การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* ภายใต้สภาวะการขาดธาตุอาหาร

HYDROGEN PRODUCTION BY NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIUM *Anabaena siamensis* UNDER NUTRIENT DEPRIVATION

ธนวัตร ขำประสิทธิ์
สุรักษ์ชนก โฉมวรรณ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* ภายใต้สภาวะการขาดธาตุอาหาร

HYDROGEN PRODUCTION BY NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIUM *Anabaena siamensis* UNDER NUTRIENT DEPRIVATION

ธนวัตร ขำประสิทธิ์
สุรักษ์ชนก โฉมวรรณ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

HYDROGEN PRODUCTION BY NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIUM *Anabaena siamensis* UNDER NUTRIENT DEPRIVATION

THANAWAT KHAMPRASIT
SURAKCHANOK CHOMWAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* ภายใต้สภาวะการขาดธาตุอาหาร Hydrogen production by nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* under nutrient deprivation
ชื่อนักศึกษา	นายธนวัตร ขำประสิทธิ์ รหัสนักศึกษา 57050831 นางสาวสุรักษ์ชนก โฉมวรรณ รหัสนักศึกษา 57050912
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* ภายใต้สภาวะการขาดธาตุอาหาร

ชื่อนักศึกษา นายธนวัตร ขำประสิทธิ์ รหัสนักศึกษา 57050831

นางสาวสุรักษ์ชนก โฉมวรรณ รหัสนักศึกษา 57050912

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนจัดเป็นตัวพาพลังงานที่มีศักยภาพและให้พลังงานจากการเผาไหม้สูง ไฮโดรเจนที่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายตรึงไนโตรเจนกำลังเป็นที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตไฮโดรเจนจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหมักในที่มืด และยังสามารถผลิตไฮโดรเจนจากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากการตรึงไนโตรเจน ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* เป็นที่รู้จักว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* ภายใต้สภาวะการขาดธาตุอาหาร จากการทดลองพบว่า *A. siamensis* มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ภายใต้สภาวะการขาดธาตุอาหาร *A. siamensis* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 12.449 ± 0.386 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ เอต่อชั่วโมง และมีการผลิตสูงสุดเท่ากับ 896.308 ± 0.760 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ เอ เมื่อทำการบ่มเซลล์ในอาหาร BG11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน หรือ อาหาร $BG11_0$ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ การบ่มให้เซลล์ปรับตัวภายใต้สภาวะขาดไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมงกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนใน *A. siamensis*

คำสำคัญ : *Anabaena siamensis*, ไซยาโนแบคทีเรีย, การผลิตไฮโดรเจน, การขาดธาตุอาหาร

Title	Hydrogen production by nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* under nutrient deprivation
Students	Mr. Thanawat Khamprasit Student ID 55051060
	Miss Surakchanok Chomwan Student ID 55051082
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Asst.Prof.Dr.Saranya Phunpruch

Abstract

Hydrogen is a potential energy carrier and provides high combustion energy. H_2 produced by N_2-fixing filamentous cyanobacteria has been interesting because these organisms can produce H_2 by hydrogenase activity via photosynthetic process and dark fermentative process and produce H_2 as a by-product by nitrogenase activity via nitrogen fixation. The filamentous N_2-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* has been known as the potential H_2-producing microorganism. This special project aimed to investigate H_2 production by nitrogen-fixing cyanobacterium *A. siamensis* under nutrient deprivation. The result showed the highest H_2 production rate was found in *A. siamensis* grown in BG11 medium for 2 weeks. Under various nutrient deprivations, *A. siamensis* showed the highest H_2 production rate with 12.449 ± 0.386 $\mu molH_2\ g^{-1}$ chl a h^{-1} and H_2 production with 896.308 ± 0.760 $\mu molH_2\ g^{-1}$ chl a in cells incubated in nitrogen-deprived BG11 or $BG11_0$ under anaerobic condition for 72 hours. In addition, incubation for cell adaptation under nitrogen deprivation for 24 hours promoted H_2 production in *A. siamensis*.

Keywords : *Anabaena siamensis*, Cyanobacteria, Hydrogen production, Nutrient deprivation

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่มาโดยตลอด ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการสอบโครงงานพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาตรวจสอบและให้คำแนะนำเพื่อให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพี่นักวิทยาศาสตร์ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ทำให้เกิดผลสำเร็จในงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล ที่ให้ความช่วยเหลือให้คำปรึกษาและคำแนะนำในทุกเรื่อง

และขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนและคอยให้กำลังใจ คอยรับฟังปัญหา และให้คำปรึกษา คำแนะนำตลอดมา

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยหวังว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไฮโดรเจน หากโครงงานพิเศษฉบับนี้มีข้อบกพร่องประการใด คณะผู้จัดทำขออภัยไว้ ณ ที่นี้

ธนวัตร ขำประสิทธิ์
สุรักษ์ชนก โฉมวรรณ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ไฮโดรเจน	3
2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน	4
2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาเคมีภายใต้อุณหภูมิสูง	4
2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า	4
2.2.3 การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนทางชีวภาพ	5
2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย	10
2.3.1 กระบวนการตรึงไนโตรเจน	10
2.3.2 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง	11
2.4 ไซยาโนแบคทีเรีย	12
2.5 ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*	13
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	15
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ	15
3.2 สารเคมี	15
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	15
3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	15
3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์	16
3.2.4 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน	16
3.3 อุปกรณ์	16

3.4 วิธีการทดลอง 17
3.4.1 วิธีการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* 17
3.4.2 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* 18
3.4.3 วิธีการศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* 18
3.4.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน 19
3.4.5 วิธีการศึกษาอายุของเซลล์ *A. siamensis* ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน 19
3.4.6 วิธีการศึกษาการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *A. siamensis* 20
3.4.7 วิธีการศึกษาระยะเวลาในการปรับตัวของเซลล์ภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *A. siamensis* 20
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 21
4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *Ananbaena siamensis* 23
4.2 ผลการศึกษาอายุของเซลล์ *Ananbaena siamensis* ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน 23
4.3 ผลการศึกษาการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Ananbaena siamensis* 25
4.4 ผลการศึกษาระยะเวลาในการปรับตัวของเซลล์ภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Ananbaena siamensis* 27
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 29
เอกสารอ้างอิง 30
ภาคผนวก 33
ภาคผนวก ก 34
ภาคผนวก ข 36

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph Thermal Conductivity Detector (GC - TCD)) 19

4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่บ่มในอาหาร BG11 (Control), อาหาร $BG11_0$ (BG11-N), อาหาร BG11-S, อาหาร BG11-P และอาหาร BG11-K ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง 26

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยการแยกสลายน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า	5
2.2 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง	6
2.3 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม	7
2.4 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง	8
2.5 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง	9
2.6 กระบวนการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย	11
2.7 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียจากกระบวนการสังเคราะห์แสง	12
2.8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*	13
4.1 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ปริมาณเซลล์และความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ เอ ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 (ก) และอาหาร $BG11_0$ (ข)	22
4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์	23
4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์	24
4.4 การผลิตไฮโดรเจนของ *Anabaena siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 และ $BG11_0$ เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์	25
4.5 การผลิตไฮโดรเจนของ *Anabaena siamensis* จากการแปรผันระยะเวลาในการบ่ม 12 และ 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะการขาดธาตุอาหารไนโตรเจน	28

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อเพลิงมีความสำคัญในการดำเนินชีวิตประจำวันของมนุษย์ เชื้อเพลิงที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่ คือ น้ำมันปิโตรเลียม ก๊าซธรรมชาติ และ ถ่านหิน เป็นต้น แต่เนื่องจากเชื้อเพลิงเหล่านี้มีปริมาณจำกัดและกำลังจะหมดไปในไม่ช้าอีกทั้งการเผาไหม้เชื้อเพลิงเหล่านี้ยังปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออก-ไซด์ และก๊าซอื่นๆ ที่นำไปสู่ปรากฏการณ์เรือนกระจก ดังนั้น นักวิจัยจึงหันมาสนใจและแสวงหาพลังงานทดแทนแหล่งใหม่ ซึ่งจะต้องเป็นพลังงานที่ยั่งยืน ไม่สร้างมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ให้ค่าพลังงานจากการเผาไหม้สูงและมีราคาถูก พลังงานทางเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน คือ ไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนอะตอมเป็นธาตุที่เบาที่สุด มีน้ำหนักอะตอมเฉลี่ย 1.00794 ยูนิต และเป็นองค์ประกอบของน้ำ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดของการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตบนโลก ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ประกอบด้วยไฮโดรเจน 2 อะตอม จัดเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่สามารถเปลี่ยนเป็นพลังงานความร้อนและให้กระแสไฟฟ้าได้ คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย มีความสะอาดสูง และไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม การเผาไหม้ไฮโดรเจนไม่ส่งผลกระทบกับสิ่งแวดล้อม ก๊าซไฮโดรเจนสามารถใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงโดยปฏิกิริยาทางเคมี เพื่อผลิตกระแสไฟฟ้า ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ทั้งในการขับเคลื่อนรถยนต์ ผลิตกระแสไฟฟ้า อุปกรณ์อิเล็คทรอนิคส์ขนาดเล็ก ฯลฯ

การผลิตไฮโดรเจนที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมคือ การผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสง เช่น ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดผลิตไฮโดรเจนจากการตรึงไนโตรเจนโดยอาศัยการทำงานเอนไซม์ไนโตรจีเนส นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียยังสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง หรือจากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตที่ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนในที่มีแสงโดยอาศัยการทำงานเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างลักษณะที่หลากหลาย มีทั้งเซลล์เดียว เช่น *Chroococcidiopsis thermalis* เซลล์เส้นสาย เช่น *Spirulina platensis* และ *Anabaena variabilis* หรืออยู่กันเป็นกลุ่มเซลล์ ไซยาโนแบคทีเรียมีความสามารถเฉพาะในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้พลังงานแสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานในการผลิตชีวมวลและผลิตไฮโดรเจน

การทดลองนี้สนใจศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* ที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายและสามารถตรึงไนโตรเจนภายใต้สภาวะที่ขาดไนโตรเจน เซลล์ปกติของ *A. siamensis* จะมีการพัฒนาไปสู่เซลล์เฮเทอโรซิสต์ เซลล์เฮเทอโรซิสต์จะมีผนังเซลล์ที่หนาเพื่อป้องกันไม่ให้ออกซิเจนซึมเข้าไป ดังนั้น เมื่อออกซิเจนที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ไนโตรจีเนสและไฮโดรจีเนสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ จึงไม่ส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *A. siamensis*

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ในอาหาร BG11 และ $BG11_0$ ที่ขาดไนโตรเจน ($BG11_0$) จากนั้น ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *A. siamensis* ได้แก่ อายุเซลล์ การขาดธาตุอาหาร และระยะเวลาการปรับตัวของเซลล์ภายใต้สภาวะการขาดธาตุอาหาร เป็นต้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ภายใต้สภาวะการขาดธาตุอาหาร เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนในอนาคต

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจน

พลังงานจัดเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์และการพัฒนาประเทศ ในปัจจุบัน ความต้องการใช้พลังงานมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง แหล่งพลังงานที่มนุษย์ใช้กันอยู่ส่วนใหญ่มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น ถ่านหิน แก๊สธรรมชาติ และ น้ำมันดิบ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้มีอยู่ในปริมาณที่จำกัด และคาดว่าจะหมดลงไปในระยะเวลาอีกไม่นาน นอกจากนี้ การเผาไหม้เชื้อเพลิงเหล่านี้ยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดสภาวะโลกร้อน เนื่องจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลมีการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกออกมาสู่ชั้นบรรยากาศ ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงมีการแสวงหาพลังงานทางเลือกใหม่ที่เป็นพลังงานหมุนเวียน มีศักยภาพสูง และเป็นพลังงานสะอาดมาใช้ทดแทนพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

พลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen) จัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นพลังงานสะอาด เมื่อเผาไหม้ไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนจะได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ดังนั้น การใช้พลังงานไฮโดรเจนจะนำไปสู่การลดมลพิษทางอากาศ ไฮโดรเจนอะตอมเป็นธาตุที่มีโครงสร้างทางเคมีที่ไม่ซับซ้อน โดยภายในอะตอมของไฮโดรเจนประกอบด้วยอิเล็กตรอน 1 ตัว ไฮโดรเจนมีค่าความหนาแน่นของพลังงานสูงถึง 122 กิโลจูลต่อกิโลกรัม (Madawar *et al.*, 2000) สสารที่อยู่ในจักรวาลส่วนมากจะประกอบไปด้วยไฮโดรเจนอะตอม ซึ่งจะพบว่าเป็นองค์ประกอบของสสารอื่นๆ เสมอ เช่น น้ำ (H_2O) ที่มีส่วนผสมของโฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอม ไฮโดรเจนเป็นธาตุและก๊าซที่เบาที่สุด มีน้ำหนักเบากว่าอากาศถึง 14 เท่า คุณสมบัติทั่วไปของก๊าซไฮโดรเจน (H_2) คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟได้ง่าย และไม่เกิดเปลวไฟเมื่อเผาไหม้ จึงไม่ทำลายโอโซนและไม่ทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก ไฮโดรเจนจึงมีคุณสมบัติเป็นเชื้อเพลิงที่ดีและสามารถพัฒนาเป็นเชื้อเพลิงหลักได้ ในปัจจุบัน มีการใช้ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงในหลากหลายด้าน เช่น ใช้สำหรับผลิตกระแสไฟฟ้า ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับครัวเรือน ใช้สำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน เครื่องไอพ่น เครื่องกังหันลม เป็นต้น มีการคาดการณ์ว่า ระบบพลังงานในอนาคตจะใช้ไฮโดรเจนเป็นตัวพาพลังงาน (Energy carrier) และเป็นเชื้อเพลิงหลักแทนปิโตรเลียม เนื่องจากไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากแหล่งทรัพยากรหลากหลาย เช่น จากการแยกน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า จากพลังงานแสงอาทิตย์ จากการแปรรูปปิโตรเลียม หรือจากชีวมวล รวมไปถึงการผลิตผ่านกระบวนการทางชีวภาพ เป็นต้น นอกจากนี้ ผลผลิตที่ได้จากการเผาไหม้ไฮโดรเจน คือ ความร้อนและน้ำ ไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นสาเหตุของปรากฏการณ์ก๊าซเรือนกระจกหรือภาวะโลกร้อน และไม่เกิดอนุภาคขนาดเล็กจากการเผาไหม้ที่เป็นสาเหตุของปัญหาระบบทางเดินหายใจ

2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน

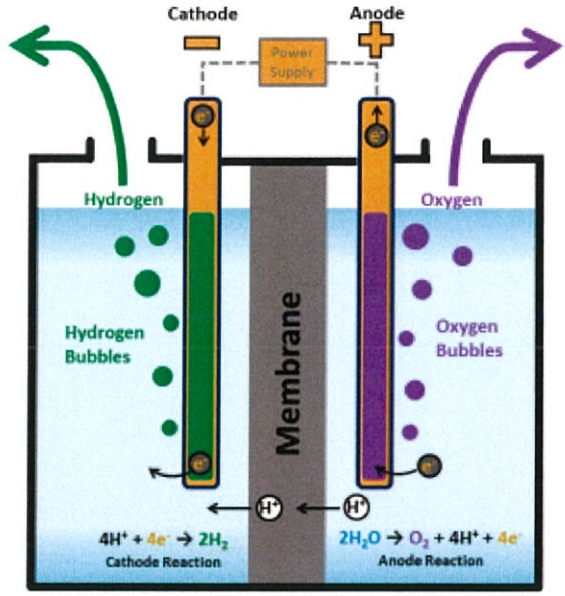
ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากแหล่งวัตถุดิบหลายชนิด เช่น น้ำ ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน พลังงานนิวเคลียร์ แหล่งทรัพยากรทดแทน ชีวมวล หรือจากสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งออกได้ 3 กระบวนการ ดังนี้

2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาเคมีภายใต้อุณหภูมิสูง

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาเคมีภายใต้อุณหภูมิสูง (Thermo-chemical process) เป็นการใช้ความร้อนในการเปลี่ยนมวลชีวภาพ ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซผสม ได้แก่ ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ (H_2O) และมีเทน (CH_4) ฯลฯ จากนั้น ทำการแยกไฮโดรเจนออกมาด้วยวิธีการเผาไหม้ ซึ่งการผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการความร้อนเคมี ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam Reforming) และกระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification) ในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำจากก๊าซธรรมชาติเป็นกระบวนการที่ใช้ในการผลิตไฮโดนเจนในเชิงพาณิชย์ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ แต่ข้อเสียของกระบวนการนี้ คือ ก่อให้เกิดมลพิษ เนื่องจากในกระบวนการนี้จะมีสารพิษตกค้างจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เกิดการเผาไหม้ และใช้สารตั้งต้นที่มาจากก๊าซธรรมชาติหรือถ่านหินที่มีอยู่ในปริมาณจำกัด

2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า

การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า (Electro-chemical process) เป็นกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำให้ได้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า ปฏิกิริยาจะเกิดในส่วนที่เรียกว่า “อิเล็กโทรไลเซอร์ (Electrolyzer)” ซึ่งจะมีขั้วบวกและขั้วลบของไฟฟ้าแยกออกจากกัน ไฮโดรเจนจะเข้าไปจับกับขั้วลบ ส่วนออกซิเจนจะเข้าไปจับกับขั้วบวก กระบวนการนี้ใช้กระแสไฟฟ้าสูงถึง 90 กิโลวัตต์และสามารผลิตไฮโดรเจนได้สูงถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต โดยก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูง กระบวนการนี้มีหลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของอิเล็กโทรไลต์เซอร์ เช่น พอลิเมอร์อิเล็กโทรไลต์เมมเบรนอิเล็กโทรไลต์เซอร์ (PEM eletrolyzer) แอลคาไลน์อิเล็กโทรไลเซอร์ (Alkaline eletrolyzer) และโลหะออกไซด์อิเล็กโทรไลเซอร์ (Solid oxide electrolyzer) ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ไม่ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจกระหว่างกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ส่วนข้อเสียของวิธีการนี้ คือ ต้องการใช้กระแสไฟฟ้าจำนวนมาก และสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายน้ำ กระบวนการนี้ต้องใช้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียส เพื่อแยกโมโลกุลของน้ำให้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยการแยกสลายน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า
(ที่มา : https://www.energy.gov/eere/fuelcells/hydrogen-production-electrolysis)

2.2.3 การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนทางชีวภาพ

การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนทางชีวภาพ (Photobiological process) โดยทั่วไปสามารถแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการหลัก ได้แก่

2.2.3.1 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการใช้แสง

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการใช้แสง (Light - driven process) สามารถจำแนกเป็น 3 วิธีการย่อย ดังนี้

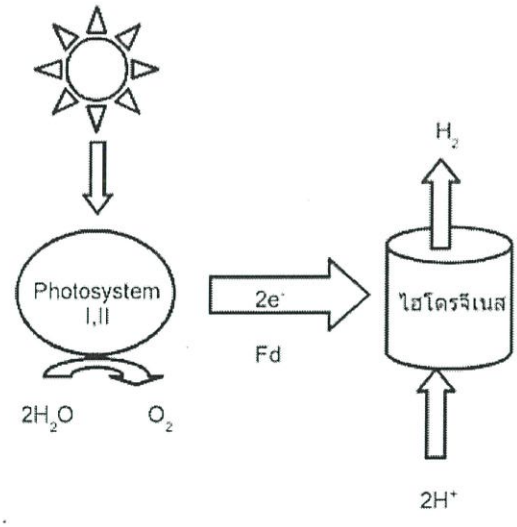
1) การผลิตไฮโดรเจนโดยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง

การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis) เป็นกระบวนการที่ใช้ระบบแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) เช่น สาหร่ายสีเขียว (Green algae) และ ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) เพื่อแยกโมโลกุลน้ำโดยการดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์โดยตรง ให้ได้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนด้วยอัตราส่วน 2:1 ดังสมการที่ 2.1 (Ni *et al.*, 2006)

$$2H_2O \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} 2H_2 + O_2 \qquad \text{สมการ 2.1}$$

ระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) จะดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์ ทำให้น้ำแตกตัวเป็นออกซิเจน (O_2) โปรตอน (H^+) และอิเล็กตรอน (e^-) จากนั้น อิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังเฟอร์รีดอกซิน

(Ferredoxin, Fd) โดยผ่านระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) เฟอร์รีดอกซินที่ถูกรีดิวซ์จะส่งอิเล็กตรอนให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง
(ที่มา : ขนิษฐา หมูโสภิญ, 2010)

ออกซิเจนในระบบสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องควบคุมระดับออกซิเจนให้มีค่าต่ำกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้สาหร่ายสามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Hallenbeck and Benemann, 2002) สาหร่ายสีเขียวหลายชนิดที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากการแยกสลายโมเลกุลน้ำด้วยแสงแบบทางตรงได้ เช่น *Chlamydomonas reinhardtii* (Melis *et al.*, 2000), *Chlorella fusca* (Winkler *et al.*, 2002) เป็นต้น

2) การผลิตไฮโดรเจนโดยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม

การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis) ส่วนมากพบในสิ่งมีชีวิตที่มีคุณสมบัติในการใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงาน และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนประเภทนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนที่แยกออกจากกัน (รูปที่ 2.3) ในขั้นตอนแรก สาหร่ายจะใช้พลังงานแสงผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงหนึ่งและระบบแสงสองร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตเก็บสะสมเป็นชีวมวลของสาหร่าย ดังสมการที่ 2.2 และในขั้นตอนที่สอง ชีวมวลของสาหร่ายจะถูกนำไปใช้ในการสร้างไฮโดรเจนดังสมการที่ 2.3 ถึงสมการที่ 2.5 (Levin *et al.*, 2004) สาหร่ายที่สามารถผลิตไฮโดรเจนจากการแยกสลายโมเลกุลน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อมได้ เช่น *Gloeocapsa alpicola* (Troshina *et al.*, 2002) เป็นต้น

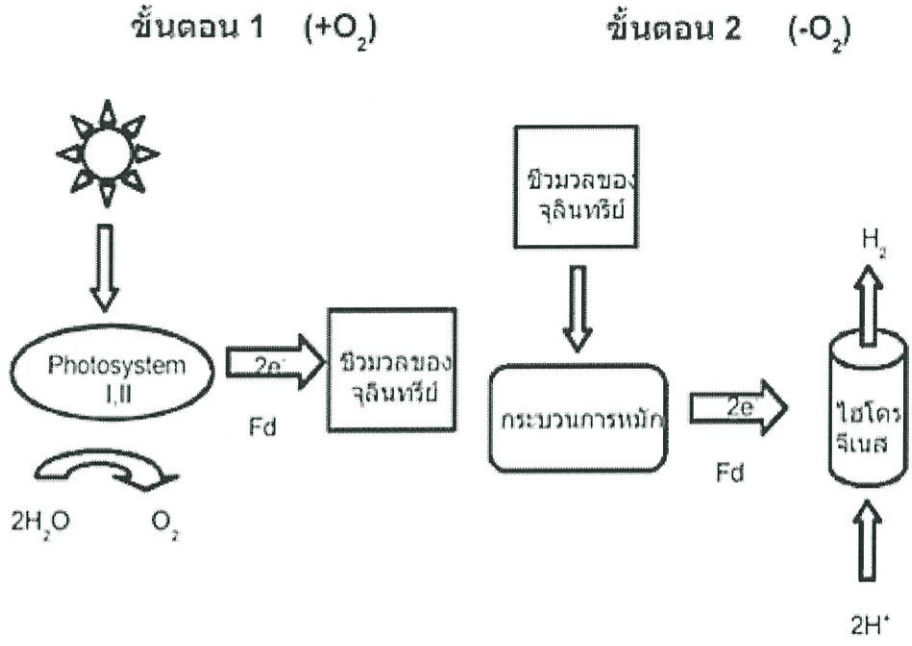
$$6H_2O + 6CO_2 \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \qquad \text{สมการ 2.2}$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \longrightarrow 12H_{12} + 6CO_2 \qquad \text{สมการ 2.3}$$

$$2CH_3COOH + 4H_2O \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} 8H_2 + 4CO_2 \qquad \text{สมการ 2.4}$$

ปฏิกิริยารวมดังนี้

$$12H_2O \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} 12H_2 + 6O_2 \qquad \text{สมการ 2.5}$$



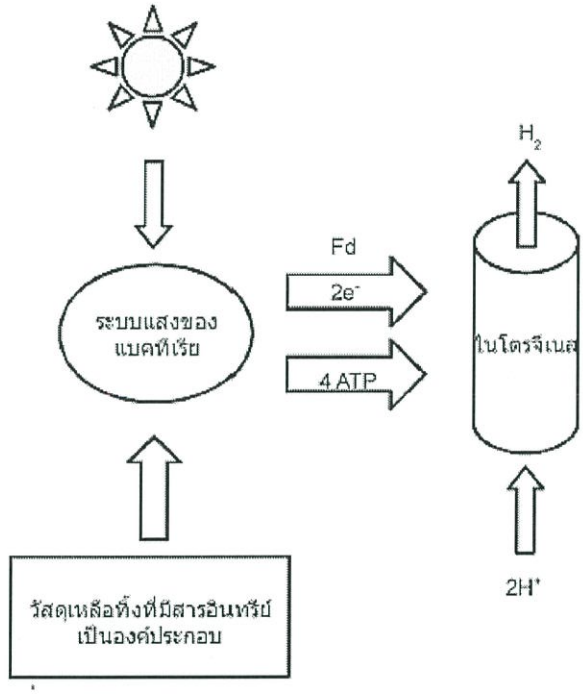
รูปที่ 2.3 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม
(ที่มา : ขนิษฐา หมูโสภิญ, 2010)

3) การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง

การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการหมักแบบใช้แสง (Photofermentation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น แบคทีเรียสีม่วง (Purple bacteria) เป็นต้น การผลิตไฮโดรเจนจากการสังเคราะห์แสงจะมีระบบสังเคราะห์แสงเดียวและไม่สร้างออกซิเจน ซึ่งแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสาหร่ายและพืชชั้นสูง แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะผลิตไฮโดรเจนโดยใช้สารประกอบอินทรีย์หรือชีวมวลเป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตไฮโดรเจนและปราศจากอากาศ (รูปที่ 2.4) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้กรดอินทรีย์อย่างง่ายเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านไปยังเฟอร์รีดอกซิน โดยใช้พลังงานในรูป ATP ซึ่งอิเล็กตรอน 1 ตัวจะต้องการใช้พลังงาน 2 ATP จากนั้น เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเพื่อสร้างไฮโดรเจน ดังสมการที่ 2.6 ที่แสดงการผลิตไฮโดรเจนจากกรดแลคติก

$$C_2H_6O_3 + H_2O \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} 2CO_2 + 4H_2 \qquad \text{สมการ 2.6}$$

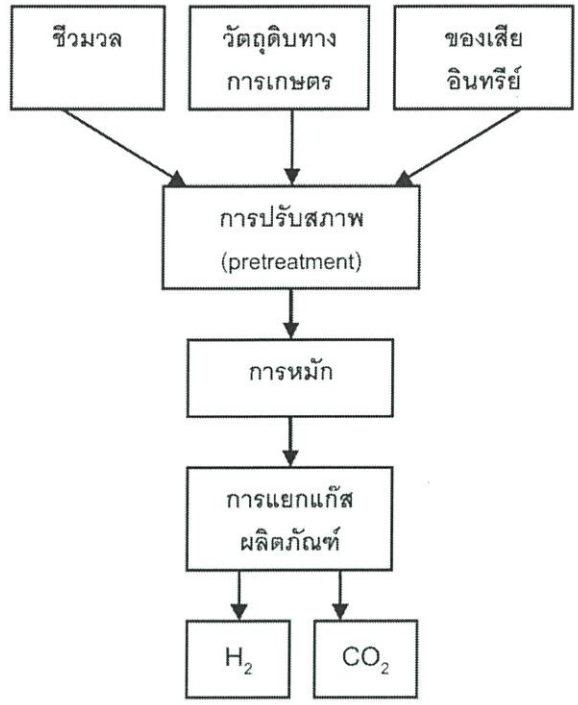
การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลายชนิด เช่น สารอินทรีย์ ของเสียที่เป็นชีวมวล ไม่ว่าจะเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมหรือจากการเกษตร ฯลฯ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก ได้แก่ *Rhodobacter capsulatus* (Ooshima et al., 1998) และ *Rhodopseudomonas capsulate* (Fang et al., 2005) เป็นต้น



รูปที่ 2.4 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง
(ที่มา : ขนิษฐา หมูโสภิญ, 2010)

2.2.3.2 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแบบไม่ใช้แสง

การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Non light-driven process) จะเกิดในแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศโดยใช้สารตั้งต้นประเภทคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลกลูโคส ชีวมวล ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ของเสียทางการเกษตรและจากโรงงานอุตสาหกรรม การผลิตไฮโดรเจนได้จากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสภายใต้สภาวะไม่ใช้แสง (รูปที่ 2.5) และเกิดผลพลอยได้เป็นสารอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์



รูปที่ 2.5 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง
(ที่มา : ขนิษฐา หมูโสภิญ, 2010)

เมื่อใช้กลูโคส 1 โมลเป็นสารตั้งต้น จะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 4 โมล เมื่อได้กรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ดังสมการที่ 2.7 หรือผลิตไฮโดรเจนได้ 2 โมล เมื่อได้กรดบิวทีริกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ดังสมการที่ 2.8 (Hawkes et al., 2002)

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \longrightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2 \qquad \text{สมการ 2.7}$$

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2 \qquad \text{สมการ 2.8}$$

แต่ในทางปฏิบัติ การผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 4 โมลต่อกลูโคส 1 โมลนั้นไม่สามารถเกิดขึ้นได้จริง เนื่องจากสารตั้งต้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นชีวมวลของจุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์สุดท้ายมักจะมีทั้งกรดอะซิติกและกรดบิวทีริกอยู่รวมกัน นอกจากนี้ ยังมีสารเมแทบอไลต์อื่นๆ เช่น กรดโพรพิโอนิก แอลกอฮอล์ และกรดแลคติกรวมอยู่ด้วย จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ แบคทีเรียพวก Facultative anaerobe ได้แก่ *Escherichia coli*, *Enterobacter* และ *Citrobacter* และ แบคทีเรียพวก Strict anaerobe ได้แก่ Rumen bacteria ฯลฯ ข้อดีของการใช้จุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นหัวเชื้อในการผลิตไฮโดรเจน คือ สามารถใช้สารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่มีข้อจำกัด คือ จะต้องรักษาสภาวะปลอดเชื้อระหว่างการผลิต แบคทีเรียพวก *Clostridium* sp. และ *Enterobacter* sp. มีการนำมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงอย่าง

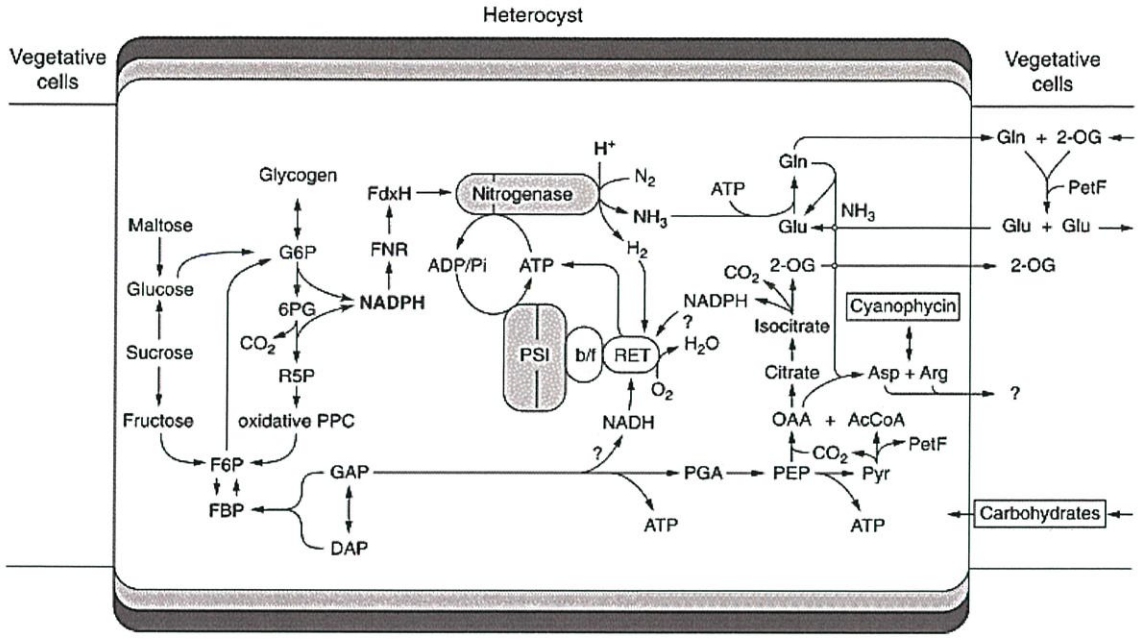
แพร่หลาย ส่วนการใช้กลุ่มจุลินทรีย์เป็นหัวเชื้อในการผลิตไฮโดรเจนนั้น ไม่จำเป็นต้องควบคุมสภาวะปลอดเชื้อ เนื่องจากการมีจุลินทรีย์หลายประเภททำงานร่วมกัน ซึ่งอาจส่งผลให้สามารถผลิตไฮโดรเจนในปริมาณที่สูงขึ้น นอกจากนี้ ยังสามารถใช้วัตถุดิบได้หลากหลายและวัตถุดิบราคาถูก เช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอีกด้วย อย่างไรก็ตาม ในกลุ่มจุลินทรีย์อาจมีจุลินทรีย์ที่ผลิตมีเทนปะปนอยู่ ทำให้ถูกนำไปใช้ในกระบวนการผลิตมีเทน ส่งผลให้ได้ปริมาณไฮโดรเจนลดลง ดังนั้น จำเป็นต้องมีการกำจัดจุลินทรีย์พวกนี้ก่อนนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการต่างๆ เช่น การให้ความร้อน การปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง การใช้สารเคมี เช่น 2-โบรโมอีเธนซัลโฟนิกแอซิด (2-Bromoethanesulfonic acid: BESA) อะเซทิลีน (Acetylene) และ ไอโอโดโพรเพน (Iodopropane) (Sparling *et al.*, 1997; Zhang and Shen, 2007)

2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตชนิดหนึ่งที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Oxygenic phototrophic prokaryote) โดยมีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ และมีคลอโรฟิลล์ เอ เป็นรงควัตถุเหมือนในสาหร่ายสีเขียวและพืช ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จาก 2 กระบวนการคือ กระบวนการตรึงไนโตรเจน และกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งการผลิตไฮโดรเจนจะผ่านกระบวนการใดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายส่วนใหญ่จะผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) ซึ่งจะเกิดในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ โดยมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนและเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย ซึ่งจะได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตผลพลอยได้

2.3.1 กระบวนการตรึงไนโตรเจน

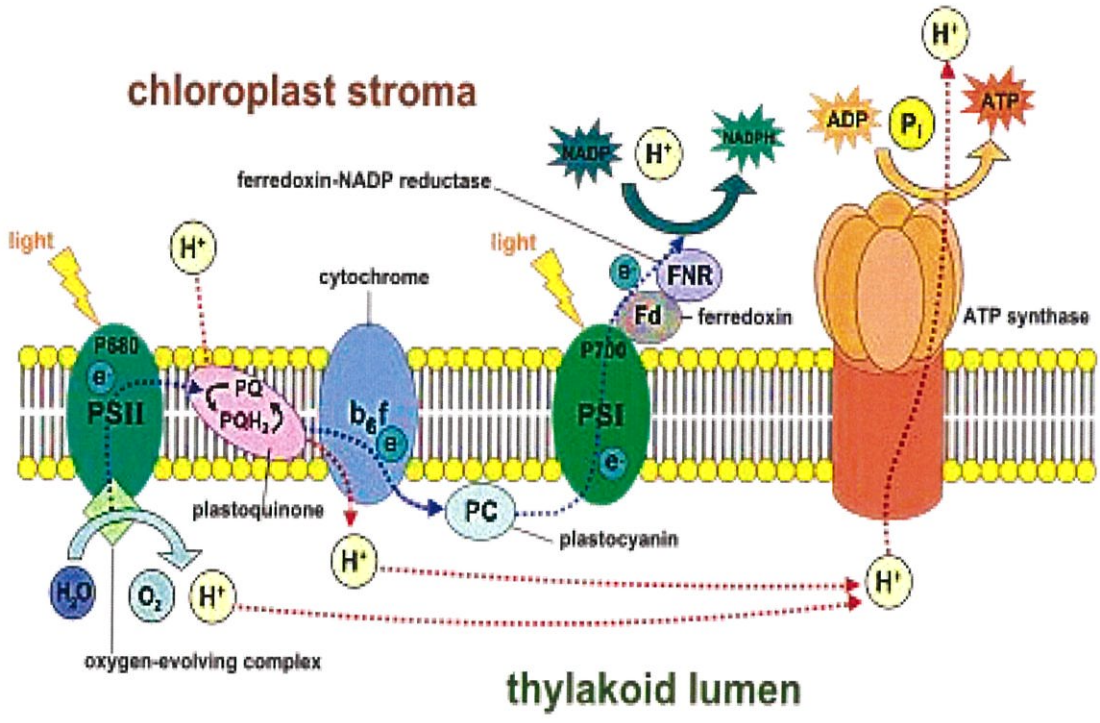
การตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) จากอากาศ เริ่มจากการรีดิวซ์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียจากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยอาศัยพลังงานจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตผลพลอยได้ (รูปที่ 2.6) ไฮโดรเจนที่ได้จะถูกออกซิไดซ์กลับไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอนด้วยเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส ในสภาวะที่เหมาะสม เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกยับยั้งการทำงานในสภาวะที่มีออกซิเจน ดังนั้น เอนไซม์ไนโตรจีเนสจึงทำงานเฉพาะในสภาวะที่ไม่มีอากาศและไม่มีแสงเท่านั้น เพราะกระบวนการสังเคราะห์แสงมีออกซิเจนเป็นผลพลอยได้ ไซยาโนแบคทีเรียจึงได้พัฒนากลไกที่ป้องกันการทำงานของเอนไซม์จากการยับยั้งของออกซิเจน โดยสร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst) ขึ้นมาแยกจากเซลล์ปกติ ภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์จะไม่มีระบบแสงสองและมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ และส่งสารประกอบไนโตรเจนไปสู่เซลล์ข้างเคียง ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะอยู่ภายในเซลล์ปกติ กระบวนตรึงไนโตรเจนจะทำงานในขณะที่ไม่มีแสงเท่านั้น (Bergman *et al.*, 1997)



รูปที่ 2.6 กระบวนการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย
(ที่มา : https://www.cell.com/trends/plant-science)

2.3.2 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

กระบวนการสังเคราะห์แสง ประกอบไปด้วยระบบแสง 2 ระบบ โดยกระบวนการสังเคราะห์แสงเริ่มจากระบบแสงสองรับพลังงานแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร เพื่อกระตุ้นให้มีการแตกตัวของน้ำให้ได้เป็นออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะถูกส่งผ่านไปยังไซโตโครมคอมเพล็กซ์ (Cytochrome complex) และส่งต่อไปยังระบบแสงหนึ่ง ซึ่งจะรับพลังงานแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร และส่งต่ออิเล็กตรอนไปยังเฟอร์รีดอกซิน กระตุ้นให้เกิดการรีดิวซ์ $NADP^+$ ให้กลายเป็น NADPH และ H^+ โปรตอนที่สะสมภายในเซลล์จะถูกนำไปใช้สร้าง ATP จากกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านวิถี Calvin-Benson นอกจากนี้ เฟอร์รีดิกซินยังสามารถส่งอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์เฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส (Ferredoxin oxidoreductase) เพื่อใช้ในการผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียจากกระบวนการสังเคราะห์แสง
(ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Light-dependent_reactions)

2.4 ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue green algae) เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดแรกที่กำเนิดขึ้นมาบนโลก โดยถูกพบอยู่ในหินตะกอนที่เกิดขึ้นเมื่อ 3,500 ล้านปีที่ผ่านมา ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ พบทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม บนบก และสภาพแวดล้อมที่เลวร้าย เช่น ทะเลสาบที่ขั้วโลกใต้ หรือ น้ำพุร้อน ไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะของเซลล์ที่คล้ายกับที่พบในแบคทีเรียมากกว่าพวกสาหร่าย ไซยาโนแบคทีเรีย เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน ประกอบด้วยออร์แกเนลที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีสารสีที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง คือ คลอโรฟิลล์-เอ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ ไซยาโน-แบคทีเรียส่วนใหญ่ มีความสามารถในการปรับตัวสูงมีการสร้างเซลล์พิเศษ ที่สามารถตรึงไนโตรเจนและเปลี่ยนเป็นสารประกอบอินทรีย์ เก็บไว้ในเซลล์ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตต่อไปไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดยังสร้างเมือกหนาหุ้มรอบเซลล์ เพื่อช่วยป้องกันเซลล์จากรังสีอัลตราไวโอเลตและความแห้งแล้ง และมีการสร้างแวคิวโอลอากาศ (Gas Vacuole) เพื่อช่วยการลอยตัวในน้ำ เพื่อให้อยู่ในระดับที่สามารถรับแสงจากดวงอาทิตย์ได้อย่างเหมาะสม นอกจากนี้ ยังสร้างสปอร์ที่ช่วยในการสืบพันธุ์ โดยสปอร์จะมีผนังเซลล์หนา และมีขนาดใหญ่ เพื่อสะสมอาหาร และปกป้องเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความแห้งแล้ง เป็นต้น

2.5 ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

Anabaena siamensis เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนาของประเทศไทย มีลักษณะเป็นเส้นสาย โดยจะมีเซลล์ต่อกันเป็นข้อๆ และสามารถสร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการตรึงไนโตรเจน จึงทำให้ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้สามารถตรึงไนโตรเจนที่อยู่ในบรรยากาศได้ *A. siamensis* มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์อยู่บริเวณปลายสุดของเส้นสาย นอกจากนี้ *A. siamensis* ยังสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะที่ขาดแหล่งไนโตรเจนหรือแหล่งคาร์บอน โดยเมื่ออยู่ในสภาวะที่ปราศจากไนโตรเจน จะไปกระตุ้นการสร้างเฮเทอโรซิสต์เพื่อทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนที่อยู่ในอากาศ มาทดแทนอาหารที่ขาดไนโตรเจน สำหรับประโยชน์ของ *A. siamensis* คือ ใช้ในการทำปุ๋ยชีวภาพทางเกษตรและช่วยฟื้นฟูสภาพโครงสร้างดินให้รองรับ น้ำ อากาศ และธาตุอาหารได้ดีขึ้น นอกจากนี้ ยังนำมาใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น และที่สำคัญคืออาจนำมาใช้ในการผลิตพลังงานไฮโดรเจนซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกชนิดใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน โดย *A. siamensis* ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูง เนื่องจากมีเอนไซม์ถึง 3 ชนิด คือ เอนไซม์ไนโตรจีเนส เอนไซม์ไบไดเรคชันนาลไฮโดรจีเนสหรือเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส และเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส

รูปที่ 2.8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Khetkorn และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 สายพันธุ์ที่แยกได้จากนาข้าวในประเทศไทย โดยพบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารประกอบไนโตรเจน หรือเซลล์ได้รับความเครียดสูงจากเกลือต่างๆ จะทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนน้อยลง แต่เมื่อควบคุมปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน เช่น อายุของเซลล์ความเข้มแสง ช่วงเวลาการให้แสง และแหล่งคาร์บอน ส่งผลให้เซลล์มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงขึ้น โดยพบว่า อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *A. siamensis* สูงสุดเท่ากับ 32 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง

Taikhao และ Phunpruch (2017) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ตรึงของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* โดยพบว่า *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 and Allen-Arnon เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มีการสร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ การขาดซัลเฟอร์ในช่วงการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้ *A. siamensis* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นอีกด้วย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่แยกได้จากดินนาของประเทศไทย

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (ภาคผนวก ก) (Rippka *et al.*, 1979)

3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน ($BG11_0$) (ภาคผนวก ก) (Rippka *et al.*, 1979)

3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.2.1 กรดบอริก (H_3BO_3) (Carlo Erba Reagents, Italy)

3.2.2.2 กรดซิตริก ($C_6H_6O_7$) (Carlo Erba Reagents, Italy)

3.2.2.3 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)

3.2.2.4 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)

3.2.2.5 โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) (Fluka, Switzerland)

3.2.2.6 โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) (Ajax, Australia)

3.2.2.7 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka Chemical Corp., USA)

3.2.2.8 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Carlo Erba Reagents, Italy)

3.2.2.9 โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) (Carlo Erba Reagents, Italy)

3.2.2.10 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)

3.2.2.11 ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA) (Promega, USA)

3.2.2.12 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Carlo Erba Reagents, Italy)

3.2.2.13 เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4$ citrate) (British Drug Houses, UK)

3.2.2.14 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)

3.2.2.15 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)

3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

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

3.2.4 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

3.2.4.1 ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอน (Praxair, Thailand)

3.2.4.2 ก๊าซอาร์กอน (ความบริสุทธิ์ 99.999%) (Thonburiwattana Ltd., Thailand)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 กระบอกตวง (Cylinder) (Kartell, Italy)

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

3.3.3 เข็มฉีดก๊าซ (Scientific Glass Engineering, Australia)

3.3.4 ขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร (Gas tight vial) (National Scientific, USA)

3.3.5 คิวเวตต์ควอตซ์ (Quartz cuvette) (Starna Scientific, UK)

3.3.6 เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)

3.3.7 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)

3.3.8 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)

3.3.9 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)

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

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

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

3.3.13 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Shimadzu,UV1601,Japan)

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

3.3.15 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Scientific Promotion, Binder, Thailand)

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)

3.3.19 หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.3.20 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) (Labvalley, Thailand)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 วิธีการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*

เตรียม Starter ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BG11 และ $BG11_0$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำเซลล์ Starter นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 และ $BG11_0$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 จากนั้น นำเซลล์ไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที จนกระทั่งเชื้อเจริญถึงระยะเจริญแบบเพิ่มทวีคูณ (Log phase) ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อสามารถเจริญได้สูงที่สุด โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 1 - 2 สัปดาห์

3.4.2 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*

การวัดการเจริญของเซลล์สามารถทำได้ 3 วิธี ดังนี้

3.4.2.1 วิธีการวัดค่าความขุ่นของเซลล์

เก็บตัวอย่างเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยปิเปตสารละลายเซลล์จากฟลาสก์ที่เพาะเลี้ยงเซลล์มา 1 มิลลิลิตร จากนั้น นำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร โดยใช้อาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์เป็น Blank

3.4.2.2 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

เก็บตัวอย่างเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมเมทานอลความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดังกล่าว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็น Blank จากนั้น นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอตามวิธีของ MacKinney (1941) ดังแสดงในภาคผนวก ข

3.4.2.2 วิธีการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

เก็บตัวอย่างเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงไปบนสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์ นำสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดาเพื่อนับจำนวนเซลล์ จากนั้น นำมาคำนวณหาปริมาณเซลล์ตามวิธีในภาคผนวก ข

3.4.3 วิธีการศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 และ $BG11_0$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น ทำการศึกษาการเจริญของเซลล์ โดยการเก็บตัวอย่างเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิตรมาวัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และ นับปริมาณเซลล์ด้วยHaemacytometer ตามวิธีในข้อ 3.4.2

3.4.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 และ $BG11_0$ มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในอาหารทดสอบ และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์มาใส่ในขวด Vial นำไปไล่อากาศโดยการพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที นำขวด Vial ไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง หรือจนกว่าปริมาณไฮโดรเจนจะลดลง จากนั้น นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Headspace) มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) โดยสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนแสดงในตารางที่ 3.1 เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนแล้ว จึงนำเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ จากนั้นคำนวณค่าการผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในภาคผนวก ข

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph–Thermal Conductivity Detector (GC - TCD))

พารามิเตอร์	สภาวะ
Column	Packed column 2m ; Molecular sieve 5 ^{0}A 60/80 mesh
Detector	Thermal conductivity detector (TCD)
Temperature Program	Injector temperature : 100 °C Column temperature: 50 °C Detector temperature: 100 °C
Carrier gas	Argon gas (99.999% purity)
Carrier gas flow rate	20 ml/min

3.4.5 วิธีการศึกษาอายุของเซลล์ *A. siamensis* ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 และ $BG11_0$ ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ เมื่อครบเวลา นำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในอาหารทดสอบ และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้น

นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวด Vial นำไปไล่อากาศโดยการพ่นก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปบ่มในที่มืด จากนั้น นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.4.6 วิธีการศึกษาการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *A. siamensis*

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบ ได้แก่ อาหาร BG11, อาหาร BG11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน ($BG11_0$ หรือ BG11-N) อาหาร BG11 ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (BG11-S) อาหาร BG11 ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (BG11-K) อาหาร BG11 ที่ปราศจากแหล่งฟอสฟอรัส (BG11-P) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ นำเซลล์ไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ในอาหารชนิดเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเซลล์ใส่ในขวด Vial นำขวด Vial ไปไล่อากาศโดยการพ่นก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำขวด Vial ไปบ่มในที่มืด จากนั้น นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.4.7 วิธีการศึกษาระยะเวลาการปรับตัวของเซลล์ภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *A. siamensis*

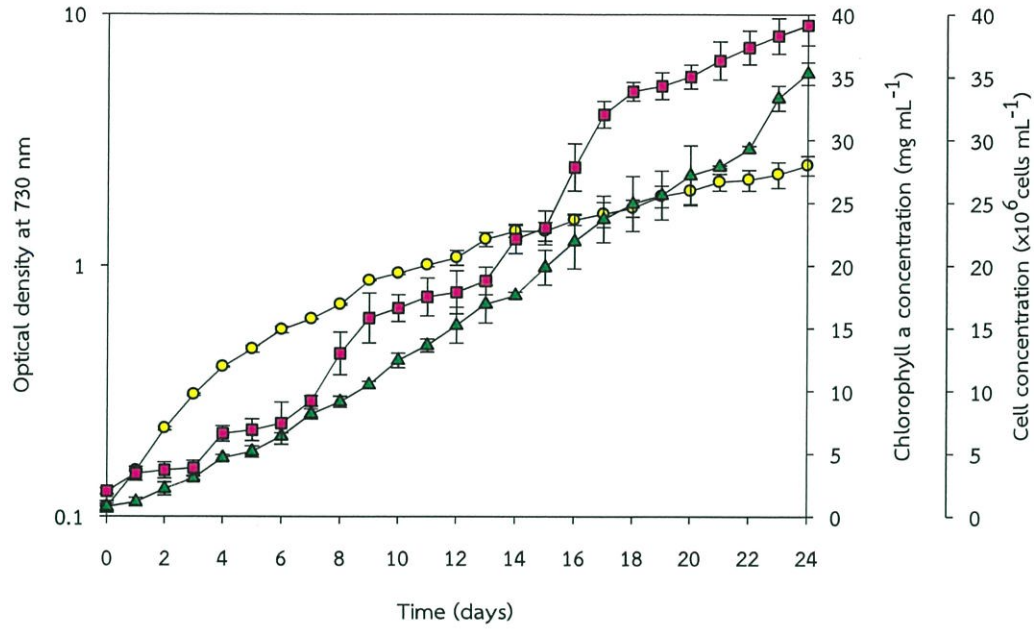
นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ 2 ครั้งและกระจายเซลล์ในอาหาร $BG11_0$ จากนั้น นำเซลล์ไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ในอาหาร $BG11_0$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวด Vial แล้วนำไปไล่อากาศโดยการพ่นก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที นำขวด Vial ไปบ่มในที่มืด จากนั้น นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

บทที่ 4

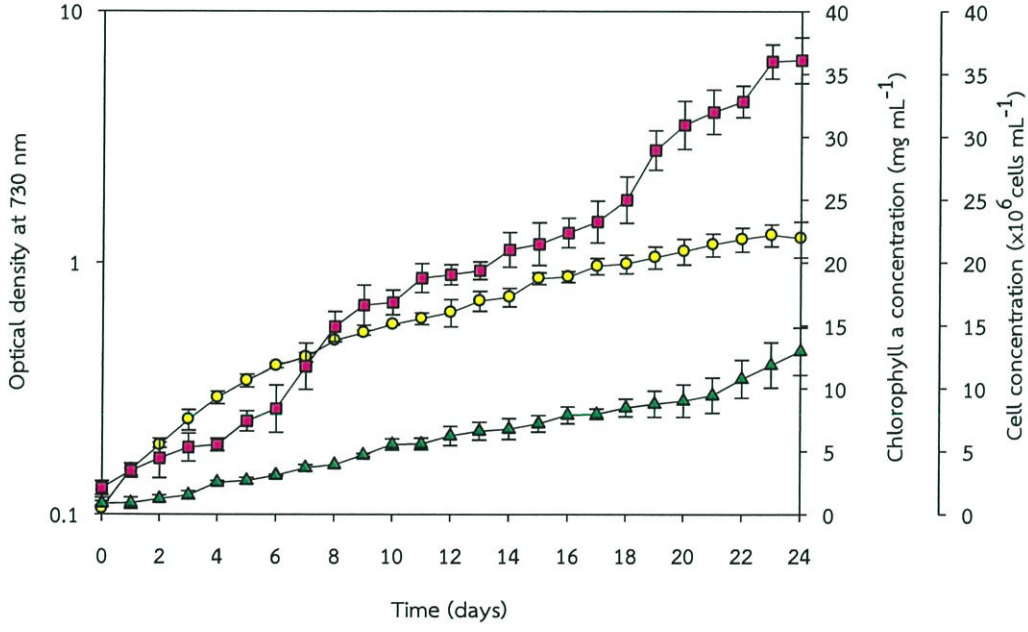
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

จากการศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชนิด คือ อาหาร BG11 และอาหาร $BG11_0$ (อาหาร BG11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน) โดยจะทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 วัน และศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ 3 วิธี ได้แก่ การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธีฮีมาไซโตมิเตอร์ ทุกๆ 24 ชั่วโมง จากการวัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร พบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นทั้งในอาหาร BG11 (รูปที่ 4.1 ก) และอาหาร $BG11_0$ (รูปที่ 4.1 ข) โดยในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 เซลล์จะเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด (Logarithmic phase) เมื่อพิจารณาผลของจำนวนเซลล์จากการนับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์พบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มีจำนวนเซลล์มากขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (รูปที่ 4.1 ก และ ข) สำหรับผลการวัดการเจริญเติบโตโดยการวัดความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 มีความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ เอ สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.1 ก และ ข) ที่เป็นอย่างนั้นเนื่องจากไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญของเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ เมื่อไม่มีไนโตรเจน เซลล์จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงและยังส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของเซลล์อีกด้วย โดยเฉพาะคลอโรฟิลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ จะมีปริมาณน้อยกว่าในอาหาร BG11 อย่างเห็นได้ชัด



(ก)

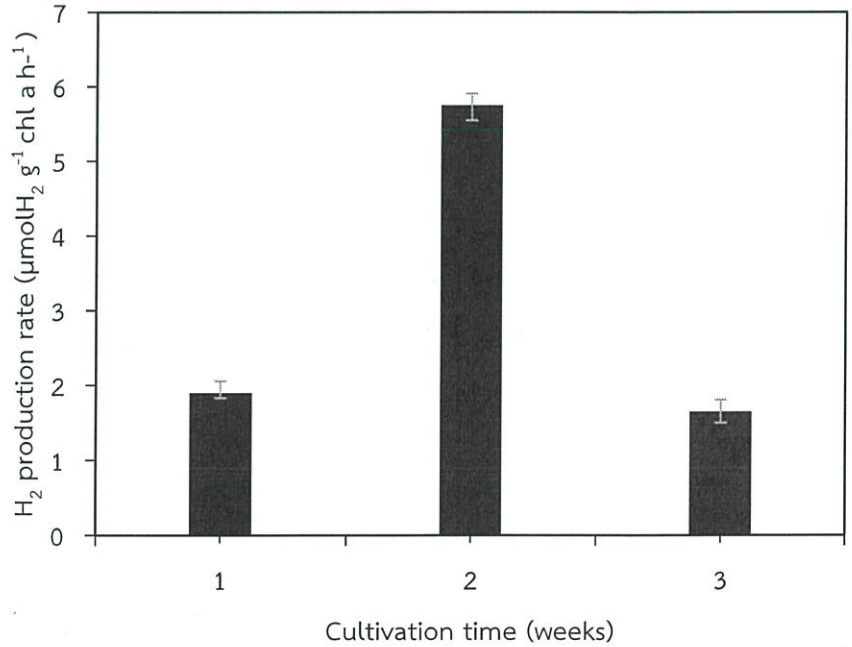


(ข)

รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ปริมาณเซลล์และความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ เอ ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 (ก) และอาหาร $BG11_0$ (ข)

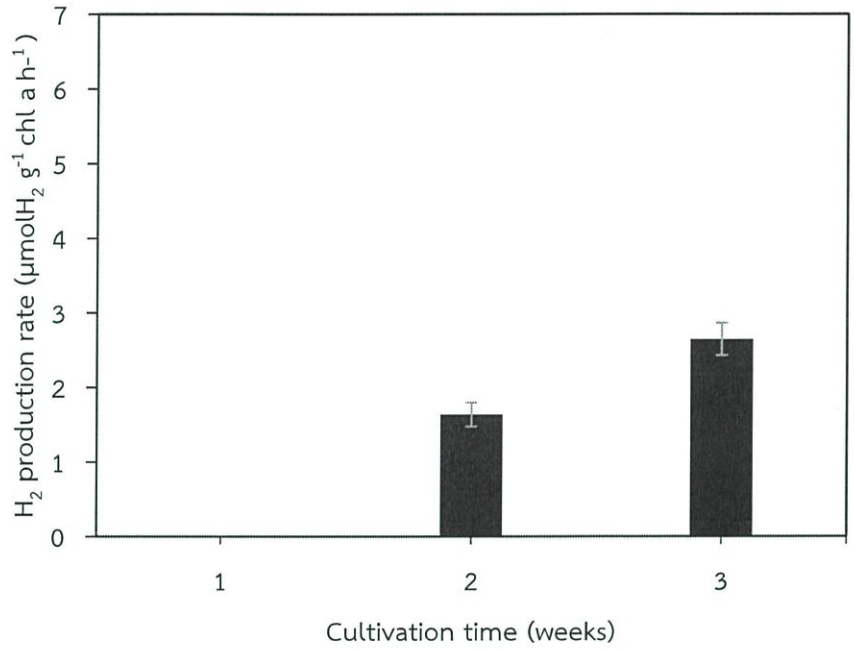
4.2 ผลการศึกษาอายุของเซลล์ *Anabaena siamensis* ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากการศึกษาอายุของเซลล์ *A. siamensis* ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยนำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มาเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 และอาหาร $BG11_0$ (โดยให้เซลล์มีค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1) ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำเซลล์มากระจายในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ลงในขวด Vial และนำ Vial ไปบ่มในที่มืดภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่าภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 5.755 ± 0.771 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ เอ ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.2) เนื่องจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด การเจริญเข้าสู่ระยะ Log phase เซลล์จะมีการสังเคราะห์แสงสูง มีปริมาณคลอโรฟิลล์มาก มีการสังเคราะห์สารต่างๆ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตเพียงพอ จึงทำให้มีพลังงานเหลือจากกระบวนการดังกล่าว อิเล็กตรอนและโปรตอนถูกนำไปใช้การผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Taikhao และ Phunpruch ในปี ค.ศ. 2017 ที่พบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. มีระยะการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง Log phase เป็นระยะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด



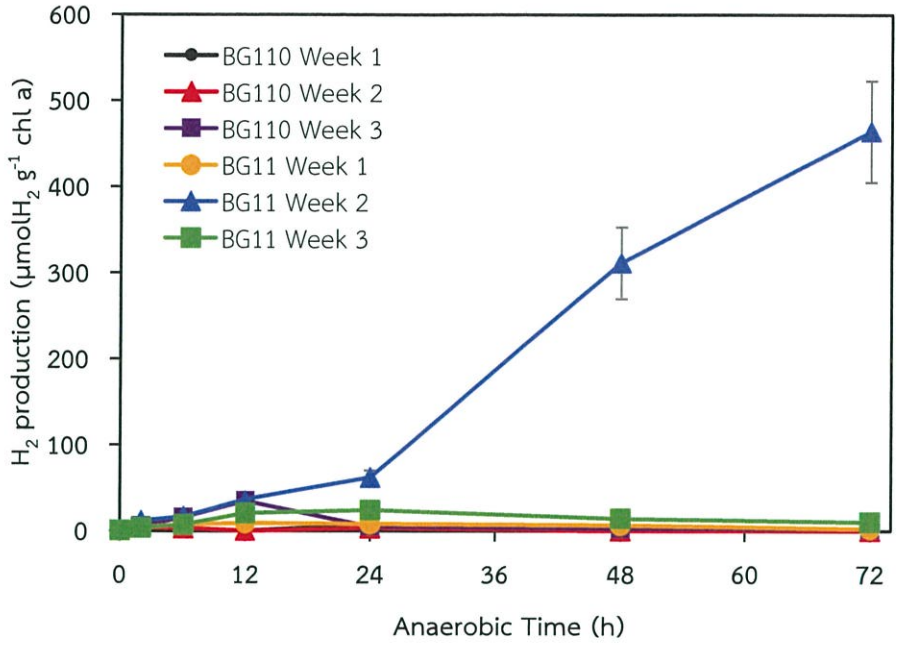
รูปที่ 4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์

สำหรับการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ ในสภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่มีอายุ 3 สัปดาห์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 2.646 ± 0.358 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ เอต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.3) แต่อัตราการผลิตไฮโดรเจนมีค่าต่ำกว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ประมาณ 2.2 เท่า



รูปที่ 4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์

จากการนำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 และอาหาร $BG11_0$ มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ เป็นเวลา 0, 2, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 5.755 ± 0.206 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ เอต่อชั่วโมง เมื่อทำการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ 4.3) ดังนั้น ในการทดลองต่อไป จึงเลือกใช้เซลล์ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มีอายุเซลล์ 2 สัปดาห์ มาศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป



รูปที่ 4.4 การผลิตไฮโดรเจนของ *Anabaena siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 และ $BG11_0$ เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์

4.3 ผลการศึกษาการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Anabaena siamensis*

จากการศึกษาการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* โดยนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบ ได้แก่ อาหาร BG11, $BG11_0$, BG11-S, BG11-K และ BG11-P บ่มเซลล์ในอาหารดังกล่าวในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารที่ทดสอบ 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ลงในขวด Vial นำไปบ่มในที่มืดภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และนำบ่มในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาบ่มภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 12.449 ± 0.386 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ เอต่อชั่วโมง และมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 896.308 ± 0.760 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ เอ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่บ่มในอาหาร BG11 (Control), อาหาร $BG11_0$ (BG11-N), อาหาร BG11-S, อาหาร BG11-P และอาหาร BG11-K ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

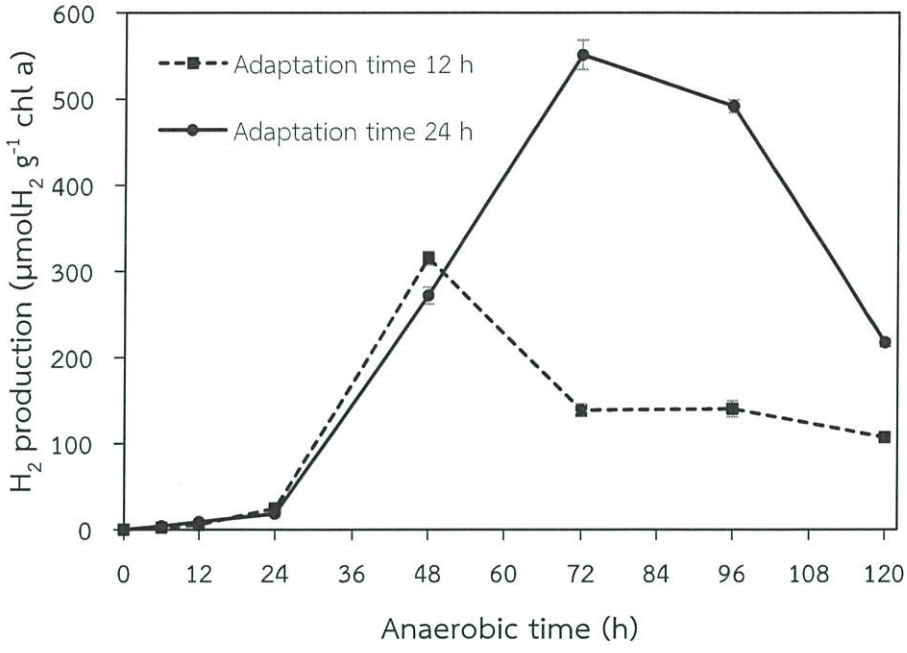
เวลา	การขาดธาตุอาหาร	อัตราการผลิตไฮโดรเจน ($\mu molH_2\ g^{-1}$ chl a h^{-1})	การสะสมไฮโดรเจน ($\mu molH_2\ g^{-1}$ chl a)
24 ชั่วโมง	BG11	ND	ND
	$BG11_0$ (BG11– N)	0.898 ± 0.034	21.552 ± 0.805
	BG11 – S	ND	ND
	BG11 – P	ND	ND
	BG11 – K	ND	ND
48 ชั่วโมง	BG11	0.012 ± 0.002	0.588 ± 0.076
	$BG11_0$ (BG11– N)	6.167 ± 0.224	296.274 ± 0.376
	BG11 – S	1.375 ± 0.007	66.012 ± 0.332
	BG11 – P	ND	ND
	BG11 – K	ND	ND
72 ชั่วโมง	BG11	0.822 ± 0.057	59.189 ± 0.088
	$BG11_0$ (BG11– N)	12.449 ± 0.386	896.308 ± 0.760
	BG11 – S	5.754 ± 0.091	414.310 ± 0.566
	BG11 – P	ND	ND
	BG11 – K	0.014 ± 0.000	1.015 ± 0.017
96 ชั่วโมง	BG11	1.738 ± 0.033	3.171 ± 0.002
	$BG11_0$ (BG11– N)	5.728 ± 0.085	8.137 ± 0.006
	BG11 – S	7.113 ± 0.056	5.356 ± 0.007
	BG11 – P	ND	ND
	BG11 – K	0.019 ± 0.004	0.359 ± 0.000
120 ชั่วโมง	BG11	3.267 ± 0.118	14.173 ± 0.003
	$BG11_0$ (BG11– N)	3.894 ± 0.089	10.643 ± 0.004
	BG11 – S	6.833 ± 0.027	3.234 ± 0.007
	BG11 – P	4.187 ± 0.040	4.760 ± 0.004
	BG11 – K	0.012 ± 0.000	0.288 ± 0.000

*ND (Non-Detected) หมายถึง ไม่สามารถตรวจวัดได้

จากการศึกษาการขาดธาตุอาหารต่างๆ ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* พบว่าการขาดไนโตรเจนจะส่งผลให้เซลล์ *A. siamensis* มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เนื่องจากอาหาร $BG11_0$ เป็นอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน เมื่อขาดแหล่งไนโตรเจนในอาหาร เซลล์ปกติจะพัฒนาไปเป็นเซลล์เฮเทอโรซิสต์ และมีการตรึงไนโตรเจนจากเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงขึ้น การผลิตไฮโดรเจนจึงสูงขึ้น ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า การมีไนโตรเจนในอาหารจะส่งผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสและไฮโดรจีเนส (Dutta *et al.*, 2005 ; Dutta *et al.*, 2000) ในการขาดซัลเฟอร์ เซลล์สาหร่าย *Synechocystis* sp. มีปริมาณไกลโคเจนลดลง และมีการผลิตไฮโดรเจนได้ดีขึ้นเมื่อเทียบกับอาหาร BG11 (Antal *et al.*, 2005) ส่วนการขาดโพแทสเซียม จะทำให้เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนลดลง เนื่องจากโพแทสเซียมมีส่วนช่วยให้กลูโคสภายในเซลล์เปลี่ยนเป็นไกลโคเจน และเมื่อขาดโพแทสเซียม จึงทำให้กลูโคสเปลี่ยนเป็นไกลโคเจนได้น้อยลง เซลล์จึงผลิตไฮโดรเจนได้ลดลงเมื่อเทียบกับอาหาร BG11 และในการขาดฟอสฟอรัส ระบบแสงสองจะถูกยับยั้งได้ช้า จึงทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้ในชั่วโมงหลังๆ แต่หลังจากที่ระบบแสงสองถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ การผลิตไฮโดรเจนจะเพิ่มขึ้น (Khorcheska *et al.*, 2012) ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และนำไปบ่มในอาหาร $BG11_0$ (BG11-N) หรือ BG11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน

4.4 ผลการศึกษาระยะเวลาในการปรับตัวของเซลล์ภายใต้สภาวะการขาดอาหารไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Anabaena siamensis*

จากการศึกษาระยะเวลาในการปรับตัวของเซลล์ ภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาแบคทีเรีย *A. siamensis* โดยนำเซลล์ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหาร $BG11_0$ จากนั้น นำเซลล์ไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหาร $BG11_0$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ลงในขวด Vial นำไปบ่มในที่มืดภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ เป็นเวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่บ่มในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาบ่มภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 551.038 ± 0.667 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ เอ (รูปที่ 4.5) เซลล์ที่บ่มในสภาวะที่ขาดธาตุอาหารจะมีการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเนื่องจากเซลล์มีการสะสมไกลโคเจนสูงขึ้น ส่งผลให้เมื่ออยู่ในสภาวะปราศจากอากาศ จะไปเพิ่มการรีดิวซ์ NAD(P)H ในเอนไซม์ไนโตรจีเนส และการแปรผันระยะเวลาในการบ่มที่ 24 ชั่วโมง สามารถเหนี่ยวนำสารอาหาร สับสเตรทในการผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าบ่มเพียง 12 ชั่วโมง เพราะมีระยะเวลาในการเหนี่ยวนำและสะสมไกลโคเจนมากกว่า จึงทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่า



รูปที่ 4.5 การผลิตไฮโดรเจนของ *Anabaena siamensis* จากการแปรผันระยะเวลาในการบ่ม 12 และ 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะการขาดธาตุอาหารไนโตรเจน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

1) จากการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชนิด คือ อาหาร BG11 และอาหาร BG11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน ($BG11_0$) เป็นเวลา 24 วัน สรุปได้ว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$

2) จากการศึกษาอายุเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยนำ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 และอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ สรุปได้ว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด

3) จากการศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* โดยนำ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาบ่มในอาหารที่ขาดแหล่งอาหารต่างๆ ดังนี้ อาหาร BG11, $BG11_0$, BG11-S, BG11-K และ BG11-P และวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ สรุปได้ว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่บ่มในอาหาร $BG11_0$ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 896.308 ± 0.760 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมต่อคลอโรฟิลล์ เอ และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 12.449 ± 0.386 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมต่อคลอโรฟิลล์ เอต่อชั่วโมง ภายใต้การบ่มในสภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4) จากการศึกษาระยะเวลาการปรับตัวของเซลล์ภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* โดยนำ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาบ่มในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ สรุปได้ว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำบ่มในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจน และมีการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

Antal, T. K., and Lindblad, P. 2005. "Production of H_2 by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH". *Journal of Applied Microbiology*. 98(1): 114-120.

Batyrova, K. A., Tsygankov, A. A., & Kosourov, S. N. 2012. "Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures". *international journal of hydrogen energy*. 37(10): 8834-8839.

Bergman, B., Gallon, J. R., Rai, A. N and Stal, L. J. 1997. "N_2 fixation by non-heterocystous cyanobacteria". *FEMS Microbiology reviews*. 19(3): 139-185.

Datta, M., Nikki, G and Shah, V. 2000. "Cyanobacterial hydrogen production". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16: 8-9.

Dutta, D., De, D., Chaudhuri, S and Bhattacharya, S. K. 2005. "Hydrogen production by cyanobacteria". *Microbial Cell Factories*. 4(1): 36.

Fang, H.H.P., Liu, H and Zhang, T. 2005. "Phototropic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater". *International Journal of Hydrogen Energy*. 30: 785-793.

Hallenbeck, P.C and Benemann, J.R. 2002. "Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes". *International Journal of Hydrogen Energy*. 27: 1185-1193.

Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L and Hussy, I. 2002. "Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization". *International Journal of Hydrogen Energy*. 27: 1339-1347.

Khetkorn, W., Lindblad, P., and Incharoensakdi, A. 2010. "Enhanced biohydrogen production by the N_2-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* strain TISTR 8012". *International journal of hydrogen energy*. 35(23): 12767-12776.

Levin, D.B., Pitt, L and Love, M. 2004. "Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application". *International Journal of Hydrogen Energy*. 29: 173-185.

MacKinney, G. 1941. "Absorption of light by Chlorophyll solutions". *J. Biol. Chem*. 140: 315-322.

Madawar, D., Garg, N and Shah, V. 2000. "Cyanobacterial hydrogen production". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 16: 757-767.

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

Ni, M., Leung, D.Y.C., Leung, M.K.H and Sumathy, K. 2006. "An overview of hydrogen production from biomass". *Fuel Processing technology*. 87: 461-472.

Ooshima, H., Takakuwa, S., Katsuda, T., Okuda, M., Shirasawa, T., Azuma, A and Kato, J. 1998. "Production of hydrogen by a hydrogenase-deficient mutant of *Rhodobacter capsulatus*". *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 85: 470-475.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M and Stanier, R.Y. 1979. Generic assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol*. 111: 1-6.

Sparling, R., Risbey, D and Poggi-Varaldo, H.M. 1997. "Hydrogen Production from Inhibited Anaerobic Composters". *International Journal of Hydrogen Energy*. 22: 563-566.

Taikhao, S and Phunpruch, S. 2017. "Increasing Hydrogen Production Efficiency of N_2-Fixing Cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012 by Cell Immobilization". *Energy Procedia*. 138: 366-371.

Troshina, O., Serebryakova, L., Sherwmetieva, M and Lindblad, P. 2002. "Production of H2 by the unicellular Cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation". *International Journal of Hydrogen Energy*. 27: 1283-1289.

Winkler, M., Heil, B., Heil, B and Happe, T. 2002. "Isolation and molecular characterization of the [Fe]hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca*". *Biochemica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression*. 1576: 330-334.

Zhang, Y and Shen, J. 2007. "Enhancement effect of gold nanoparticles on biohydrogen production from artificial wastewater". *International Journal of Hydrogen Energy*. 32: 17-23.

การผลิตไฮโดรเจนโดยการแยกสลายน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า . วันที่สืบค้น 16 พฤษภาคม 2561 . ที่มา https://www.energy.gov/eere/fuelcells/hydrogen-production-electrolysis

กระบวนการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย . วันที่สืบค้น 16 พฤษภาคม 2561 . ที่มา https://www.cell.com/trends/plant-science

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียจากกระบวนการสังเคราะห์แสง. วันที่สืบค้น 16 พฤษภาคม 2561 . ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Light-dependent_reactions

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ส่วนประกอบของอาหาร

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (Blue-green medium) (Rippka *et al.*, 1979)

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	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	โมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric Acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)	279	มิลลิโมลาร์
Trace metal mix 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น	1000	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบอาหาร BG11 1000 มิลลิลิตร

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
Na_2CO_3 (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
K_2HPO_4 (3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
$FeNH_4 \cdot$Citrate (0.60 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร $BG11_0$

ส่วนประกอบ Trace metal mix – N 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	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
โคบอลต์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric Acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)	279	มิลลิโมลาร์
Trace metal mix - N 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น	1000	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบอาหาร BG11 1000 มิลลิลิตร

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
Na_2CO_3 (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
K_2HPO_4 (3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
$FeNH_4 \cdot$Citrate (0.60 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

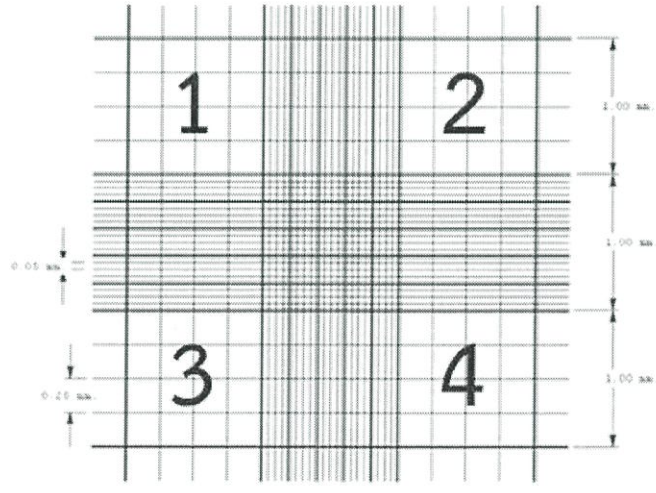
วิเคราะห์ผลการทดลอง

1. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

Chlorophyll a Concentration ($\mu g\ mL^{-1}$) = 12.7 x Abs at 665 nm x Dilution Factor

2. วิธีการคำนวณหาจำนวนเซลล์

นับเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ในช่องหมายเลย 1, 2, 3 และ 4 ปริมาตรสารแขวนลอยเซลล์แต่ละช่องมีค่าเท่ากับ กว้าง x ยาว x สูง (ความกว้างเท่ากับ 1 มิลลิเมตร, ความสูงเท่ากับ 1 มิลลิเมตร และความลึกหรือความสูงเท่ากับ 1 มิลลิเมตร)



รูปที่ ก Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ดังนั้น ปริมาตรสารแขวนลอยเซลล์ทั้ง 4 ช่อง มีค่าเท่ากับ 1 x 1 x 1 มิลลิเมตร

เท่ากับ 0.1 x 0.1 x 0.1 เซนติเมตร

เท่ากับ 0.0001 ลูกบาศก์เซนติเมตร

เท่ากับ 10^4 ลูกบาศก์เซนติเมตร

เพราะฉะนั้น ปริมาตรเซลล์ = จำนวนเซลล์การนับ x 10^4 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

1. นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยลงจากกราฟมาตรฐาน

2. นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละมาเปรียบเทียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร

3. นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาเปรียบเทียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิโมล โดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาณไฮโดรเจน 1 มิลลิโมล

4. นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมงจะได้ ปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมง

5. นำปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมงที่ได้มาหารปริมาณคลอโรฟิลล์จะได้หน่วยเป็นไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 3 เดือน กรกฎาคม พ.ศ.2561

ข้าพเจ้า นาย ธนวัตร ขำประสิทธิ์ รหัสประจำตัว 57050831
ข้าพเจ้า นางสาว สุรักษ์ชนก โฉมวรรณ รหัสประจำตัว 57050912

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยาขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* ภายใต้สภาวะการขาดธาตุอาหาร

ชื่อภาษาอังกฤษ Hydrogen production by nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* under nutrient deprivation

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.39 %

ลงชื่อ.....ธนวัตร ขำประสิทธิ์..... ลงชื่อ.....สุรักษ์ชนก โฉมวรรณ.....

(ธนวัตร ขำประสิทธิ์) (สุรักษ์ชนก โฉมวรรณ)

นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....

อาจารย์ที่ปรึกษา