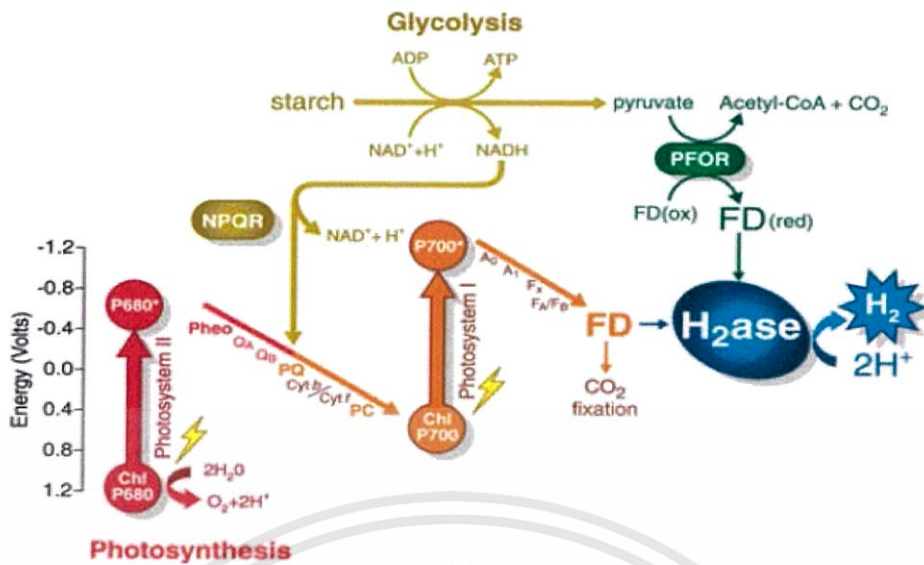
สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยสามารถใช้แสงและน้ำในการผลิตไฮโดรเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ซึ่งจะประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิด คือ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี ที่ทำงานร่วมกัน จากนั้นจึงส่งต่อพลังงานแสงเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center) ซึ่งอยู่ภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ เมื่อโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ได้รับพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้นและจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เมื่อมีพลังงานในรูปของแสงตกกระทบในบริเวณระบบแสง 2 (PSII) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ระบบแสง 2 จะถูกกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ควิโนน ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน หลังจากนั้นน้ำจะมีการแตกตัวออกได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสง 2 ไปแทนที่อิเล็กตรอนในคลอโรฟิลล์ที่มีการสูญเสียไปในระบบ จากนั้นอิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนนจะถูกส่งต่อไปยังไซโตโครม บี ไซโตโครม เอฟ พลาสโตไซยานิน และเข้าไปยังระบบแสง 1 (PSI) ซึ่งประกอบไปด้วย หน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อระบบแสง 1 ถูกกระตุ้นก็จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนมากระตุ้นคลอโรฟิลล์ภายในระบบแสง 1 คลอโรฟิลล์จะปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซิน จะไปรวมกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำโดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.3

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนให้เปลี่ยนเป็นไฮโดรเจน (bidirectional หรือ reversible hydrogenase) และเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนให้เป็นโปรตอน (unidirectional หรือ uptake hydrogenase)

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถแบ่งออกตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้ 3 ชนิด ดังนี้

1. ไฮโดรจีเนสที่อยู่ในโมเลกุลประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (Ni-Fe hydrogenase)
2. ไฮโดรจีเนสที่อยู่ในโมเลกุลประกอบด้วยเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์เท่านั้น (Fe hydrogenase)
3. ไฮโดรจีเนสที่ไม่พบโลหะใดเป็นองค์ประกอบในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (Metal-free hydrogenase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

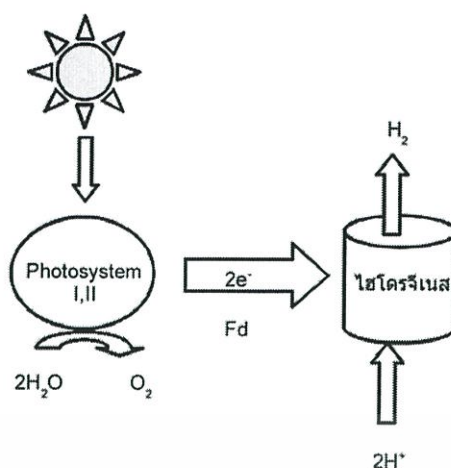
ที่มา : Posewitz (2009)

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการหลัก ดังนี้

2.4.1 กระบวนการใช้แสง (light-driven process) แบ่งออกเป็น 2 วิธีย่อย คือ

1. กระบวนการแยกด้วยแสงแบบทางตรง (direct biophotolysis)

การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกด้วยแสงแบบทางตรง เป็นกระบวนการที่ในระบบแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เช่น สาหร่ายสีเขียว เพื่อแยกน้ำโดยการดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์โดยตรงให้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน โดยที่ระบบแสงที่ 1 (photosystem I, PSI) และระบบแสงที่ 2 (photosystem II, PSII) ทั้งสองระบบนี้สามารถที่จะเปลี่ยนพลังงานแสงอาทิตย์มาเป็นพลังงานเคมีได้ โดยจะทำการดูดซับ พลังงานแสงอาทิตย์ทำให้น้ำแตกตัวเป็นออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังเฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin, FDX) เฟอร์รีดอกซินที่ถูกรีดิวซ์จะส่งอิเล็กตรอนให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อสร้างไฮโดรเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง
ที่มา : วารสารศูนย์บริการวิชาการ (2553)

หลังจากนั้นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสก็จะทำการรวมอิเล็กตรอนและโปรตอนที่ได้รับจาก ระบบแสงที่ 2 และปลดปล่อยโมเลกุลไฮโดรเจน ดังแสดงในสมการที่ (1)



แต่เนื่องจากออกซิเจนมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่สะสมจากการแยกโมเลกุลของน้ำที่ระบบแสงที่ 2 จึงมีความจำเป็นต้องรักษาระดับออกซิเจน เพื่อให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างยั่งยืน

2. กระบวนการแยกด้วยแสงแบบทางอ้อม (indirect biophotolysis)

การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกด้วยแสงแบบทางอ้อม มักจะพบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งมีคุณสมบัติในการใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนที่แยกออกจากกัน

โดยการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้สามารถแก้ปัญหาออกซิเจนที่มายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจนได้ เนื่องจากกระบวนการในการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนจะแยกออกจากกัน โดยในขั้นตอนที่ 1 สาหร่ายจะใช้พลังงานแสงอาทิตย์ผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในระบบแสงที่ 1 และระบบแสงที่ 2 ร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตเก็บสะสมเป็นชีวมวลของสาหร่าย และในขั้นตอนที่ 2 ชีวมวลของสาหร่ายก็จะถูกนำไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจน

2.4.2 กระบวนการแบบไม่ใช้แสง (non light-driven process)

การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงจะเกิดในแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ ซึ่งมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และสามารถใช้สารตั้งต้นพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลกลูโคส ซีววมล ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ของเสียจากการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรม ในสภาวะไม่ใช้แสงเพื่อการผลิตไฮโดรเจน และมีผลพลอยได้เป็นสารอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ อย่างไรก็ตามการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้ยังคงให้ปริมาณไฮโดรเจนน้อยกว่ากระบวนการแบบใช้แสง

2.5 การตรึงเซลล์ (Immobilization)

การตรึง (Immobilization) เป็นการนำเอาเซลล์มายึดติดกับวัสดุใดๆ เพื่อเพิ่มความทนทานของเซลล์ในการนำไปใช้งาน อีกทั้งยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ช่วยลดต้นทุนในกระบวนการผลิตที่ต้องอาศัยการทำงานของเซลล์ นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้ยังมีการปนเปื้อนที่น้อยลงเนื่องจากไม่มีโปรตีนของเซลล์ละลายอยู่ในสารละลายนั้น การตรึงเซลล์ยังสามารถควบคุมกระบวนการได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถเพิ่มหรือลดอัตราการเร็วของการผลิต โดยการแยกเอาเซลล์ออกซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกได้ทันที และยังช่วยให้การทำปฏิกิริยาต่อเนื่องหลายๆขั้นตอนทำได้ง่าย โดยการปล่อยให้สารละลายปฏิกิริยาผ่านเข้าสู่ระบบการตรึงเซลล์ต่างๆ ไปทีละขั้นตอนได้ วิธีการตรึงเซลล์แบ่งออกเป็น 3 วิธีการคือ การยึดด้วยตัวนำ การเชื่อมแบบไขว้ และการห่อหุ้ม

2.5.1 การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method)

คือ การเชื่อมจุลินทรีย์โดยตรงกับตัวนำที่ไม่ละลายน้ำ สามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีย่อย ได้ดังนี้

Adsorption method เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยใช้เซลล์ดูดซับอยู่กับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไอออนิก พันธะไฮโดรโฟบิก หรือพันธะไฮโดรเจน โดยอาศัยหลักธรรมชาติทางเคมี โดยแรงดูดซับนี้ขึ้นอยู่กับขนาดและอายุของเซลล์ รวมทั้งปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่การดูดซับค่อนข้างอ่อน และมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH, ionic strength การไหลของน้ำ การเกิดฟองอากาศ และเมื่อมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะกับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการผลผลิตที่ปราศจากการปนเปื้อนของเซลล์

Covalent binding method เป็นวิธีที่นิยมในการตรึงเอนไซม์ เนื่องจากได้ผลดี แต่ไม่นิยมในการตรึงเซลล์เพราะต้องใช้สารเคมีซึ่งมักเป็นพิษต่อเซลล์ อาจทำให้เซลล์ตายและเอนไซม์ถูกทำลายได้

2.5.2 การเชื่อมแบบไขว้ (Cross-linking method)

คือ การเชื่อมจุลินทรีย์เข้าด้วยกันโดยใช้สารพวก multifunctional reagent เช่น glutaraldehyde และ toluene diisocyanate การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะต่างจากการตรึงวิธีอื่นๆ คือ เซลล์จะไม่ได้ถูกตรึงอยู่กับสารที่เป็นตัวดูดซับหรือถูกห่อหุ้ม แต่เป็นการเชื่อมเข้าด้วยกันด้วยสารเคมี ภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง ซึ่งอาจทำให้เซลล์ตายได้ วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับกรณีที่ต้องการใช้ปฏิกิริยาเชิงเดี่ยวเท่านั้น

2.5.3 การห่อหุ้ม (Entrapping method) แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

Semi-permeable membrane คือ การห่อหุ้มด้วยคอลโลอิดียน (collodian) หรือ ซิลิโคน (silicone) สามารถป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้ แต่จะยอมให้ substrates หรือ ผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ การตรึงด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่จะไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ในอุตสาหกรรม และอาจมีปัญหาการตกตะกอนของเซลล์ที่เกิดขึ้นด้วย

Lattices type คือ การตรึงเซลล์ด้วยกานห่อหุ้มเซลล์ไว้ภายในเจลของสารพวกโพลีเมอร์ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมาก เนื่องจากสามารถใช้ได้กับเซลล์ทุกชนิด สารที่นิยมนำมาใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ โพลีอะคริลิไมด์ คาร์ราจีแนน และแคลเซียมแอลจีเนต

การตรึงเซลล์ด้วยโพลีอะคริลิไมด์

เป็นการนำเซลล์มาผสมในสารละลายอะคริลิไมด์โมโนเมอร์ แล้วทำให้เกิดโพลีเมอร์ไรซ์ โดยใช้ N,N'-methylenebisacrylamine เป็นตัวช่วยทำให้เกิดการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลของอะคริลิไมด์ ใช้โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต หรือ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เพื่อทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ในการเกิดโพลีเมอร์ไรซ์ β -dimethylaminopropionitrile หรือ TEMED (N,N'-tetramethylethylenediamine) เป็นตัวเร่ง โพลีอะคริลิไมด์เจลจะมีขนาดของรูภายในเจลและความแข็งแรงของเจลแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโพลีอะคริลิไมด์โมโนเมอร์และปริมาณเซลล์ที่ใช้ ข้อเสียของวิธีนี้ คือ สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจลรวมทั้งอะคริลิไมด์ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ดังนั้นต้องใช้เวลาที่เซลล์และสารเคมีสัมผัสกันให้สั้นที่สุด และในระหว่างการโพลีเมอร์ไรซ์จะมีความร้อนเกิดขึ้นซึ่งจะมีผลต่อเซลล์ ดังนั้นการโพลีเมอร์ไรซ์ควรทำที่อุณหภูมิต่ำ

การตรึงเซลล์ด้วยคาร์ราจีแนน

คาร์ราจีแนน (Carrageenan) เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายทะเล มีคุณสมบัติในการดูดน้ำและแขวนลอยในน้ำ การตรึงเซลล์ด้วยคาร์ราจีแนน ทำได้โดยใช้ความร้อนประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้คาร์ราจีแนนละลาย จากนั้นผสมซัสเพนชัน ของเซลล์ลงไป ที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส แล้วใส่ลงในสารละลายเกลือโพแทสเซียม หรือ เกลือแอมโมเนียม ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส จะได้เจลเกิดขึ้น ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว ปลอดภัย และในการตรึงไม่มีการใช้สารเคมีที่เป็นพิษ จึงทำให้ไม่เกิดความเสียหายต่อเซลล์ และยังสามารถเปลี่ยนรูปร่างได้เพื่อให้เกิดความเหมาะสมกับการใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมแอลจีเนต

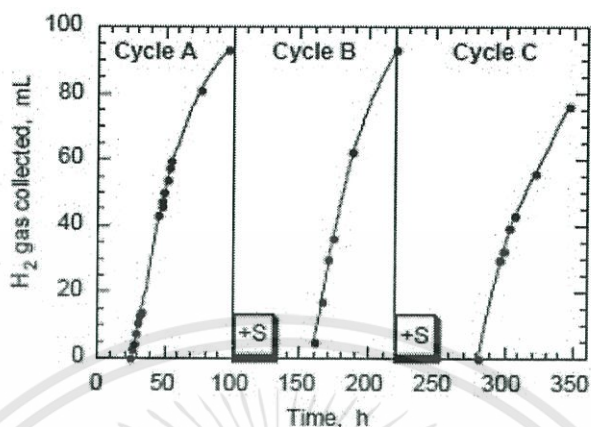
แอลจีเนต (Alginate) เป็นสารที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล แอลจีเนตเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีชีวิตมากที่สุด มักจะอยู่ในรูปอนุพันธ์ของเกลือ Ca^{2+} , K^+ , Na^+ และ NH_4^+ แต่ส่วนใหญ่มักพบในรูปของ โซเดียมแอลจีเนต สามารถทำได้โดยผสมเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมแอลจีเนต แล้วนำมาหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะเกิดแคลเซียมแอลจีเนตขึ้น จากนั้นแช่เจลไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เกิดเจลอย่างสมบูรณ์ การตรึงเซลล์ด้วยแอลจีเนตสามารถช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ภายในเม็ดแอลจีเนต เพิ่มการผลิตไฮโดรเจน และขยายระยะเวลาในการผลิตไฮโดรเจนให้ได้นานขึ้น การตรึงเซลล์ด้วยแอลจีเนตสามารถทำได้โดยการการผสมเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมแอลจีเนต แล้วทำการหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ด้วยกระบอกฉีดยา ดังแสดงในรูปที่ 2.5



2.6 การนำเซลล์สาหร่ายสีเขียวเพื่อผลิตไฮโดรเจนกลับมาใช้ซ้ำ

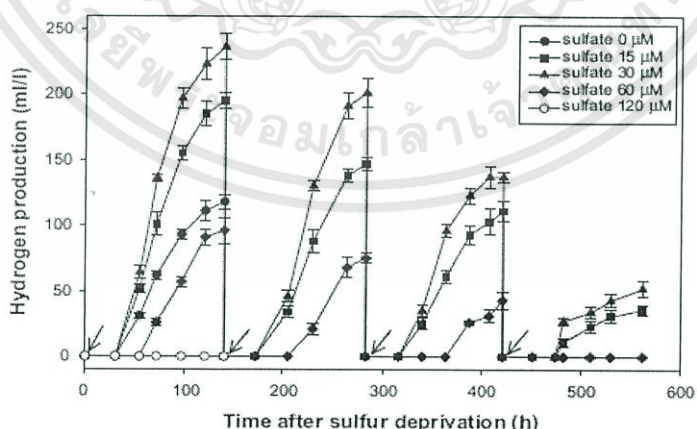
การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวสามารถนำเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนแล้วมาผลิตไฮโดรเจนใหม่ แต่การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้เพียงช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น และจะหยุดการผลิตไฮโดรเจน การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวได้มีรายงานวิจัย พบว่าเป็นแบบวัฏจักรที่มีกระบวนการเปลี่ยนโหมดระหว่าง stage I ในสถานะที่มีซัลเฟตและ stage II ในสถานะปราศจากซัลเฟต พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สามารถผลิตไฮโดรเจนเป็นวัฏจักรได้สูงที่สุด 3 รอบ นั่นคือวัฏจักร A, B และ C ที่ 100 ชั่วโมงของวัฏจักร A และที่ 160 ชั่วโมงของวัฏจักร B การผลิตไฮโดรเจนจะยุติลง ดังรูปที่ 2.6 จากนั้นเซลล์จะเข้าสู่โหมด

stage I โดยนำเซลล์จากอาหารที่ปราศจากซัลเฟตถ่ายโอนไปยังอาหารที่มีซัลเฟต ดังนั้น ที่เวลา 100 – 130 ชั่วโมง และที่ 160 – 220 ชั่วโมง จะไม่มีการผลิตไฮโดรเจน (Melis *et al.*, 2007)



รูปที่ 2.6 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii*
ที่มา : Ghiradi *et al.* (2000)

นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยได้ทำการทดลองการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* จากนั้นควบคุมสภาวะให้ปราศจากซัลเฟต และพ้นแก๊สอาร์กอน จากนั้นตรวจสอบการผลิตไฮโดรเจนซ้ำ พบว่าหากไม่มีซัลเฟตจะทำให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้เป็นวัฏจักรถึง 4 รอบและค่อยๆลดลงเรื่อยๆจนหยุดผลิตไฮโดรเจน (Jun Pyo Kima *et al.* 2010) ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*
ที่มา : Jun Pyo Kima *et al.*(2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Maneeruttanarungroj และคณะ (2010) กล่าวว่าไว้วาพบสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้นำมาคัดเลือกจากบ่อน้ำจืดในจังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง สาหร่ายนี้ถูกระบุว่าอยู่ในกลุ่ม *Tetraspora* สาหร่ายนี้มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายเซลล์เดี่ยว เนื่องจากมีผลการยืนยันจากการหาลำดับเบสดีเอ็นเอของยีนส์ 18s rDNA ซึ่งตั้งชื่อว่า *Tetraspora* sp. CU2551 มีระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าสั้นที่สุดเมื่อเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ภายใต้ความเข้มแสงที่ $48-92 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส การผลิตไฮโดรเจนจะเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชเพิ่มจากพีเอช 5.75-9.30 และผลิตได้ต่ำสุดที่ 5.25 ดังนั้น จึงต้องเติม 0.5 mM β -mercaptoethanol ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้กระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนได้ประมาณสองเท่า นอกจากนี้หากในอาหารเลี้ยงเชื้อขาดไนโตรเจนและซัลเฟอร์ จะทำให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 50% จากผลนี้ถ้าขาดแหล่งไนโตรเจนหรือซัลเฟอร์เพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่งจะส่งผลให้เซลล์ผลิตก๊าซในอัตราเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย การกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนด้วย 0.5 mM β -mercaptoethanol ภายใต้เงื่อนไขการขาดทั้งแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์จะเกิดขึ้นเมื่อความเข้มแสงไม่เกิน $5 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ จากการคำนวณได้ค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนประมาณ $17.3-61.7 \mu\text{mol}/\text{mg Chl a}/\text{h}$ ซึ่งถือว่าสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับสาหร่ายอื่นๆ ดังนั้นสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551จึงเป็นที่สนใจในการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีชีวภาพที่ใช้แสง

สุรัตน์ดิพรและคณะ (2554) กล่าวว่าการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมีความได้เปรียบในแง่ของการเพาะเลี้ยงที่สามารถทำได้ง่ายทั้งในสภาวะโฟโตออโตโทป และสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทป โดยสามารถเลือกใช้คาร์บอนไดออกไซด์หรือสารประกอบอินทรีย์มาเป็นแหล่งคาร์บอนได้ นอกจากนี้ยังใช้พลังงานแสงที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดเป็นแหล่งพลังงานได้ทำการศึกษาผลการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศพบว่าภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นปริมาณไฮโดรเจนจะลดลง และได้ทำการแปรผันความเข้มข้นของซัลเฟตในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟต ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0 – 1.55 ไมโครโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0 มิลลิโมลาร์ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงสุดคือ 0.401 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

ศศิธรและคณะ (2550) กล่าวว่าการใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพโดยอาศัยวิธีการตรึง หรือ Immobilization เป็นการนำเอนไซม์หรือเซลล์มายึดติดไว้กับวัสดุใดๆ เพื่อเพิ่มความทนทานของเอนไซม์หรือเซลล์ในการใช้งาน อีกทั้งให้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้เหมือนอย่างกับเอนไซม์หรือเซลล์เดิม ข้อดีของวิธีการนี้คือช่วยในกระบวนการผลิตทำยุ่งยากและราคาแพง ช่วยให้สามารถต้นทุนการผลิตกระบวนการใดๆ นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้ยังมีการปนเปื้อนน้อยลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jun Pyo Kim *et al.* (2010) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเติมซัลเฟตโดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ที่ปราศจากซัลเฟตโดยทำการนำสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* มาเลี้ยงใน TAP-S medium จากนั้น ทำการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งซัลเฟต โดยใช้ซัลเฟตในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นของซัลเฟตเท่ากับ 0, 5, 30, 60 และ 120 μM ผลการทดลองพบว่า การเติมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 30 μM สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 605 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร

Anjana *et al.* (2014) ได้ศึกษาการตรึงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya perelegans* ภายใต้สภาวะมีอากาศ โดยใช้ agar และ alginate พบว่าการตรึงด้วย agar ขนาด 1.0 มิลลิกรัมบาศก์เมตรและ alginate เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 มิลลิเมตร สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด และพบว่าการตรึงเซลล์สาหร่ายที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ของเม็ด alginate มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่า agar

Touloutakis *et al.* (2016) ได้ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากการตรึง *synechocystis* sp. PCC 6803 พบว่าการตรึงเซลล์โดยใช้ 3 % แอลจิเนตสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุดเท่ากับ 5.73 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์ หรือ 40.6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Chl a/h ที่เส้นผ่าศูนย์กลาง 5.06 มิลลิเมตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 46.3 ไมโครกรัม

นภิศาและคณะ (2559) ได้ทำการทดลองนำสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ไปตรึงด้วยสารตรึงเซลล์ 2 ชนิด คือ แอลจิเนตและเอ็กัว โดยทำการขึ้นรูปเป็น 3 ลักษณะ คือ ทรงกลม, สีเหลี่ยม และ เป็นแผ่นฟิล์ม ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายที่ตรึงด้วย แอลจิเนตที่มีลักษณะเป็นทรงกลมสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด คิดเป็น 1.96 $\mu\text{mol H}_2/\text{mg DW}/\text{hr}$

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์ที่ใช้คือ *Tetraspora* sp. CU2551 ซึ่งถูกคัดแยกโดย เชิดศักดิ์และคณะ (2554)

3.2 อาหารใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์

3.2.1 อาหาร TAP (Tris-Acetate Phosphate medium) (ภาพผนวก ก)

3.2.2 อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารซัลเฟต หรือ TAP – S (ภาพผนวก ก)

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base)
2. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)
3. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
5. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
6. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
7. โซเดียม อีดีทีเอไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
8. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
9. กรดบอริก (H_3BO_3)
10. แมกนีเซียมคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
11. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
12. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. คอปเปอร์(II)ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
14. แอมโมเนียมโมลิบเดต ($\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
15. กรดอะซิติก (CH_3COOH)
16. ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2)
17. แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
18. เฟอริกคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
19. คอปเปอร์ (II)คลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
20. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)
21. เอ้ก้า (Agar)

3.3.2 สารเคมีสำหรับการตรึงเซลล์

1. โซเดียมแอลจิเนต
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต

3.3.3 ก๊าซมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

1. ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4% ในอาร์กอน
2. อาร์กอน 99.999%

3.3.4 ยาสำหรับยับยั้งการเกิดแบคทีเรีย

1. แอมพลิซิลลิน (Amplcillin Sodium Salt)

3.3.5 สารเคมีที่ใช้ในการแปรผันความเข้มข้นของซัลเฟต

1. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)

3.4.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิและความเข้มแสง (Shaking Incubator)
- 3.4.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar)
- 3.4.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.4.6 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance)
- 3.4.7 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.4.8 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)
- 3.4.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible spectrophotometer)
- 3.4.10 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- 3.4.11 เข็มเขี่ยเชื้อแบบกลม (Loop)
- 3.4.12 ตะแกรงร่อนเบอร์ 2.80-3.30 มิลลิเมตร (Sieve)
- 3.4.13 ไมโครเวฟ (Microwave)
- 3.4.14 คิวเวต (Cuvette)
- 3.4.15 ขวดแก้ว (Gas-tight vial) ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 3.4.16 จุกยางครอบฝาอะลูมิเนียม (Flip Aluminium)
- 3.4.17 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatography) (HP 5890 II, Japan)
- 3.4.18 กระบอกฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร (Syringe)
- 3.4.19 เข็มฉีดยาเบอร์ 18G และ 21G (Needle)

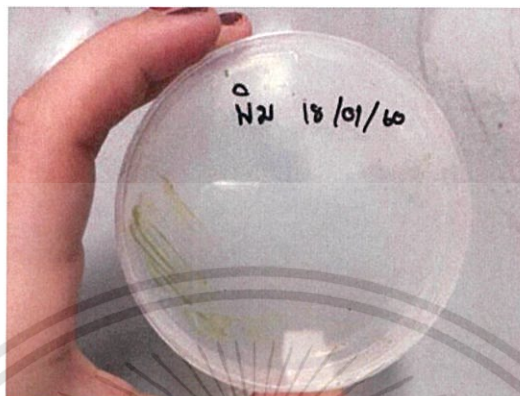
3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

3.5.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารรุ้น

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารรุ้นนั้น ทำโดยเทคนิค Steak plate โดยใช้วิธี Cross Steak plate ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ซึ่งทำได้โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) ไปแตะที่เซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 แล้วลากหรือขีดลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารรุ้นบรรจุอยู่ในแนวระนาบ 4-5 เส้นติดต่อกัน โดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สองจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง จึงจะสามารถนำไปถ่ายเชื้อจากอาหารรุ้นไปยังอาหารใหม่เพื่อทำการทดลองต่อไป และทุกขั้นตอนในการทำเทคนิค Steak Plate จำเป็นต้องทำภายในตู้ถ่ายเชื้อ เพื่อเป็นการป้องกันเชื้อแบคทีเรียลงสู่อาหารรุ้น



รูปที่ 3.1 หลังจากนำอาหารรุ้นที่มีเชื้อสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ไปบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.2 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว

การเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวในขั้นตอนนี้จะเรียกว่า Starter ซึ่งจะเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นสำหรับการผลิตไฮโดรเจน ทุกขั้นตอนจำเป็นต้องทำในตู้ถ่ายเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปิดจุกสำลี เริ่มจากการเปิดจุกสำลีและนำบริเวณปากขวดรูปชมพู่ไปเผาไฟ จากนั้นนำอาหารเหลว TAP ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และเติมยาแอมพลิซิลลิน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำห่วงเช็ชไปเผาไฟจนลวดบริเวณปลายห้วงร้อนแดง และนำออกมารอให้เย็นลง จากนั้นใช้ห่วงเช็ชเชื้อ เชื้อสาหร่ายสีเขียวบนอาหารรุ้นที่บ่มในหัวข้อที่ 3.5.1 และนำไปจุ่มลงในอาหารเหลว TAP ที่เตรียมไว้ ทำการปิดจุกสำลีให้แน่น และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อได้ Starter แล้ว จะทำการวัดค่าความขุ่นให้ได้เซลล์เริ่มต้นที่ต้องการเป็น 0.1 โดยปิเปตน้ำสาหร่ายจาก Starter มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 730 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าความขุ่นที่ได้จาก Starter ไปคำนวณหาปริมาตรที่ต้องการโดยวิธีการเทียบบัญญัติไตรยางค์ จากนั้นปิเปตปริมาตรที่ต้องการจาก Starter ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP บรรจุอยู่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

3.6.1 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 แบบอิสระเพื่อศึกษาปริมาณไฮโดรเจน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวตามหัวข้อที่ 3.5.2 แล้วจากนั้นนำสาหร่ายสีเขียวมาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยอาหาร TAP และทำการกระจายเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด gas-tight vial ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการปิดจุกยางและครอบฝาอลูมิเนียมให้เรียบร้อย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส จากนั้นนำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) เทียบกับก๊าซมาตรฐาน (ภาพผนวก ค) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ แสดงในตารางที่ 3.1

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

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

3.6.2 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของไซโตเคมิคัลที่ผสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 แบบอิสระ

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดังหัวข้อที่ 3.5.2 จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000x g เป็นเวลา 2 นาที และทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยอาหาร TAP จากนั้นนำไปเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยการปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าความขุ่นที่ได้ไปคำนวณหาปริมาตรที่ต้องการโดยใช้วิธีการเทียบบัญญัติโดรยางค์ จากนั้นปิเปตปริมาตรที่ต้องการจากน้ำสาหร่ายใส่ลงในบีกเกอร์ ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร TAP บรรจุอยู่ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งจะใช้เป็นตัวแปรควบคุม จากนั้น ปิเปตน้ำสาหร่ายปริมาตรเท่าเดิมใส่ลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปีเกอร์ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร TAP – S บรรจุอยู่ 400 มิลลิลิตร ขั้นตอนนี้จะเป็นการปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นให้กลายเป็น 0.2 จากนั้น นำน้ำสาหร่ายที่อยู่ในอาหาร TAP ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด gas-tight vial ปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ และทำเช่นเดียวกันกับน้ำสาหร่ายที่อยู่ในอาหาร TAP-S แต่จะทำการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตให้เท่ากับ 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นทำการปิดจุกยางและครอบฝาอลูมิเนียมให้แน่น และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส จากนั้นนำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatograph) เทียบกับก๊าซมาตรฐาน (ภาพผนวก ค) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแสดงในตารางที่ 3.1 ทุก 24 ชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด และทำการวัดค่าความเป็นกรดต่างหลังการบ่มเพื่อการศึกษาเพิ่มเติม

3.6.3 วิธีการศึกษาความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวตามหัวข้อที่ 3.5.2 แล้วจากนั้นนำสาหร่ายสีเขียวมาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้น ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP และ TAP-S จากนั้นนำไปทำการแปรผันความเข้มแสงตั้งแต่ 500, 1,000, 1,500, 2,000 และ 2,500 ลักซ์ และนำไปบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง แก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatograph) เทียบกับก๊าซมาตรฐาน (ภาพผนวก ค)

3.6.4 วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 เพื่อการผลิตไฮโดรเจน

การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวจะใช้สารค้ำจุนเซลล์ คือ แอลจิเนตโดยทุกขั้นตอนในการทดลองจำเป็นต้องทำในตู้ถ่ายเชื้อเพื่อลดการปนเปื้อน โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP, TAP-S และ TAP-S ที่เติมโซเดียมซัลเฟตในความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากหัวข้อที่ 3.6.2 โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.6.2 จากนั้นเตรียมสารละลายร้อยละ 5 แอลจิเนต โดยนำแอลจิเนต 20 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร และนำไปต้มให้สารละลายทั้งหมดละลายรวมกัน จากนั้นเตรียมสารละลายร้อยละ 2 แคลเซียมคลอไรด์ โดยนำแคลเซียมคลอไรด์ 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายแอลจิเนตให้เป็น ร้อยละ 4 แอลจิเนต โดยการเติมน้ำสาหร่ายลงในสารละลายแอลจิเนต

โดยกำหนดความหนาแน่นที่เหมาะสมของเซลล์สำหรับที่ตรึงเท่ากับ 0.125 มิลลิกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมแอลจิเนต โดยน้ำหนักแห้งของเซลล์สามารถคำนวณได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 730 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณโดยนำไปแทนค่า y ในสมการ $y = 1.791521x$ Maneeruttanarungroj C, *et al.* (2011) จากนั้นปีเปิดน้ำสำหรับตามปริมาตรที่คำนวณได้ลงในสารละลายโซเดียมแอลจิเนต เพื่อปรับเป็นสารละลายโซเดียมแอลจิเนต ร้อยละ 4

2. หลังจากทำการผสมน้ำสำหรับเข้ากับสารละลายโซเดียมแอลจิเนตแล้ว ทำการบรรจุสารละลายลงในกระบอกฉีดยา โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 18G และ 21G จากนั้นทำการกดกระบอกฉีดยา และหยดสารละลายลงใน สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 2 และทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้สารละลายจับตรึงกับเป็นเม็ดทรงกลม และนำมาคัดขนาดโดยใช้ตะแกรงร่อนขนาด 2.8 และ 3.35 มิลลิเมตร จากนั้นนำเม็ดแอลจิเนตซึ่งน้ำหนัก สมมติ ซึ่งน้ำหนักได้เท่ากับ 40 กรัม จะได้ว่าใน 40 กรัมของเม็ดแอลจิเนตจะมีเซลล์สำหรับน้ำหนักแห้งเท่ากับ 100 มิลลิกรัม และในระบบของเซลล์อิสระ จะให้เป็นตัวเปรียบเทียบซึ่งสามารถเตรียมได้จากขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.6.2 โดยใช้ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 0.01 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับสี่เซียจะมีน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 4 มิลลิกรัม ในอาหาร TAP ปริมาตร 25 มิลลิกรัม

3.6.5 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากการตรึงสำหรับ *Tetraspora* sp. CU2551 ด้วยแอลจิเนต

หลังจากทำการตรึงเซลล์สำหรับ *Tetraspora* sp. CU2551 และคัดแยกขนาดที่เหมาะสม ดังขั้นตอนที่ 3.6.4 แล้ว จะทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจน โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการบรรจุเม็ดแอลจิเนตที่ตรึงเซลล์สำหรับ ลงในขวด gas-tight vial ขนาด 100 มิลลิลิตร โดยมีอาหาร TAP, TAP-S และ TAP-S ที่เติมโซเดียมซัลเฟตในความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยปริมาณของเม็ดแอลจิเนตจะเทียบกับน้ำหนักแห้งของเซลล์สำหรับอิสระ เช่น น้ำหนักเซลล์แห้งในเซลล์อิสระเท่ากับ 4 มิลลิกรัม ถ้าน้ำหนักแห้งของเซลล์สำหรับเท่ากับ 100 มิลลิกรัม จะอยู่ในเม็ดแอลจิเนตน้ำหนัก 40 กรัม ดังนั้นถ้าหากต้องการน้ำหนักแห้งของเซลล์สำหรับเท่ากับ 4 มิลลิกรัมจะต้องชั่งเม็ดแอลจิเนตทั้งหมด 1.6 กรัม บรรจุลงในขวด gas-tight vial ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร TAP, TAP-S และ TAP-S ที่เติมโซเดียมซัลเฟตในความเข้มข้นที่เหมาะสม บรรจุอยู่ 25 มิลลิลิตร

2. หลังจากบรรจุเม็ดแอลจิเนตที่ตรึงเซลล์สำหรับสี่เซีย *Tetraspora* sp. CU2551 เรียบร้อยแล้ว ทำการปิดจุกยางและครอบฝาอลูมิเนียมให้แน่น และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแสง 1,500 ลักซ์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph)

เทียบกับก๊าซมาตรฐาน ทุกๆ 24 ชั่วโมง สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราแสดงในตารางที่ 3.1

3.7 วิธีการศึกษาการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ตรึงด้วยแอลจินิต ที่ใช้งานแล้วมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำ

ทำการเตรียมเซลล์สาหร่ายและตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวเพื่อผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะระบบและความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่เหมาะสมที่ได้จากหัวข้อที่ 3.6.2 และวัดปริมาณไฮโดรเจนทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตช่วงเวลาที่เกิดการผลิตไฮโดรเจน จากนั้นเซลล์จะถูกนำกลับมาผลิตไฮโดรเจนซ้ำโดยมีขั้นตอนดังนี้

3.7.1 ขั้นตอนการนำเซลล์สาหร่ายเข้าสู่ stage I

นำเม็ดแอลจินิตที่ยุติการผลิตไฮโดรเจนใส่ลงในอาหาร TAP ที่มีธาตุอาหารครบถ้วน จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากขวด gas-tight vial และทำการเติมอาหาร TAP ลงไป ซึ่งเป็นการล้างเซลล์โดยเทอาหาร TAP เข้าและออกซ้ำไปมาประมาณ 3 รอบ จากนั้นค่อยๆเติมอาหาร TAP ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวด gas-tight vial ที่มีเม็ดแอลจินิตบรรจุอยู่ จากนั้นปิดจุกยางและครอบฝาอลูมิเนียมให้แน่น และนำไปบ่มโดยการเขย่าที่ 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการเทอาหาร TAP ออก และเติมอาหาร TAP ลงไปใหม่ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่สภาวะเดิมเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ทำเช่นนี้จนกระทั่งครบ 4 ชั่วโมง ในขั้นตอนนี้จะเป็นการพาเซลล์ไปสู่ stage I

3.7.2 ขั้นตอนการนำเซลล์เข้าสู่ stage II

ทำการย้ายเซลล์สาหร่ายที่ติงในเม็ดแอลจินิตลงในอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากหัวข้อ 3.6.2 โดยทำการรินอาหาร TAP อันเดิมออกจากขวด gas-tight vial จากนั้นทำการเติมอาหาร TAP ที่เหมาะสมโดยทำการล้างเซลล์โดยให้เทเข้าและเทออกซ้ำไปมาประมาณ 3 รอบ จากนั้นเติมอาหาร TAP ที่เหมาะสมปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวด gas-tight vial ที่บรรจุเม็ดแอลจินิตอยู่ จากนั้นปิดจุกยางและครอบฝาอลูมิเนียมให้แน่นและนำไปบ่มภายใต้สภาวะเดียวกันกับหัวข้อ 3.7.1 แต่ทำการวัดไฮโดรเจนทุกๆ 6 ชั่วโมง ขั้นตอนนี้จะเป็นการพาเซลล์เข้าสู่ stage II จนกระทั่งเซลล์สาหร่ายที่ติงด้วยแอลจินิตยุติการผลิตไฮโดรเจน เมื่อเซลล์ยุติการผลิตไฮโดรเจนแล้ว จึงจะทำการถ่ายโอนเซลล์สาหร่ายที่ตรึงด้วยแอลจินิตเข้าสู่ stage I ใหม่ โดยทำการทดลองตามหัวข้อที่ 3.7.1 – 3.7.2 ซ้ำจนกระทั่งเซลล์สาหร่ายที่ตรึงด้วยแอลจินิตยุติการผลิตไฮโดรเจนหรือ เม็ดแอลจินิตเสียสภาพลง และจากนั้นจึงจะทำการนับจำนวนรอบที่เซลล์สาหร่ายที่ตรึงด้วยแอลจินิตสามารถผลิตไฮโดรเจนซ้ำต่อได้

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองนี้ผู้ทดลองได้ทำการทดลองแบบปัจจัยเดียว (Experimental design CRD) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี one way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 20 (SPSS software, New York, USA) ที่ความเชื่อมั่น 95% โดยตั้งสมมติฐาน ยอมรับสมมติฐาน H_0 เมื่อ p -value > 0.05 ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

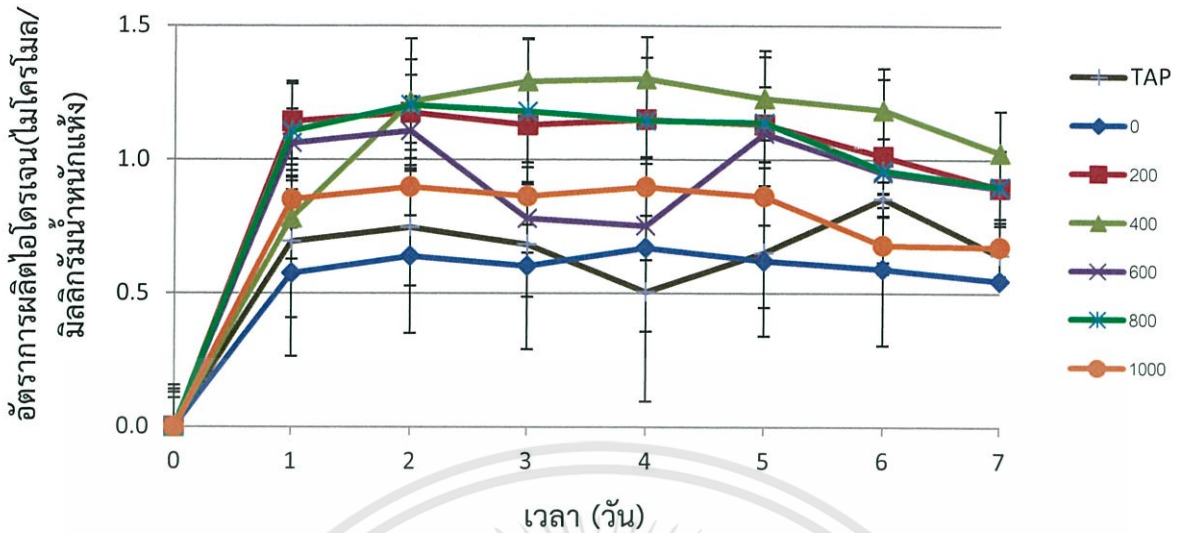
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

งานวิจัยนี้ ผู้ทดลองได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของซัลเฟตในอาหาร Tris Acetate Phosphate (TAP) ต่อการผลิตไฮโดรเจน ของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 เนื่องจากแหล่งอาหารซัลเฟตมีความสำคัญต่อระบบแสง 2 ซึ่งเป็นระบบที่ทำการแยกสลายน้ำได้ผลผลิตคือโปรตอน อิเล็กตรอน และ ออกซิเจน โดยจะส่งอิเล็กตรอนไปยังหน่วยรับอิเล็กตรอนต่างๆเพื่อนำไปผลิตไฮโดรเจนโดยผ่านเอนไซม์ไฮโดรจีเนส แต่ในขณะที่เดียวกันออกซิเจนที่ถูกผลิตขึ้นในระบบแสง 2 เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้ปริมาณไฮโดรเจนผลิตได้น้อยลงด้วย ดังนั้น เมื่อขาดแหล่งซัลเฟต ระบบแสง 2 จะถูกยับยั้งลง ปริมาณออกซิเจนจะลดลงเช่นเดียวกัน ผู้ทดลองจึงมีความสนใจที่จะศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งอาหารซัลเฟตต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 และเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนผู้ทดลองจึงสนใจที่จะทำการตรึงสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 กับอาหารที่มีแหล่งซัลเฟตเหมาะสมที่สุด โดยได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

4.1 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟต ด้วยการเลี้ยงเซลล์แบบอิสระที่ความเข้มข้น 0 – 1000 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เขียว *Tetraspora* sp. CU2551

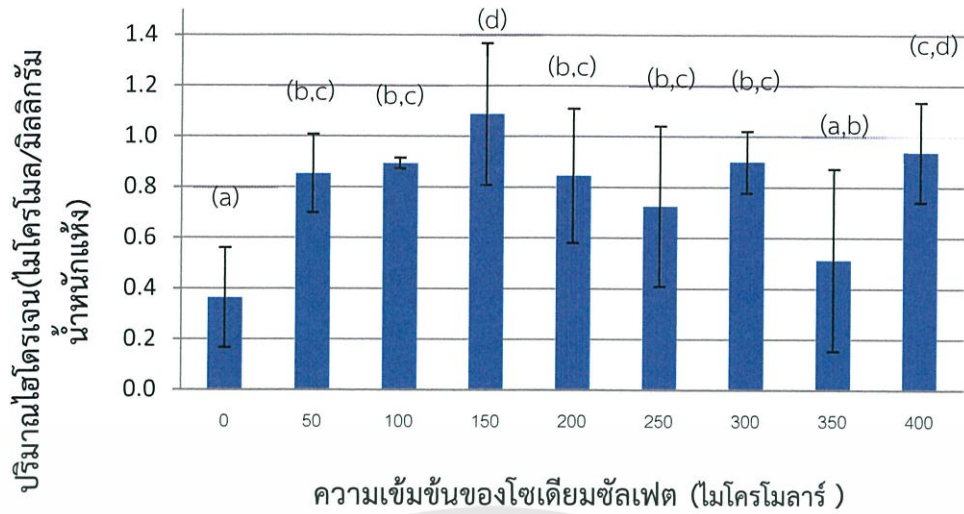
จากการศึกษาผลของความเข้มข้นโซเดียมซัลเฟตต่อการผลิตไฮโดรเจนแบบเซลล์อิสระ โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 0 – 1,000 ไมโครโมลาร์ ทำการวัดปริมาณไฮโดรเจนเป็นระยะเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า ทุกตัวแปรปริมาณไฮโดรเจนจะเริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 1 และที่ความเข้มข้น 0 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณไฮโดรเจนที่ 0.57 ไมโครโมล/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟต 200 มีปริมาณไฮโดรเจนที่สูงที่สุด คิดเป็น 1.14 ไมโครโมล/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีปริมาณไฮโดรเจนมากกว่า การเลี้ยงสาหร่ายในอาหารปกติ (TAP) ดังแสดงในรูปที่ 4.1 หลังจากที่เราทราบความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงแล้ว ผู้ทดลองจึงทำการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 0 – 400 ไมโครโมลาร์ เป็นลำดับต่อไป ดังแสดงผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.2



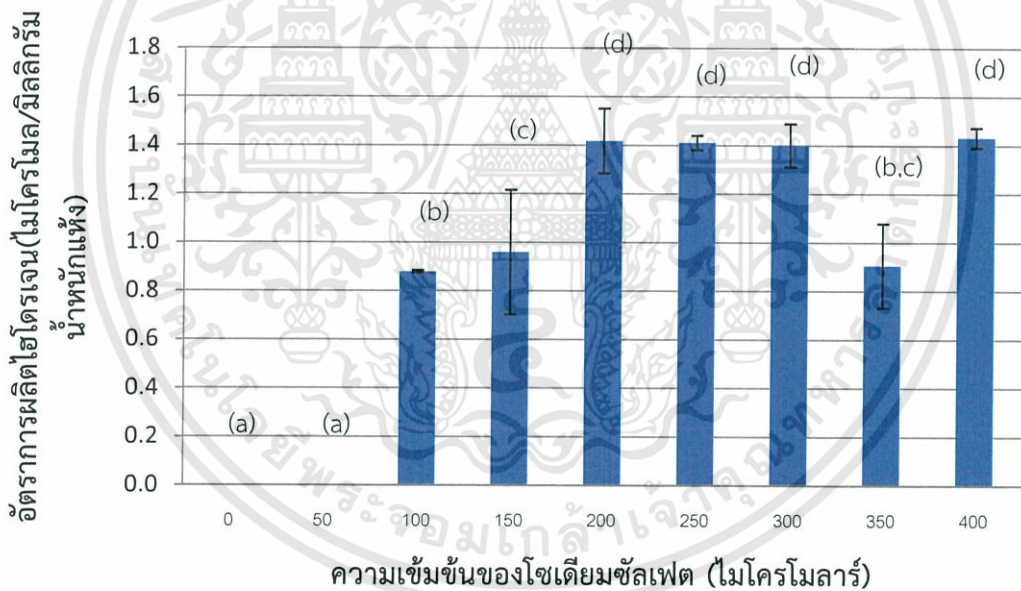
รูปที่ 4.1 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0 – 1000 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ในระยะเวลาการบ่ม 7 วัน

4.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ด้วยการเลี้ยงเซลล์แบบอิสระที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0 – 400 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ด้วยการเลี้ยงเซลล์แบบอิสระที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0 – 400 ไมโครโมลาร์ ผู้ทดลองได้ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้งดังแสดงในรูปที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ ผลการทดลองครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ได้ผลการทดลองที่ไม่มีความสอดคล้องหรือใกล้เคียงกัน โดยสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0 และ 50 ไมโครโมลาร์ ซึ่งในการทดลองครั้งที่ 1 มีไฮโดรเจนเกิดขึ้น แต่การทดลองครั้งที่ 2 ไม่มีไฮโดรเจนเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปได้ว่าในขณะที่ทำการบ่มตัวอย่างครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ขวด Vials ได้มีการซ้อนทับกัน ทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน ผู้ทดลองจึงเริ่มมีความสนใจผลกระทบของความเข้มข้นแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP-S จึงได้ทำการแปรผันความเข้มข้นแสง ดังแสดงผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.3



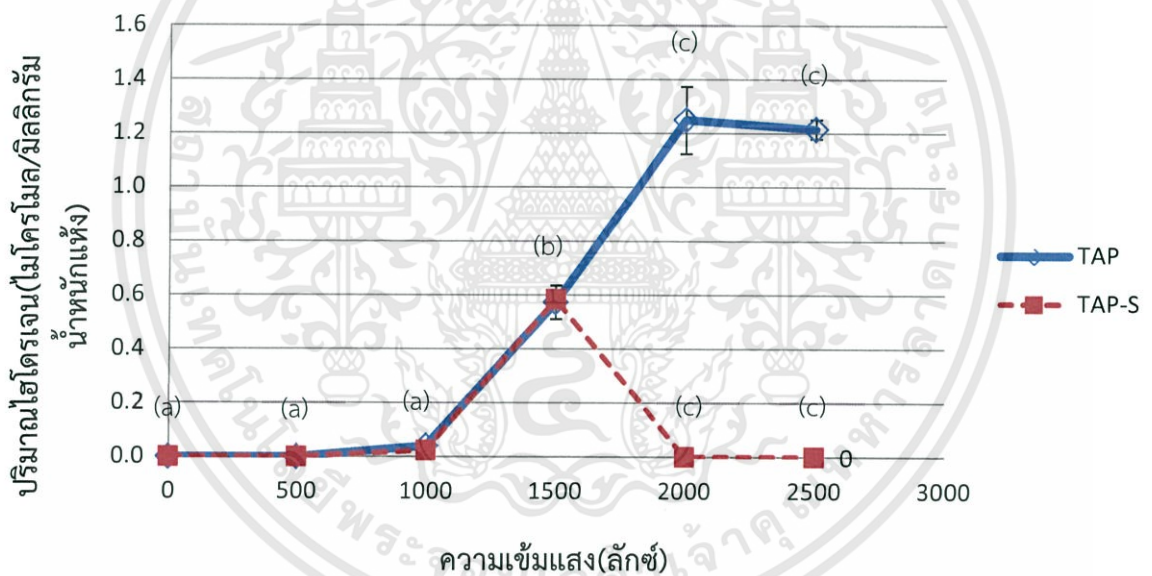
รูปที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 - 400 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ครั้งที่ 1



รูปที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 - 400 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ครั้งที่ 2

4.3 ผลของความเข้มแสง แปรผันความเข้มชั้นแสงระหว่าง 0 – 2,500 ลักซ์ ด้วยการเลี้ยงเซลล์แบบอิสระ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

จากหัวข้อที่ 4.2 คาดว่าความผิดพลาดที่เกิดขึ้นอาจเกิดจาก ความเข้มแสงที่ไม่เท่ากัน ผู้ทดลองจึงได้ศึกษาผลของความเข้มแสง โดยแปรผันความเข้มชั้นแสงระหว่าง 0 – 2,500 ลักซ์ ที่เลี้ยงแบบเซลล์อิสระ โดยเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP และ ในอาหาร TAP-S ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มแสง โดยเริ่มคงที่ที่ความเข้มแสงเท่ากับ 2,000 ลักซ์ ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 1.25 ไมโครโมล/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนในสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP-S สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เท่ากับ 0.58 ไมโครโมล/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ดังแสดงในรูปที่ 4.4 จะเห็นว่าที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์มีความเหมาะสมกับอาหารทั้ง 2 แบบ ในการทดลองถัดไปผู้ทดลองจึงเลือกใช้ความเข้มแสงเท่ากับ 1,500 ลักซ์ ในทุกการทดลองต่อไป

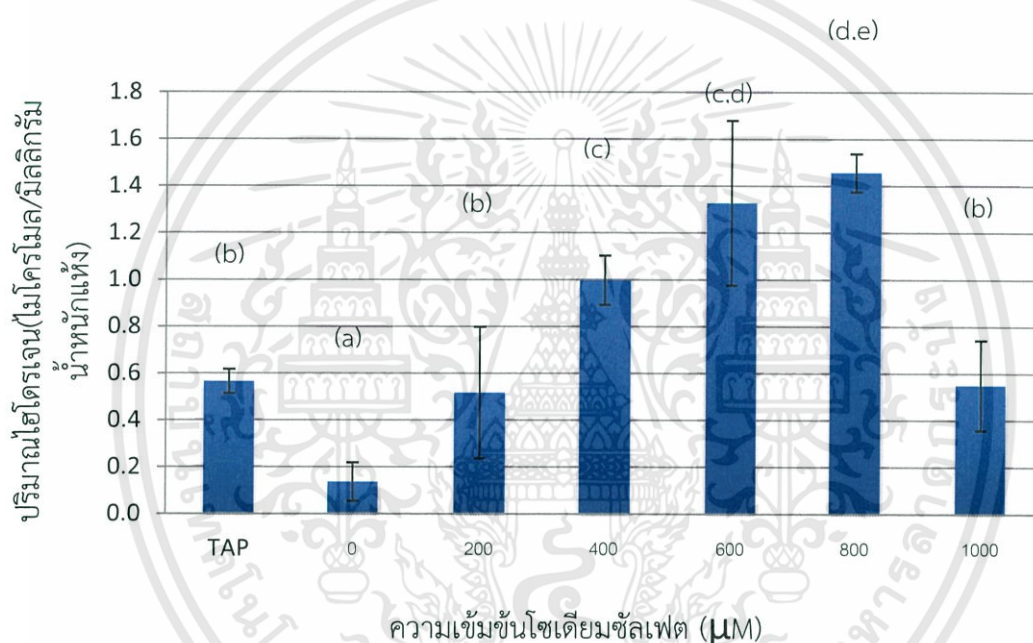


รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มแสงตั้งแต่ 0 – 2,500 ลักซ์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

ทั้งนี้เนื่องจาก ที่ความเข้มแสงที่ 1,500 ลักซ์ มีความเหมาะสมต่อรงควัตถุ ภายในคลอโรพลาส ของเซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 และเมื่อมีความเข้มแสงที่เพิ่มมากขึ้น รงควัตถุ ภายในคลอโรพลาสอาจถูกทำให้เสื่อมประสิทธิภาพลง จึงไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ ดังนั้น เมื่อเราทราบความเข้มแสงที่ดีที่สุดที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีในอาหาร TAP-S เราจึงเลือกใช้ความเข้มแสงที่ 1,500 ลักซ์ ตลอดการทดลอง

4.4 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่แปรผันความเข้มข้นที่ 0 – 1,000 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้น 1,500 ลักซ์ เลี้ยงแบบเซลล์อิสระ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

หลังจากทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมกับอาหารทั้ง 2 แบบ คือเท่ากับ 1,500 ลักซ์ ผู้ทดลองจึงทำการทดลองอีกครั้งโดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 0 – 1,000 ไมโครโมลาร์ ที่ความเข้มข้น 1,500 ลักซ์ เลี้ยงเซลล์แบบอิสระ แทนการทดลองที่ 4.2 ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 600 และ 800 ไมโครโมลาร์ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงที่สุดใกล้เคียงกันโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ คิดเป็น 1.38 และ 1.42 ไมโครโมล/มิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่า TAP และ TAP-S ดังแสดงในรูปที่ 4.5



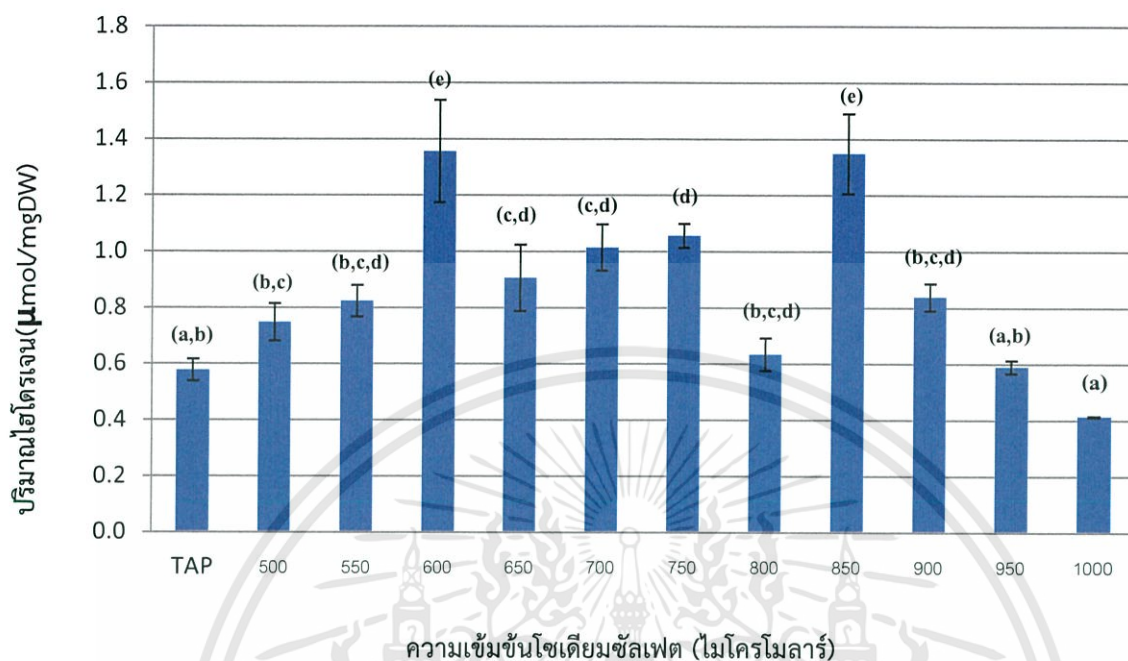
รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 – 1,000 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้น 1,500 ลักซ์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากรูปที่ 4.5 จะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตเท่ากับ 0 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนที่น้อยที่สุด ทั้งนี้เนื่องมาจาก ระบบแสง 2 ไม่สามารถทำการแยกน้ำให้กลายเป็นอิเล็กตรอน เพื่อนำไปผลิตไฮโดรเจนได้ โดยจะได้รับอิเล็กตรอนมาจากกระบวนการไกลโคไลซิส และ ไพรูเวท ทำให้ยังสามารถผลิตไฮโดรเจนได้บางส่วน แต่ในขณะเดียวกัน ก๊าซออกซิเจนภายในขวด Vial ก็ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จึงทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถทำงานได้อย่างไม่เต็มประสิทธิภาพ ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน ที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตเท่ากับ 0 ไมโครโม

ลาร์ จึงมีปริมาณน้อยที่สุด แต่เมื่อความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตเพิ่มมากขึ้น ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนจึงเพิ่มสูงขึ้นไปในแนวโน้มเดียวกัน เนื่องจาก เมื่อเซลล์สาหร่ายได้รับแหล่งอาหารซัลเฟตเพิ่มขึ้น การทำงานของระบบแสง 2 เริ่มทำงานได้ดีขึ้น เกิดการแยกสลายน้ำ กลายเป็นอิเล็กตรอน โปรตอน และ ออกซิเจน ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตเท่ากับ 200 ไมโครโมลลาร์ ระบบแสง 2 เริ่มทำงานได้ดีในระดับหนึ่ง จึงสามารถผลิตอิเล็กตรอนได้ แต่อาจไม่เต็มที่ที่ออกซิเจนที่เกิดขึ้น ถูกนำไปใช้ในการหายใจของเซลล์ จึงทำให้มีปริมาณไฮโดรเจนที่สูงเพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกันกับความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 400, 600 และ 800 ไมโครโมลลาร์ เมื่อถึงความเข้มข้นที่ 1,000 ไมโครโมลลาร์ เนื่องจาก ระบบแสง 2 ได้ทำงานอย่างเต็มประสิทธิภาพ ทำให้เกิดออกซิเจนจากระบบแสง 2 เพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก ออกซิเจนจากระบบแสง 2 นี้จึงไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนที่ต่ำลง ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jun Pyo Kim, *et al.* (2010) ได้ทำการทดลองการแปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต โดยที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 30 ไมโครโมลลาร์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด เนื่องจากมีปริมาณของซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการทำงานของระบบแสง 2 และ ที่ความเข้มข้นที่ 60 และ 120 ไมโครโมลลาร์ มีปริมาณไฮโดรเจนที่ต่ำลงเนื่องจากจากระบบแสง 2 สามารถมีการผลิตออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้น ออกซิเจนที่เกิดขึ้นจึงไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้มีประสิทธิภาพลดลง ทำให้มีปริมาณไฮโดรเจนลดน้อยลงไปด้วย โดยทำการบ่มในสถานะที่ไม่มีอากาศ และในงานวิจัยนี้ที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตเท่ากับ 1,000 ไมโครโมลลาร์มีปริมาณไฮโดรเจนเกิดขึ้นไม่แตกต่างกับในอาหาร TAP เพราะอาหาร TAP มีส่วนประกอบของซัลเฟตเท่ากับ 1,000 ไมโครโมลลาร์ เช่นเดียวกัน และจากรูปที่ 4.5 ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 600 และ 800 ไมโครโมลลาร์ ผู้ทดลองจึงทำการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 500 – 1,000 ไมโครโมลลาร์ ดังแสดงผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.5 เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora sp.* CU2551

4.5 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตด้วยการเลี้ยงเซลล์แบบอิสระที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟต 500 – 1000 ไมโครโมลลาร์ ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora sp.* CU2551

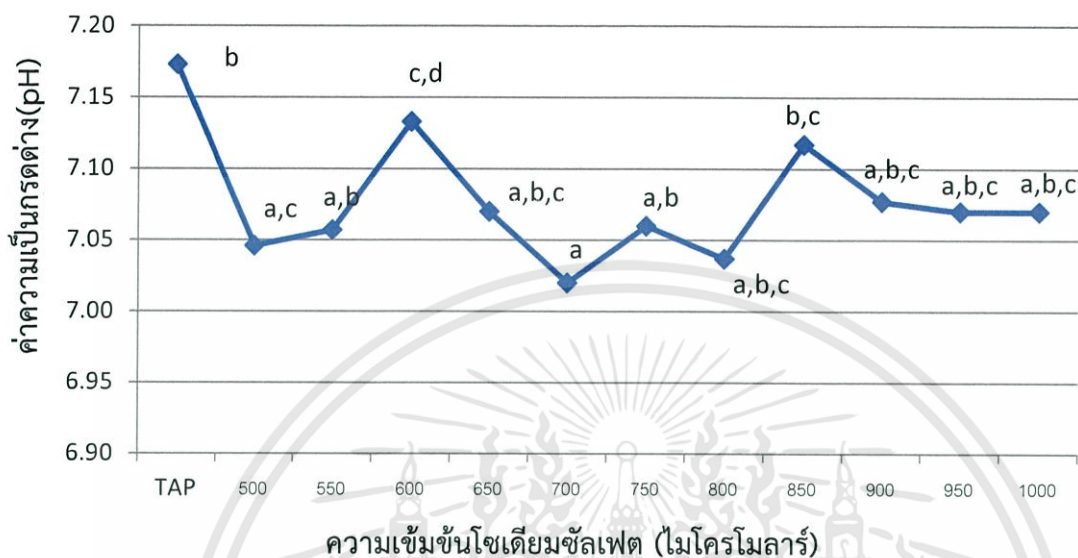
จากการศึกษาผลของโซเดียมซัลเฟตโดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 500 – 1000 ไมโครโมลลาร์ ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 600 และ 850 ไมโครโมลลาร์ มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนที่สูงคิดเป็น 1.34 และ 1.33 ไมโครโมล/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นของไซเตียมซัลเฟตตั้งแต่ 500 – 1,000 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นแสง 1500 ลักซ์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

ผู้ทดลองจึงสังเกตเห็นว่าปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในช่วงความเข้มข้นของไซเตียมซัลเฟตตั้งแต่ 500 – 1,000 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณการผลิตที่ค่อนข้างแปรปรวน ดังแสดงในรูปที่ 4.6 จึงคาดว่าอาจมีสาเหตุมาจากค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ผู้ทดลองจึงทำการวัดค่าความเป็นกรดต่างหลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 600 และ 850 ไมโครโมลาร์ มีค่าความเป็นกรดต่างที่สูงใกล้เคียงกันโดยไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 โดยให้ผลการทดลองสอดคล้องกับปริมาณการผลิตไฮโดรเจนดังแสดงในรูปที่ 4.6 และพบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP-S มีค่า pH ที่ค่อนข้างต่ำกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP ซึ่งอาจเป็นเพราะอิทธิพลของคลอไรด์ เนื่องจากในอาหาร TAP-S ผู้ทดลองทำการเติมเกลือคลอไรด์ลงไปแทนที่เกลือซัลเฟตในอาหาร TAP และอาจได้รับอิทธิพลมาจากปริมาณออกซิเจนที่ไม่เท่ากันในแต่ละขวดของการทดลอง ดังนั้นผู้ทดลองจึงเลือกความเข้มข้นที่ 600 และ 850 ไมโครโมลาร์ มาใช้ในการตรึงเซลล์สาหร่ายด้วย 4% แอลจิเนต แบบผลิตอย่างต่อเนื่องโดยมีการนำมาใช้ซ้ำ ดังแสดงผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.6 แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาค่า pH เป็นเพียงหลักฐานหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่าค่า pH อาจมีความเกี่ยวข้องใน

การทดลอง แต่ทั้งนี้ยังมีปัจจัยอื่นอีกมากมายที่มีความเกี่ยวข้อง แต่ไม่ได้ทำการศึกษาในการศึกษาครั้งนี้



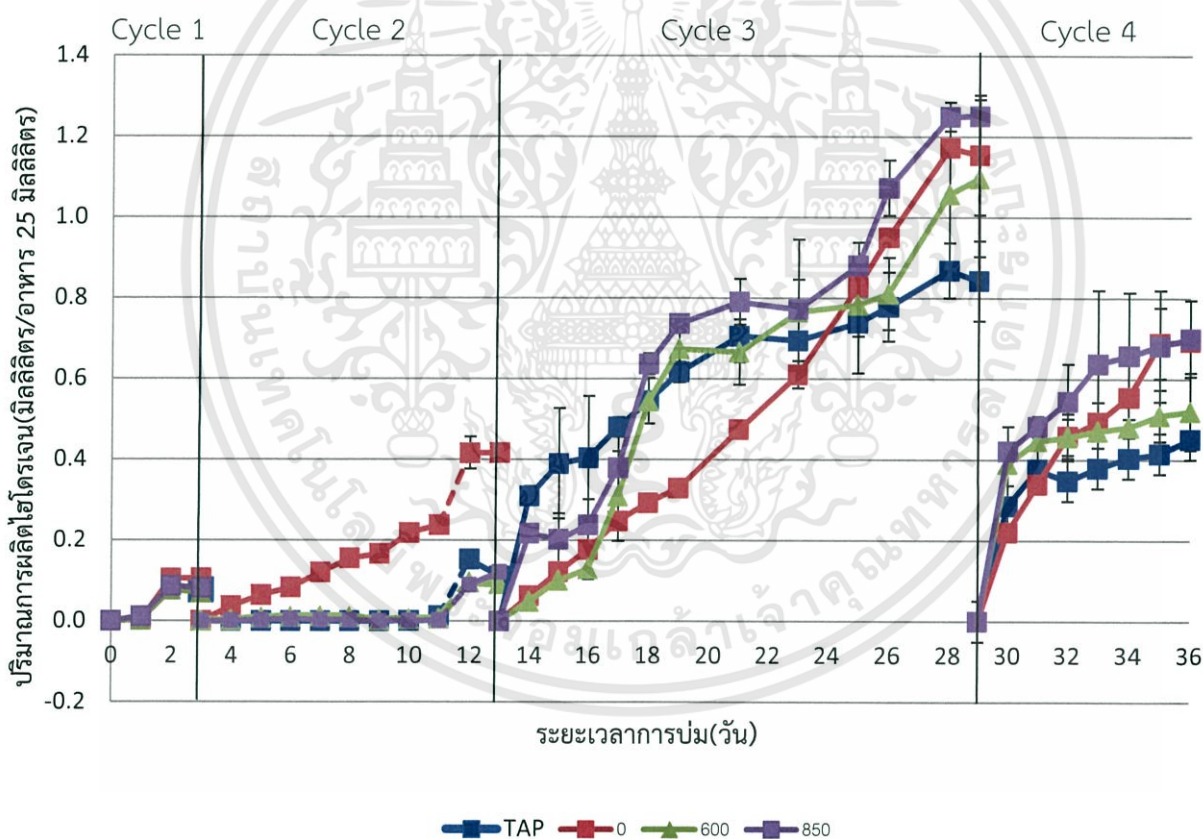
รูปที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตตั้งแต่ 500 – 1,000 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อค่าความเป็นกรดต่าง

4.6 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตโดยการตรึงเซลล์สำหรับด้วยแอลจินเนต บ่มที่ความเข้มข้นแสง 1,500 ลักซ์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 แบบผลิตอย่างต่อเนื่องโดยมีการนำเซลล์มาใช้ซ้ำ

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 0, 600 และ 850 ไมโครโมลาร์ ด้วยการตรึงเซลล์สำหรับด้วย 4% แอลจินเนต เลี้ยงในอาหาร TAP-S ความเข้มข้นแสง 1,500 ลักซ์ โดยมีสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP เป็นตัวแปรควบคุม ผลการทดลองพบว่ารอบที่ 1 ปริมาณไฮโดรเจนคงที่ในวันที่ 2 ของการทดลองในทุกความเข้มข้น โดยที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 0 ไมโครโมลาร์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ 0.24 มิลลิลิตร/อาหาร 25 มิลลิลิตร ในรอบที่ 2 ปริมาณไฮโดรเจนคงที่ในวันที่ 11 ของการทดลองในทุกความเข้มข้น โดยที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 0 ไมโครโมลาร์สามารถผลิตได้สูงสุด คิดเป็น 0.42 มิลลิลิตร/อาหาร 25 มิลลิลิตร รองลงมาคือ TAP, 850 ไมโครโมลาร์ และ 600 ไมโครโมลาร์ คิดเป็น 0.15, 0.12 และ 0.09 มิลลิลิตร/อาหาร 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ ในรอบที่ 3 เป็นรอบที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสองรอบแรกโดยปริมาณไฮโดรเจนคงที่ในวันที่ 28 ของการทดลองในทุกความเข้มข้น โดยที่ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 850 ไมโครโมลาร์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด คิดเป็น 1.25 มิลลิลิตร/อาหาร 25 มิลลิลิตร รองลงมาคือ 0 ไมโครโมลาร์, 600 ไมโครโมลาร์ และ TAP คิดเป็น 1.17, 1.09 และ 0.86 มิลลิลิตร/อาหาร 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ ในรอบที่ 4 การผลิตไฮโดรเจนเริ่มลดลง โดยที่ปริมาณไฮโดรเจนคงที่ในวันที่ 36 ของการทดลองในทุกความเข้มข้น โดยที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 850 ไมโครโมลาร์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด คิดเป็น 0.70 มิลลิลิตร/อาหาร 25 มิลลิลิตร รองลงมาคือ 0 ไมโครโมลาร์, 600 ไมโครโมลาร์ และ TAP คิดเป็น 0.69, 0.52 และ 0.45 มิลลิลิตร/อาหาร 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า การผลิตไฮโดรเจนรวมทั้ง 4 รอบ ที่ความเข้มข้นที่ 0 ไมโครโมลาร์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด คิดเป็น 2.39 มิลลิลิตร/อาหาร 25 มิลลิลิตร รองลงมาคือ 850 ไมโครโมลาร์, 600 ไมโครโมลาร์ และ TAP โดยคิดเป็น 2.15, 1.79 และ 1.54 มิลลิลิตร/อาหาร 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นที่ 0, 850 และ 600 ไมโครโมลาร์ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่า TAP 1.55, 1.39 และ 1.16 เท่าตามลำดับ



รูปที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตโดยการตรึงเซลล์สาหร่ายด้วยแอลจิเนต บ่มที่ความเข้มข้น 1,500 ลักซ์ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 แบบผลิตอย่างต่อเนื่องโดยมีการนำเซลล์มาใช้ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลความเข้มข้นของซัลเฟตต่อการผลิตไฮโดรเจนและการตรึงเซลล์สาหร่ายด้วย แอลจีเนต สามารถสรุปได้ดังนี้

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. ผลของความเข้มแสง แปรผันความเข้มข้นแสงระหว่าง 0 – 2,500 ลักซ์ ที่เลี้ยงแบบ เซลล์อิสระ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

ผลการทดลองพบว่า ความเข้มแสงที่เหมาะสมในอาหาร TAP คือ 1,500 – 2,500 ลักซ์ และ อาหาร TAP – S คือ 1,500 ลักซ์ จึงเลือกความเข้มแสงที่ 1,500 ลักซ์ นำมาใช้ตลอดการทดลอง

2. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่แปรผันความเข้มข้นที่ 0 – 1,000 ไมโครโมลาร์ ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เลี้ยงแบบเซลล์อิสระ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นโซเดียมซัลเฟต 600 และ 800 ไมโครโมลาร์ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงที่สุด คิดเป็น 1.38 และ 1.42 ไมโครโมล/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง

3. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟต ด้วยการเลี้ยงเซลล์แบบอิสระที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟต 500 – 1,000 ไมโครโมลาร์ ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตที่ 600 และ 850 ไมโครโมลาร์ มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนที่สูงคิดเป็น 1.34 และ 1.33 ไมโครโมล/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง

4. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตจากอาหาร TAP และอาหาร TAP-S ที่ความเข้มข้นโซเดียมซัลเฟต 0, 600 และ 850 ไมโครโมลาร์ ด้วยการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ตรึงเซลล์ด้วยแอลจีเนต โดยผลิตอย่างต่อเนื่องแบบมีการนำเซลล์มาใช้ซ้ำ

ผลการทดลองพบว่า การผลิตไฮโดรเจนในรอบที่ 3 ที่ความเข้มข้นโซเดียมซัลเฟต 850 ไมโครโมลาร์ มีผลการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด รองลงมาคือความเข้มข้นโซเดียมซัลเฟตที่ 0 และ 600 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณปริมาณไฮโดรเจนรวมทั้ง 4 รอบพบว่า ที่ความเข้มข้น 0 ไมโครโมลาร์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยคิดเป็น 2.39 มิลลิลิตร/อาหาร25 มิลลิลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรแปรผันความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนให้เท่ากันในทุกๆการทดลองเพื่อผลการทดลองที่มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น
2. ควรศึกษาพารามิเตอร์อื่นที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน
3. ศึกษากลไกการผลิตในแต่ละรอบเพื่ออธิบายอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่เท่ากันในแต่ละรอบการผลิต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นภিকা เปี่ยมจิตต์สกุล, นัฐกานต์ ชุณหกิจ, สุดารัตน์ ภิรมย์สุด. 2559. “การเลือกวัสดุตั้งสำหรับ *Tetraspora* sp. CU2551 เพื่อการ ผลิตไฮโดรเจน *Alga Tetraspora* sp. CU2551 immobilization material selection for H₂ production.” วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี สิ่งแวดล้อม) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ภาสกร สกุลศิลปกร. 2549. สาหร่ายสีเขียว (Chlorophytes).

[Online]. Available : <https://www.eduzones.com/knowledge-2-5-28773.html>

วารสารศูนย์บริการวิชาการ. 2553. ไบโอดีเจน พลังงานทางเลือกใหม่.

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

ศศิธร คงเรือง, เบญจมาภรณ์ วงศ์อนุ. 2550. “การตรึงเซลล์ยีสต์โดยการห่อหุ้มเพื่อผลิตไวน์ลำไยอบแห้ง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

สร้อยญา พันธุ์พุกษ์, อรัญ อินเจริญศักดิ์. 2557. “การผลิตไบโอดีเจนของจุลสาหร่ายที่แยกได้จากนาข้าวของประเทศไทย.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุรัตน์ดิพร รัตน์ะ, สร้อยญา พันธุ์พุกษ์. 2554. “การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Aikaterini Papazi, Armida-Irene Gjindali, Elizabeth Kastanaki, Konstantinos Assimakopoulos, Konstantinos Stamatakis, Kiriakos Kotzabasis, “Potassium deficiency, a “smart” cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus*.” *International journal of hydrogen energy*. 39(2014) : 19452-19464

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

Cherdsak Maneeruttanarungroj. “Screening of hydrogen-producing algae and optimization for enhanced hydrogen production.” *Biochemistry*. 2011.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า .
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Cherdsak Maneeruttanarungroj a, Peter Lindblad b, Aran Incharoensakdi a. "A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production." *International journal of hydrogen energy*. 35(2010) : 13193-13199
- Ghirardi M.L., Zhang, J.P., Lee, J.W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E. and Melis, A. 2000. "Microalgae: a green source of renewable H₂." *Trends Biotechnology*. 18(12) : 506-511.
- Jun Pyo Kim a, Kyoung-Rok Kim a, Seung Phill Choi a, Se Jong Han b, Mi Sun Kim c, Sang Jun Sim a. "Repeated production of hydrogen by sulfate re-addition in sulfur deprived culture of *Chlamydomonas reinhardtii*." *International journal of hydrogen energy*. 35(2010) : 13387-13391.
- Melis A. "Photosynthetic H₂ metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae)." *Planta*. 226(2007) : 1075-1086.
- Taras K. Antal a, Dmitriy N. Matorin a, Galina P. Kukarskikh a, Maya D. Lambreva d, Esa Tyystjarvi b, Tatyana E. Krendeleva a, Anatoliy A. Tsygankov c, Andrej B. Rubin. "Pathways of hydrogen photoproduction by immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* cells deprived of sulfur." *International journal of hydrogen energy*. 39(2014) : 18194-18203.
- Touloupakis, E. Cicchi, B. Torzillo, G. Rontogiannis, G. Benauides, AMS. And Ghanotakis, DF. "Hydrogen production by immobilized *synechocystis* sp. PCC 6803." *International journal of Hydrogen Energy* 41(2016) : 15181-15186



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวก ก

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหลวที่มีธาตุอาหารครบ (Tris – Acetate - Phosphate)

Tris base	2.4200	กรัม
NH ₄ Cl	0.3750	กรัม
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.0500	กรัม
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.1000	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.2880	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.1440	กรัม
EDTA-Na ₂ •2H ₂ O	0.0500	กรัม
H ₃ BO ₃	0.0114	กรัม
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.0220	กรัม
MnCl ₂ • 4H ₂ O	0.0050	กรัม
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.0050	กรัม
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0.0016	กรัม
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.0016	กรัม
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4H ₂ O	0.7700	มิลลิกรัม
CH ₃ COOH	1.0000	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1.0000	ลิตร

อาหารที่ขาดแหล่งซัลเฟต (Tris – Acetate – Phosphate - Sulfate) โดยแทนที่เกลือซัลเฟตด้วยเกลือคลอไรด์

Tris base	2.42	กรัม
NH ₄ Cl	0.375	กรัม
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.05	กรัม
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.089	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.288	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.144	กรัม
EDTA-Na ₂	0.05	กรัม
H ₃ BO ₃	0.0114	กรัม
ZnCl ₂	0.027	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.005	กรัม
$\text{FeCl}_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.0035	กรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0016	กรัม
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0019	กรัม
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.77	มิลลิกรัม
CH_3COOH	1.00	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1.00	ลิตร

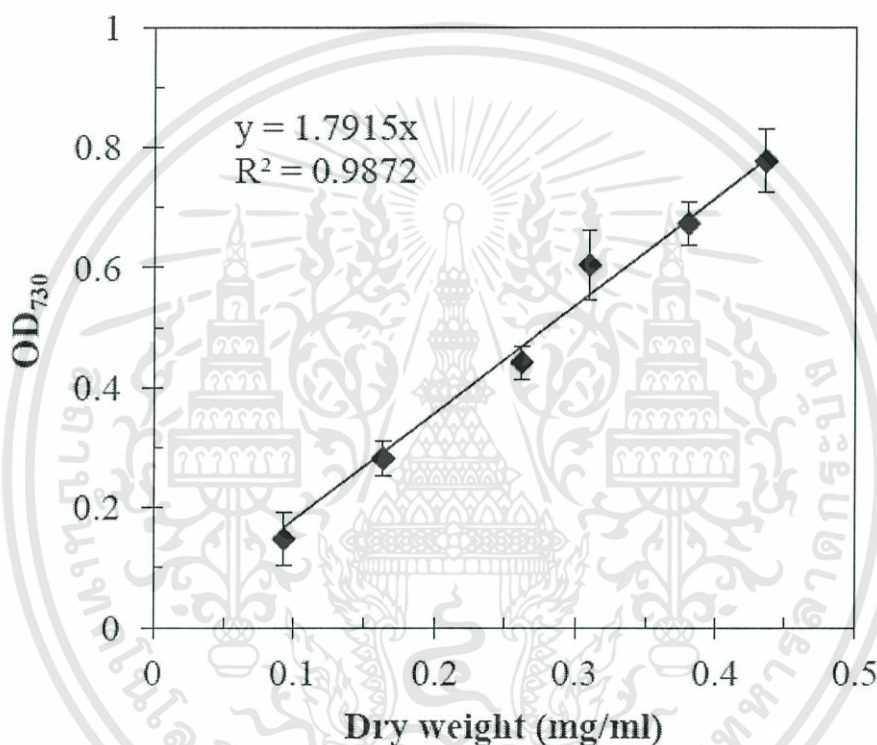


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวก ข

การคำนวณน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

การคำนวณน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 สามารถคำนวณได้จากสมการ $y = 1.7915x$ เมื่อ y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และ x คือ น้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย (มิลลิกรัม)



รูปที่ ข-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง(OD₇₃₀)กับน้ำหนักเซลล์แห้ง

ที่มา : Maneeruttanarungroj C, et al. (2011)

ภาพผนวก ค

การคำนวณปริมาณไฮโดรเจน

การคำนวณปริมาณไฮโดรเจนงานวิจัยได้ใช้ 4% ไฮโดรเจนในอาร์กอน 99.999% เป็นสารมาตรฐาน โดยจะวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนด้วยวิธีการเทียบบัณญัติไตรยางค์กับสารมาตรฐาน และคำนวณปริมาณไฮโดรเจนออกมาในหน่วย $\mu\text{mol}/\text{mg DW}$ โดยมีวิธีการคำนวณดังต่อไปนี้

1. คำนวณหา %H ของตัวอย่างโดยเทียบกับก๊าซมาตรฐาน

$$\%H = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง(mV.S)} \times 4\%}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน(mV.S)}}$$

2. คำนวณหาปริมาตรของก๊าซไฮโดรเจนของตัวอย่าง

$$\text{ปริมาตร (ml)} = \text{ปริมาตรของช่องว่างเหนือของเหลว(ml)} \times \%H$$

3. คำนวณหาไมโครโมลของไฮโดรเจนของตัวอย่าง

$$\text{ไมโครโมลของไฮโดรเจน} = \text{ปริมาตรไฮโดรเจน(ml)} \times 22.4 \text{ L/mol}$$

4. คำนวณน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย

$$Y = 1.791521x \text{ เมื่อ } y \text{ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ } 730 \text{ นาโนเมตร และ } x \text{ คือ น้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย(mg)}$$

5. การคำนวณปริมาณการผลิตไฮโดรเจน

$$\text{ปริมาณไฮโดรเจน} = \frac{\text{ไมโครโมลไฮโดรเจน}}{\text{น้ำหนักแห้ง (mg)}}$$