

การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ
ในประเทศไทย

HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN ALGAE ISOLATED FROM
NATURAL WATER SOURCES IN THAILAND

อมรรัตน์ พวงพลับ
AMORN RAT PUANGPLUB

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาดำเนินการ
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

KMITL-2018-SC-M-020-005

การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ
ในประเทศไทย

HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN ALGAE ISOLATED FROM
NATURAL WATER SOURCES IN THAILAND

อมรรัตน์ พ่วงพลับ
AMORNRAT PUANGPLUB

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2561

KMITL-2018-SC-M-020-005

HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN ALGAE ISOLATED FROM
NATURAL WATER SOURCES IN THAILAND

AMORN RAT PUANGPLUB

A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE
OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2018
KMITL-2018-SC-M-020-005

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย
ชื่อนักศึกษา	นางสาวอมรรัตน์ พ่วงพลับ
รหัสประจำตัว	58605044
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2561
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรัญญา พันธุ์พุกษ์

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนที่ผลิตจากสาหร่ายสีเขียวจัดเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยใช้พลังงานแสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานและผ่านกระบวนการหมักในที่มีดจากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียว ซึ่งแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไฮโดรเจน ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งอาหารและแร่ธาตุในอาหารและปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในขนาดเฉพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร และศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากการศึกษาพบว่าในบรรดาสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 24 ไอโซเลท สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวไอโซเลท LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดโดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.722 ± 0.028 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจน สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 สามารถระบุชนิดเป็น *Chlorella* จากการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ในขนาดเฉพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร Tris acetate phosphate (TAP) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ก่อนนำมาบ่มในอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเติมโซเดียมอะซีเตทให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 174 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ความเข้มข้นแสง อุณหภูมิการบ่ม และพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 คือ ความเข้มข้นแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.0 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.188 ± 0.147 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีการสะสมไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 78.239 ± 5.625 มิลลิลิตรต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 ของการบ่มเซลล์ นอกจากนี้ ยังทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน (Stirred tank bioreactor) และแบบอากาศลอยตัว (Air-lift bioreactor) และศึกษาการผลิตไฮโดรเจน จากการศึกษาพบว่าสาหร่ายที่

เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank มีการเจริญเติบโตที่สูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ในทางตรงกันข้าม สาหร่ายที่บ่มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift มีการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายที่บ่มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank นอกจากนี้ เซลล์ที่บ่มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทั้งสองแบบมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่บ่มในขวดเพาะเลี้ยง

คำสำคัญ : การผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

Thesis Title	Hydrogen production by green algae isolated from natural water sources in Thailand
Student Name	Amornrat Puangplub
Student ID	58605044
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2018
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch

Abstract

H₂ produced by green algae is one of the interesting alternative energy carriers. Green algae can produce H₂ via a photosynthetic process using sunlight as an energy source and via a dark fermentation by a storage carbohydrate catabolism. This study aimed to screen for high H₂ producing green algae isolated from natural water sources in Thailand, to study optimal some nutritional and mineral concentrations in medium and physical factors for H₂ production of the selected strain in a 120-mL culture bottle and to investigate H₂ production in a bioreactor. The result showed that among 24 green algal isolates, unicellular green algal isolate LSD-W2 showed the highest H₂ production rate with $0.722 \pm 0.028 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ under nitrogen deprivation. It can be identified as *Chlorella* by morphological and 18S rDNA nucleotide sequence analyses. In a 120-mL culture bottle, the highest H₂ production rate by *Chlorella* sp. LSD-W2 were found when cells were cultivated in Tris acetate phosphate (TAP) medium for 36 h, then incubated in nitrogen-deprived TAP medium containing $90 \mu\text{M Fe}^{2+}$ for 24 h, subsequently added with sodium acetate to final concentration of $174 \text{ mmol C-atom L}^{-1}$. The optimal light intensity, incubation temperature and initial pH of medium for H₂ production by *Chlorella* sp. LSD-W2 were $60 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $35 \text{ }^\circ\text{C}$ and pH 7.0, respectively. Under these optimal conditions *Chlorella* sp. LSD-W2 showed the highest H₂ production rate with $2.188 \pm 0.147 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and maximum H₂ accumulation with $78.239 \pm 5.625 \text{ mL L}^{-1}$ at 120 h of incubation time. Finally, *Chlorella* sp. LSD-W2 was grown in both Stirred-tank and Air-lift bioreactors and its H₂ production was determined. It was found that cells cultivated in Stirred-tank bioreactor showed the higher growth than those in Air-lift bioreactor. On the other hand, cells incubated in Air-lift bioreactor gave the higher H₂

production than those in Stirred-tank bioreactor. Additionally, cells incubated in both bioreactors gave higher H₂ production yield than cells incubated in the small bottle.

Keywords : Hydrogen production, Green algae, *Chlorella*, Bioreactor

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี โดยได้รับความอนุเคราะห์ คำแนะนำ ความช่วยเหลือและกำลังใจที่ดีจากบุคคลหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรัญญา พันธุ์พฤษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สำหรับความรู้ คำแนะนำต่างๆ ที่ใช้เป็นแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ และความช่วยเหลือในการ ปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์ รวมทั้งคอยให้ คำปรึกษาและให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอด จนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสาวรัตน์ จันทะโร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลามาทำการสอบวิทยานิพนธ์นี้ รวมทั้งให้คำแนะนำที่เป็น ประโยชน์ และช่วยตรวจสอบ ปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ นางสาวปรียานุช ศรีไพบูลย์ นางพยอม เกียรติกำจร และนางสาวพัชรินทร์ ขาวสวย นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการวิจัย และคอยอำนวยความสะดวกต่างๆ ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ นางสาวสุนิสา บันสุข นางสาวณิชนันท์ ทินปราณี นางสาวยุวดี คำแหง นางสาววิชชุดา ภัทรกุลชัย นางสาวกชพร เสรีตระกูล นางสาวทักษพร ปิยะ นายณัฐนนท์ ชินชูศักดิ์ นายกิตติพัฒน์ วาริชนันท์ และ นายรชานนท์ มั่นกิจ นักศึกษาประจำห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับ โม่เลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาต่างๆ เป็นอย่างดีตลอดการทำวิทยานิพนธ์

ท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ผู้ที่ให้กำลังใจมาโดยตลอด และสนับสนุนโอกาสในการศึกษาครั้งนี้อันมีค่ายิ่ง

นางสาวอมรรัตน์ พ่วงพลับ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 พลังงานไฮโดรเจน.....	5
2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.....	7
2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการความร้อนเคมี.....	8
2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยไฟฟ้า.....	9
2.2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ.....	10
2.3 สาหร่ายสีเขียว.....	16
2.3.1 โครงสร้างเซลล์.....	16
2.3.2 รูปร่างลักษณะ.....	17
2.3.3 การเคลื่อนไหว.....	17
2.3.4 การสืบพันธุ์.....	18
2.4 การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว.....	18
2.5 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส.....	22
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว.....	25
2.6.1 แหล่งซัลเฟอร์.....	25
2.6.2 แหล่งไนโตรเจน.....	26
2.6.3 แหล่งฟอสฟอรัส.....	27
2.6.4 แหล่งคาร์บอน.....	27
2.6.5 ค่าพีเอช.....	28

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6.6 แสง.....	28
2.6.7 อุณหภูมิ.....	29
2.6.8 ความไวต่อออกซิเจนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส.....	30
2.7 การผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	30
2.7.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน.....	31
2.7.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว.....	32
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	33
2.8.1 งานวิจัยเกี่ยวกับการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.....	33
2.8.2 งานวิจัยเกี่ยวกับปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว.....	35
2.8.3 งานวิจัยเกี่ยวกับการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	40
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	42
3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง.....	42
3.2 อุปกรณ์.....	44
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	45
3.4 สารเคมี.....	45
3.4.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	45
3.4.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์.....	46
3.4.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกอฮอล์โพลิเมอเรส.....	46
3.4.4 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	46
3.4.5 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน.....	47
3.4.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	47
3.4.7 ชุดทดสอบ (Kit).....	47
3.5 วิธีการทดลอง.....	47
3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว.....	47
3.5.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในระดับพลาสก์.....	47
3.5.3 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว.....	48
3.5.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน.....	49

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว.....	49
3.5.6 วิธีการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน	50
3.5.7 วิธีการระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกโดยการศึกษาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA.....	50
3.5.8 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร	53
3.5.9 วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร.....	54
3.5.10 การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	59
3.5.11 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	62
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	63
4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน.....	63
4.2 การระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	67
4.2.1 ลักษณะของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	67
4.2.2 การระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกโดยการศึกษาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA.....	68
4.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในขวด เพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร.....	76
4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร	78
4.4.1 ผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	78
4.4.2 ผลของระยะเวลาของการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศต่อการผลิต ไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	80
4.4.3 ผลของการขาดแหล่งอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	81
4.4.4 ผลของความเข้มข้นของเหล็กไอออนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย สีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	85

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4.5 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	87
4.4.6 ผลของความเข้มแสงและรูปแบบการให้แสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	92
4.4.7 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	98
4.4.8 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	100
4.4.9 การเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในสภาวะที่เหมาะสมและสภาวะปกติ.....	103
4.5 ผลการศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	109
4.5.1 ผลการเจริญของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน (Stirred tank bioreactor).....	109
4.5.2 ผลการเจริญของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว (Air-lift bioreactor)	110
4.5.3 ผลการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank และ Air-lift.....	112
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	115
5.1 สรุปผลงานวิจัย.....	115
5.2 ข้อเสนอแนะ	116
เอกสารอ้างอิง	118
ภาคผนวก ก สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง	130
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP).....	135
ภาคผนวก ค สารละลายบัฟเฟอร์ Universal (Universal buffer).....	137
ภาคผนวก ง สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA (TBE)	138
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ความหนาแน่นของสาหร่ายสีเขียว	139
ภาคผนวก ฉ โครมาโตแกรมของก๊าซไฮโดรเจน.....	141
ภาคผนวก ช ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA	143
ประวัติผู้เขียน.....	152

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของก๊าซไฮโดรเจน.....	7
2.2 การเปรียบเทียบกระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ.....	15
3.1 แหล่งที่มาและสถานที่เก็บตัวอย่างของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 24 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดลอง.....	42
3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)).....	49
3.3 องค์ประกอบและปริมาณของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน 18S rDNA.....	52
3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน 18S rDNA.....	52
4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้การบ่มเซลล์ในสภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง.	64
4.2 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว ไอโซเลท LSD-W2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่น ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน.....	73
4.3 อัตราการผลิตและผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 34.8 มิลลิโมล คาร์บอนอะตอมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2, 6, 24 และ 48 ชั่วโมง.....	88
4.4 ค่าพีเอชเริ่มต้นและค่าพีเอชหลังจาก 24 ชั่วโมงของในอาหารที่ใช้และไม่ใช้ซัลเฟอร์ ยูนิเวอร์ซัล.....	101
4.5 สภาวะที่ใช้ในการเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP อาหาร TAP-N และอาหาร Optimized TAP-N.....	104
4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 เปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> สายพันธุ์อื่นๆ ภายใต้สภาวะการเจริญและสภาวะการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน.....	107
ข 1 อาหารเชื้อสูตร TAP ที่ขาดแหล่งอาหารต่างๆ.....	136

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ช 1 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาอายุเซลล์ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2...	144
ช 2 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาระยะเวลาการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	144
ช 3 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาการขาดแหล่งอาหารต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	145
ช 4 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาความเข้มข้นของเหล็กไอออนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	145
ช 5 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในชั่วโมงที่ 2.....	146
ช 6 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในชั่วโมงที่ 6.....	147
ช 7 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในชั่วโมงที่ 24.....	147
ช 8 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในชั่วโมงที่ 48.....	148
ช 9 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในชั่วโมงที่ 2.....	148
ช 11 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในชั่วโมงที่ 24.....	149

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ช 12 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในช่วงโม่งที่ 48.....	149
ช 13 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตตต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	150
ช 14 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาความเข้มข้นต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	150
ช 15 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	151
ช 16 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารโดยปรับพีเอชด้วย Universal buffer ต่อการผลิตไฮโดรเจน ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	151
ช 17 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารไม่ปรับพีเอชด้วย Universal buffer ต่อการผลิตไฮโดรเจน ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	152
ช 18 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการ ศึกษาการเปรียบเทียบอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2.....	152

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 ค่าพลังงานความร้อนของเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ (เมกะจูลต่อกิโลกรัม).....	6
2.2 กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า	10
2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักแบบใช้แสงในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง.....	12
2.4 กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ระหว่าง การเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีอากาศและการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจาก อากาศ.....	20
2.5 บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ NiFe-hydrogenase.....	24
2.6 บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ FeFe-hydrogenase.....	24
2.7 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน (Stirred tank bioreactor).....	31
2.8 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว (Air-lift bioreactor)	32
3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร.....	54
3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank ขนาด 3 ลิตร.....	60
3.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร.....	61
4.1 รูปร่างลักษณะของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลัง สว่างที่มีกำลังขยายภาพ 1,000 เท่า.....	68
4.2 จีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร).....	69
4.3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสใน อะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร).....	71
4.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2.....	72
4.5 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 จาก ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA และสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นที่มีรายงานในธนาคารยีน โดยใช้วิธีการ Maximum likelihood ด้วยโมเดลของ Tamura-Nei.....	75
4.6 การเจริญเติบโตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ปริมาณ คลอโรฟิลล์และความหนาแน่นของเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่ เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร	76

สารบัญรูปร่างภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP โดยมีอายุเซลล์ 18, 36, 54 และ 72 ชั่วโมง.....	79
4.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่แปรผันระยะเวลาของการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศในอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N)	81
4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ภายใต้สภาวะการขาดแหล่งอาหารแบบเดี่ยวและแบบรวม	82
4.10 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กไอออน	86
4.11 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตทภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	91
4.12 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหารสูตรที่เหมาะสม (Optimized TAP-N medium) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ โดยแปรผันความเข้มข้นแสง	93
4.13 ปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในอาหารสูตรที่เหมาะสม (Optimized TAP-N medium) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศโดยแปรผันรูปแบบการให้แสงต่างๆ	96
4.14 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในอาหารสูตรที่เหมาะสม (Optimized TAP-N medium) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศในที่มีความเข้มข้นแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยแปรผันอุณหภูมิการบ่มเซลล์	99
4.15 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในอาหารสูตรที่เหมาะสม (Optimized TAP-N medium) ที่แปรผันพีเอชเริ่มต้น	101
4.16 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณไฮโดรเจนสะสมทั้งหมดของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP อาหาร TAP-N และอาหาร Optimized TAP-N ภายใต้สภาวะการบ่มในช่วงการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน	105
4.17 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP 2 ลิตร ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank ขนาด 3 ลิตร จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ และความหนาแน่นของเซลล์.....	109

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.18 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP 3 ลิตรที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ และความหนาแน่นของเซลล์.....	111
4.19 ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N (อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน) และอาหาร Optimized TAP-N (อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจนและมีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตท 174 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift	113
ก 1 สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 1SinS1.1, 2SinS4, 2TKS2.1, 2TKS2.2, 8260, A25.1, ChiW1, CirGreen, LSD-W2 และ NakS4	130
ก 2 สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 2C2, CH, ChiS4, SD, TISTR 8412, TISTR 8562, TISTR 8568 และ TT.....	132
ก 3 สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท B35.1 และ OvalGreen.....	133
ก 4 สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 8553	133
ก 5 สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 8486	133
ก 6 สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 8641	134
จ 1 ฮีมาไซโตมิเตอร์.....	139
จ 2 พื้นที่ตารางและตำแหน่งช่องสำหรับการนับเซลล์สาหร่ายสีเขียวบนฮีมาไซโตมิเตอร์	140
ฉ 1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของก๊าซไฮโดรเจนที่วิเคราะห์จากเครื่อง GC-TCD.....	141
ฉ 2 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของไฮโดรเจน (เปอร์เซ็นต์)	141

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบัน ความต้องการใช้พลังงานเพิ่มสูงขึ้น ทั้งในภาคอุตสาหกรรม การขนส่ง ภาคเศรษฐกิจ รวมถึงการใช้พลังงานในชีวิตประจำวัน พลังงานหลักที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น น้ำมันดิบ ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ ฯลฯ ซึ่งเชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้มีอยู่ในปริมาณที่จำกัดและมีแนวโน้มจะหมดไปในระยะเวลาอีกไม่นาน การเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลยังก่อให้เกิดภาวะโลกร้อน (Global warming) จากการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก ได้แก่ ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ก๊าซไนโตรเจนออกไซด์ (NO_x) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจกที่ทำให้เกิดพลังงานความร้อนสะสมในบรรยากาศของโลกมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับก๊าซเรือนกระจกชนิดอื่นๆ ดังนั้น เพื่อเป็นการแก้ปัญหาทางด้านทรัพยากรเชื้อเพลิงฟอสซิลที่มีอยู่อย่างจำกัดและลดปริมาณการปล่อยก๊าซเรือนกระจกออกสู่ชั้นบรรยากาศ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องแสวงหาพลังงานทางเลือกที่มีศักยภาพในการเผาไหม้สูง เป็นเชื้อเพลิงสะอาด และสามารถผลิตหมุนเวียนได้อย่างเพียงพอต่อความต้องการของมนุษย์

ก๊าซไฮโดรเจน (Hydrogen, H_2) เป็นเชื้อเพลิงชนิดหนึ่งที่ได้รับการคาดหมายว่าจะเป็นพลังงานทดแทนที่สำคัญในอนาคต เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นสารที่ให้ค่าพลังงานความร้อนจากการเผาไหม้สูงถึง 141.65 เมกะจูลต่อกิโลกรัม (Perry, 1963) การเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนจะปลดปล่อยไอน้ำออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ ด้วยเหตุนี้ ก๊าซไฮโดรเจนจึงจัดเป็นเชื้อเพลิงที่มีประสิทธิภาพสูงและจัดเป็นเชื้อเพลิงที่สะอาดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเพลิงฟอสซิล กระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งได้เป็น 3 กระบวนการ คือ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการความร้อนเคมี (Thermo-chemical process) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยไฟฟ้า (Water electrolysis process) และกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ (Biological process) ในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนมากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ ได้มาจากกระบวนการความร้อนเคมีโดยใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นวัตถุดิบ (Wünschiers and Lindblad, 2002) อย่างไรก็ตาม เชื้อเพลิงฟอสซิลที่ใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการนี้มีอยู่ในปริมาณจำกัด และกระบวนการนี้ยังใช้ อุณหภูมิและความดันในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงมาก อีกทั้งยังก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางอากาศ นั่นคือ มีการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาในปริมาณมาก ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยปฏิกิริยาชีวเคมีในสิ่งมีชีวิตซึ่งไม่มีการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกสู่ชั้นบรรยากาศ

สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตไฮโดรเจนมีหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียว และไซยาโนแบคทีเรีย เป็นต้น ในบรรดาสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ สาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียมีข้อได้เปรียบในการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียสามารถนำเอาพลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน ผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงได้มวลชีวภาพและก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ นอกจากสาหร่ายสีเขียวจะสามารถนำพลังงานแสงมาผลิตก๊าซไฮโดรเจนแล้ว สาหร่ายสีเขียวยังมีข้อดีในการเพาะเลี้ยงคือ สาหร่ายสีเขียวมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เพาะเลี้ยงได้ง่าย สามารถใช้อินทรีย์คาร์บอนหรืออนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวได้ทั้งในสภาวะโฟโตออโตโทรปและโฟโตเฮเทโรโทรป

การสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวมีระบบการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่คล้ายกับในพืช เมื่อสาหร่ายสีเขียวได้รับพลังงานแสง โมเลกุลของคลอโรฟิลล์ที่เป็นศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยา (Reaction center) ในระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้น โมเลกุลของศูนย์กลางปฏิกิริยาที่อยู่ในสภาวะกระตุ้นจะคายพลังงานออกมาในรูปแบบของการสูญเสียอิเล็กตรอนเพื่อกลับสู่สภาวะปกติตามเดิม อิเล็กตรอนจะถูกถ่ายทอดไปให้ตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไปเป็นลำดับจนกระทั่งถึงระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) เมื่อศูนย์กลางปฏิกิริยาในระบบแสงหนึ่งได้รับพลังงานแสง อิเล็กตรอนในระบบแสงหนึ่งจะถูกปลดปล่อยออกจากศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไปเป็นลำดับ จนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) จากนั้น เฟอร์รีดอกซินจะส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมโปรตอนและอิเล็กตรอนเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน จากกระบวนการสังเคราะห์แสงที่กล่าวมา อิเล็กตรอนที่ถูกถ่ายทอดจากระบบแสงสองจะถูกแทนที่ด้วยอิเล็กตรอนที่ได้จากกระบวนการแตกตัวของน้ำ (Water splitting) โดยการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นโปรตอน อิเล็กตรอน และโมเลกุลของออกซิเจน

ปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นโมเลกุลของไฮโดรเจน อย่างไรก็ตาม โมเลกุลของออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้สาหร่ายสีเขียวมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง ดังนั้น ในการแก้ไขปัญหานี้จึงจำเป็นต้องแยกช่วงการสังเคราะห์แสงและช่วงการผลิตไฮโดรเจนออกจากกัน (Two-stage photosynthesis and H₂-production process) (Melis *et al.*, 2000) ช่วงที่ 1 เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรปกติที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ ทำให้สาหร่ายเพิ่มปริมาณชีวมวลจำนวนมาก ในช่วงนี้ กิจกรรมการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นตามปกติ สาหร่ายมีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์และปลดปล่อยออกซิเจนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำออกมา จากนั้น ทำการย้ายเซลล์สาหร่ายเข้าสู่ช่วงที่ 2 ซึ่งเป็นช่วงการผลิตไฮโดรเจน โดยการย้ายเซลล์มาบ่มในอาหารที่ขาดธาตุอาหารบางชนิด

สาหร่ายสีเขียวที่อยู่ในสภาวะการขาดธาตุอาหารจะมีการยับยั้งกระบวนการซ่อมแซมระบบแสงสองช่วงคร่าว ทำให้การแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองลดลงส่งผลให้ลดการผลิตออกซิเจน เมื่ออัตราการผลิตโมเลกุลของออกซิเจนต่ำกว่าอัตราการนำไปใช้ในกระบวนการหายใจของเซลล์ ระบบจึงเข้าสู่สภาวะปราศจากอากาศ (Anaerobic condition) และเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายให้ผลิตก๊าซไฮโดรเจน อย่างไรก็ตาม การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวมีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงหลายประการ เช่น สายพันธุ์ของสาหร่าย อายุของสาหร่าย ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นของแหล่งอาหารและแร่ธาตุ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง และความเข้มแสง เป็นต้น

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ทั้งแหล่งทรัพยากรธรรมชาติ รวมถึงมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการเพาะเลี้ยงของสาหร่ายสีเขียว ทำให้สามารถพบสาหร่ายสีเขียวจำนวนมากและหลากหลาย นอกจากนี้ ยังสนใจศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก รวมทั้งศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อผลิตไฮโดรเจน อันจะนำไปสู่การปรับปรุงและพัฒนางานวิจัยด้านพลังงานไฮโดรเจนต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน
- 2) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก
- 3) เพื่อศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกเพื่อผลิตไฮโดรเจน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) คัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน เริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวชนิดต่างๆ ในอาหารเหลว Tris-Acetate-Phosphate (TAP) โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรให้มีค่าเท่ากับ 0.1 นำเซลล์สาหร่ายไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวและกระจายเซลล์ในอาหาร 3 ชนิด คือ อาหาร TAP สูตรปกติ (TAP) อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ (TAP-S) ทำการบ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจนภายใต้การให้แสงต่อเนื่อง ทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

2) ศึกษาชนิดของสาหร่ายสีเขียวจากการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ทำการสกัดจีโนมดีเอ็นเอ

ของสาหร่ายสีเขียวด้วยชุดสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Wizard SV Genomic DNA Purification system kit, Promega, USA) จากนั้น นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้น นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้มา ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (QIAquick[®] PCR Purification Kit, Qiagen, Germany) แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 18S rDNA เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานในธนาคารยีน และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

3) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร เริ่มต้นจากการนำสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP จากนั้น ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ อายุเซลล์ การขาดแหล่งอาหาร ความเข้มข้นของเหล็กไอออน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นและรูปแบบการให้แสง อุณหภูมิ และพีเอชเริ่มต้นของอาหาร ทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

4) ศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน (Stirred tank bioreactor) ขนาด 3 ลิตร และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว (Air-lift bioreactor) ขนาด 3.7 ลิตร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไฮโดรเจน
- 2) ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่ทำการคัดเลือก
- 3) สามารถขยายขนาดการเพาะเลี้ยงของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกเพื่อการผลิตไฮโดรเจน

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

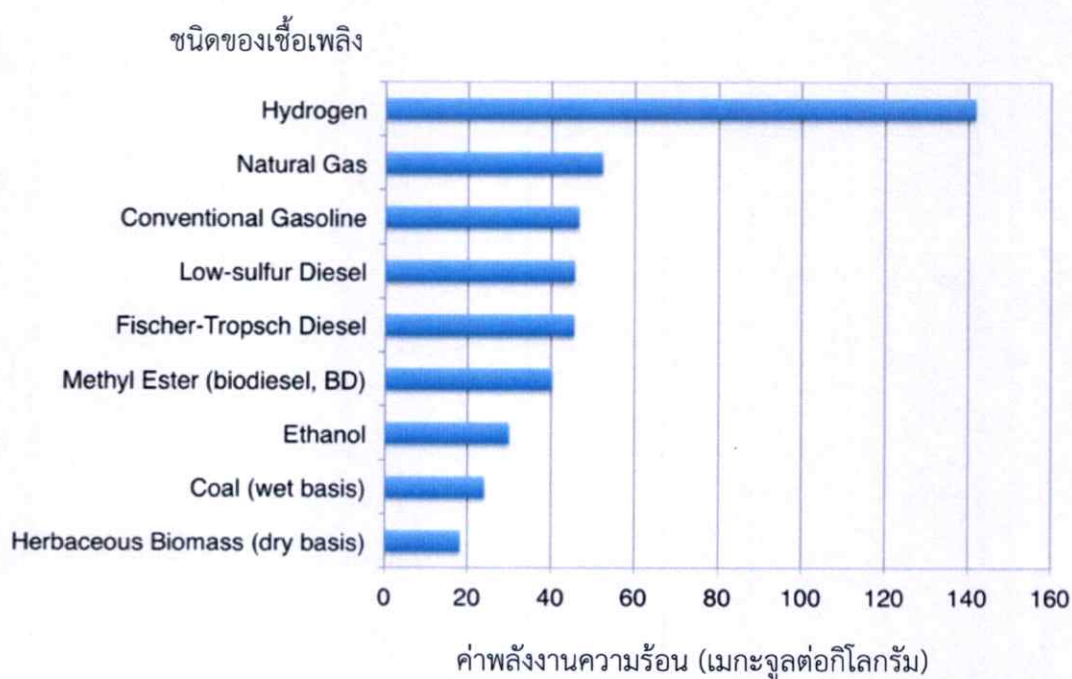
2.1 พลังงานไฮโดรเจน

พลังงานเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญหนึ่ง ในการตอบสนองความต้องการขั้นพื้นฐานของมนุษย์ และมีความสำคัญต่อการพัฒนาทางด้านวิทยาการและเทคโนโลยี ตลอดจนการขยายตัวทางเศรษฐกิจ และใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เมื่อความต้องการใช้พลังงานที่เพิ่มขึ้น จึงต้องมีการจัดหาพลังงานให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการขั้นพื้นฐานของประชากรมนุษย์ และตอบสนองต่อความต้องการของภาคอุตสาหกรรมต่างๆ พลังงานที่ใช้ในปัจจุบันมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล โดยเฉพาะจากเชื้อเพลิงฟอสซิล 3 ประเภท คือ น้ำมันปิโตรเลียม ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ (IEA, 2006) เชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้เป็นแหล่งพลังงานสิ้นเปลืองที่ใช้แล้วหมดไป และกำลังจะหมดไปในระยะเวลาอันใกล้นี้ นอกจากนี้ เชื้อเพลิงฟอสซิลยังประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเมื่อเกิดการเผาไหม้จะปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกหลักคือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในปริมาณมาก ออกสู่ชั้นบรรยากาศ และหากเกิดการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลที่ไม่สมบูรณ์ จะก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจกชนิดอื่นๆ เช่น ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และสารประกอบออกไซด์ของไนโตรเจน (NO_x) หรือ ซัลเฟอร์ (SO_x) ในรูปแบบต่างๆ อีกด้วย การปลดปล่อยก๊าซมลพิษเหล่านี้่ออกสู่บรรยากาศทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก (Greenhouse effect) และนำไปสู่สภาวะโลกร้อน (Global warming) ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงต้องมีการสำรวจและแสวงหาแหล่งเชื้อเพลิงทางเลือกอื่นๆ ที่มีศักยภาพสูงและเป็นพลังงานเชื้อเพลิงสะอาดเพื่อนำมาทดแทนการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล

ไฮโดรเจนอะตอม (Hydrogen atom, H) เป็นธาตุเคมีที่มีเลขอะตอมเท่ากับ 1 มีสัญลักษณ์ธาตุคือ H มีมวลอะตอมเท่ากับ 1.00794 กรัมต่อโมล มีความหนาแน่นเท่ากับ 0.08988 กรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและพบมากที่สุดในเอกภพ โดยคิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ของมวลธาตุเคมีที่พบในเอกภพ ดาวฤกษ์ในลำดับหลักส่วนใหญ่ประกอบด้วยไฮโดรเจนในสถานะพลาสมา ไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของน้ำและในสารประกอบอินทรีย์เกือบทุกชนิด นอกจากนี้ ธาตุไฮโดรเจนยังเป็นองค์ประกอบในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในเชื้อเพลิง เช่น น้ำมันเบนซิน ก๊าซธรรมชาติ โพรเพน และเมทานอล ฯลฯ

ก๊าซไฮโดรเจน (Hydrogen, H_2) เป็นเชื้อเพลิงชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนที่สำคัญในอนาคต เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ให้พลังงานสูง โดยมีค่าพลังงานความร้อนที่ได้จากการเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนสูงถึง 141.65 เมกะจูลต่อกิโลกรัม (Perry, 1963) ซึ่งมากกว่าค่าพลังงานความร้อนจากเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นๆ (รูปที่ 2.1) การเผาผลาญไฮโดรเจนไม่ว่าจะจากการเผาไหม้โดยตรงหรือจากปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีในเซลล์เชื้อเพลิง จะได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นไอน้ำและได้ก๊าซ

ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ จึงถือว่าการเผาไหม้ไฮโดรเจนเป็นการเผาไหม้ที่สะอาด ไม่ก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือก๊าซมลพิษชนิดอื่นๆ ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ก๊าซไฮโดรเจนสามารถพบได้ตามธรรมชาติ โดยมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ส่วนในล้านส่วนของบรรยากาศในโลก ไฮโดรเจนมีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลเท่ากับ 436 กิโลจูลต่อโมลหรือ 104 กิโลแคลอรีต่อโมล ดังนั้น เมื่อต้องการให้โมเลกุลของไฮโดรเจนทำปฏิกิริยาจึงต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลดังกล่าว เช่น เพิ่มอุณหภูมิ หรือ ใช้สารเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น ไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ไม่มีฤทธิ์ในการกัดกร่อนและไม่เป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์ ไฮโดรเจนมีจุดเดือดที่ต่ำมากถึง 20.2 เคลวิน ไฮโดรเจนยังมีความไวไฟสูงและสามารถลุกไหม้ในอากาศในช่วงความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนที่กว้างมากตั้งแต่ 4 ถึง 75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ก๊าซไฮโดรเจนยังใช้พลังงานในการจุดติดไฟต่ำ ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนในอากาศที่ระดับจุดติดไฟสามารถระเบิดได้เองและเกิดการลุกไหม้เป็นเปลวไฟสีน้ำเงินจางๆ โดยอัตราการเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งทำให้มีระยะชะงักเปลวไฟสั้น ด้วยเหตุที่ว่าไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่มีน้ำหนักเบากว่าอากาศทำให้ก๊าซไฮโดรเจนสามารถแพร่กระจายในอากาศอย่างรวดเร็ว คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจนแสดงดังตารางที่ 2.1 (Balat, 2008) จากคุณสมบัติการเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนและค่าพลังงานความร้อนจากการเผาไหม้ที่กล่าวมาข้างต้น ก๊าซไฮโดรเจนจึงจัดเป็นก๊าซที่มีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อเพลิงที่ดี และสามารถพัฒนาให้เป็นเชื้อเพลิงหลักได้ในอนาคต



รูปที่ 2.1 ค่าพลังงานความร้อนของเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ (เมกะจูลต่อกิโลกรัม)

ที่มา : Hydrogen analysis resource center, 2008

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของก๊าซไฮโดรเจน (ที่มา : Balat, 2008)

คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน	ค่าที่ได้
น้ำหนักโมเลกุล	2.016 กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น ที่ความดัน 1 บรรยากาศ และอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส	0.09 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร
จุดเดือด	20.2 เคลวิน
ค่าพลังงานความร้อนสูงในการเผาไหม้	142.0 เมกะจูลต่อกิโลกรัม
ค่าพลังงานความร้อนต่ำในการเผาไหม้	120.0 เมกะจูลต่อกิโลกรัม
ขีดจำกัดการลุกไหม้	4.0 - 75.0 ร้อยละโดยปริมาตร
ขีดจำกัดของความสามารถทำให้ระเบิด	18.3 - 59.0 ร้อยละโดยปริมาตร
ความเร็วการแพร่ในอากาศ	2.0 เมตรต่อวินาที
ค่าพลังงานในการจุดติดไฟ	
- ค่าพลังงานที่เกิดการสันดาปสมบูรณ์ในเชิงทฤษฎี	0.02 มิลลิจูล
- ค่าพลังงานต่ำสุดในการจุดติดไฟ	10 มิลลิจูล
ความเร็วเปลวไฟในอากาศ	265 - 325 เซนติเมตรต่อวินาที

ในปัจจุบัน มีการนำก๊าซไฮโดรเจนมาใช้เป็นเชื้อเพลิงอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ พลังงานไฮโดรเจนสามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์มากมาย เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงเผาไหม้ที่ให้พลังงานโดยตรงในเครื่องยนต์สันดาปภายใน ใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการกลั่นน้ำมันเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำมัน ใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการผลิตสารเคมีและยา เป็นต้น (ธรรมบุญ, 2550) ในขณะนี้ นักวิจัยทั่วโลกให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงไฮโดรเจน (Fuel cell) ให้สามารถใช้เป็นอุปกรณ์ผลิตไฟฟ้าเพื่อใช้ในการขับเคลื่อนรถยนต์ เนื่องจากการเปลี่ยนพลังงานของก๊าซไฮโดรเจนในลักษณะนี้จะไม่ผ่านการเผาไหม้และยังทำให้เครื่องยนต์มีประสิทธิภาพในการให้พลังงานสูงกว่าเครื่องยนต์ที่ใช้ระบบการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลแบบดั้งเดิมอีกด้วย (รัชนิกร , 2554)

2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากแหล่งวัตถุดิบหลายชนิด คือ แหล่งวัตถุดิบจากเชื้อเพลิงฟอสซิล ได้แก่ ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน และน้ำมันปิโตรเลียม เป็นต้น แหล่งวัตถุดิบจากพลังงานหมุนเวียน ได้แก่ แสงอาทิตย์ น้ำ ลม และชีวมวล เป็นต้น และแหล่งวัตถุดิบจากพลังงานนิวเคลียร์ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งได้เป็น 3 กระบวนการใหญ่ๆ คือ

2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการความร้อนเคมี

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี (Thermochemical process) เป็นการให้ความร้อนในการเปลี่ยนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน หรือ ชีวมวล ฯลฯ ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซผสมที่ประกอบด้วย ก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และมีเทน จากนั้น จะนำก๊าซผสมที่ได้มาผ่านกระบวนการทำให้ได้ไฮโดรเจนที่บริสุทธิ์ขึ้น การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการความร้อนเคมีที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมสามารถแบ่งเป็น 2 กระบวนการย่อย ดังนี้

2.2.1.1 กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ

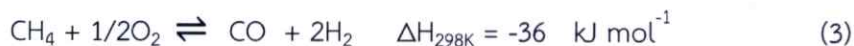
กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam reforming process) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติ โดยนำก๊าซธรรมชาติมาทำปฏิกิริยากับไอน้ำภายใต้อุณหภูมิสูงโดยทั่วไป การผลิตก๊าซไฮโดรเจนในเชิงพาณิชย์ส่วนใหญ่จะใช้ก๊าซธรรมชาติเป็นวัตถุดิบ ซึ่งก๊าซธรรมชาติที่ใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ คือ ก๊าซมีเทนที่ได้มาจากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ กระบวนการนี้สามารถเรียกอีกชื่อหนึ่งว่ากระบวนการเปลี่ยนรูปก๊าซมีเทนด้วยไอน้ำ (Steam methane reformation (SMR) process) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติโดยผ่านกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำนี้ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นที่ 1 การนำไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูงเข้าทำปฏิกิริยากับก๊าซมีเทนในเตาปฏิกรณ์ภายใต้อุณหภูมิสูงถึง 700 ถึง 1,000 องศาเซลเซียสและความดัน 2 ถึง 25 บาร์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะทำให้ไฮโดรเจนถูกดึงออกจากโมเลกุลของน้ำและก๊าซมีเทน และได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไป (สมการที่ 1) ขั้นที่ 2 ไอน้ำจะเข้าทำปฏิกิริยากับก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ทำให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นและมีการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา (สมการที่ 2) (McHugh, 2005)



ปฏิกิริยารีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำเป็นปฏิกิริยาที่ย้อนกลับได้ โดยปฏิกิริยาในสมการที่ 1 เป็นปฏิกิริยาแบบดูดความร้อน (Endothermic reaction) ดังนั้น กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจึงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิและพลังงานค่อนข้างสูงในการเกิดปฏิกิริยารีฟอร์มมิง ในปัจจุบัน กระบวนการรีฟอร์มมิงเชื้อเพลิงฟอสซิลด้วยไอน้ำเป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่นิยมมากที่สุด โดยคิดเป็น 96 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรม (Wünschiers and Lindblad, 2002) แต่กระบวนการนี้มีข้อเสียคือ ใช้ก๊าซธรรมชาติหรือถ่านหินซึ่งมีอยู่อย่างจำกัดมาใช้เป็นวัตถุดิบ และก่อให้เกิดมลพิษจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้

2.2.1.2 กระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน

กระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification process) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมาทำปฏิกิริยากับก๊าซออกซิเจนที่มีปริมาณต่ำโดยอาศัยความร้อน ซึ่งปฏิกิริยานี้จัดเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันบางส่วน (Partial oxidation) สารตั้งต้นที่นิยมใช้ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น ก๊าซมีเทน หรือเอทานอล เป็นต้น โดยทั่วไป การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันบางส่วนมักทำที่อุณหภูมิสูงกว่า 700 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาออกซิเดชันบางส่วนของก๊าซมีเทนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน (สมการที่ 3) เมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของก๊าซมีเทนอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (สมการที่ 4) (Enger *et al.*, 2008) ตัวแปรที่ควบคุมว่าจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันบางส่วนหรือปฏิกิริยาออกซิเดชันอย่างสมบูรณ์คือ ปริมาณของก๊าซออกซิเจนที่เข้าทำปฏิกิริยากับก๊าซมีเทน แต่เมื่อพิจารณาถึงผลผลิตของก๊าซไฮโดรเจนที่ได้พบว่า กระบวนการแก๊สซิฟิเคชันยังไม่มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Mateos-Pedrero *et al.*, 2007)



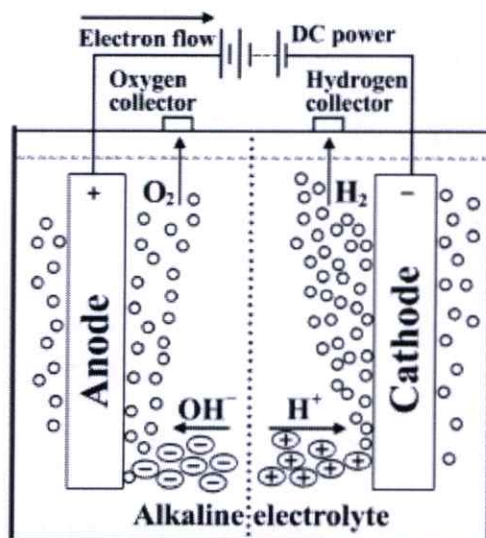
2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยไฟฟ้า

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยไฟฟ้า (Water electrolytic process) เป็นการผลิตไฮโดรเจนจากการให้กระแสไฟฟ้าแก่โมเลกุลของน้ำเพื่อให้เกิดการแยกไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอมออกจากกัน อะตอมชนิดที่เหมือนกันจะทำปฏิกิริยารวมตัวกันได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซออกซิเจน (สมการที่ 5)



กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าจะเกิดขึ้นในอุปกรณ์ที่เรียกว่า “อิเล็กโทรไลเซอร์ (Electrolyzer)” โดยการส่งกระแสไฟฟ้าผ่านอิเล็กโทรดขั้วบวก (Anode) และอิเล็กโทรดขั้วลบ (Cathode) ไปยังน้ำที่เพิ่มคุณสมบัติการนำไฟฟ้าจากการเติมสารอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte) ไฮโดรเจนอะตอมจะเข้าไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบและออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วบวก (รูปที่ 2.2) กระบวนการผลิตนี้ใช้กระแสไฟฟ้ามากถึง 90 กิโลวัตต์และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ ไม่ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจกระหว่างกระบวนการผลิตและก๊าซไฮโดรเจนที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งดูได้จากปฏิกิริยาในสมการที่ 5 พบว่าไม่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า มีเพียงก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซออกซิเจนเกิดขึ้นเท่านั้น ส่วนข้อเสียของกระบวนการนี้ คือ ต้องการกระแสไฟฟ้า

จำนวนมากในการผลิต โดยค่าพลังงานไฟฟ้าที่ได้นั้นยังไม่คุ้มค่ากับต้นทุนในการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า



รูปที่ 2.2 กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า
ที่มา : Santos and Sequeira, 2013

2.2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ (Biological process) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยปฏิกิริยาชีวเคมีในสิ่งมีชีวิต ก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตนี้อาจเรียกว่า “ไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen)” สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตไฮโดรเจนโดยส่วนใหญ่เป็นพวกจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็ก เช่น แบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไชยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว เป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถใช้แหล่งวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจนได้หลากหลาย เช่น น้ำ แสงแดด สารอินทรีย์และอนินทรีย์คาร์บอน รวมถึงวัตถุดิบที่เป็นของเหลือทิ้ง เช่น เศษอาหาร กากน้ำตาล หรือ มูลชีวภาพที่ได้จากระบบบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น ถึงแม้ว่าในปัจจุบัน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมยังนิยมใช้กระบวนการความร้อนเคมี แต่แหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจนนั้นมีอยู่ในปริมาณจำกัดและยังต้องใช้พลังงานในกระบวนการผลิตที่สูงมาก ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางชีวภาพจึงเป็นกระบวนการที่น่าสนใจสำหรับศึกษาและนำมาพัฒนากระบวนการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพสามารถแบ่งได้ 4 กระบวนการย่อย ดังนี้

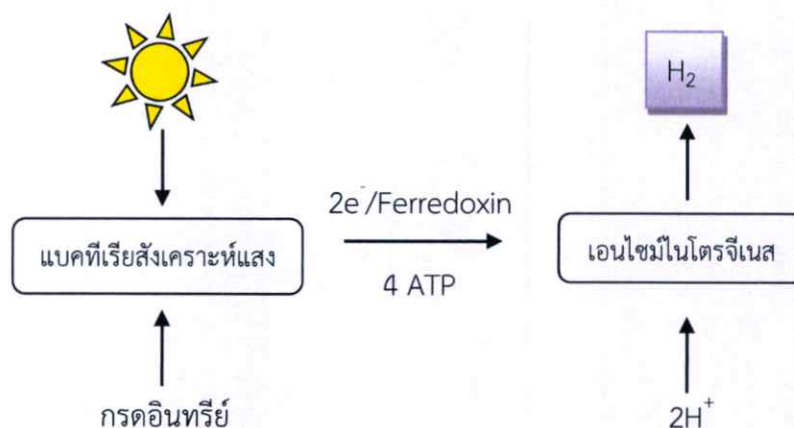
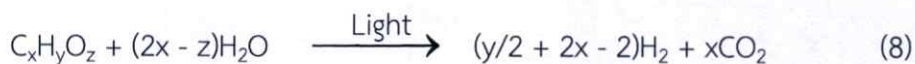
2.2.3.1 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark fermentation) สามารถพบในแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะไม่มีอากาศ (Anaerobic bacteria) เช่น *Clostridium* เป็นต้น และแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศ (Facultative bacteria) เช่น *Escherichia coli*, *Enterobacter* และ *Citrobacter* เป็นต้น การผลิตไฮโดรเจนในแบคทีเรียกลุ่มนี้จะใช้สารประกอบอินทรีย์คาร์บอน เช่น น้ำตาลกลูโคส ซิวมวล ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ของเสียของการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจน โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะซิติก กรดบิวทีริก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในกระบวนการหมัก แบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 4 โมล และได้กรดอะซิติกจำนวน 2 โมลเป็นผลิตภัณฑ์หลักเมื่อใช้กลูโคส 1 โมลเป็นสารตั้งต้น (สมการที่ 6) แต่แบคทีเรียจะผลิตไฮโดรเจนลดลง โดยผลิตไฮโดรเจนได้จำนวน 2 โมล เมื่อกลูโคสถูกย่อยสลายและได้กรดบิวทีริกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (สมการที่ 7) (Levin *et al.*, 2004)



2.2.3.2 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักแบบใช้แสง

การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการหมักแบบใช้แสง (Photofermentation) สามารถพบในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง (Purple photosynthetic bacteria) เช่น *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospseudomonas palustris* และ *Rhodospirillum rubrum* เป็นต้น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงประกอบด้วยระบบสังเคราะห์แสงเดียวและไม่สร้างออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ การผลิตไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากอากาศ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้แหล่งคาร์บอนจากสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก และกรดแลคติก ฯลฯ เป็นตัวให้อิเล็กตรอน อิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ไปกับตัวขนส่งอิเล็กตรอนต่างๆ เป็นลำดับ จนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin, Fd) จากนั้นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะรับอิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซิน และเร่งปฏิกิริยาการรวมอิเล็กตรอนกับโปรตอนโดยอาศัยพลังงานจาก ATP เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (สมการที่ 8) (Srirangan *et al.*, 2011) แผนภาพการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสงในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงแสดงในรูปที่ 2.3 (Hallenbeck and Benemann, 2002)



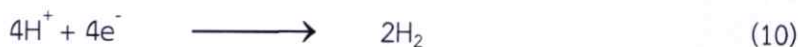
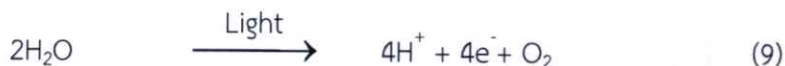
รูปที่ 2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักแบบใช้แสงในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง
ที่มา : Hallenbeck and Benemann, 2002

2.2.3.3 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสง

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสง (Biophotolysis) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาการแตกโมเลกุลของน้ำด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการนี้สามารถพบได้ในสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย โดยแบ่งออกได้ 2 กระบวนการย่อย ดังนี้

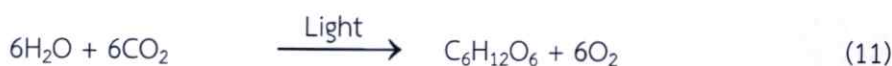
1.) การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาการแตกตัวโมเลกุลของน้ำด้วยการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย เมื่อระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) ดูดซับพลังงานจากแสงที่มีความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร จะเกิดการกระตุ้นให้เข้าสู่ระดับพลังงานที่สูงขึ้นและทำให้เกิดการออกซิไดซ์น้ำไปเป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน (สมการที่ 9) อิเล็กตรอนจะถูกถ่ายทอดผ่านตัวรับอิเล็กตรอนต่างๆ และเคลื่อนที่ไปยังระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) เมื่อระบบแสงหนึ่งได้รับพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จะกระตุ้นการปลดปล่อยอิเล็กตรอนและส่งต่ออิเล็กตรอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป จนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือเฟอร์ริดอกซิน ในสภาวะปราศจากอากาศ เฟอร์ริดอกซินในสภาพรีดิวซ์จะส่งอิเล็กตรอนไปให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อเร่งปฏิกิริยาการรีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (สมการที่ 10)



2.) การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis) เป็นการผลิตไฮโดรเจนจากการสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเพื่อใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนในการผลิตไฮโดรเจน โดยใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานและใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้จะแยกช่วงการเจริญเติบโตออกจากช่วงการผลิตไฮโดรเจน ทำให้ออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส การแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อมสามารถพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว ในช่วงแรก สาหร่ายจะใช้พลังงานแสงผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงของระบบแสงหนึ่งและสองร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตในรูปของแป้งหรือไกลโคเจนและเก็บสะสมไว้เป็นชีวมวลของสาหร่าย (สมการที่ 11) ช่วงที่สองเป็นช่วงการหมักในที่มีสภาพได้สภาวะที่ไม่มีแสง เซลล์จะเข้าสู่สภาวะปราศจากอากาศ ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จากนั้น คาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายจะถูกสลายไปเป็นอะซีเตตและไฮโดรเจน (สมการที่ 12) หลังจากนั้น โมเลกุลของอะซีเตตจะถูกสลายเป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ (สมการที่ 13) จากปฏิกิริยารวมจะพบว่า การสลายกลูโคส 1 โมล โดยใช้ น้ำ 12 โมล สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 12 โมล และออกซิเจน 6 โมล (สมการที่ 14) (Gaudernack, 1998)



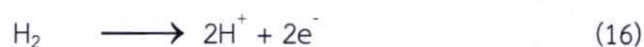
ปฏิกิริยารวมดังนี้



2.2.3.4 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน

การตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) จากอากาศ จะเกิดในจุลินทรีย์จำพวกโปรคาริโอต เช่น แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยซิสต์ รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน จุลินทรีย์เหล่านี้จะใช้เอนไซม์ไนโตรจีเนสในการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียโดยอาศัยพลังงาน ATP ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (สมการที่ 15) (Stal and Krumbein, 1985) หลังจากนั้นไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นอาจ

ถูกออกซิไดซ์กลับไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอนจากการทำงานของเอนไซม์แอฟเทคไฮโดรจีเนส (สมการที่ 16)



ในสภาวะที่มีแสง ออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการแตกตัวของน้ำจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังนั้น การตรึงไนโตรเจนจากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจึงเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ อย่างไรก็ตาม ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดมีการพัฒนากลไกของเซลล์ในการป้องกันการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากออกซิเจน โดยการสร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst cell) แยกจากเซลล์ปกติ (Vegetative cell) ซึ่งเซลล์เฮเทอโรซิสต์จะไม่มีระบบแสงสอง แต่มีเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนภายในเซลล์ (Fay, 1992) สำหรับไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์จะมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสภายในเซลล์ปกติ

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพเป็นการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2.2) ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพนี้ กระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรงเป็นการผลิตไฮโดรเจนที่มีประสิทธิภาพ กระบวนการหนึ่ง เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ให้ค่าการผลิตไฮโดรเจนสูง สามารถใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานในการผลิตไฮโดรเจน ทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำ และยังสามารถใช้อุณหภูมิและความดันปกติในกระบวนการผลิต

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบกระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ (ที่มา : Srirangan *et al.*, 2011)

กระบวนการ	สารตั้งต้น	ตัวให้อิเล็กตรอน	กระบวนการเมแทบอลิซึม	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง	จุลินทรีย์
กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง	สารประกอบอินทรีย์ (คาร์โบไฮเดรต)	สารประกอบอินทรีย์	คีโมเฮเทอโรโทรฟิก	FeFe-hydrogenase	แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะไม่มีอากาศ (Anaerobic bacteria) เช่น <i>Clostridium butyricum</i> แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศ (Facultative bacteria) เช่น <i>Enterobacter aerogenes</i>
กระบวนการหมักแบบใช้แสง	สารประกอบอินทรีย์ (กรดอินทรีย์) และ สารประกอบซัลเฟอร์	สารประกอบอินทรีย์	โฟโตเฮเทอโรโทรฟิก	Nitrogenase	แบคทีเรียสีม่วงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ (Purple non-sulfur (PNS) bacteria) เช่น <i>Rhodobacter sphaeroides</i> แบคทีเรียสีเขียวกลุ่มสะสมซัลเฟอร์ (Green sulfur (GS) bacteria) เช่น <i>Chlorobiaceae</i> sp.
กระบวนการแยกสลายด้วยแสง	อนินทรีย์คาร์บอน	น้ำ	โฟโตออโตโทรฟิก	FeFe-Hydrogenase NiFe-Hydrogenase	สาหร่ายสีเขียว เช่น <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> และ <i>Chlorella pyrenoidosa</i> ไซยาโนแบคทีเรีย เช่น <i>Synechocystis</i> sp.
กระบวนการตรึงไนโตรเจน	อนินทรีย์คาร์บอน	สารประกอบอินทรีย์และน้ำ	โฟโตออโตโทรฟิก	Nitrogenase	ไซยาโนแบคทีเรีย เช่น <i>Anabaena variabilis</i>

2.3 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (Eukaryote) จัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Chlorophyta) สาหร่ายในดิวิชันนี้ส่วนใหญ่มีสีเขียวเหมือนหญ้า ภายในคลอโรพลาสต์มีรงควัตถุพวกคลอโรฟิลล์เอและบีจำนวนมาก ซึ่งจะบดบังรงควัตถุอื่นๆ ไว้ นอกจากนี้ ยังมีรงควัตถุแคโรทีนอยด์และแซนโทฟิลล์อีกหลายชนิด สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่จะมีพริ้นอยด์ในคลอโรพลาสต์ ซึ่งเป็นศูนย์กลางของการสะสมแป้งในเซลล์ของสาหร่าย สาหร่ายสีเขียวนี้สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและสามารถเจริญแตกต่างกันตามสภาพอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มแสง และความสมบูรณ์ของอาหาร สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์จัดเป็นสาหร่ายน้ำจืด ซึ่งเจริญอยู่ในน้ำตื้นหรือในน้ำลึกที่แสงส่องถึง สาหร่ายสีเขียวบางชนิดขึ้นอยู่กับก้อนหิน หวาย โคลน เปลือกหอย เปลือกไม้ หิมะ หรือน้ำแข็ง สาหร่ายที่เหลืออีกประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์จัดเป็นสาหร่ายทะเล ซึ่งมักจะพบบริเวณน้ำตื้นตามแนวชายฝั่ง สาหร่ายสีเขียวเป็นสาหร่ายที่มีความหลากหลายมากที่สุด โดยมีการค้นพบมากถึง 450 จีนัส และสามารถระบุชนิดได้มากกว่า 7,500 สปีชีส์ (ยูดี, 2546) สาหร่ายสีเขียวแต่ละจีนัสมีลักษณะโครงสร้าง รูปร่าง การเคลื่อนไหวและการสืบพันธุ์ที่แตกต่างกัน ดังนี้

2.3.1 โครงสร้างเซลล์

สาหร่ายสีเขียวมีโครงสร้างของเซลล์ ผนังเซลล์ คลอโรพลาสต์และการสะสมแป้งคล้ายกับพืชชั้นสูง โดยมีรายละเอียดโครงสร้างเซลล์สาหร่ายสีเขียวดังนี้

1.) ผนังเซลล์

สาหร่ายสีเขียวสามารถพบได้ทั้งแบบมีผนังเซลล์และไม่มีผนังเซลล์ สาหร่ายสีเขียวที่ไม่มีผนังเซลล์จะมีเยื่อหุ้มเซลล์เพลลิเคิล (Pellicle) แต่สำหรับสาหร่ายสีเขียวที่มีผนังเซลล์จะมีผนังเซลล์ 2 ชั้น ผนังเซลล์ชั้นในประกอบด้วยเซลลูโลส (Cellulose) และผนังชั้นนอกประกอบด้วยเพกติน (Pectin) สาหร่ายสีเขียวบางชนิดอาจจะมีผนังเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วยสารจำพวกไคติน (Chitin) หรือสปอโรโพลลินิน (Sporopollenin) นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวบางชนิดไม่สามารถพบผนังเซลล์ในเซลล์ปกติหรือเซลล์สืบพันธุ์

2.) รงควัตถุและคลอโรพลาสต์

รงควัตถุของสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วย (1) คลอโรฟิลล์เอและบี (Chlorophyll a and b) (2) แคโรทีน (Carotene) ได้แก่ เบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) แอลฟาแคโรทีน (Alpha-carotene) แกมมาแคโรทีน (Gamma-carotene) และ (3) แซนโทฟิลล์ (Xanthophyll) ได้แก่ ลูเทอิน (Lutein) ซีเอแซนธิน (Zeaxanthin) ไวโอลแซนธิน (Violoxanthin) และนีโอแซนธิน

(Neoxanthin) รงควัตถุทั้งหมดนี้จะรวมกันในเม็ดสีหรือพลาสติด (Plastid) ที่เรียกว่าคลอโรพลาสต์ คลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างลักษณะแตกต่างกัน เช่น รูปร่างเป็นเกลียว (Helical หรือ Spiral chloroplast) พบใน *Spirogyra* รูปร่างเป็นรูปดาว (Stellate chloroplast) พบใน *Zygnema* รูปร่างเป็นแผ่นแบน 1 แผ่น (Lamellar หรือ Flat plate chloroplast) พบใน *Mougeotia* รูปร่างเป็นร่างแห (Reticulate chloroplast) พบใน *Oedogonium* รูปร่างเป็นกระบอกตรงหัวท้ายเปิด (Open cylinder chloroplast) พบใน *Ulothrix* รูปร่างเป็นรูปถ้วย (Cup shaped chloroplast) พบใน *Chlamydomonas*

3.) อาหารสะสม

อาหารสะสมของสาหร่ายสีเขียวจะอยู่ในรูปของแป้งที่ประกอบด้วยอะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพกติน (Amylopectin) โดยจะเก็บสะสมแป้งไว้ในไพเรโนอิด (Pyrenoid) สำหรับสาหร่ายสีเขียวที่ไม่มีไพเรโนอิดจะสะสมอาหารไว้ในรูปของน้ำมัน

2.3.2 รูปร่างลักษณะ

สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างลักษณะหลายแบบด้วยกัน สามารถจัดจำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ (1) เซลล์เดี่ยว (Unicellular form) อาจมีรูปร่างกลม รูปไข่ หรือรูปคล้ายพระจันทร์เสี้ยว เช่น *Chlamydomonas* และ *Chlorella* เป็นต้น (2) เซลล์ที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (Filamentous form) ซึ่งเกิดจากการแบ่งเซลล์ตามขวางในระนาบเดียว ทำให้เซลล์เรียงต่อกันเป็นสาย เช่น *Ulothrix* และ *Chaetophora* เป็นต้น (3) เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (Colony form) โดยแต่ละเซลล์มีลักษณะคล้ายกันและยึดเกาะกันด้วยสารเมือก เช่น *Coelastrum* และ *Scenedesmus* เป็นต้น (4) กลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะเป็นหลอดหรือท่อติดต่อกันตลอด (Siphonous form) เช่น *Siphonocladus* และ (5) เซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อพาราเอนไคมา (Parenchymatous form) จะมีการแบ่งเซลล์แบบ 2 ทิศทาง เช่น *Percursaria*

2.3.3 การเคลื่อนไหว

สาหร่ายสีเขียวมีทั้งชนิดที่สามารถเคลื่อนไหวได้และเคลื่อนไหวไม่ได้ สาหร่ายสีเขียวที่เคลื่อนไหวได้ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ปกติหรือเซลล์สืบพันธุ์ มักพบออร์แกเนลล์ที่มีสีซึ่งเรียกว่า สติกมา (Stigma) หรืออายสปอต (Eye spot) สติกมาหรืออายสปอตทำหน้าที่ในการรับแสงแล้วส่งความรู้สึกต่อไปยังแฟลกเจลลา (Flagella) แฟลกเจลลาของสาหร่ายสีเขียวส่วนมากมี 2 เส้นที่มีความยาวเท่ากัน (Isokontan) บางจิ้นส์มีแฟลกเจลลาเพียง 1 เส้น บางจิ้นส์มีแฟลกเจลลา 4 เส้น เช่น *Carteria* บางจิ้นส์มีแฟลกเจลลาจำนวนมากเป็นกระจุกทางด้านบนของเซลล์ เช่น *Oedogonium* การเคลื่อนที่ของเซลล์สืบพันธุ์ไม่ได้อาศัยหนวด แต่จะเคลื่อนที่แบบอะมีบา (Amoeboid movement)

2.3.4 การสืบพันธุ์

การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวมีทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่จะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยอาศัยการแบ่งเซลล์ สาหร่ายสีเขียวที่เป็นเส้นสายจะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการหักเป็นท่อน (Fragmentation) ซึ่งแต่ละท่อนของสายที่หักสามารถเจริญเป็นเส้นใหม่ได้อีก เช่น *Spirogyra* สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวจะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ (Sporulation) ซึ่งมีทั้งแบบสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ที่เรียกว่า ซูโอสปอร์ (Zoospore) เช่น *Chlamydomonas* สาหร่ายบางชนิดจะสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้เรียกว่า ออโตสปอร์ (Autospore) เช่น *Chlorella* สำหรับสาหร่ายสีเขียวที่อยู่กันเป็นโคโลนีจะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างโคโลนี (Colonization) โคโลนีใหม่ที่เกิดขึ้นจะอยู่ในโคโลนีเดิม ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น เช่น *Volvox* ในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สาหร่ายสีเขียวจะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนโครโมโซมชุดเดียวเรียกว่า แกมีต (Gamete) การรวมของแกมีตอาจเป็นแบบไอโซแกมี (Isogamy) ซึ่งเป็นวิธีการสร้างแกมีตที่มีรูปร่างและลักษณะเหมือนกัน หรือแบบแอนไอโซแกมี (Anisogamy) ซึ่งเป็นวิธีการสร้างแกมีตที่มีรูปร่างและลักษณะเหมือนกันแต่ขนาดต่างกัน หรือแบบโอโอแกมี (Oogamy) ซึ่งเป็นวิธีการสร้างแกมีตที่มีรูปร่างและลักษณะแตกต่างกัน เมื่อแกมีตมารวมกันเป็นไซโกต (Zygote) ไซโกตจะพัฒนาเป็นสปอร์ที่มีโครโมโซม 2 ชุด เรียกว่า ไซโกสปอร์ (Zygospore) จากนั้น สปอร์จะเจริญเป็นเซลล์ใหม่เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญ

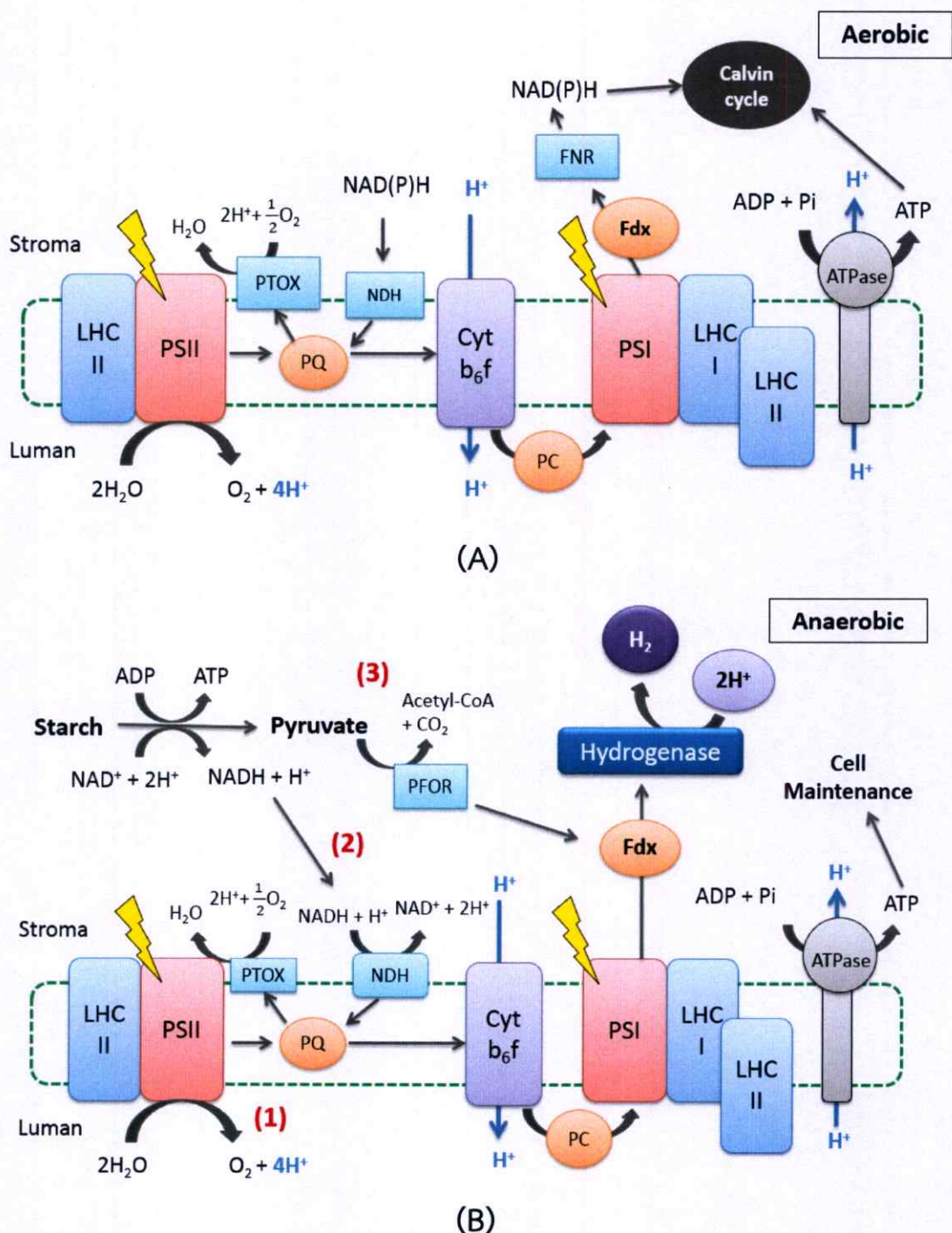
2.4 การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว

การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวถูกค้นพบมานานกว่า 70 ปีมาแล้ว โดยค้นพบการผลิตไฮโดรเจนเป็นครั้งแรกในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* (Gaffron, 1939) สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* สามารถผลิตไฮโดรเจนเป็นเวลาต่อเนื่องหลายชั่วโมง เมื่อชักนำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะที่ปราศจากอากาศในที่มืด แต่ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนยังคงค่อนข้างต่ำและสาหร่ายมีช่วงชีวิตที่สั้น (Gaffron, 1939) ในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น สาหร่ายสีเขียวบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการบ่มที่ปราศจากอากาศทั้งในที่มืดและที่มีแสง สาหร่ายสีเขียวที่เป็นที่นิยมนำมาศึกษาคุณลักษณะในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. เป็นต้น (Gaffron and Rubin, 1942; Healey, 1970; Skjånes et al., 2008; Chader et al., 2009; Amutha and Murugesan, 2011; He et al., 2012; Pongpadung et al., 2015)

สาหร่ายสีเขียวผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ โดยมีระบบแสงที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง 2 ระบบ คือ ระบบแสงหนึ่งและระบบแสงสอง ระบบแสงทั้งสองจะทำหน้าที่ดูดซับพลังงานแสง เปลี่ยนเป็นพลังงานเคมีเพื่อใช้ในกระบวนการ

การเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์สาหร่าย ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว จะเกิดกลไกของการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสอง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโปรตอน อิเล็กตรอน และโมเลกุลของออกซิเจน อย่างไรก็ตาม โมเลกุลของออกซิเจนที่ได้มีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง ดังนั้น การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน โดยการเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้ผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้น จึงจำเป็นต้องรักษาปริมาณของออกซิเจนให้มีความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (Ghirardi *et al.*, 1997)

การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมักจะแบ่งระยะเวลาออกเป็น 2 ช่วง (Two-stage process) คือ ช่วงที่ 1 ช่วงของการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Aerobic condition) และช่วงที่ 2 คือ ช่วงของการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ (Anaerobic condition) (Melis *et al.*, 2000) ในช่วงการเจริญเติบโต ระบบแสงของสาหร่ายสีเขียวมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิด คือ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง เมื่อพลังงานในรูปของแสงตกกระทบในบริเวณระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) ในคลอโรฟิลล์ หน่วยรับพลังงานแสง (Light harvesting complexes, LHC) จะทำหน้าที่ดูดซับพลังงานแสง แล้วส่งผ่านไปให้หน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center, RC) ที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร โดยพลังงานจะถูกถ่ายทอดมาจากคลอโรฟิลล์เอ ทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากโมเลกุลของศูนย์กลางปฏิกิริยาในระบบแสงสองและถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปตามระบบการขนส่งอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนของระบบแสงสองที่หลุดออกไปจะทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสอง การแตกตัวของน้ำจะได้โปรตอน อิเล็กตรอนและโมเลกุลของออกซิเจน อิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำจะเข้าไปแทนที่อิเล็กตรอนที่สูญเสียไปในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ จากนั้น อิเล็กตรอนจากระบบแสงสองจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (Plastoquinone, PQ) ไซโตโครม บี 6 เอฟ (Cytochrome *b₆f*, Cyt *b₆f*) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin, PC) และเข้าสู่ระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) ตามลำดับ ระบบแสงหนึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อมีแสงมากระตุ้นคลอโรฟิลล์ภายในระบบแสงหนึ่ง ทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากโมเลกุลของศูนย์กลางปฏิกิริยาในระบบแสงหนึ่ง และส่งผ่านไปยังตัวรับอิเล็กตรอนเป็นลำดับ จนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือ เฟอร์รีดอกซิน เฟอร์รีดอกซินจะส่งอิเล็กตรอนต่อไปโดยไปรีดิวซ์ NAD(P)^+ จากการกระตุ้นปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ เฟอร์รีดอกซิน-เอ็นเอตี(พี)รีดักเตส (Ferredoxin-NADP reductase, FNR) และได้ผลิตภัณฑ์เป็น NAD(P)H จากนั้น NAD(P)H จะถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมกับ ATP ผ่านวัฏจักรเคลวิน (Calvin cycle) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสมในเซลล์สาหร่ายต่อไป (รูปที่ 2.4A)



รูปที่ 2.4 กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ระหว่างการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (A) และการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ (B) [ATP synthase (ATPase), Cytochrome b_6f complex (Cyt b_6f), Ferredoxin (Fdx), Ferredoxin-NADP reductase (FNR), Light harvesting complex (LHCII), NAD(P)H-dehydrogenase (NDH), Photosystem II (PSII), Photosystem I (PSI), Plastid terminal oxidase (PTOX), Plastocyanin (PC), Plastoquinone (PQ), Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (PFOR)]

ที่มา : ดัดแปลงจาก Hemschemeier *et al.*, 2009

ในช่วงการผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายจะเริ่มผลิตไฮโดรเจนเมื่อระบบเข้าสู่สภาวะที่ปราศจากอากาศด้วยการพ่นก๊าซอาร์กอนหรือไนโตรเจนเพื่อไล่อากาศหรือออกซิเจน หรือให้เซลล์อยู่ในอาหารที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ เป็นต้น (Melis *et al.*, 2000; Melis and Happe, 2001) สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนโดยผ่าน 3 กระบวนการ แบ่งเป็นการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีแสง 2 กระบวนการ และการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง 1 กระบวนการ (รูปที่ 2.4B)

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสงสามารถแบ่งออกได้ 2 กระบวนการ คือ กระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรงและกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรงจะมีกลไกการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเช่นเดียวกับการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวในช่วงการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีอากาศ โดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจะผ่านทั้งระบบแสงสอง (PSII) และระบบแสงหนึ่ง (PSI) ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถทำงานได้ดีเนื่องจากไม่มีออกซิเจนมายับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินจึงไปรวมกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจน (รูปที่ 2.4B (1)) อย่างไรก็ตาม การผลิตไฮโดรเจนในระยะยาวด้วยกระบวนการนี้จะถูกจำกัดจากปริมาณออกซิเจนที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสอง ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสถูกยับยั้งจากออกซิเจน การผลิตไฮโดรเจนจึงลดต่ำลง

การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อมสามารถแก้ปัญหาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสด้วยออกซิเจน การผลิตไฮโดรเจนเกิดจากการสลายแป้งที่ถูกเก็บสะสมไว้ในขณะที่สาหร่ายมีการเจริญเติบโต โมเลกุลของแป้งจะถูกย่อยสลายผ่านวิถีไกลโคไลซิสและปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาอยู่ในโครงสร้างของ NADH จากนั้น เอนไซม์เอ็นเอดีเอสดีไฮโดรจีเนส (NADH dehydrogenase, NDH) จะกระตุ้นปฏิกิริยาการสลาย NADH กลายเป็น NAD^+ โปรตอน และ อิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะถูกส่งผ่านพลาสโตควิโนนไปยังระบบแสงหนึ่ง และส่งต่อมายังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจนต่อไป (รูปที่ 2.4B (2))

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจากกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงจะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงและไม่มีออกซิเจน โดยแป้งจะถูกสลายไปเป็นไพรูเวต (Pyruvate) ผ่านเอนไซม์ไพรูเวต-เฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส (Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase, PFOR) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) อะซิติล-โคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) และอิเล็กตรอนออกมา เฟอร์รีดอกซินจะรับอิเล็กตรอนที่ปลดปล่อยออกมาและส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้ผลิตไฮโดรเจนต่อไป (รูปที่ 2.4B (3)) อย่างไรก็ตาม การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงจะได้ผลผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง (Dubini *et al.*, 2011)

2.5 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase : acceptor oxidoreductase) ถูกค้นพบในช่วงคริสต์ศตวรรษที่ 19 ในปี ค.ศ. 1939 Stephenson และ Stickland บัญญัติศัพท์คำว่า “ไฮโดรจีเนส” ขึ้นเป็นครั้งแรก ภายหลังจากการพบการสร้างและสลายไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมทิลีนบลู (Methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Stephenson and Stickland, 1931) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนในสิ่งมีชีวิต โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นไฮโดรเจน หรือเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน (สมการที่ 17) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตประเภทโปรคาริโอตและยูคาริโอต สิ่งมีชีวิตประเภทโปรคาริโอตจะพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซโตพลาสซึม ในขณะที่สิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตจะพบเอนไซม์ชนิดนี้ในคลอโรพลาสต์ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสส่วนใหญ่จะมีความไวต่อก๊าซออกซิเจน



เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจัดจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้ 2 ชนิด ดังนี้

1.) เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส

เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (Reversible hydrogenase) หรือ เอนไซม์ไบไดเรกชันนัลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ทั้งในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว เมื่อศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ชนิดนี้พบว่า เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสมีความไวต่อก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์มากกว่าเอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสทำงานได้โดยอาศัยหน่วยย่อยของโปรตีน 4 หน่วยย่อยที่แตกต่างกัน (Heterotetrameric enzyme) มารวมกัน โดยที่สองหน่วยย่อยรวมกันเรียกว่าไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) และอีกสองหน่วยย่อยที่เหลือรวมเรียกว่าไดอะฟอเรส (Diaphorase) (Tamagnini *et al.*, 2000; 2002) หน่วยย่อยของไฮโดรจีเนสถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxY* และ *hoxH* ซึ่งเป็นบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่วนหน่วยย่อยของไดอะฟอเรสถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxF* และ *hoxU* นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ยังมีหน่วยย่อยของไดอะฟอเรสอีกหนึ่งหน่วย (HoxE) ที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxE* (Appel and Schulz, 1996) หน่วยย่อยไดอะฟอเรสทำหน้าที่ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอนไปยัง NAD^+ หรือ NAD(P)^+ และส่งผ่านอิเล็กตรอนไปหน่วยย่อยไฮโดรจีเนส

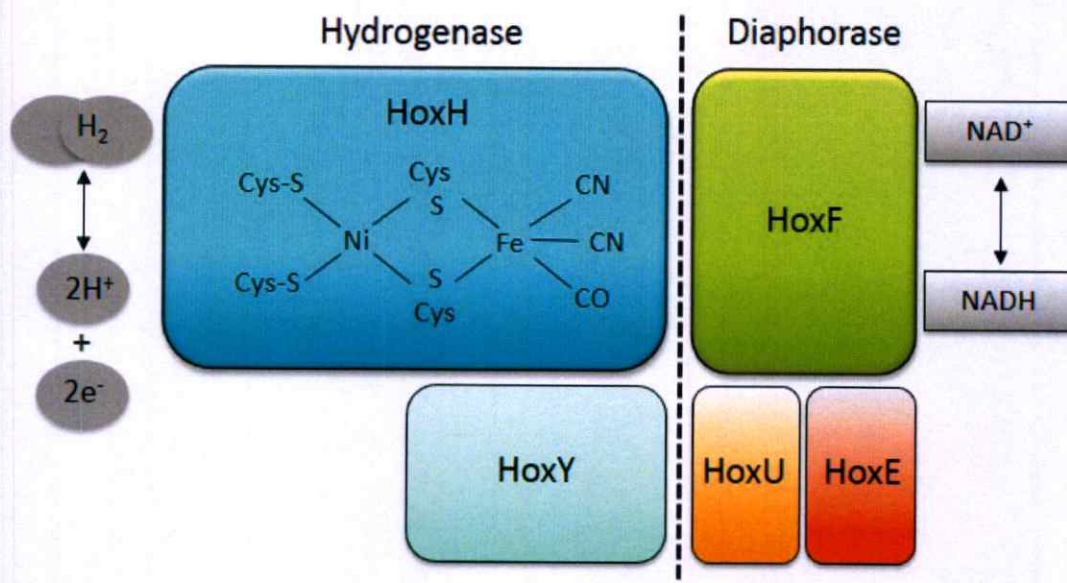
2.) เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส

เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenase) หรือ เอนไซม์ยูนิไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส (Unidirectional hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาสซึมเมมเบรน (Cytoplasmic membrane) ของเซลล์เฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรีย (Appel and Schulz, 1996) เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน เอนไซม์ชนิดนี้มีความไวต่อออกซิเจนและมีหน้าที่หลักในการสลายไฮโดรเจนที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์จากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ทั้งในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวบางชนิดที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน เช่น *Synechococcus* sp. PCC 6301 เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสจัดเป็นไดเมอร์ิกเอนไซม์ (Dimeric enzyme) ที่ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อยที่มีขนาดต่างกันมาทำงานร่วมกัน โปรตีนหน่วยใหญ่ (Large subunit) หรือ HupL มีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hupL* ส่วนโปรตีนหน่วยย่อยเล็ก (Small subunit) หรือ HupS มีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตัน ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hupS*

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถจำแนกตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ ออกเป็น 2 ชนิด ดังนี้

1.) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีนิกเกิลและเหล็กอยู่ในโมเลกุล

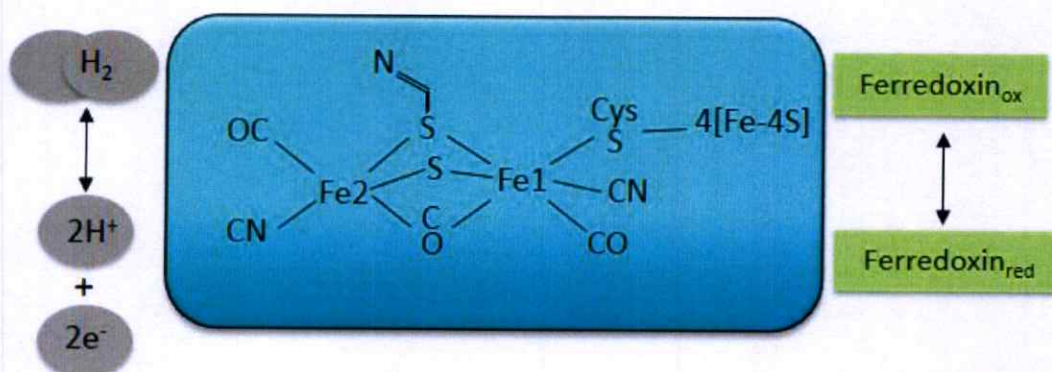
เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีนิกเกิลและเหล็กอยู่ในโมเลกุล (NiFe-hydrogenase) สามารถพบได้ในแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย เอนไซม์ชนิดนี้มีองค์ประกอบของโลหะนิกเกิลและเหล็กในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ อะตอมของเหล็ก (Fe) และนิกเกิล (Ni) จะเข้าจับกับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่หรือ HoxH โดยอะตอมของเหล็กยังเชื่อมกับคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ไซยาไนด์ (CN) และซัลเฟอร์ (S) (รูปที่ 2.5) หน่วยย่อยเล็กหรือ HoxY ประกอบด้วยคลัสเตอร์ของ [4Fe-4S] เอนไซม์ไดอะเฟอร์สประกอบด้วยโปรตีน HoxF, HoxU และ HoxE เป็นช่องทางส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ไปยังบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Maness *et al.*, 2009) (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ NiFe-hydrogenase
ที่มา : Maness *et al.*, 2009

2.) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กอยู่ในโมเลกุล

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กอยู่ในโมเลกุล (FeFe-hydrogenase) สามารถพบได้ในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียว บริเวณศูนย์กลางเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยเหล็ก 2 อะตอม โดยเหล็กอะตอมจะจับกับซัลเฟอร์อะตอมของกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) นอกจากนี้ เอนไซม์ FeFe-hydrogenase ยังประกอบด้วยคลัสเตอร์ของ [4Fe-4S] ดังนั้น ซัลเฟอร์เปรียบเสมือนเป็นสะพานในการเชื่อมระหว่างอะตอมของเหล็ก นอกจากอะตอมของเหล็กจะจับกับกรดอะมิโนซิสเทอีนแล้ว เหล็กอะตอมยังจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และไซยาไนด์ (CN) (Maness *et al.*, 2009) (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.6 บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ FeFe-hydrogenase
ที่มา : Maness *et al.*, 2009

สาหร่ายสีเขียวจะใช้เอนไซม์ FeFe-hydrogenase เพื่อเร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแบบทิศทางเดียว โดยออกซิโดซีโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ FeFe-hydrogenase มีค่าสูงกว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ NiFe-hydrogenase ถึง 10 ถึง 1,000 เท่า (Frey, 2002) จึงเป็นไปได้ว่า สาหร่ายสีเขียวที่มีเอนไซม์ FeFe-hydrogenase อาจมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่าไซยาโนแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ NiFe-hydrogenase

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหมักในที่มืด โดยการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจะเกิดขึ้นในสภาวะที่มีออกซิเจนในระบบต่ำ ดังนั้นการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงหลายประการ ดังนี้

2.6.1 แหล่งซัลเฟอร์

ซัลเฟอร์เป็นธาตุที่จำเป็นต่อการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ ซัลเฟอร์ที่ถูกเก็บไว้ภายในเซลล์ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของกรดอะมิโน 2 ชนิดคือ เมไทโอนีน (Methionine) และซิสเทอีน (Cysteine) ในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* การขาดซัลเฟอร์ในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลยับยั้งกิจกรรมของระบบแสงสองของเซลล์ชั่วคราว ส่งผลให้อัตราการอิมตัวของแสงลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการขาดซัลเฟอร์ส่งผลให้การสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเทอีนและเมไทโอนีนลดลง และทำให้โปรตีน D1 ที่อยู่ในบริเวณศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของระบบแสงสองเกิดความเสียหาย เมื่อโปรตีน D1 เสียหาย จะทำให้กระบวนการซ่อมแซมระบบแสงสองเกิดความบกพร่อง จึงส่งผลยับยั้งการเกิดออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสอง ทำให้สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น (Wykoff *et al.*, 1998)

สาหร่ายสีเขียวใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจน อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจนสูง ซึ่งออกซิเจนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ส่วนใหญ่เกิดจากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสอง ดังนั้น เพื่อหลีกเลี่ยงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จึงต้องทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนภายในระบบมีค่าต่ำกว่า 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เพื่อให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานได้ดีขึ้น (Ghirardi *et al.*, 1997) การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทำโดยการแยกช่วงของกระบวนการสังเคราะห์แสงออกจากช่วงของการผลิตไฮโดรเจน (Melis *et al.*, 2000) ดังนี้

ช่วงที่ 1 เป็นช่วงของกระบวนการสังเคราะห์แสง เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเติบโตในอาหารที่มีแหล่งอาหารสมบูรณ์ เพื่อให้เซลล์เจริญได้ดีและมีอัตราการสังเคราะห์แสงสูง

ในระหว่างการเจริญ สาหร่ายจะมีกิจกรรมของระบบแสงปกติ ทำให้มีการผลิตออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสอง นอกจากนี้ สาหร่ายยังสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศหรือใช้สารอินทรีย์คาร์บอนที่มีอยู่ในอาหารมาผลิตเป็นชีวมวลและมีการสร้างและสะสมสารประกอบคาร์โบไฮเดรตไว้ภายในเซลล์ เมื่อเซลล์เจริญจนมีความหนาแน่นของเซลล์สูง จะทำการย้ายเซลล์เข้าสู่อาหารที่ขาดซิลเฟอร์

ช่วงที่ 2 เป็นช่วงการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย เมื่อย้ายเซลล์สาหร่ายเข้าสู่อาหารที่ขาดซิลเฟอร์ ทำให้เซลล์ตอบสนองต่อความเครียดเนื่องจากการขาดซิลเฟอร์ โดยส่งผลให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ RuBisCo (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) ลดลง (Zhang *et al.*, 2002) การลดกิจกรรมของเอนไซม์ RuBisCo ทำให้ไม่เกิดการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ การเจริญเติบโตของสาหร่ายจึงลดลง เซลล์สาหร่ายจะทำการปรับตัวในสภาวะการขาดแหล่งซิลเฟอร์ โดยในช่วงเริ่มต้นของการขาดซิลเฟอร์ เซลล์จะเก็บสะสมแป้งได้มากกว่าในสภาวะปกติ 8 ถึง 10 เท่า (White and Melis, 2006) และเมื่ออัตราการเกิดออกซิเจนลดลงต่ำกว่าปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ในกระบวนการหายใจ จึงทำให้เกิดสภาวะปราศจากอากาศภายในระบบ เซลล์จะสลายแป้งที่เก็บสะสมและนำมาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดนิวคลีอิกและกรดอะมิโนทุกชนิดซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และไนโตรเจนยังเป็นองค์ประกอบสำคัญของหน่วยโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ เซลล์ที่อยู่ในสภาวะการขาดไนโตรเจนจะลดปริมาณการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และลดประสิทธิภาพการดูดซับพลังงานของระบบแสง เนื่องมาจากการลดลงของปริมาณการสังเคราะห์โปรตีนดูดซับพลังงานแสง (LHC) โปรตีนศูนย์กลางปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสง (RC) และเอนไซม์ RuBisCo (Peltier and Schmidt, 1991) การลดลงของกิจกรรมของระบบแสงสองในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนทำให้ปริมาณออกซิเจนเกิดขึ้นในระบบแสงสองน้อยลง นอกจากนี้ การขาดไนโตรเจนยังไปกระตุ้นการเข้าสู่วิถี Alternative oxidoreductase (AOX) ในไมโทคอนเดรีย เกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนในกระบวนการลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนและการหายใจแบบใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น (Zhang *et al.*, 2015) ปริมาณออกซิเจนจึงถูกใช้ในกิจกรรมการหายใจของเซลล์ เมื่อปริมาณออกซิเจนในระบบลดลงจะช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจน เช่นเดียวกับการขาดซิลเฟอร์ ในสภาวะขาดแหล่งไนโตรเจน เซลล์สาหร่ายสีเขียวจะมีสะสมแป้งเพิ่มขึ้น โดยช่วงแรกของการขาดไนโตรเจน เซลล์จะทำการสะสมอาหารในรูปของแป้ง และเมื่อปริมาณออกซิเจนในระบบต่ำลงจนเกิดสภาวะปราศจากออกซิเจน เซลล์จะสลายแป้งมาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับผลิตไฮโดรเจน (He *et al.*, 2012; Philipps *et al.*, 2012)

2.6.3 แหล่งฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต การสังเคราะห์แสง การหายใจ และการแบ่งเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว ฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกและสารประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการถ่ายเทพลังงานภายในเซลล์ ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว ระบบแสงจะดูดซับพลังงานแสง ทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากระบบแสงสองไปยังระบบแสงหนึ่งและได้ ATP และ NADPH สำหรับใช้ในปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นคาร์โบไฮเดรต การขาดฟอสฟอรัสจึงมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายและจำกัดปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากสารตัวกลางในการถ่ายเทพลังงานในวิถีเพนโทสเฟสมีระดับลดลง จึงนำไปสู่การลดกิจกรรมการถ่ายเทอิเล็กตรอนของระบบแสง (Photosynthetic electron transport activity) (Brooks, 1986) นอกจากนี้ การขาดฟอสฟอรัสยังทำให้อัตราการอิมมัตูวของแสงลดลงและมีผลยับยั้งการปลดปล่อยออกซิเจนออกสู่ระบบ เซลล์จึงเริ่มเข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจน ส่งผลให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีประสิทธิผลการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม การลดปริมาณออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะการขาดฟอสฟอรัสจะใช้เวลานานกว่าสภาวะการขาดซิลิเฟอรัส ดังนั้น สาหร่ายจะใช้ระยะเวลาเริ่มต้นการผลิตไฮโดรเจนภายหลังจากการฟอสฟอรัสค่อนข้างช้า (Batyrova *et al.*, 2012)

2.6.4 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต การหายใจระดับเซลล์ รวมไปถึงการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญภายใต้สภาวะการเจริญแบบเฮเทอโรโทรฟิกซึ่งใช้สารอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน และภายใต้สภาวะการเจริญแบบออโตโทรฟิกที่ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน สาหร่ายสีเขียวจะเก็บสะสมแหล่งคาร์บอนในรูปของแป้งในช่วงระหว่างกระบวนการสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะที่มีอากาศ เมื่อนำสาหร่ายสีเขียวมาเหนี่ยวนำให้ผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ แป้งจะถูกสลายเพื่อใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจน แหล่งคาร์บอนที่สาหร่ายสามารถนำมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจน เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งจัดเป็นสารอินทรีย์คาร์บอน (Melis *et al.*, 2000) และสารอินทรีย์คาร์บอนต่างๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลซูโครส อะซีเตท กรดมาลิก และสารอินทรีย์ในน้ำเสีย เป็นต้น (Amutha and Murugesan, 2011; Song *et al.*, 2011; He *et al.*, 2015) โดยส่วนใหญ่ การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสงจะเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มเซลล์ในอาหารที่มีอะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอน (Healey, 1970; Gibbs *et al.*, 1986; Jurado-Oller *et al.*, 2015) โดยสาหร่ายสีเขียวที่บ่มในอาหารที่มีอะซีเตทจะมีประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงลดลง ทำให้ปริมาณออกซิเจนลดลงด้วยเช่นกัน อะซีเตทที่มีอยู่ในอาหารจะถูกใช้เป็นสับสเตรทสำหรับกระบวนการหายใจของเซลล์สาหร่าย การเพิ่มความเข้มข้นของอะซีเตททำให้

สาหร่ายสีเขียวมีอัตราการหายใจเพิ่มขึ้น (Wang *et al.*, 2011) นอกจากนี้ กระบวนการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ของสาหร่ายจะถูกยับยั้ง ทำให้มีอิเล็กตรอนถูกส่งไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น (Hemschemeier *et al.*, 2008)

การเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียวที่ใช้สารอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าสาหร่ายที่ใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน (Chen, 1996) แต่อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกมีข้อเสียคืออาจเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียได้ง่าย เนื่องจากแบคทีเรียสามารถใช้คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกับสาหร่ายสีเขียว

2.6.5 ค่าพีเอช

ค่าพีเอช (pH) หรือค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงพีเอชทำให้เมแทบอลิซึมของสาหร่ายสีเขียวเปลี่ยนแปลงไปและมีผลต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ ในระหว่างการสังเคราะห์แสง พีเอชเริ่มต้นของอาหารจะลดลงเนื่องจากเกิดกรดคาร์บอนิก (Carbonic acid) จากการทำปฏิกิริยาระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 ถึง 3 วัน ค่าพีเอชจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากอะซีเตทซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง เมื่อละลายในอาหารจะเกิดปฏิกิริยาจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับน้ำได้เป็นไฮดรอกไซด์ไอออน (OH⁻) ขึ้น ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงมีค่าเป็นเบสเพิ่มขึ้น โดยทั่วไป สาหร่ายสีเขียวจะเจริญเติบโตในช่วงพีเอช 5.0 ถึง 9.0 (Song *et al.*, 2011) ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยส่วนใหญ่จะมีค่าความเป็นกลาง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายสีเขียวและเมแทบอลิซึมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย การเพิ่มค่าพีเอชของอาหารให้สูงขึ้นส่งผลให้ระยะเวลาการปรับตัวเข้าสู่กระบวนการผลิตไฮโดรเจนเร็วขึ้น (Khanal *et al.*, 2004) แต่การเพิ่มค่าพีเอชของอาหารให้มีค่าสูงกว่า 8.0 จะทำให้ประสิทธิภาพของระบบแสงต่ำลง (Antal *et al.*, 2016) สำหรับอาหารที่มีค่าพีเอชเป็นกรด กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะถูกยับยั้ง ทำให้การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวลดลง โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่าย *C. reinhardtii* จะอยู่ในช่วงพีเอช 7.0 ถึง 7.4 แต่กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะลดลงในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอช 6.8 (Kosourov *et al.*, 2003)

2.6.6 แสง

แสงเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ในกระบวนการสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียวจะดูดซับพลังงานแสงและเปลี่ยนเป็นพลังงาน ATP เพื่อใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ โดยจะทำการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์เป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการผลิตชีวมวล เมื่อน้ำตาลในปริมาณที่มากพอ เซลล์สาหร่ายสีเขียวจะเก็บสะสมน้ำตาลในรูปของ

แบ่ง ปริมาณแสงที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงและส่งผลให้สาหร่ายสีเขียวเจริญอย่างรวดเร็ว แต่ปริมาณแสงที่มากเกินไปจะเป็นสาเหตุทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายถูกยับยั้งด้วยแสง (Photoinhibition) เนื่องจากโปรตีนในระบบแสงถูกทำลาย (Kim *et al.*, 2006)

ในการช่วงการเจริญของสาหร่ายสีเขียว การเพิ่มความเข้มแสงส่งผลให้เซลล์มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงขึ้นและเจริญเติบโตได้มากขึ้น เมื่อทำการย้ายเซลล์เข้าสู่สภาวะที่เหนียวทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนภายใต้ความเข้มแสงสูง เซลล์จะมีการผลิตไฮโดรเจนในระยะเริ่มต้นสั้นลงและทำให้ในระบบเข้าสู่สภาวะปราศจากอากาศได้เร็วขึ้น (Oncel *et al.*, 2014) โดยช่วงแรกของการผลิตไฮโดรเจนภายใต้ความเข้มแสงสูง สาหร่ายจะมีตอบสนองอย่างรวดเร็วทำให้การสะสมแบ่งเพิ่มขึ้น และเมื่อระบบเข้าสู่สภาวะปราศจากอากาศ แบ่งจะถูกสลายเพื่อใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนต่อไป (Oncel *et al.*, 2014)

2.6.7 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีเขียวมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงหลายชนิด การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทั่วไป อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายอยู่ระหว่าง 10 ถึง 35 องศาเซลเซียส เพราะเป็นช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ อัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถึงประมาณ 35 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสจะทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงจะลดลงอย่างรวดเร็ว สภาวะกีดกันจากอุณหภูมิสูงมีผลต่อการเกิดการยับยั้งด้วยแสงและการลดปริมาณการสร้างไรบูโลส 1,5 บิสฟอสเฟต (Ribulose-1,5-bisphosphate, RuBP) ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากเอนไซม์ RuBisCo มีความไวต่ออุณหภูมิสูง นอกจากนี้ อุณหภูมิสูงยังส่งผลต่อการยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในระบบแสง (Salvucci and Crafts-Brandner, 2004)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนอยู่ในช่วง 35 ถึง 40 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ก๊าซออกซิเจนจะไม่ถูกผลิตขึ้น เนื่องจากกิจกรรมของระบบแสงสองมีความไวต่ออุณหภูมิสูง และมีผลต่อการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองด้วย ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง การทำงานของระบบแสงสองจะถูกยับยั้ง เนื่องจากโปรตีนที่ศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยา (RC) และโปรตีนรับแสง (LHC) ในระบบแสงสองถูกทำลาย เมื่อกิจกรรมของระบบแสงสองถูกยับยั้ง การส่งผ่านอิเล็กตรอนจึงหยุดชะงัก อิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองไม่ได้ถูกส่งไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จึงมีเพียงอิเล็กตรอนที่เกิดจากการสลายแบ่งที่ถูกถ่ายทอดผ่านระบบแสงหนึ่งส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจนเท่านั้น นอกจากนี้ อุณหภูมิยังมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในระยะเริ่มต้น ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการปรับตัวเข้าสู่สภาวะเหนียวนำการทำงานของ

เอนไซม์ไฮโดรจีเนส โดยที่อุณหภูมิต่ำคือประมาณ 25 องศาเซลเซียส เซลล์จะมีการผลิตไฮโดรเจน ในระยะเริ่มต้นค่อนข้างนาน แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นถึงประมาณ 40 องศาเซลเซียส เซลล์จะมีการผลิตไฮโดรเจนในระยะเริ่มต้นเร็วขึ้น (Song *et al.*, 2011) ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนยังขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายสีเขียวอีกด้วย

2.6.8 ความไวต่อออกซิเจนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

ความไวต่อออกซิเจนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เอนไซม์ FeFe-hydrogenase มีความไวต่อออกซิเจน เมื่อออกซิเจนมาจับอะตอมของเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ จะทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมอย่างมีนัยสำคัญ (Cohen *et al.*, 2005) โมเลกุลของออกซิเจนจะแย่งเข้าไปจับกับอะตอมของเหล็กภายในบริเวณกระตุ้นแทนการจับของโปรตอน ทำให้เกิดการกีดกันยับยั้งปฏิกิริยารีดักชันโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นไฮโดรเจน นอกจากนี้ การปรับเข้าสู่สภาวะปราศจากอากาศจะช่วยเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และป้องกันการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม วิธีการกำจัดออกซิเจนบางวิธีไม่คุ้มค่าต่อการผลิตไฮโดรเจน เช่น การใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นก๊าซเฉื่อยสำหรับกำจัดออกซิเจน เนื่องจากก๊าซฮีเลียมมีราคาสูง ในปัจจุบัน ได้มีการคิดค้นวิธีการที่ทำให้เกิดสภาวะปราศจากอากาศ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดซิลเฟอร์ (Melis *et al.*, 2000) หรือการปรับปรุงทางพันธุกรรมในสาหร่ายสีเขียว เช่น สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์กลายที่ขาดโปรตีน D1 จากการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโน (Torzillo *et al.*, 2009)

2.7 การผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

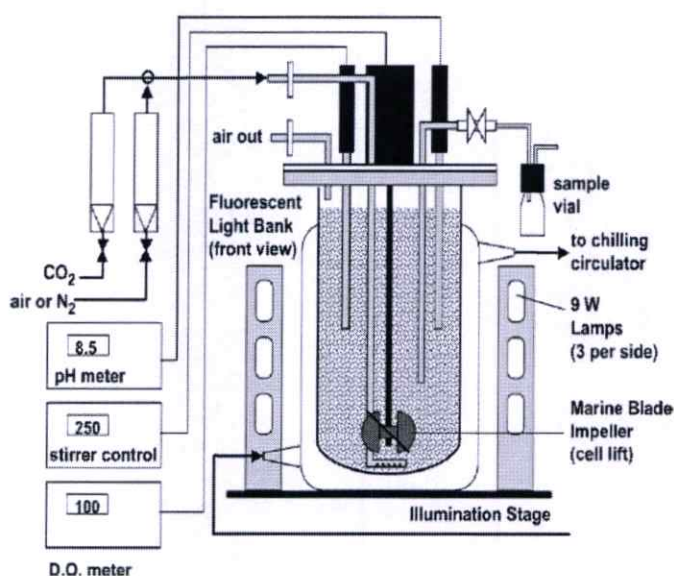
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) เป็นอุปกรณ์สำหรับการเพิ่มผลผลิตให้ได้ปริมาณสูง สามารถบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมาก และสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ตลอดกระบวนการผลิต โดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะมีระบบควบคุมสภาวะการหมัก เช่น อุณหภูมิ พีเอช การละลายออกซิเจน เป็นต้น โดยทั่วไป สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน การผลิตชีวมวลของเซลล์สาหร่ายสีเขียวให้ได้ปริมาณสูงจะทำการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีลักษณะโปร่งแสงหรือที่เรียกว่า “ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง (Photobioreactor)” ซึ่งตัวถังทำมาจากวัสดุที่เป็นแก้วหรือพลาสติกใสที่แสงสามารถส่องได้ทั่วถึง

การผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเหมาะสำหรับการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในระดับที่ใหญ่ขึ้น เนื่องจากควบคุมสภาวะการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ง่ายและมีระบบการผสมที่มีประสิทธิภาพ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแต่ละชนิดจะมีลักษณะรูปร่าง อัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตร (Surface-to-volume (S/V) ratio) รวมถึงระบบการผสมที่แตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องเลือกชนิดของถังปฏิกรณ์และการควบคุมระบบภายในให้เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

นอกจากนี้ การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ยังต้องคำนึงถึงโอกาสในการรั่วไหลของก๊าซไฮโดรเจนออกสู่ภายนอกถึง การประกอบตัวถังและการใส่หัววัดต่างๆ ต้องปิดให้แน่นสนิท เนื่องจากก๊าซไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่มีน้ำหนักเบาจึงมีโอกาสเกิดการรั่วไหลของก๊าซออกนอกถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในระดับห้องปฏิบัติการสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ ดังนี้

2.7.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน (Stirred tank bioreactor) เป็นชนิดของถังปฏิกรณ์ที่มีการให้อากาศเป็นแบบการกวนเชิงกล นิยมนำถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภทนี้มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในระดับห้องปฏิบัติการ (Skjånes *et al.*, 2016) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพใช้ระบบการผสมที่อาศัยการกวนของแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stir bar) หรือใช้แกนกวนต่อกับใบพัด (Impeller) ในการกวนผสมจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าด้วยกัน มีการให้อากาศหรือก๊าซต่างๆ ผ่านหัวพ่นอากาศ (Air sparger) ที่ติดตั้งอยู่ด้านล่างของชุดแกนกวน (รูปที่ 2.6) โดยนิยมใช้หัวพ่นอากาศแบบวงแหวนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณเศษสามส่วนสี่ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเครื่องกวน เพื่อให้การกระจายตัวของอากาศภายในถังปฏิกรณ์ทั่วถึง ภายในถังปฏิกรณ์มักจะมีติดตั้งตัวกั้น (Baffle) เพื่อป้องกันการเกิดกระแสวนบริเวณส่วนกลางของถังปฏิกรณ์ การควบคุมอุณหภูมิภายในถังประกอบด้วยระบบหล่อเย็นกับระบบทำความร้อน โดยจ่ายน้ำหล่อเย็นเข้ามาทางคอยล์ความร้อน (Cooling coil) หรือผ่านทางแจ็กเก็ตเกิด (Jacket) บริเวณรอบถัง ข้อดีของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนในระดับห้องปฏิบัติการคือ การผสมมีประสิทธิภาพทำให้จุลินทรีย์สัมผัสกับอาหารและอากาศอย่างทั่วถึง ส่วนข้อเสียของถังปฏิกรณ์ชนิดนี้คือ มีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรค่อนข้างต่ำและใช้พลังงานสูงในการกวนผสม (Skjånes *et al.*, 2016)

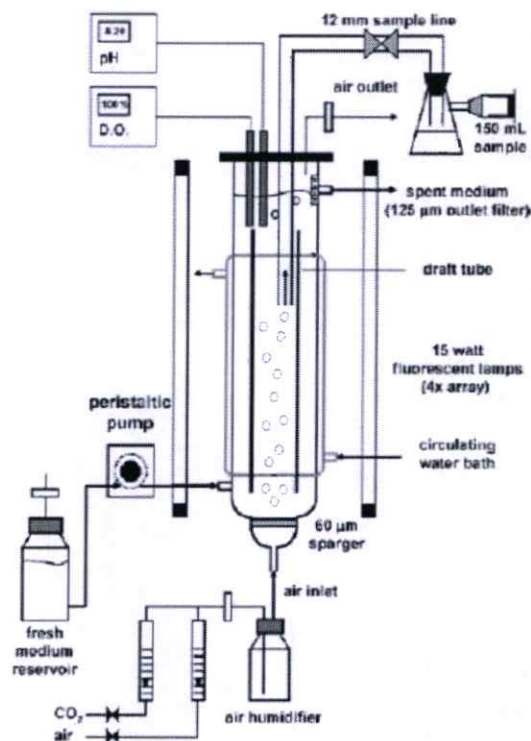


รูปที่ 2.7 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน (Stirred tank bioreactor)

ที่มา : Rorrer and Cheney, 2004

2.7.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว (Air-lift bioreactor) เป็นชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีระบบการผสมโดยการให้อากาศหมุนเวียนภายในถัง การให้อากาศจะให้จากทางด้านล่างของถัง อากาศจะดันตัวลอยสู่ด้านบนของถังผ่านท่อส่งผ่านอากาศ (Draft tube) (รูปที่ 2.8) ซึ่งท่อส่งผ่านอากาศจะช่วยควบคุมการไหลวนของของเหลวในส่วนที่ให้อากาศ (Riser section) กับส่วนที่ไม่ให้อากาศ (Downcomer section) ทำให้เกิดการผสมของสารแขวนลอยเซลล์กับอาหารได้ดียิ่งขึ้นและกระจายความร้อนภายในถังได้ทั่วถึง การควบคุมอุณหภูมิจะใช้ระบบทำความร้อนและระบบน้ำหล่อเย็นเพื่อจ่ายน้ำร้อนหรือน้ำเย็นไหลผ่านทาง Jacket บริเวณรอบถัง ข้อดีของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบลอยตัวในระดับห้องปฏิบัติการคือ แรงเดือนต่ำจึงเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชหรือเซลล์สัตว์ (Skjånes *et al.*, 2016) แต่มีข้อเสียคือ การผสมมีประสิทธิภาพต่ำลง เมื่อจุลินทรีย์เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้นจะเกิดการตกตะกอนบริเวณก้นถังได้ ทำให้สารอาหารและออกซิเจนภายในถังกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ ส่งผลต่อการเกิดภาวะจำกัดของสารอาหารและออกซิเจนได้ง่าย การออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบลอยตัวนี้ไม่เอื้อต่อการนำมาใช้ผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากมีการตกตะกอนของเซลล์ ทำให้ต้องมีการเติมก๊าซอาร์กอนลงไปเพื่อให้เกิดการหมุนเวียนของสารแขวนลอยเซลล์ ส่งผลให้ปริมาณไฮโดรเจนที่สะสมไว้มีความเจือจาง และมีโอกาสสูงที่จะเกิดการสูญเสียก๊าซไฮโดรเจน (Skjånes *et al.*, 2016)



รูปที่ 2.8 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว (Air-lift bioreactor)

ที่มา : Rorrer and Cheney, 2004

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.8.1 งานวิจัยเกี่ยวกับการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

Healey (1970) ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวจำนวน 33 สายพันธุ์ จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ สาหร่ายในจีนัส *Chlamydomonas*, *Chlorella* และ *Scenedesmus* นอกจากนี้ ยังพบว่าสาหร่ายสีเขียวใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไฮโดรเจน กลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวในแต่ละสายพันธุ์ขึ้นอยู่กับกระบวนการแตกตัวของน้ำหรือการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอินทรีย์คาร์บอน

Chader *et al.* (2009) ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* จากแหล่งดินและน้ำจากอุโมงค์ชกน้ำ (Foggara) ในทะเลทรายซาฮารา ประเทศแอลจีเรีย จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนและออกซิเจนที่สาหร่ายผลิตภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ในอาหารเพาะเลี้ยงพบว่า มีสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella sorokiniana* Ce, *Chlorella salina* Mt และ *Chlorella* sp. Pt6 สามารถผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ ในบรรดาสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด สาหร่าย *Chlorella sorokiniana* Ce ให้ค่าผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 147 มิลลิลิตร ในช่วงเวลาที่ 222 โดยมีความดันออกซิเจนในระบบเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในขณะที่สาหร่าย *Chlorella salina* Mt และ *Chlorella* sp. Pt6 ผลิตไฮโดรเจนได้น้อยมากเนื่องจากมีความดันออกซิเจนภายในระบบสูงถึง 11.5 และ 15.4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตามลำดับ

Maneeruttanarungroj *et al.* (2010) ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่สามารถผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่แยกมาจากแหล่งน้ำจืดและน้ำขุ่นในภาคกลางของประเทศไทยจำนวน 150 สายพันธุ์ พบว่า สาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด คือ สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ซึ่งสาหร่ายสายพันธุ์นี้ใช้เวลาของการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time) สั้นที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ภายใต้ความเข้มแสง 37 ถึง 92 ไมโครโพลตันต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงเมื่อค่าพีเอชของอาหารอยู่ในช่วงพีเอช 5.75 ถึง 9.30 แต่การผลิตไฮโดรเจนจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อพีเอชของอาหารต่ำกว่าพีเอช 5.2 การบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ที่ขาดทั้งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 เท่าเมื่อเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ ซึ่งต่างจากการขาดไนโตรเจนหรือซัลเฟอร์เพียงอย่างเดียวอย่างใดอย่างหนึ่งที่ทำให้เซลล์เพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพียงเล็กน้อย จากการศึกษาผลการสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 พบว่า การเติมสารเบต้าเมอแคปโตเอทานอลที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์ จะช่วยกระตุ้นให้เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าเทียบกับสภาวะที่

ไม่เต็มสาร แต่สารนี้จะไม่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนเมื่อเซลล์ถูกปรับสภาวะในอาหารที่ขาดไนโตรเจน และซัลเฟอร์ จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายที่มีอายุเซลล์ 24 ชั่วโมง สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะการขาดทั้งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ ภายใต้ความเข้มแสง 29 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 61.7 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งถือได้ว่าเป็นค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่น

Amutha and Murugesan (2011) ทำการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวจากดินตะกอนในบ่อน้ำในประเทศอินเดีย พบว่าสาหร่าย *Chlorella vulgaris* MSU01 มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนสูง จากการศึกษาแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน โดยใช้ซังข้าวโพดปริมาณ 1 ถึง 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 10 วัน ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 1.6 ไปเป็น 19 กรัมต่อลิตร และได้ผลผลิตไฮโดรเจน 5.534 มิลลิตรเมื่อใช้ซังข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชทั้งช่วงการเจริญและช่วงการผลิตไฮโดรเจนมีค่าเพิ่มขึ้นจากพีเอช 7.0 ไปเป็นพีเอช 8.5-8.7

He et al. (2012) ทำการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวที่ได้จากแหล่งน้ำทะเล น้ำจืด และแหล่งดินในประเทศจีนพบว่า มีสาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 52 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ จากการศึกษาเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์หรือขาดไนโตรเจนพบว่า สาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนมีจำนวน 28 สายพันธุ์ โดยเป็นสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากแหล่งน้ำจืดจำนวน 13 สายพันธุ์ สาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากแหล่งน้ำทะเลจำนวน 12 สายพันธุ์ และไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ นอกจากนี้ ยังพบสาหร่ายสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้ คือ *Parietochloris incisa*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella capsulata*, *Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis helgolandica*, *Pyramimonas* sp., *Chlorella autotrophica*, *Dunaliella apiculata*, *Tetraselmis striata* และ *Tetraselmis tetrahele* จากการศึกษาเลือกพบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. protothecoides* ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำจืดผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดภายใต้สภาวะที่ขาดซัลเฟอร์ โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 2.93 มิลลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีผลผลิตไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 123.6 มิลลิตรต่อลิตร สำหรับสาหร่ายสีเขียวทะเลมีการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าสาหร่ายที่แยกได้จากน้ำจืด โดยสาหร่ายสีเขียวทะเลที่ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ *C. autotrophica* และ *T. striata* ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้เพียง 3.73 และ 20.11 มิลลิตรต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นเพราะว่าสาหร่ายสีเขียวน้ำจืดใช้ระยะเวลาปรับตัวเข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจนได้เร็วกว่าสาหร่ายน้ำทะเล จึงทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่สูงกว่า

Pongpadung et al. (2015) คัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีความศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่แยกจากแหล่งน้ำจืดในประเทศไทยจำนวน 43 สายพันธุ์ จาก

การคัดเลือกสายพันธุ์ภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ สภาวะการจำกัดไนโตรเจนร่วมกับการขาดซัลเฟอร์ และสภาวะการจำกัดไนโตรเจนร่วมกับการขาดฟอสฟอรัสพบว่า สาหร่ายสีเขียวทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ โดยสามารถจำแนกสาหร่ายสีเขียวได้ 6 จินัส ได้แก่ *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Colestrella*, *Micractinium*, *Monoraphidium* และ *Scenedesmus* เมื่อนำสาหร่ายทั้งหมดมาบ่มในอาหารที่จำกัดไนโตรเจนและขาดซัลเฟอร์ พบว่ามีเพียงสาหร่ายสีเขียวในจินัส *Chlorella* และ *Chlamydomonas* ที่มีผลผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น โดยสาหร่าย *Chlorella* จะมีระยะเวลาเข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจน (Anoxic state) ในสภาวะการจำกัดไนโตรเจนและขาดซัลเฟอร์ เร็วกว่าในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์เพียงแหล่งเดียว แต่ไม่มีผลต่อระยะเวลาเข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจนในสาหร่าย *Chlamydomonas* ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าสาหร่าย *Chlorella* มีเมแทบอลิซึมของการผลิตไฮโดรเจนแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* จากการทดลองในบรรดาทุกสายพันธุ์ สาหร่าย *Chlorella sorokiniana* KU204 ที่บ่มในอาหารที่จำกัดไนโตรเจนและขาดซัลเฟอร์มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 90 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่จำกัดไนโตรเจนร่วมกับการขาดฟอสฟอรัส และสภาวะการขาดซัลเฟอร์

2.8.2 งานวิจัยเกี่ยวกับปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

Schnackenberg *et al.* (1996) ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlorococcum littorale* โดยพบว่าสาหร่าย *C. littorale* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเข้าไปในระบบ พีเอชของอาหารเท่ากับ 7.5 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายชนิดนี้ เมื่อนำสาหร่ายไปบ่มในอาหารที่มีพีเอชเท่ากับ 11 อัตราการผลิตไฮโดรเจนจะลดลง แต่ปริมาณการสะสมไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากสภาวะที่มีพีเอชสูงทำให้การแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองถูกยับยั้ง ผลผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้นจึงเป็นผลมาจากการสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเพื่อใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน สำหรับอุณหภูมิการบ่มที่สูงจะมีผลต่อกิจกรรมของกระบวนการสังเคราะห์แสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย

Melis *et al.* (2000) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* C137 โดยแบ่งระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 ช่วงการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว ทำให้มีการปลดปล่อยก๊าซออกซิเจนออกมาจากการแตกตัวของน้ำ และเป็นช่วงที่มีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ช่วงที่ 2 เป็นช่วงของการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน การเปลี่ยนจากช่วงที่ 1 เป็นช่วงที่ 2 ทำได้โดยการย้ายเซลล์เข้าสู่อาหารที่ขาดซัลเฟอร์ ซึ่งสภาวะการขาดซัลเฟอร์นี้จะทำให้การทำงานของระบบแสงสองและการปลดปล่อยก๊าซ

ออกซิเจนลดลง ภายใต้สภาวะนี้ ก๊าซออกซิเจนจะถูกนำมาใช้ในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ทำให้เกิดสภาวะที่ปราศจากอากาศ ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ทำหน้าที่ผลิตไฮโดรเจน

Zhang *et al.* (2002) ศึกษากลไกทางชีวเคมีและลักษณะพื้นฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์พบว่า การขาดซัลเฟอร์ในอาหารเป็นสาเหตุของการยับยั้งการทำงานของระบบแสงสอง โดยอัตราการปลดปล่อยก๊าซออกซิเจนจะต่ำกว่าการใช้ก๊าซออกซิเจนในกระบวนการหายใจ เป็นผลทำให้เกิดสภาวะปราศจากออกซิเจน สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนนี้จะทำให้เกิดการเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และกระตุ้นการส่งต่ออิเล็กตรอนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ ยังพบว่าการขาดซัลเฟอร์ในช่วงแรกทำให้เซลล์มีการสะสมแป้งและโปรตีนเพิ่มขึ้น จากนั้น เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะปราศจากออกซิเจน ปริมาณแป้งที่สะสมภายในเซลล์จะลดลงในขณะที่เซลล์ผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น แสดงว่าเซลล์สลายแป้งมาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนในการผลิตไฮโดรเจน จากการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สาหร่าย *C. reinhardtii* พบว่าเซลล์สาหร่ายมีขนาดใหญ่ขึ้นใน 24 ชั่วโมงแรกของการขาดซัลเฟอร์ ทั้งนี้เป็นผลมาการสะสมแป้งภายในคลอโรพลาสต์ แต่หลังจากอยู่ในสภาวะการขาดซัลเฟอร์เป็นเวลา 96 ถึง 120 ชั่วโมง เซลล์จะมีลักษณะโปร่งแสงมากขึ้น เนื่องจากเซลล์ได้สลายแป้งที่เก็บสะสมไว้มาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

Kim *et al.* (2005) ศึกษาอายุเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะการให้แสงที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงสลับกับการไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์สาหร่ายในระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน คือ ระยะเริ่มต้น การเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (Early-exponential phase) ระยะกึ่งกลางการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (Mid-exponential phase) ระยะเฉื่อย (Late-exponential phase) และ ระยะคงที่ (Stationary phase) จากการทดลองพบว่าอายุเซลล์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยภายหลังจากการบ่มเซลล์ในสภาวะที่ขาดซัลเฟอร์ เซลล์ที่อยู่ในระยะเฉื่อยมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 159 มิลลิลิตรต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งเซลล์ในระยะนี้มีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 0.96 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุดคือ 19.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับอายุเซลล์ในระยะอื่นๆ

Kim *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ โดยการแปรผันความเข้มแสงต่างๆ พบว่าสาหร่ายผลิตไฮโดรเจนภายใต้ความเข้มแสง 60 ถึง 200 ไมโครโอสไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ความเข้มแสง 200 ไมโครโอสไตนต่อตารางเมตรต่อ

วินาที ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มแสงสูงทำให้เซลล์มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุด อย่างไรก็ตาม การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งที่ความเข้มแสง 300 ไมโครโวนส์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เนื่องจากระบบแสงสองถูกทำลายจากปริมาณแสงที่มากเกินไป (Photoinhibition) ดังนั้น สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุดภายใต้สภาวะที่ขาดซัลเฟอร์เมื่อทำการควบคุมความเข้มแสงให้ต่ำกว่าความเข้มแสงอิ่มตัว

Kosourov et al. (2007) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยง 3 แบบ คือ สภาวะออโตโทรฟิก สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก และสภาวะมิกโซโทรฟิก พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์สามารถผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงทั้ง 3 แบบ แสดงให้เห็นว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจนไม่ได้ขึ้นอยู่กับอะซิเตทที่เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร แต่จะขึ้นอยู่กับคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหารที่เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ ยังพบว่าสาหร่ายมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงเมื่อค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 7.5 แต่อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะต่ำลงเมื่อค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 6.5

Oncel and Sukan (2011) ศึกษาผลของความเข้มแสงและการให้แสงสลับมืดต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *Chlamydomonas reinhardtii* ภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ พบว่าความเข้มแสง 70 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีและการให้แสงทั้งสองด้านเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน จากนั้น จึงนำสภาวะการให้แสงนี้มาศึกษาการให้แสงสลับกับไม่ให้แสง โดยรูปแบบการให้แสงสลับมืดจะแบ่งเป็นต่อชั่วโมง (18:6, 14:10, 12:12) หรือต่อนาที (45:15, 35:25, 30:30) พบว่า การให้แสงสลับมืดทั้งแบ่งต่อชั่วโมงหรือต่อนาทีมีผลทำให้ระยะเริ่มต้นของการผลิตไฮโดรเจนนานกว่าการให้แสงต่อเนื่อง ส่งผลให้สาหร่ายที่บ่มภายใต้สภาวะการให้แสงสลับมืดมีการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าสาหร่ายที่บ่มภายใต้สภาวะการให้แสงต่อเนื่อง จากการทดลองในทุกสภาวะของการให้แสงพบว่า สาหร่ายสามารถผลิตไฮโดรเจนในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ได้ระยะเวลานานถึง 27 วัน และการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในช่วง 5 วันของการบ่ม

Song et al. (2011) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ที่ทำการตรึงเซลล์ด้วยอะการ์ (Agar) จากการทดลองพบว่า เซลล์ตรึงของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ทำการบ่มในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นสุดท้าย 30 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการบ่มเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิการบ่มจะทำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจนได้เร็วขึ้น โดยที่อุณหภูมิการบ่ม 40 องศาเซลเซียส สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 238 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อลิตร แต่ถ้าบ่มเซลล์ในอุณหภูมิที่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียสทำให้เซลล์เกิดการตาย

Wang et al. (2011) ศึกษาผลของอะซิเตทและความเข้มแสงต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* จากการทดลองพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรเจน

อะซีเตทในอาหาร TAP ทำให้สาหร่ายมีอัตราการหายใจสูงขึ้น และยังพบว่าสาหร่ายมีการผลิตออกซิเจนสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มแสง จากนั้น จึงนำสภาวะนี้มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะการขาดซัลเฟอร์พบว่า สาหร่ายสามารถผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 43.2 มิลลิลิตรต่อลิตร นอกจากนี้ ยังพบว่า การยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองโดยการเติมสารยับยั้ง 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) มีผลทำให้สาหร่ายมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนลดลง จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าปริมาณอิเล็กตรอนส่วนใหญ่ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. pyrenoidosa* มาจากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสอง

Batyrova et al. (2012) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* 137c+ ภายใต้สภาวะการขาดฟอสฟอรัสพบว่า หลังจากการขาดฟอสฟอรัสในอาหารเป็นเวลา 100 ชั่วโมง สาหร่ายจะเข้าสู่สภาวะปราศจากอากาศและมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยสาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด 68 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อเซลล์มีปริมาณคลอโรฟิลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อลิตร ในขณะที่สาหร่ายจะไม่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เมื่อปริมาณคลอโรฟิลล์เริ่มต้นของเซลล์สูงกว่า 2 มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อลิตร การตอบสนองทางกายภาพของ *C. reinhardtii* ภายใต้สภาวะที่ขาดฟอสฟอรัสจะเกิดขึ้นในทำนองเดียวกับการตอบสนองภายใต้สภาวะที่ขาดซัลเฟอร์นั่นคือ การขาดแหล่งฟอสฟอรัสมีผลยับยั้งการเกิดออกซิเจนในระบบแสงสอง แต่สาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะการขาดฟอสฟอรัสช้ากว่าในสภาวะที่สาหร่ายขาดแหล่งซัลเฟอร์ โดยสาหร่ายจะเริ่มต้นการผลิตไฮโดรเจนหลังจากการบ่มเซลล์ในสภาวะการขาดซัลเฟอร์เป็นเวลา 18 ถึง 40 ชั่วโมงเท่านั้น

Philipps et al. (2012) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนใน *Chlamydomonas reinhardtii* ภายใต้สภาวะที่ขาดไนโตรเจนพบว่า เซลล์สะสมแป้งและไขมันเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดเมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน การขาดไนโตรเจนทำให้เซลล์มีอัตราการผลิตออกซิเจนลดลง แต่ออกซิเจนไม่ได้ถูกกำจัดอย่างสมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ นอกจากนี้ ยังพบว่าสาหร่ายมีค่าประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงสองสูงใน 72 ชั่วโมงแรกของการบ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของระบบแสงของสาหร่ายยังคงดำเนินต่อไปในช่วงแรกของการขาดไนโตรเจน ถึงแม้ว่าการที่เซลล์ขาดไนโตรเจนจะทำให้เซลล์มีการสะสมแป้งได้ในปริมาณที่มากขึ้นและสะสมได้มากกว่าเซลล์ที่ขาดซัลเฟอร์ แต่ผลผลิตไฮโดรเจนที่ได้ยังต่ำกว่าไฮโดรเจนที่ผลิตจากเซลล์ที่ขาดซัลเฟอร์ รวมไปถึงปริมาณการสลายแป้งเพื่อใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ที่ขาดไนโตรเจนมีค่าต่ำกว่าปริมาณการสลายแป้งของเซลล์ที่ขาดซัลเฟอร์ด้วยเช่นกัน

Saleem et al. (2012) ศึกษาพีเอชของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนใน *Chlamydomonas reinhardtii* ภายใต้สภาวะการให้แสงและไม่ให้แสง โดยทำการแปรผันพีเอชของอาหารในช่วงความเป็นเบสตั้งแต่ 7.5 ถึง 9.5 จากการทดลองพบว่าเซลล์ที่บ่มภายใต้แสงสามารถผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อมีพีเอชของอาหารเท่ากับ 7.5 แต่เซลล์ที่บ่มในที่มืดจะผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด

ที่พีเอชของอาหารเท่ากับ 9.5 และยังพบว่าการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะความเข้มแสงสูงเท่ากับ 150 วัตต์ต่อตารางเมตร มีผลให้ระยะเวลาเริ่มต้นของการผลิตไฮโดรเจนเร็วขึ้นจาก 12 ชั่วโมง เป็น 5 ชั่วโมง

Zhang *et al.* (2014) ศึกษาผลกระทบที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella protothecoides* จากการทดลองพบว่าสาหร่ายที่บ่มภายใต้สภาวะการจำกัดไนโตรเจน (Nitrogen limitation, LN) ร่วมกับการขาดซัลเฟอร์จะมีประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่า การขาดซัลเฟอร์เพียงแหล่งเดียว ทั้งนี้การขาดแหล่งซัลเฟอร์และจำกัดแหล่งไนโตรเจนจะทำให้กิจกรรมของระบบแสงสองถูกยับยั้งและค่าประสิทธิภาพสูงสุดของระบบแสงสอง (The maximal efficiency of PSII photochemical activity, Fv/Fm) ระหว่างการบ่มภายใต้สภาวะที่มีแสงลดลง จึงทำให้การสังเคราะห์ออกซิเจนต่ำลง เมื่อออกซิเจนภายในระบบลดลง สาหร่ายจึงผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น เมื่อทำการศึกษากลไกการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนผ่านระบบแสงสองใน *C. protothecoides* ที่มีการเคลื่อนที่ 2 แบบคือ แบบเชิงเส้น (Linear electron flow, LEF) และแบบวัฏจักร (Cyclic electron flow, CEF) พบว่า ในช่วงการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการจำกัดแหล่งไนโตรเจนและขาดซัลเฟอร์ สาหร่ายมีการเคลื่อนที่อิเล็กตรอนแบบเชิงเส้นสูงกว่าและมีการเคลื่อนที่อิเล็กตรอนแบบวัฏจักรต่ำกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบการจำกัดแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบการจำกัดแหล่งไนโตรเจนและการขาดซัลเฟอร์ ทำให้เซลล์มีค่าประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงสอง (The quantum yield of PSII electron transport, Φ_{PSII}) ต่ำมาก จึงส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น

He *et al.* (2015) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Chlorella pyrenoidosa* 689S และ *Chlorella pyrenoidosa* 707S เมื่อบ่มในอาหาร Artificial seawater (ASW) และอาหารน้ำทะเล (Natural seawater) จากการทดลองพบว่า การเติมอะซีเตตในอาหารทำให้สาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น เนื่องจากอะซีเตตถูกใช้เป็นสับสเตรทสำหรับกระบวนการหายใจระดับเซลล์ เมื่ออัตราการหายใจของเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้ภายในระบบมีปริมาณออกซิเจนต่ำลง การผลิตไฮโดรเจนของเซลล์จึงเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ยังพบว่า การขาดซัลเฟอร์หรือไนโตรเจนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญ แต่การขาดฟอสฟอรัสไม่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ในการทดลองนี้มีการใช้น้ำทะเลเป็นอาหารสำหรับการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากมีต้นทุนที่ไม่แพงและอุดมไปด้วยแร่ธาตุต่างๆ หลายชนิด จากการทดลองพบว่า สาหร่าย *C. pyrenoidosa* 689S ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เมื่อทำการบ่มในน้ำทะเล ถึงแม้ว่าจะเติมอะซีเตตลงไปในการบ่มในอาหารน้ำทะเลที่ขาดไนโตรเจนแล้วก็ตาม แต่สาหร่าย *C. pyrenoidosa* 707S สามารถผลิตไฮโดรเจนเมื่อทำการบ่มในอาหารน้ำทะเลที่ขาดไนโตรเจน โดยมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเทียบเท่ากับในอาหาร ASW ที่ขาดไนโตรเจน แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้น้ำทะเลมาทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตไฮโดรเจนได้บางสายพันธุ์เท่านั้น

Li *et al.* (2015) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทะเล *Chlorella pyrenoidosa* IOAC707S พบว่า การขาดไนโตรเจนมีผลยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนและทำให้บริเวณที่เกิดการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสอง (Oxygen evolving complex, OEC) เกิดความเสียหาย ซึ่งส่งผลให้การทำงานของระบบแสงสองและการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองลดลง เมื่อเซลล์ผลิตออกซิเจนลดลงทำให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น จากการทดลองจะเห็นได้ว่า การขาดไนโตรเจนทั้งในช่วงการเจริญเติบโตและช่วงการผลิตไฮโดรเจนส่งผลให้สาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่ขาดไนโตรเจนในช่วงการผลิตไฮโดรเจนอย่างเดียว

Márquez-Reyes *et al.* (2015) ศึกษาผลของสารรีดิวซ์ต่อการลดปริมาณออกซิเจนภายในระบบและการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas gloeopara* และ *Scenedesmus obliquus* พบว่าสารรีดิวซ์ เช่น กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ซิสเทอีน (Cysteine) โซเดียมซัลไฟต์ (Sodium sulfite) และ ไฮโดรควิโนน (Hydroquinone) ลดปริมาณออกซิเจนในสาหร่ายทั้งสองชนิด แต่สารรีดิวซ์ทุกชนิดยกเว้นซิสเทอีนมีผลไปยับยั้งการเจริญของสาหร่าย เมื่อใช้ซิสเทอีนเป็นสารรีดิวซ์ในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้งสองชนิดในอาหาร TAP พบว่า สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP ที่เติมซิสเทอีนผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 3 ถึง 5 เท่า เทียบกับสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ โดยปริมาณออกซิเจนจะลดลงภายหลังจากการบ่ม แสดงให้เห็นว่าซิสเทอีนเป็นสารรีดิวซ์ที่สามารถดักจับออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสง และเหนี่ยวนำการผลิตไฮโดรเจนโดยเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ จากการทดลองยังพบอีกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP ที่เติมซิสเทอีน มีปริมาณการสลายคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ลดลงชี้ให้เห็นว่า สาหร่ายสลายแป้งเพื่อใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนด้วย

2.8.3 งานวิจัยเกี่ยวกับการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

Skjånes *et al.* (2008) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากน้ำทะเลและน้ำจืดภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากการทดลองพบว่าวัสดุที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ได้แก่ ยาง พลาสติก และเหล็กกล้าผสมบางชนิด ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas euryale* การปรับพีเอชของอาหารโดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกลงไปผ่านทางสายยางซิลิโคนที่ทำให้สายยางเกิดการกัดกร่อนและปล่อยสารประกอบที่เป็นพิษต่อเซลล์สาหร่ายได้ นอกจากนี้ การวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีอากาศอาจเกิดความผิดพลาด เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวบางสายพันธุ์มีการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm) มาคลุมหัววัดออกซิเจน (Oxygen electrode) ที่ใช้ในวัดและควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง ดังนั้น การเลือกใช้วัสดุในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นปัจจัยที่สำคัญหนึ่งสำหรับการขยายขนาดการผลิตไฮโดรเจน

Lehr *et al.* (2012) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน (Stirred tank) ขนาด 2 ลิตร จากการทดลองพบว่า ความเข้มแสงมีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน โดยความเข้มแสง 250 และ 280 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน ตามลำดับ ดังนั้น การเพิ่มประสิทธิภาพการใช้แสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน จำเป็นต้องควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพภายใต้ความเข้มแสงสูง

Oncel and Kose (2014) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC124 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบท่อ (Tubular) และแบบแผ่น (Panel) พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Tubular สามารถผลิตชีวมวลได้สูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Panel ประมาณ 11 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Tubular มีพื้นที่การรับแสงมากกว่า ทำให้เซลล์สาหร่ายได้รับพลังงานแสงสูงกว่าประมาณ 3.6 เท่าของถังแบบ Panel ภายใต้ความเข้มแสงที่เท่ากัน นอกจากนี้ ระบบการผสมที่มีการไหลไปตามท่อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Tubular ทำให้เซลล์สาหร่ายสัมผัสกับอาหารเพาะเลี้ยงได้ดีขึ้น แต่สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Panel เนื่องจากลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Panel ทำให้เกิดแรงดันไฮโดรเจนออกจากตัวถังได้มีประสิทธิภาพมากกว่าถังแบบ Tubular และระบบการผสมของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Panel ยังเหมาะแก่การผลิตไฮโดรเจน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวน 24 ไอโซเลท ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยที่เก็บรวบรวมไว้ที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยแหล่งที่มาของตัวอย่างและสถานที่เก็บตัวอย่างของสาหร่ายสีเขียวแต่ละไอโซเลทแสดงในตารางที่ 3.1 ภาพถ่ายเซลล์สาหร่ายสีเขียวแต่ละไอโซเลทแสดงในภาคผนวก ก

ตารางที่ 3.1 แหล่งที่มาและสถานที่เก็บตัวอย่างของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 24 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	ไอโซเลท	แหล่งที่มาของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	อ้างอิง
1	1SinS1.1	น้ำจากนาข้าว	จังหวัดสิงห์บุรี	รัตนลักษณ์ และคณะ, 2556
2	2C2	น้ำจากนาข้าว	จังหวัดร้อยเอ็ด	ช่อลัดดา และคณะ, 2552
3	2SinS4	น้ำจากนาข้าว	จังหวัดสิงห์บุรี	รัตนลักษณ์ และคณะ, 2556
4	2TKS2.1	น้ำจากนาข้าว	อำเภอตากสี จังหวัดนครสวรรค์	รัตนลักษณ์ และคณะ, 2556
5	2TKS2.2	น้ำจากนาข้าว	อำเภอตากสี จังหวัดนครสวรรค์	รัตนลักษณ์ และคณะ, 2556
6	A25.1	น้ำจากนาข้าว	จังหวัดชัยนาท	ช่อลัดดา และคณะ, 2555
7	B35.1	น้ำจืด	จังหวัดมหาสารคาม	รัตนลักษณ์ และคณะ, 2556
8	CH	น้ำจืด	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ	สุรัตน์ตีพร, 2554
9	ChiS4	น้ำจากนาข้าว	จังหวัดชัยนาท	รัตนลักษณ์ และคณะ, 2556

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) แหล่งที่มาและสถานที่เก็บตัวอย่างของสารยีสี่เชื้อยจำนวน 24 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	ไอโซเลท	แหล่งที่มา ของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	อ้างอิง
10	ChiW1	น้ำจากนาข้าว	จังหวัดชัยนาท	รัตนลักษณ์ และคณะ, 2556
11	CirGreen	น้ำจืด	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ	สุรัตน์ดีพร, 2554
12	L	น้ำจืด	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ	มณีทิพย์ และคณะ, 2555
13	LSD-W2	น้ำทะเล	หาดแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี	Tinpranee <i>et al.</i> , 2016
14	NakS4	น้ำจากนาข้าว	จังหวัดนครสวรรค์	รัตนลักษณ์ และคณะ, 2556
15	OvalGreen	น้ำจืด	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ	สุรัตน์ดีพร, 2554
16	SD	น้ำจืด	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ	มณีทิพย์ และคณะ, 2555
17	TISTR 8260	น้ำจืด	จังหวัดกรุงเทพฯ	วว.
18	TISTR 8412	น้ำจืด	สวนสาธารณะกองทัพอากาศ อำเภอดอนเมือง จังหวัดกรุงเทพฯ	วว.
19	TISTR 8486	น้ำจืด	จังหวัดสมุทรปราการ	วว.
20	TISTR 8553	น้ำจืด	เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ	วว.
21	TISTR 8562	น้ำจืด	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ	วว.
22	TISTR 8568	น้ำจืด	เขตนองจอก จังหวัดกรุงเทพฯ	วว.
23	TISTR 8641	น้ำจืด	อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี	วว.
24	TT	น้ำจืด	จังหวัดปทุมธานี	Maneeruttanarungroj <i>et al.</i> , 2010

หมายเหตุ : วว. หมายถึง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่าง (Bright field microscope) (Nikon, Eclipse Ci-L, Japan)
- 3.2.2 ขวดแก้ว (Gas tight vial) ขนาด 10 และ 120 มิลลิลิตร พร้อมจุกยางครอบฝาอะลูมิเนียม
- 3.2.3 เข็มฉีดยาก๊าซ (Gas tight syringe) (Scientific Glass Engineering, Australia)
- 3.2.4 คิวเวตควอตซ์ (Quartz cuvette) (Starna scientific, Starna™ 9/Q/10, England)
- 3.2.5 เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hotplate stirrer) (Vision scientific, VS130SH, Korea)
- 3.2.6 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares) (Pyrex, USA)
- 3.2.7 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-เทอร์มอลคอนดักทีวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)) (Hewlett-Packard, HP5890A GC, Japan)
- 3.2.8 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Vision scientific, VS-8480, Korea)
- 3.2.9 เครื่องชั่งสาร (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
- 3.2.10 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA Thermal cycler) (Biometra, TProfessional, Germany)
- 3.2.11 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries, Genies2 G560, USA)
- 3.2.12 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge™ 16M, USA)
- 3.2.13 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortechnik, Z38K, Germany)
- 3.2.14 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Mettler Toledo, Seven2Go S2, Switzerland)
- 3.2.15 เครื่องวัดแสง (Light meter) (Lutron, LX-1108, Thailand)
- 3.2.16 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1800, Japan)
- 3.2.17 เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (Thermoblock) (Labnet, Accu Block™ digital dry bath, USA)
- 3.2.18 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama, HVE-50, Japan)
- 3.2.19 ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพเจลอะกาโรส (Gel Documentation) (Syngene, MD1 1019, Japan)

- 3.2.20 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipment) (Advance Mupid[®]-exu, Japan)
- 3.2.21 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) (ESCO, SCV4A1, Singapore)
- 3.2.22 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 3.2.23 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนขนาด 3 ลิตร (Stirred tank bioreactor) (B.E.Marubishi (Thailand) Ltd., MDFT-N-3L, Thailand)
- 3.2.24 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัวขนาด 3 ลิตร (Air-lift bioreactor) (B.E.Marubishi (Thailand) Ltd., BIOREACTOR 3 L (AIR LIFT), Thailand)
- 3.2.25 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) (Labnet, BioPette Plus, USA)
- 3.2.26 หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร (Oak ridge centrifuge tube) (Thermo Scientific, Nalgene, USA)
- 3.2.27 หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) (Eppendorf, USA)
- 3.2.28 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) (Boeco, Neubauer improved bright line, Germany)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

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

3.4 สารเคมี

3.4.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.4.1.1 กรดบอริก (H_3BO_3) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.2 กรดอะซิติก (CH_3COOH) (Ajax Finechem, Australia)
- 3.4.1.3 คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) (Mallinckrodt Baker, USA)
- 3.4.1.4 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.5 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.6 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) (Fluka, Switzerland)
- 3.4.1.7 ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) (Fluka, Switzerland)
- 3.4.1.8 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka, Switzerland)
- 3.4.1.9 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$) (British Drug Houses, England)
- 3.4.1.10 โซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa) (Merck, Germany)
- 3.4.1.11 ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA) (Promega, USA)

- 3.4.1.12 โดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.13 ทรಿಸไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน ($NH_2C(CH_2OH)_3$) (Vivantis, Malaysia)
- 3.4.1.14 น้ำตาลกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) (Merck, Germany)
- 3.4.1.15 น้ำตาลซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.16 น้ำตาลฟรักโทส ($C_6H_{12}O_6$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.17 น้ำตาลมอลโทส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Merck, Germany)
- 3.4.1.18 น้ำตาลแลกโทส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Sigma, USA)
- 3.4.1.19 บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล (Universal buffer) (ภาคผนวก ค)
- 3.4.1.20 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.21 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.22 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.23 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.24 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (Carlo Erba, Italy)

3.4.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

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

3.4.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

- 3.4.3.1 ดิวอกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotidetriphosphates, dNTPs) (Promega, USA)
- 3.4.3.2 แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) (Promega, USA)
- 3.4.3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (Oligonucleotide primers) (Bio Basic Inc., Thailand)
- 3.4.3.4 บัฟเฟอร์ PCR (PCR buffer) (Promega, USA)
- 3.4.3.5 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Promega, USA)

3.4.4 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

- 3.4.4.1 อะกาโรส (Agarose) (BioWhittaker Molecular Application, USA)
- 3.4.4.2 เจลสตาร์ (Gelstar) (BioWhittaker Molecular Application, USA)
- 3.4.4.3 บัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA (TBE buffer) (ภาคผนวก ง)

3.4.5 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

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

3.4.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ฝาฉลากบับดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (Invitrogen, USA)

3.4.7 ชุดทดสอบ (Kit)

- 3.4.7.1 ชุดสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System Kit) (Promega, USA)
- 3.4.7.2 ชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (QIAquick[®] PCR Purification Kit)
(Qiagen, Germany)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อสายรายสีเขียว

เพาะเลี้ยงสายรายสีเขียวเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (Starter) โดยเริ่มจากการลาก (Streak) เชื้อบนอาหารแข็ง Tris-Acetate-Phosphate (TAP) (ภาคผนวก ข) นำจานอาหารแข็งไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเชื้อเจริญ จึงย้ายโคลนที่เจริญบนอาหารแข็ง 1 ถึง 2 ลูบ กระจายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำฟลาสก์ไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และให้แสงต่อเนื่องภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสายรายสีในการทดลอง

3.5.2 การเพาะเลี้ยงสายรายสีเขียวในฟลาสก์

นำสายรายสีเขียวที่ได้จากการเตรียมหัวเชื้อตามหัวข้อที่ 3.5.1 มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์สายรายสีมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ล้างเซลล์สายรายสีด้วยอาหารเหลว TAP จำนวน 2 ครั้งและกระจายเซลล์ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 นำฟลาสก์เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และให้แสงต่อเนื่องภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

3.5.3 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

3.5.3.1 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายสีเขียวที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสารละลายแบลนค์ (Blank)

3.5.3.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง จากนั้น นำตะกอนเซลล์มาเติมเมทานอลที่มีความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex) และนำหลอดไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายออกมาใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 และ 650 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Lee and Shen (2004) ดังสมการที่ 3.1

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = (4.0 \times A_{665}) + (25.5 \times A_{650}) \quad \text{สมการที่ 3.1}$$

3.5.3.3 วิธีการวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวมาวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ภาคผนวก จ) เริ่มต้นจากการวางกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) บนสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์บริเวณที่เป็นตาราง จากนั้น ปิเปตสารละลายเซลล์สาหร่ายสีเขียวปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้ววางปลายปิเปตใกล้ขอบกระจกปิดสไลด์ ปล่อยให้สารละลายเซลล์จากปิเปตลงไปในช่องใส่ตัวอย่าง สารละลายเซลล์จะกระจายเต็มพื้นที่ตาราง วางทิ้งไว้ 1 นาที เพื่อให้เซลล์สาหร่ายจมลงสู่พื้นสไลด์ จากนั้น นำสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่าง (Nikon Eclipse Ci-L, Japan) ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า คำนวณจำนวนเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวต่อปริมาตรน้ำ 1 มิลลิลิตร ตามวิธีในภาคผนวก จ

3.5.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยใส่ลงในขวด Vial และปิดฝาขวด ฟันก๊าซอาร์กอนในขวดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อไล่อากาศและเป็นการชักนำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ ทำการบ่มเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนเป็นเวลา 2 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ทดสอบมาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยการใช้เข็มฉีดยาดูดก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวในขวด Vial (Headspace) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักทีวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector, GC-TCD) เทียบกับก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ในก๊าซอาร์กอน (ปริมาตรต่อปริมาตร) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟแสดงในตารางที่ 3.2 จากนั้น คำนวณอัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในภาคผนวก ฉ

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักทีวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD))

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

3.5.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว

นำสารละลายเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวมาหยดลงบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่าง (Nikon Eclipse Ci-L, Japan) ที่กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า ศึกษาลักษณะรูปร่าง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง การจัดเรียงตัวของเซลล์สาหร่าย และถ่ายภาพเซลล์โดยใช้โปรแกรม NIS-Elements

3.5.6 วิธีการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรตามวิธีในหัวข้อ 3.5.2 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยนำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยอาหาร TAP, อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ (TAP-S) และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยปริมาตร 5 มิลลิลิตรไปใส่ในขวด Vial ขนาด 10 มิลลิลิตรและปิดฝาขวด ฟังก์ชันอาร์กอนในขวดเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อไล่อากาศ นำขวด Vial ไปบ่มในสภาวะเขย่าภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดอัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2 และ 24 ของการบ่มเซลล์ โดยนำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4 จากนั้น คัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงสุดมาศึกษาชนิดของสาหร่ายต่อไป

3.5.7 วิธีการระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

3.5.7.1 วิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System Kit, Promega, USA) โดยนำสาหร่ายสีเขียวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง TAP บ่มภายใต้สภาวะที่ให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้น เขี่ยเซลล์สาหร่ายสีเขียว 1 ลูกบาศก์กระจายลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ที่มีสารละลายสำหรับย่อยผนังเซลล์ (Digestion solution) ปริมาตร 255 ไมโครลิตรที่ประกอบด้วยสารละลาย Nuclei lysis ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Proteinase K ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้น เติมสารละลาย Wizard SV lysis ลงไปปริมาตร 255 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารปิเปตสารละลายทั้งหมดใส่ลงในคอลัมน์ที่มีตัวกรอง (Wizard[®] SV minicolumn) นำคอลัมน์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที ทั้งส่วนใสด้านล่าง ทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายสำหรับล้าง (Wash solution) ปริมาตร 650 ไมโครลิตร (ที่มีเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ผสมอยู่) ใส่ลงในคอลัมน์ นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทั้งส่วนใสด้านล่าง ทำการล้างซ้ำทั้งหมด 4 ครั้ง หลังจากนั้น นำตัวกรองกับคอลัมน์เปล่าไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วทำการเติมน้ำที่ปราศจากนิวคลีโอไซด์

(Nuclease-free water) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ที่ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น ปั่นเหยียงคอลัมน์ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ตั้งตัวกรอง เก็บสารละลายจีโนมิกดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.7.2 วิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากหัวข้อ 3.5.7.1 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมโดยชั่งอะกาโรส 0.2 กรัม นำมาละลายในบัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA (TBE) (ประกอบด้วย Tris ความเข้มข้นสุดท้าย 0.089 โมลาร์ Boric acid ความเข้มข้นสุดท้าย 0.089 โมลาร์ และ EDTA ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 มิลลิโมลาร์) พีเอช 8.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเพื่อให้เจลละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้อะกาโรสมีอุณหภูมิลดลงถึงประมาณ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส จากนั้น เติมสารละลายเจลสตาร์ (Gelstar) ความเข้มข้นสุดท้าย 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในสารละลายอะกาโรส ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำสารละลายเจลเทลงในถาดเจลที่เสียบหัวไว้ รอให้อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 30 นาที นำเจลใส่ลงในอ่าง (Chamber) เท็บฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA ลงไปในอ่างจนท่วมเจล จากนั้น หยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาลงในหลุมของแผ่นอะกาโรส ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 10 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 40 นาที หลังจากนั้น นำแผ่นเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และถ่ายภาพเจลโดยชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปเจล (Gel documentation)

3.5.7.3 วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยใช้ไพรเมอร์ 18SrRNAF1 (5'-CTGCGAATGGCTCATTAAATC-3') และ 18SrRNAR1 (5'-AAGGCCAGGGACGTAATCAA-3') (Rasoul-Amini *et al.*, 2009) องค์ประกอบและปริมาตรของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสแสดงในตารางที่ 3.3 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA Thermal Cycler) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแสดงในตารางที่ 3.4 เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีในหัวข้อ 3.5.7.2 โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบและปริมาณของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 18S rDNA

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์ PCR 5 เท่า	10
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl ₂) (25 มิลลิโมลาร์)	3
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (2.5 มิลลิโมลาร์)	4
ไพรเมอร์ 18SrRNAF1 (5 มิลลิโมลาร์)	2.5
ไพรเมอร์ 18SrRNAR1 (5 มิลลิโมลาร์)	2.5
Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5
จีโนมิกดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1
น้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	26.5
ปริมาตรสุทธิ	50

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 18S rDNA

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94	45 วินาที	} 35 รอบ
Annealing	55	60 วินาที	
Extension	72	90 วินาที	
Final extension	72	10 นาที	1 รอบ

3.5.7.4 วิธีการทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากหัวห้อยที่ 3.5.7.3 ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (QIAquick[®] PCR Purification Kit, Qiagen, Germany) โดยนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เติมน้ำบัฟเฟอร์ DF (DF buffer) ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรผลิตภัณฑ์ PCR ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้น นำคอลัมน์ DF (DF column) ใส่ลงในหลอด Collection tube ปิดเตตสารละลายผสมของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับบัฟเฟอร์ DF ใส่ในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทั้งส่วนใส จากนั้น ล้างผลิตภัณฑ์ PCR โดยการเติมน้ำบัฟเฟอร์สำหรับล้าง (Wash buffer) ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ แล้วนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทั้งส่วนใสด้านล่างแล้วปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่า เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ย้ายคอลัมน์ DF ไปใสในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์สำหรับชะผลิตภัณฑ์ PCR (Elution buffer) ปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วจึงนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรสึท

3.5.7.5 วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสึทที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA โดยส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First BASE Laboratories จำกัด ประเทศมาเลเซีย จากนั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลของธนาคารยีนด้วยโปรแกรม Nucleotide blast (blastn) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 7.0 และเลือกวิธีการจัดกลุ่มจากรยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) โดยใช้วิธี Maximum likelihood (ML) ด้วยโมเดล Tamura-Nei ซึ่งจะแสดงผลในรูปของแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) จากผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA และศึกษาลักษณะรูปร่างของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก พบว่าสาหร่ายที่คัดเลือกจัดอยู่ในจีนัส *Chlorella* จึงสามารถเรียกชื่อสาหร่ายที่คัดเลือกนี้ว่า *Chlorella* sp. LSD-W2 จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ไปศึกษาการเจริญเติบโตและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

3.5.8 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตามวิธีในหัวข้อ 3.5.1 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วกระจายเซลล์ในอาหารเหลว TAP ปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดด้วยจุกยางและครอบฝาอะลูมิเนียม นำขวดเพาะเลี้ยงไปวางบนเครื่องกวน (Stirrer) โดยใช้ความเร็วในการกวน 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้องและให้แสงต่อเนื่องภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (รูปที่ 3.1) เก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายปริมาณ 3 มิลลิลิตร ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน นำตัวอย่างเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกไปวัดการเจริญเติบโต โดยวัดความขุ่นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ตามวิธีในหัวข้อ

3.5.3.1 วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์จากการสกัดด้วยเมทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามวิธีในหัวข้อ 3.5.3.2 และนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ตามวิธีในหัวข้อ 3.5.3.3



รูปที่ 3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร

3.5.9 วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 ภายใต้การเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร สามารถแบ่งช่วงระยะเวลาออกเป็น 3 ช่วงคือ ช่วงที่ 1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP สูตรปกติ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและออกซิเจนเพื่อผลิตชีวมวล จากนั้น ทำการย้ายเซลล์สาหร่ายเข้าสู่ช่วงที่ 2 ซึ่งเป็นการปรับสภาวะของเซลล์ในการเตรียมวัตถุดิบสำหรับการผลิตไฮโดรเจน โดยบ่มเซลล์ในอาหารสูตรที่เหมาะสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่มีแสงและออกซิเจน ก่อนทำการย้ายเซลล์สาหร่ายเข้าสู่ช่วงที่ 3 ซึ่งเป็นช่วงการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 ดำเนินการดังนี้

3.5.9.1 วิธีการศึกษาผลของอายุของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตามวิธีในหัวข้อ 3.5.1 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง แล้วกระจายเซลล์ในอาหารเหลว TAP ปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตรและปิดฝาขวด นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 18, 36, 54 และ 72 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง ทำ

การล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) และกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-N ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำสารแขวนลอยเซลล์ใส่ในขวด Vial ขนาด 120 มิลลิลิตรและปิดฝาขวด ทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะการกวนในขวดเพาะเลี้ยง จากนั้น พ่นก๊าซ อาร์กอนในขวดเป็นเวลา 20 นาที เพื่อไล่อากาศ นำเซลล์ไปบ่มภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครโมล โฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือ ของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

3.5.9.2 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนตามการทดลองในหัวข้อที่ 3.5.9.1 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยอาหาร TAP-N และกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-N ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยมาใส่ในขวด Vial ขนาด 120 มิลลิลิตรและปิดฝาขวด ทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะการกวนในขวดเพาะเลี้ยง จากนั้น พ่นก๊าซอาร์กอนในขวดเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อไล่อากาศ แล้วนำเซลล์ไปบ่ม ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2, 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง แก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

3.5.9.3 วิธีการศึกษาผลของการขาดแหล่งอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนตามการทดลองในหัวข้อที่ 3.5.9.1 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยอาหาร TAP ที่มีการขาดแหล่งอาหารต่างๆ ดังนี้ อาหาร TAP อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ (TAP-S) อาหาร TAP ที่ขาดฟอสฟอรัส (TAP-P) อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน และซัลเฟอร์ (TAP-N-S) อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (TAP-N-P) อาหาร TAP ที่ขาด ซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส (TAP-S-P) และอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน ซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส (TAP-N-S-P) กระจายเซลล์ในอาหารทดสอบแต่ละชนิดปริมาณ 90 มิลลิลิตร แล้วนำเซลล์ แขวนลอยใส่ในขวด Vial ขนาด 120 มิลลิลิตรและปิดฝาขวด ทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะการกวนในขวดเพาะเลี้ยง จากนั้น พ่นก๊าซอาร์กอนในขวดเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อไล่ อากาศ แล้วนำเซลล์ไปบ่มภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่

อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

3.5.9.4 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของเหล็กไอออนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนตามการทดลองในหัวข้อที่ 3.5.9.1 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP ที่มีการขาดแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของเหล็กไอออน (Fe^{2+}) ในอาหารให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 3.6, 18, 90 และ 180 ไมโครโมลาร์ นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวด Vial ขนาด 120 มิลลิลิตรและปิดฝาขวด ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะการกวนในขวดเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น พ่นก๊าซอาร์กอนในขวดเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อไล่อากาศ ทำการบ่มเซลล์ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

3.5.9.5 วิธีการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนตามการทดลองในหัวข้อที่ 3.5.9.1 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP ที่มีการขาดแหล่งคาร์บอน (TAP-C) ร่วมกับการขาดแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน นำเซลล์แขวนลอยมาใส่ในขวด Vial ขนาด 120 มิลลิลิตรและปิดฝาขวด ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะการกวนในขวดเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น ทำการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ แทนการเติมกรดอะซีติกที่เป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารปกติ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลองนี้คือน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลกโทส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลฟรักโทส โซเดียมอะซิเตท และโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต โดยให้มีความเข้มข้นของคาร์บอนอะตอมเท่ากันคือ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหาร TAP-N สูตรปกติที่มีกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้น พ่นก๊าซอาร์กอนในขวดเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อไล่อากาศ ทำการบ่มเซลล์ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2, 6, 24 และ 48 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4 เมื่อได้ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนแล้ว ทำการแปรผัน

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 3.48, 17.4, 34.8, 87, 174 และ 348 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร

3.5.9.6 วิธีการศึกษาผลของความเข้มแสงและรูปแบบการให้แสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนตามการทดลองในหัวข้อที่ 3.5.9.1 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-C ที่มีการขาดแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน นำเซลล์แขวนลอยมาใส่ในขวด Vial ขนาด 120 มิลลิลิตรและปิดฝาขวด ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะการกวนในขวดเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น ทำการเติมชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน แล้วพ่นก๊าซอาร์กอนในขวดเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อไล่อากาศ นำเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ให้แสงอย่างต่อเนื่องโดยแปรผันความเข้มแสงเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4 เมื่อได้ความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนแล้ว ทำการศึกษารูปแบบการให้แสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยแปรผันรูปแบบการให้แสงดังนี้ (1) การบ่มเซลล์ในที่ที่มีแสงต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง (2) การบ่มเซลล์ในที่ที่มีแสง 18 ชั่วโมงสลับกับในที่มืด 6 ชั่วโมง (3) การบ่มเซลล์ในที่มืด 6 ชั่วโมงสลับกับในที่ที่มีแสง 18 ชั่วโมง (4) การบ่มเซลล์ในที่ที่มีแสง 12 ชั่วโมงสลับกับในที่มืด 12 ชั่วโมง (5) การบ่มเซลล์ในที่มืด 12 ชั่วโมงสลับกับในที่ที่มีแสง 12 ชั่วโมง และ (6) การบ่มเซลล์ในที่มืดต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง โดยทำการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนทุก 6 ชั่วโมง

3.5.9.7 วิธีการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนตามการทดลองในหัวข้อที่ 3.5.9.1 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-C ที่มีการขาดแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน นำเซลล์แขวนลอยมาใส่ในขวด Vial ขนาด 120 มิลลิลิตรและปิดฝาขวด ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะการกวนในขวดเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น ทำการเติมชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน แล้วพ่นก๊าซอาร์กอนในขวดเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อไล่อากาศ นำเซลล์ไปบ่มภายใต้ความเข้มแสงและรูปแบบการให้แสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25, 30, 35, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำก๊าซบริเวณ

ช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

3.5.9.8 วิธีการศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนตามการทดลองในหัวข้อที่ 3.5.9.1 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-C ที่มีการขาดแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน นำเซลล์แขวนลอยมาใส่ในขวด Vial ขนาด 120 มิลลิลิตรและปิดฝาขวด ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะการกวนในขวดเพาะเลี้ยง เมื่อบ่มเซลล์ครบ 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนที่มีการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5, 6, 7, 7.2, 8, 9 และ 10 ในบัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล (Universal buffer) ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์ (Lopez, 2001) (อาหาร TAP สูตรปกติมีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 7.2) เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารโดยไม่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล ทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารโดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 1 นอร์มอล หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 โมลาร์ จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวด Vial ขนาด 120 มิลลิลิตรและปิดฝาขวด ทำการพ่นก๊าซอาร์กอนในขวดเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อไล่อากาศ นำเซลล์ไปบ่มภายใต้ความเข้มแสง รูปแบบการให้แสงและอุณหภูมิของการบ่มเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

3.5.9.9 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในสภาวะที่เหมาะสมเทียบกับสภาวะปกติ

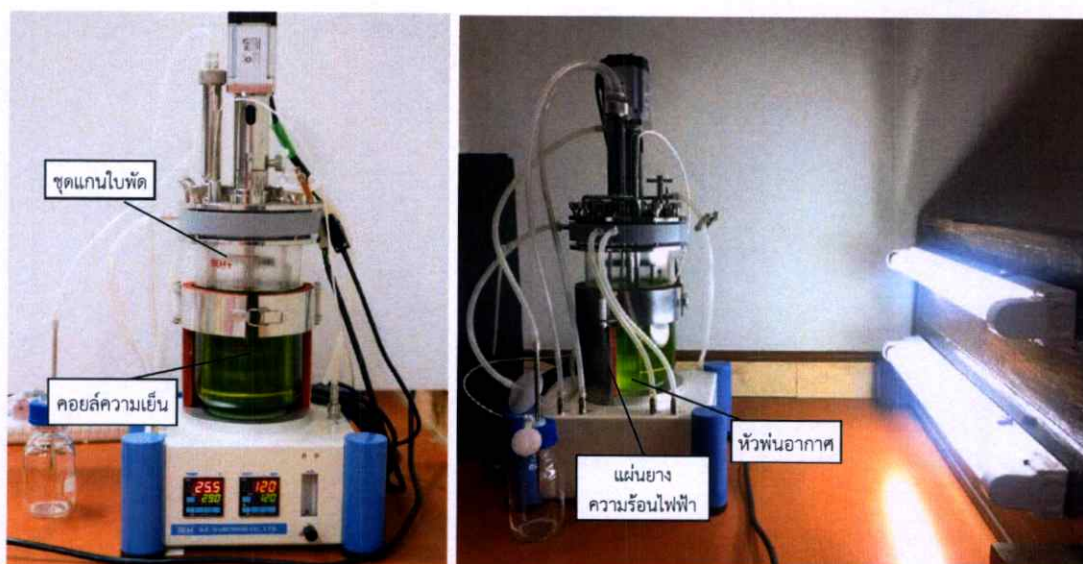
ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 จะทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายในอาหาร TAP ที่มีและไม่มีแหล่งไนโตรเจน โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน (TAP-N-C) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยมาใส่ในขวด Vial ขนาด 120 มิลลิลิตรและปิดฝาขวด ทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะการกวนในขวดเพาะเลี้ยง เมื่อบ่มเซลล์ครบ 24 ชั่วโมง นำเซลล์ที่บ่มใน TAP-N-C มาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-N ที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้น

สุดท้ายของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน จากนั้น ฟังก์ชันอาร์กอนในขวดเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อไล่อากาศ แล้วนำเซลล์ไปบ่มภายใต้สภาวะที่มีแสงเป็นเวลา 7 วัน ทำการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 6, 24 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 7 วัน นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

3.5.10 การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

3.5.10.1 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ภายใต้การเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตามวิธีในหัวข้อ 3.5.1 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank ขนาด 3 ลิตรที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 2 ลิตร (คิดปริมาตรการทำงานประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของขนาดถังปฏิกรณ์ชีวภาพ) (รูปที่ 3.2) โดยให้มีความขุ่นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงให้คงที่ ระบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank ประกอบด้วยอัตราการไหลของอากาศ 1 ลิตรต่อนาทีจากการให้อากาศผ่านหัวพ่นอากาศ (Air sparger) อัตราการกวน 120 รอบต่อนาทีโดยใช้ใบพัดชนิด 6-blade disk turbine จำนวน 2 ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสซึ่งมีระบบควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติภายในถังด้วยชุดทำความร้อน (Heater) และชุดวาล์วควบคุมการไหลเวียนน้ำ (Solenoid valve) เพื่อทำให้เกิดความร้อนโดยตรงกับผนังถังปฏิกรณ์ผ่านแผ่นยางความร้อนไฟฟ้า (Silicone rubber heater) หรือจ่ายน้ำเย็นเข้าระบบผ่านคอยล์ความเย็น (Cooling coil) (รูปที่ 3.2) ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 4 วัน นำตัวอย่างเซลล์มาวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.5.8

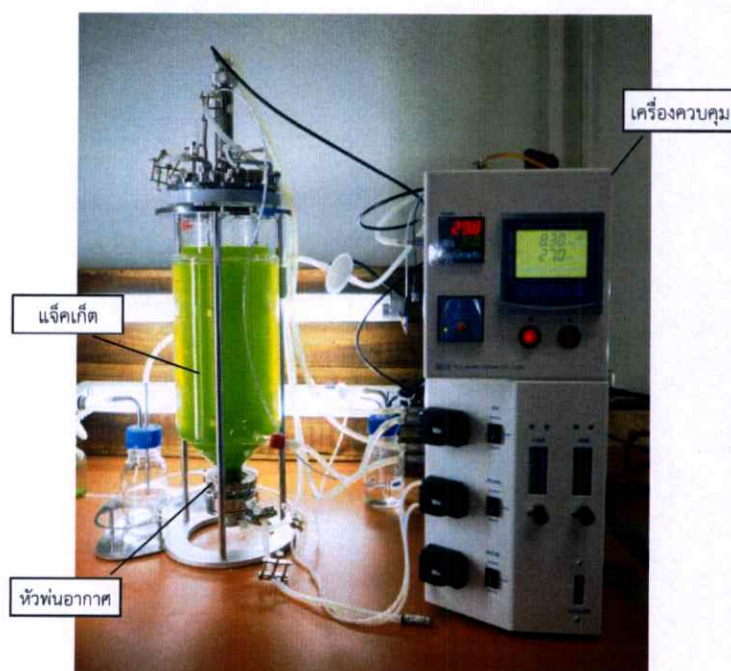


รูปที่ 3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank ขนาด 3 ลิตร

นำสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายในระดับขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ตามการทดลองในหัวข้อที่ 3.5.9.9 มาขยายขนาดการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank โดยจะทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายในอาหาร TAP ไม่มีแหล่งไนโตรเจนและอาหารสูตรที่เหมาะสม เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank ที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 2 ลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-N และอาหาร TAP-N-C ปริมาตร 2 ลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่มีแสงและออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank ที่มีอัตราการไหลของอากาศ 1 ลิตรต่อนาที อัตราการกวน 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเซลล์ครบ 24 ชั่วโมง นำเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-N-C มาเติมชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน หลังจากนั้น ฟังก์ชันอาร์กอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจนกระทั่งความเข้มข้นของออกซิเจนในถังอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ตามการทดลองในหัวข้อที่ 3.5.9.9 เป็นเวลา 7 วัน โดยปิดระบบการกวนและระบบการให้อากาศ ทำการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 6, 24 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 7 วัน นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

3.5.10.2 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ภายใต้การเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตามวิธีในหัวข้อ 3.5.1 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 3 ลิตร (คิดปริมาตรการทำงานประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของขนาดถังปฏิกรณ์ชีวภาพ) (รูปที่ 3.2) โดยให้ความเข้มข้นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และควบคุมระบบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ให้มีอัตราการไหลของอากาศ 1 ลิตรต่อนาทีโดยอาศัยแรงดันอากาศจากทางด้านล่างของถัง และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสซึ่งมีระบบควบคุมอุณหภูมิในถังหมักด้วยชุดทำความร้อนและชุดคว่ำควบคุมอัตโนมัติ ทำให้เกิดการไหลเวียนน้ำร้อนหรือน้ำเย็นผ่านทางแจ็กเก็ต (Jacket) บริเวณรอบถัง (รูปที่ 3.2) ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่าย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 4 วัน นำตัวอย่างเซลล์ไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.5.8



รูปที่ 3.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร

นำสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายในระดับขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ตามการทดลองในหัวข้อที่ 3.5.9.9 มาขยายขนาดการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift โดยจะทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายในอาหาร TAP ไม่มีแหล่งไนโตรเจนและอาหารสูตรที่เหมาะสม เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 3 ลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-N และอาหาร TAP-N-C ปริมาตร 3 ลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่มีแสงและออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอัตราการไหลของอากาศ 1 ลิตรต่อนาที และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเซลล์ครบ 24 ชั่วโมง ทำการเติมชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนลงไป หลังจากนั้น พ่นก๊าซอาร์กอนในถังปฏิกรณ์จนกระทั่งความเข้มข้นของออกซิเจนในถังอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แล้วทำการบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนตามการทดลองในหัวข้อที่ 3.5.9.9 เป็นเวลา 7 วัน โดยปิดระบบการให้อากาศ ทำการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 6, 24 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 7 วัน นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟตามวิธีในหัวข้อ 3.5.4

3.5.11 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนและค่าผลผลิตไฮโดรเจนของแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลตั้งแต่สองชุดข้อมูลขึ้นไปโดยทดสอบเพียงปัจจัยเดียว ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (The One-way analysis of variance, One-way ANOVA) แล้ววัดค่าความแตกต่างของข้อมูลตามวิธีของ Duncan ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics ver. 24.0 (SPSS software, New York, USA) โดยตั้งสมมติฐานคือยอมรับสมมติฐาน H_0 เมื่อค่า $P > 0.05$ คือมีปัจจัยอย่างน้อย 1 ปัจจัยที่มีค่าไม่แตกต่างกัน และปฏิเสธสมมติฐาน H_0 และยอมรับสมมติฐาน H_1 เมื่อค่า $P < 0.05$ คือมีปัจจัยอย่างน้อย 1 ปัจจัยที่แตกต่างกัน ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันซึ่งกำกับไว้ในรูปภาพหรือตารางแสดงถึงความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน

จากการนำสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย ซึ่งเก็บรวบรวมไว้ที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จำนวน 24 ไอโซเลท มาศึกษาอัตราการผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร 3 ชนิด คือ อาหาร TAP อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ (TAP-S) ในขวด Vial ขนาด 10 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และปราศจากอากาศ เป็นเวลา 2 และ 24 ชั่วโมง พบว่ามีสาหร่ายสีเขียวจำนวน 20 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน และสาหร่ายทั้ง 20 ไอโซเลทสามารถผลิตไฮโดรเจนได้เมื่อบ่มในอาหารทั้ง 3 ชนิด โดยสาหร่ายส่วนใหญ่จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นเมื่อทำการบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-N หรือ TAP-S (ตารางที่ 4.1) ในขณะที่ไม่พบการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวจำนวน 4 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท 8412, 8553, 8562 และ L (ตารางที่ 4.1) นอกจากนี้ สาหร่ายทั้ง 20 ไอโซเลทที่ผลิตไฮโดรเจนได้มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2 สูงกว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 24 ของการบ่มเซลล์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ ในบรรดาไอโซเลททั้งหมดที่สามารถผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียว ไอโซเลท LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.722 ± 0.028 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าสูงกว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP และอาหาร TAP-S ประมาณ 2.4 และ 1.6 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

สาหร่ายสีเขียวนำมาศึกษาส่วนใหญ่เป็นสาหร่ายที่คัดแยกได้จากน้ำจืดตามแหล่งธรรมชาติ หรือเป็นสาหร่ายที่แยกได้จากน้ำจากนาข้าวในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ยกเว้นสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 ที่แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณแหลมเสด็จในจังหวัดจันทบุรี (Tinpranee *et al.*, 2016) (ตารางที่ 4.1) สาหร่ายสีเขียวแต่ละไอโซเลทมีลักษณะรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งกลุ่มสาหร่ายตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้เป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่า 5 ไมโครเมตร ได้แก่ ไอโซเลท 1SinS1.1, 2SinS4, 2TKS2.1, 2TKS2.2, 8260, A25.1, ChiW1, CirGreen, LSD-W2 และ NakS4 กลุ่มที่ 2 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 ไมโครเมตร ได้แก่ ไอโซเลท 2C2, 8412, 8562, 8568, CH, ChiS4, SD และ TT กลุ่มที่ 3 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว รูปร่างรี ปลายเซลล์โค้งงอและบิด มีขนาดความกว้างประมาณ 2.5 ไมโครเมตร และความยาว

ตารางที่ 4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้การบ่มเซลล์ในสภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง

ลำดับที่	ไอโซเลท	สถานที่เก็บตัวอย่าง	แหล่งที่มาของตัวอย่าง	อัตราการผลิตไฮโดรเจน ($\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$)					
				TAP		TAP-N		TAP-S	
				2 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
1	1SinS1.1	Singburi	Rice paddle field water	0.152 ± 0.015	0.054 ± 0.004	0.087 ± 0.003	0.022 ± 0.001	0.122 ± 0.005	0.017 ± 0.001
2	2C2	Roi et	Rice paddle field water	0.012 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.091 ± 0.008	0.014 ± 0.003	0.007 ± 0.001	0.014 ± 0.002
3	2SinS4	Singburi	Rice paddle field water	0.478 ± 0.036	0.088 ± 0.007	0.576 ± 0.034	0.117 ± 0.017	0.503 ± 0.008	0.095 ± 0.022
4	2TKS2.1	Takhli, Nakhon Sawan	Rice paddle field water	0.175 ± 0.016	0.060 ± 0.006	0.107 ± 0.003	0.024 ± 0.005	0.357 ± 0.019	0.098 ± 0.013
5	2TKS2.2	Takhli, Nakhon Sawan	Rice paddle field water	0.196 ± 0.017	0.061 ± 0.004	0.258 ± 0.021	0.073 ± 0.002	0.214 ± 0.012	0.060 ± 0.001
6	A25.1	Chai Nat	Rice paddle field water	0.408 ± 0.040	0.056 ± 0.005	0.693 ± 0.015	0.099 ± 0.012	0.452 ± 0.033	0.067 ± 0.006
7	B35.1	Maha Sarakham	Freshwater	0.120 ± 0.005	0.015 ± 0.001	0.114 ± 0.017	0.021 ± 0.001	0.100 ± 0.008	0.022 ± 0.002
8	CH	KMITL, Bangkok	Freshwater	0.138 ± 0.012	0.008 ± 0.001	0.234 ± 0.012	0.004 ± 0.001	0.187 ± 0.018	0.007 ± 0.001
9	ChiS4	Chai Nat	Rice paddle field water	0.176 ± 0.017	0.022 ± 0.001	0.077 ± 0.007	0.007 ± 0.001	0.098 ± 0.005	0.013 ± 0.001
10	ChiW1	Chai Nat	Rice paddle field water	0.457 ± 0.018	0.036 ± 0.002	0.636 ± 0.000	0.080 ± 0.008	0.402 ± 0.026	0.045 ± 0.003
11	CirGreen	KMITL, Bangkok	Freshwater	0.546 ± 0.034	0.036 ± 0.002	0.635 ± 0.043	0.054 ± 0.003	0.568 ± 0.041	0.039 ± 0.005
12	L	KMITL, Bangkok	Freshwater	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	LSD-W2	Laemsadet, Chanthaburi	Seawater	0.299 ± 0.030	0.108 ± 0.006	0.722 ± 0.028	0.163 ± 0.008	0.446 ± 0.087	0.130 ± 0.002

n.d. : not detected

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) อัตราการผลิตไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้การบ่มเซลล์ในสภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง

ลำดับที่	ไอโซเลท	สถานที่เก็บตัวอย่าง	แหล่งที่มาของตัวอย่าง	อัตราการผลิตไนโตรเจน ($\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$)					
				TAP		TAP-N		TAP-S	
				2 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
14	NakS4	Nakhon Sawan	Rice paddy field water	0.190 ± 0.023	0.013 ± 0.001	0.379 ± 0.021	0.021 ± 0.001	0.297 ± 0.045	0.025 ± 0.003
15	OvalGreen	KMITL, Bangkok	Freshwater	0.296 ± 0.054	0.005 ± 0.001	0.335 ± 0.034	0.069 ± 0.013	0.340 ± 0.017	0.023 ± 0.002
16	SD	KMITL, Bangkok	Freshwater	0.019 ± 0.004	0.005 ± 0.001	0.003 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.001 ± 0.000
17	TISTR 8260	Bangkok	Freshwater	0.415 ± 0.023	0.088 ± 0.005	0.618 ± 0.052	0.095 ± 0.003	0.490 ± 0.015	0.075 ± 0.001
18	TISTR 8412	Don Mueang, Bangkok	Freshwater	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19	TISTR 8486	Samut Prakan	Freshwater	0.130 ± 0.011	0.019 ± 0.003	0.240 ± 0.040	0.050 ± 0.008	0.140 ± 0.004	0.010 ± 0.001
20	TISTR 8553	Ladkrabang, Bangkok	Freshwater	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21	TISTR 8562	KMITL, Bangkok	Freshwater	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22	TISTR 8568	Nong Chok, Bangkok	Freshwater	0.527 ± 0.023	0.074 ± 0.007	0.699 ± 0.032	0.139 ± 0.048	0.638 ± 0.031	0.094 ± 0.010
23	TISTR 8641	Pak Kret, Nonthaburi	Freshwater	0.021 ± 0.008	0.006 ± 0.001	0.022 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.027 ± 0.003	0.008 ± 0.001
24	TT	Pathum Thani	Freshwater	0.328 ± 0.023	0.097 ± 0.004	0.381 ± 0.009	0.116 ± 0.004	0.291 ± 0.037	0.043 ± 0.001

n.d. : not detected

ประมาณ 5 ไมโครเมตร ได้แก่ ไอโซเลท B35.1 และ OvalGreen กลุ่มที่ 4 สำหรับสายสีเขียวเซลล์เดี่ยว คล้ายพระจันทร์เสี้ยว ปลายเซลล์ทั้งสองข้างเรียวยแหลม มีขนาดความกว้างประมาณ 3 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 25 ไมโครเมตร ได้แก่ ไอโซเลท 8553 กลุ่มที่ 5 สำหรับสายสีเขียวเซลล์เดี่ยว รูปร่างรี คล้ายกระสวย ปลายเซลล์โค้งมน มีขนาดความกว้างประมาณ 5 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 10 ไมโครเมตร ได้แก่ ไอโซเลท 8486 และกลุ่มที่ 6 สำหรับสายสีเขียวรูปร่างรี เซลล์เรียงติดกันโดยใช้ด้านข้างและกันเป็นโคโลนี 2, 4 หรือ 8 เซลล์ มีขนาดความกว้างประมาณ 5 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 10 ถึง 15 ไมโครเมตร ได้แก่ ไอโซเลท 8641 และ L ภาพถ่ายเซลล์สำหรับสายสีเขียวแต่ละไอโซเลท แสดงในภาคผนวก ก

ในการคัดเลือกสายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน ได้ทำการศึกษาภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศในอาหาร 3 ชนิด คือ อาหาร TAP อาหาร TAP-N และ อาหาร TAP-S เนื่องจากสายสีเขียวแต่ละสายพันธุ์มีวิถีเมแทบอลิซึมของการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน การขาดธาตุอาหารต่างๆ จึงส่งผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์สายเขียว รวมถึงเมแทบอลิซึมของการผลิตไฮโดรเจนของสายเขียวแต่ละชนิดแตกต่างกันด้วย (Melis *et al.*, 2000; Kosourov *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002; 2014; 2015) ดังนั้น เพื่อให้ครอบคลุมการคัดเลือกสายพันธุ์ของสายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด จำเป็นต้องทำการคัดเลือกสายสีเขียวภายใต้สภาวะที่ขาดไนโตรเจนหรือซัลเฟอร์ เปรียบเทียบกับสภาวะปกติที่ทำการบ่มในอาหาร TAP มีรายงานการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ของสายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ การจำกัดไนโตรเจนร่วมกับการขาดซัลเฟอร์ และการจำกัดไนโตรเจนร่วมกับการขาดฟอสฟอรัส โดยพบว่า สายสีเขียว *Chlorella* และ *Chlamydomonas* มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ร่วมกับการจำกัดแหล่งไนโตรเจน ในขณะที่สายสีเขียว *Scenedesmus* ผลิตไฮโดรเจนได้สูงภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ แต่จะไม่พบการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการขาดฟอสฟอรัส และยังพบว่าสายสีเขียว *Coelastrella* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ทั้งในสภาวะการขาดซัลเฟอร์ การขาดฟอสฟอรัสและการจำกัดแหล่งไนโตรเจน แต่มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนที่น้อย (Pongpadung *et al.*, 2015)

ในการทดลองนี้ สายสีเขียวที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยว มีลักษณะรูปร่างกลม และไม่มีแฟลกเจลลา และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจน (ตารางที่ 4.1) โดยส่วนใหญ่ สายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีลักษณะรูปร่างกลมจัดอยู่ในสกุล *Chlorella* (Skjånes *et al.*, 2008; He *et al.*, 2012; Pongpadung *et al.*, 2015) จึงเป็นไปได้ว่าสายเขียวรูปร่างกลมที่นำมาคัดเลือกส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Chlorella* ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบว่า การขาดไนโตรเจนหรือการจำกัดไนโตรเจนมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในสายสีเขียว *Chlorella* (Zhang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Pongpadung *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าสายสีเขียวที่อยู่ในสภาวะการขาดไนโตรเจนมีประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงสองและการแตกตัว

ของน้ำลดลง จึงส่งผลให้การสังเคราะห์ออกซิเจนจากปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำลดลง เมื่อมีออกซิเจนภายในระบบน้อยจึงไม่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น (Li *et al.*, 2015) นอกจากนี้ ยังพบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 2TKS2.1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์เทียบกับสภาวะอื่น และสาหร่ายไอโซเลท 2SinS4 และ Cirgreen ที่บ่มในอาหาร TAP-S มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงไม่แตกต่างจากเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-N การขาดซัลเฟอร์ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายส่งผลให้กระบวนการซ่อมแซมโปรตีน D1 ในระบบแสงสองของสาหร่ายสีเขียวถูกยับยั้งชั่วคราว ทำให้อัตราการเกิดออกซิเจนลดลง จึงเกิดการเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้ผลิตไฮโดรเจน (Melis and Happe, 2001) โดยปกติ จะพบสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ (Melis *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002) ในการทดลองนี้ยังพบสาหร่ายไอโซเลท 1SinS1.1 และ ChiS4 ที่ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในอาหาร TAP ปกติ แต่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ ในอาหารปกติ เซลล์สาหร่ายจะมีกิจกรรมการสังเคราะห์แสงเกิดขึ้น ทำให้เกิดกระบวนการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองและมีการสังเคราะห์ออกซิเจนเกิดขึ้น ออกซิเจนที่ผลิตขึ้นนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณจำกัด (Zhang *et al.*, 2014)

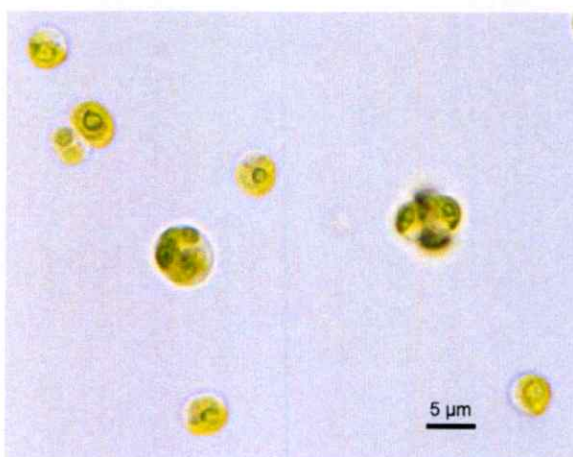
จากผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียวแต่ละไอโซเลทที่มาจากแหล่งที่มาและสถานที่เก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนแตกต่างกัน เช่น สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 1SinS1.1 ซึ่งแยกได้จากน้ำจากนาข้าวมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำ ในขณะที่สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 ซึ่งเป็นสาหร่ายทะเลมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสภาพสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการปรับตัวของเซลล์สาหร่ายทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์สาหร่ายและความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนแตกต่างกัน (Burris, 1997; Skjånes *et al.*, 2008) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของสาหร่าย สภาวะการขาดแหล่งอาหารและแหล่งที่มาของตัวอย่าง ในการทดลองนี้ สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในอาหาร TAP-N จึงนำสาหร่ายสายพันธุ์นี้มาศึกษาชนิดของสาหร่ายและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.2 การระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

4.2.1 ลักษณะของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 มาศึกษารูปร่างและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์สาหร่าย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่างด้วยกำลังขยายภาพ 1,000 เท่า และถ่ายภาพเซลล์โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ NIS-Elements พบว่า สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท

LSD-W2 เป็นเซลล์เดี่ยว มีลักษณะรูปร่างกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.32 ± 0.77 ไมโครเมตรและไม่มีแฟลกเจลลา (รูปที่ 4.1) โดยทั่วไป สาหร่ายสีเขียวน้ำทะเลมักจะพบบริเวณน้ำตื้นตามแนวชายฝั่งที่มีแสงส่องถึง ซึ่งสาหร่ายไอโซเลทนี้ได้คัดแยกมาจากน้ำทะเลของหาดแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี (ตารางที่ 4.1) จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 มีความเป็นไปได้ว่าสาหร่ายชนิดนี้จัดอยู่ในสกุล *Chlorella* อย่างไรก็ตาม การระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวตามลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากสาหร่ายในแต่ละจีโนมมีรูปร่างลักษณะและขนาดที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงได้ทำการทดลองระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA



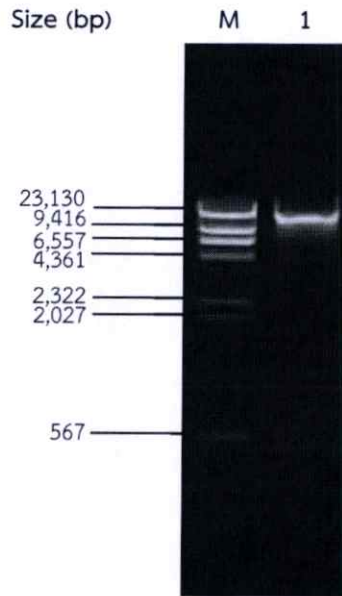
รูปที่ 4.1 รูปร่างลักษณะของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่างที่มีกำลังขยายภาพ 1,000 เท่า

4.2.2 การระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

4.2.2.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2

จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง TAP มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด Wizard SV Genomic DNA Purification system Kit (Promega, USA) และนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 10 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 35 นาที นำอะกาโรสเจลมาย้อมด้วยเจลสตาร์และส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตพบว่า ปรากฏแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 จำนวน 1 แถบ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของจีโนมิกดีเอ็นเอกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัด

ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ($\lambda/HindIII$) พบว่าจีโนมทีเอ็นเอมีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นส่วนทีเอ็นเอของทีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาดประมาณ 23,130 คู่เบส และมีความเข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 จีโนมทีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

Lane M คือ ทีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

Lane 1 คือ จีโนมทีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2

จากการวิเคราะห์แถบจีโนมทีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะเห็นได้ว่าปรากฏแถบจีโนมทีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่เพียงแถบเดียว (รูปที่ 4.2) โดยไม่พบรอยป็นของจีโนมทีเอ็นเอที่เกิดจากการถูกย่อย และไม่ปรากฏแถบของอาร์เอ็นเอที่มีขนาดเล็กอยู่บริเวณด้านล่างของแถบจีโนมทีเอ็นเอ รวมทั้งยังได้จีโนมทีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นสูง ดังนั้น จีโนมทีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และมีคุณภาพดี จึงนำจีโนมทีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำการเพิ่มปริมาณทีเอ็นเอของยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป

4.2.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวโอสเลท LSD-W2 ที่ได้จากหัวข้อ 4.2.2.1 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 18S rRNAF1 (5'-CTGCGAATGGCTCATTAATC-3') และ 18S rRNAR1 (5'-AAGGCCAGGGACGTAATCAA-3') นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ความเข้มข้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR กับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวโอสเลท LSD-W2 มีจำนวน 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (รูปที่ 4.3) ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดดีเอ็นเอใกล้เคียงกับขนาดของดีเอ็นเอที่คาดหวังคือ 1,539 คู่เบส จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวโอสเลท LSD-W2 ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (QIAquick[®] PCR Purification Kit, Qiagen, Germany) ก่อนนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



รูปที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

Lane 1 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวโอสเลท LSD-W2

Lane N คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ปราศจากการเติมจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวโอสเลท LSD-W2 (Negative control)

4.2.2.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ทิศทางด้วยไพรเมอร์ 18S rRNA1 และ 18S rRNA2 พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 1,387 คู่เบส (รูปที่ 4.4) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 ไปเปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวอื่นที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูลของธนาคารยีนด้วยใช้โปรแกรม Nucleotide blast (blastn) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 มีความเหมือนกับสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* สายพันธุ์ต่างๆ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงถึง 99.71 ถึง 99.86 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) นอกจากสายพันธุ์ *Chlorella* แล้ว สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ที่มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Micractinium*, *Coronastrum*, *Didymogenes* และ *Hindakia* 99.57 ถึง 99.71 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวดังกล่าวจัดอยู่ในคลาส Trebouxiophyceae เช่นเดียวกับสาหร่าย *Chlorella* ทำให้พบวิวัฒนาการเชิงพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ที่ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสีเขียวในคลาส Chlorophyceae ได้แก่ สายพันธุ์ *Pseudopediastrum*, *Lacunastrum*, *Hydrodictyon*, *Pediastrum*, *Chlamydomonas*, *Volvox* และ *Tetrabaena* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 92.05 ถึง 95.74 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสีเขียวในคลาส Ulvophyceae ได้แก่ สายพันธุ์ *Percursaria*, *Enteromorpha*, *Ulvaria*, *Ulva* และ *Umbraulva* พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนลดลง โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 90.09 ถึง 90.98 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2)

จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวที่รายงานไว้ในฐานข้อมูลของธนาคารยีน สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA สูงที่สุดในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 และสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นที่รายงานไว้ในฐานข้อมูลของธนาคารยีน มาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมโดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ต่อไป

1	TCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAA	60
61	GGCCGACCGGGCTTTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCC	120
121	TTGCGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAG	180
181	GCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTG	240
241	AGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA	300
301	GGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAG	360
361	TACAATCTAAACCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCG	420
421	GTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGA	480
481	TTTCGGGTGGGGCTTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGCCACCTTGTTG	540
541	CCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAG	600
601	TAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGAT	660
661	AGGACTCTGGCCTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCG	720
721	GGGGCATTTCGTATTTTCATTGTGACAGGTGAAATCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACT	780
781	GCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGA	840
841	CGATTAGATACCGTCTTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTT	900
901	TCTTCGATGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGT	960
961	ATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCT	1,020
1,021	GCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGAC	1,080
1,081	AGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGG	1,140
1,141	GTTGCCTTGTGAGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGG	1,200
1,201	TTGGCTCGCCAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCAT	1,260
1,261	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGA	1,320
1,321	TGCATTCAACGAGCCTAGCCTTGGCCGAGAGGCCCGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTG	1,380
1,381	ATGGGGA	1,387

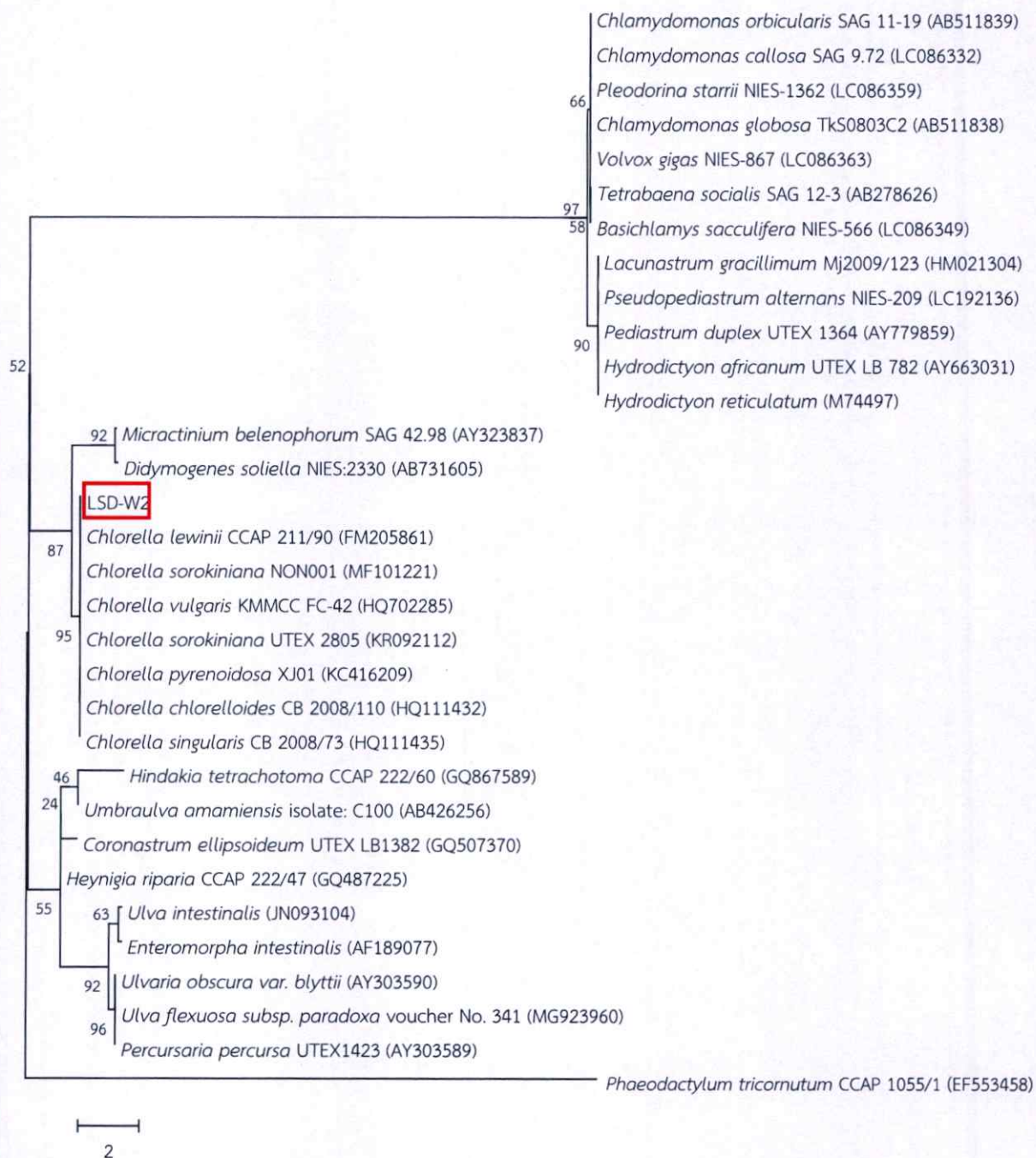
รูปที่ 4.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวโлкโซเลท LSD-W2

ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน

ลำดับที่	สายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว	ความเหมือน (%)
1	<i>Chlorella sorokiniana</i> NON001	99.86
2	<i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 2805	99.86
3	<i>Chlorella vulgaris</i> KMMCC FC-42	99.86
4	<i>Chlorella chlorelloides</i> CB 2008/110	99.78
5	<i>Chlorella lewinii</i> CCAP 221/90	99.78
6	<i>Chlorella vulgaris</i> KMMCC FC-15	99.78
7	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> XJ01	99.71
8	<i>Chlorella singularis</i> CB 2008/73	99.71
9	<i>Micractinium belenophorum</i> SAG 42.98	99.71
10	<i>Coronastrum ellipsoideum</i> UTEX LB1382	99.71
11	<i>Didymogenes soliella</i> NIES:2330	99.64
12	<i>Hindakia tetrachotoma</i> CCAP 222/60	99.57
13	<i>Pseudopediastrum alternans</i> NIES-209	95.74
14	<i>Lacunastrum gracillimum</i> Mj2009/123	95.66
15	<i>Hydrodictyon africanum</i> UTEX LB 782	95.23
16	<i>Hydrodictyon reticulatum</i>	95.16
17	<i>Pediastrum duplex</i> UTEX 1364	95.09
18	<i>Pleodorina starrii</i> NIES-1362	92.77
19	<i>Chlamydomonas globosa</i> TKS0803C2	92.77
20	<i>Volvox gigas</i> NIES-867	92.70
21	<i>Chlamydomonas orbicularis</i> SAG 11-19	92.62
22	<i>Chlamydomonas callosa</i> SAG 9.72	92.55
23	<i>Tetrabaena socialis</i> SAG 12-3	92.05
24	<i>Percursaria percursa</i> UTEX1423	91.06
25	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	90.98
26	<i>Ulva flexuosa</i> subsp. <i>paradoxa</i> voucher No. 341	90.70
27	<i>Ulvaria obscura</i> var. <i>blyttii</i>	90.70
28	<i>Umbraulva amamiensis</i> isolate: C100	90.27
29	<i>Ulva intestinalis</i>	90.09
30	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCAP 1055/1	80.58

4.2.2.4 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 18S rDNA

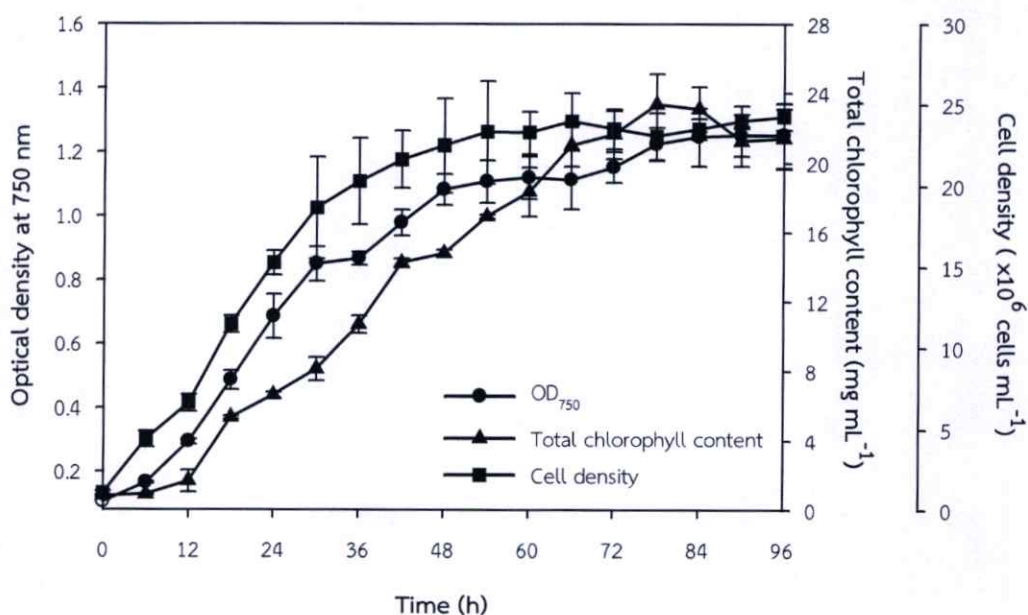
จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 และสาหร่ายสีเขียวในดิวิชันคลอโรไฟตา (Chlorophyta) ชนิดอื่นที่รายงานไว้ในฐานข้อมูลของธนาคารยีน มาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้วิธี Maximum likelihood ด้วยโมเดล Tamura-Nei และเลือกทำ Bootstrap analysis จำนวน 1,000 ครั้ง โดยใช้ไดอะตอม *Phaeodactylum tricornutum* ซึ่งอยู่ในอาณาจักรโครมิสตา (Chromista) ดิวิชันบาซิลลารีโอไฟตา (Bacillariophyta) เป็นกลุ่มนอกสายวิวัฒนาการ (Outgroup) พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มสาหร่ายสีเขียวในดิวิชันคลอโรไฟตาที่นำมาศึกษาตามความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่หนึ่งประกอบด้วยสาหร่ายสีเขียวในคลาส Chlorophyceae กลุ่มที่สองประกอบด้วยสาหร่ายสีเขียวในคลาส Trebouxiophyceae และกลุ่มที่สามประกอบด้วยสาหร่ายสีเขียวในคลาส Ulvophyceae (รูปที่ 4.5) ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Lewis และ McCourt (2004) ที่พบว่าสามารถจัดกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่า สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับสาหร่ายสีเขียวในคลาส Trebouxiophyceae ที่มีสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* สายพันธุ์อื่นๆ อยู่ในกลุ่มเช่นกัน โดยมีค่าความเชื่อมั่นที่ได้จากการทำซ้ำ (Bootstrap) ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสาหร่ายสีเขียวในจีนัส *Chlorella* จากข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA และลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 มาประกอบกัน สรุปได้ว่า สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 จัดอยู่ในจีนัส *Chlorella* โดยตั้งชื่อสาหร่ายสีเขียวนี้ว่า *Chlorella* sp. LSD-W2



รูปที่ 4.5 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA และสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นที่มีรายงานในธนาคารยีน โดยใช้วิธี Maximum likelihood ด้วยโมเดลของ Tamura-Nei (Bootstrap 1,000 ครั้ง) สเกล 2 แทนระยะห่างทางวิวัฒนาการ (Evolution distance) ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปต่อกับนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง ตัวเลขที่จุดตัด (Node) ของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย Bootstrap test

4.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ตามหัวข้อที่ 3.5.8 ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยการวัดความขุ่นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ และวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์จากการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการเจริญเติบโตภายใน 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นระยะที่สาหร่ายปรับตัวอยู่ในระยะพัก (Lag phase) จากนั้น สาหร่ายจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 54 ซึ่งเป็นระยะการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (Logarithmic phase) โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.059 ต่อชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 54 ของการเพาะเลี้ยง การเจริญเติบโตของสาหร่ายจะเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) (รูปที่ 4.6) ในการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่า สาหร่ายมีอัตราการเพิ่มขึ้นของคลอโรฟิลล์อย่างรวดเร็วตั้งแต่วินาที 12 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นได้ในระยะยาวจนถึงชั่วโมงที่ 78 (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 การเจริญเติบโตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ และความหนาแน่นของเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร

โดยปกติ สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกและออโตโทรฟิก งานวิจัยนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก โดยใช้กรดอะซิติกที่มีอยู่ในสูตรอาหาร TAP เป็นแหล่งของสารอินทรีย์คาร์บอน จึงทำให้สาหร่ายมีรูปแบบการเจริญเติบโตและมีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วเช่นเดียวกับรูปแบบการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้ อาหาร TAP ยังมีธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส ซึ่งธาตุอาหารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบสำคัญของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ของสาหร่าย (Grossman and Takahashi, 2001) ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่สำคัญในการสังเคราะห์กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก และหน่วยโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ มีรายงานพบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* Y-019 ในอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน ทำให้ปริมาณเซลล์ลดลง 2.5 เท่าเมื่อเทียบกับของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร TAP (Deng *et al.*, 2011) สำหรับซัลเฟอร์เป็นธาตุที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ ซัลเฟอร์ที่ถูกเก็บไว้ภายในเซลล์ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของกรดอะมิโนเมทไธโอนีนและซิสเทอีน ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดนิวคลีอิกและสารตัวกลางในวิถีเพนโตสฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบของ ATP และ NADPH ที่มีบทบาทในการถ่ายทอดพลังงานภายในเซลล์และการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (Grossman and Takahashi, 2001)

จากผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP สามารถแบ่งการเจริญของสาหร่ายออกเป็น 3 ระยะ (รูปที่ 4.6) โดยพบว่าใน 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง สาหร่ายมีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า เนื่องจากสาหร่ายต้องปรับตัวให้เข้ากับอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงก่อนเริ่มต้นการแบ่งเซลล์ ช่วงที่ 2 ในชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 54 พบว่าสาหร่ายสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว เนื่องจากเซลล์สามารถปรับตัวและใช้สารอาหารในการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว อาหารมีสารอาหารครบถ้วนสมบูรณ์ กราฟการเจริญจึงเป็นแบบทวีคูณ (Exponential) ในระยะนี้ สาหร่ายมีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้สาหร่ายมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้นด้วย (Hopkins *et al.*, 2004) เมื่อสาหร่ายมีกิจกรรมของระบบแสงเพิ่มขึ้น เซลล์จะดูดซับพลังงานแสงมากขึ้น ทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำและปลดปล่อยพลังงานเคมีในรูปของ ATP และ NADPH มากขึ้น พลังงานที่ได้จะถูกนำมาใช้ในการสร้างสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายผ่านวิถี Calvin-Benson (Bassham *et al.*, 1950; Hemschemeier *et al.*, 2009) เมื่อสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการเจริญเติบโตเต็มที่เข้าสู่ระยะ Late-logarithmic ในชั่วโมงที่ 54 เซลล์จะมีอัตราการเจริญลดลงเนื่องจากธาตุอาหารเริ่มลดน้อยลง ภายหลังจากชั่วโมงที่ 54 ของการเพาะเลี้ยงจะพบว่าความหนาแน่นเซลล์และปริมาณเซลล์สาหร่ายสูงมากและการเพิ่มจำนวนเซลล์เริ่มคงที่ จึงเป็นช่วงที่สาหร่ายเข้าสู่ระยะ Stationary เซลล์จะมีอัตราการเกิดเท่ากับอัตราการตายเพราะเซลล์ขาดแคลนอาหาร นอกจากนี้ ยังพบว่า สาหร่ายมีปริมาณคลอโรฟิลล์คงที่ เมื่อการเจริญของสาหร่ายเข้าสู่ระยะ

Stationary (รูปที่ 4.6) แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายที่มีการเจริญอยู่ในระยะ Stationary มีประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงลดลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการเจริญของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* Y-019 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ซึ่งพบว่าสาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์สาหร่ายจะคงที่ (Deng *et al.*, 2011)

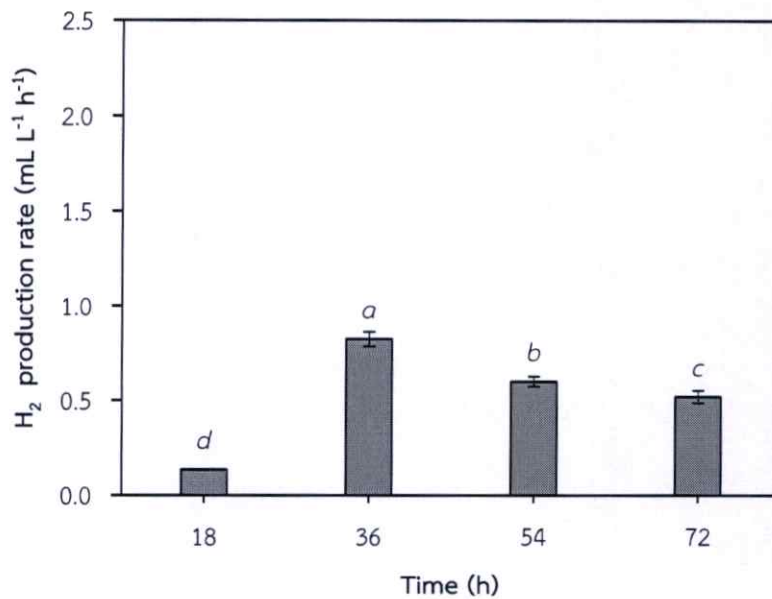
4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร

ในงานวิจัยนี้ ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบการกวนในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้ อายุเซลล์ การขาดแหล่งอาหาร ความเข้มข้นของเหล็กไอออน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ความเข้มแสงและรูปแบบการให้แสง อุณหภูมิ และพีเอชของอาหาร

4.4.1 ผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp.

LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18, 36, 54 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์เจริญเติบโตอยู่ในระยะเริ่มต้นของการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (Early-logarithmic phase) ระยะกึ่งกลางของการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (Mid-logarithmic phase) ระยะเฉื่อย (Late-logarithmic phase) และระยะคงที่ (Stationary phase) ตามลำดับ มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายในอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) จากนั้น ทำการบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-N ในขวดเพาะเลี้ยงภายใต้แสงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ไปฟั่นไล่อากาศและบ่มในสภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 0.824 ± 0.037 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงในสาหร่ายที่มีอายุเซลล์เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.7) ในขณะที่สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง (รูปที่ 4.7)



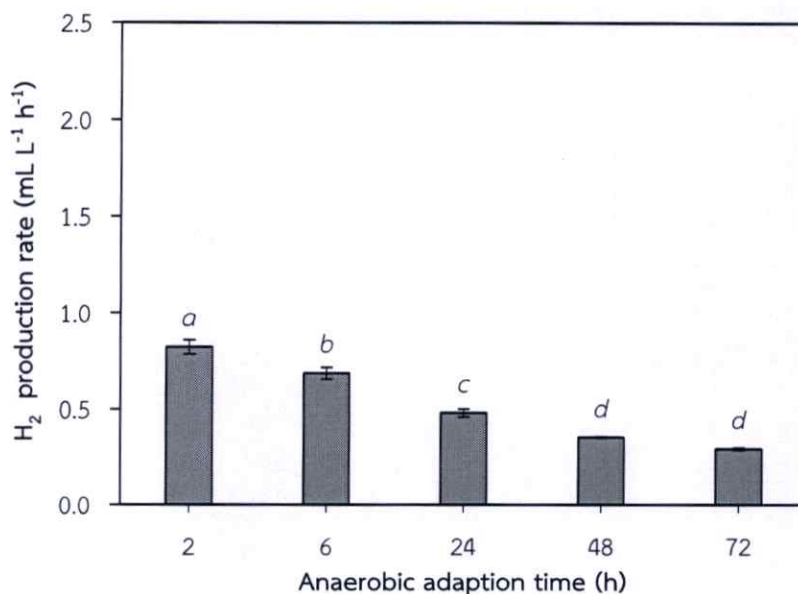
รูปที่ 4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีอายุเซลล์ 18, 36, 54 และ 72 ชั่วโมง (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

จากการนำสาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะ Early-logarithmic (18 ชั่วโมง) ระยะ Mid-logarithmic (36 ชั่วโมง) ระยะ Late-logarithmic (54 ชั่วโมง) และ ระยะ Stationary (72 ชั่วโมง) มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายแต่ละช่วงอายุมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สาหร่ายที่มีอายุเซลล์ 18 ชั่วโมงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุด เนื่องจากสาหร่ายเจริญเติบโตอยู่ในช่วงเริ่มต้นของการเพิ่มจำนวนเซลล์ พลังงานที่ได้รับจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะถูกนำมาใช้ในการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นหลัก โดยอิเล็กตรอนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงถูกใช้ไปในการสร้าง NADPH ซึ่งเป็นสับสเตรทสำหรับวิถี Calvin-Belton (Hemschemeier *et al.*, 2009) ทำให้สาหร่ายที่อยู่ในระยะเริ่มต้นของการแบ่งเซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ต่ำที่สุด จากการทดลองสาหร่ายที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเซลล์มีการเจริญเติบโตเต็มที่อยู่ในระยะ Mid-logarithmic โดยสังเกตได้จากค่าความขุ่นของเซลล์และจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 4.5) ทำให้เซลล์มีการผลิตพลังงานจากกระบวนการสังเคราะห์แสงมากที่สุดและเพียงพอสำหรับการสร้างและสะสมสารประกอบคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นบ่งชี้ว่าสาหร่ายมีกิจกรรมการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น ทำให้อิเล็กตรอนที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองมากขึ้น เมื่อบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ อิเล็กตรอนที่มีจำนวนมากภายในเซลล์

จะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Kim et al., 2005) ดังนั้น สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่มีอายุเซลล์อยู่ในระยะ Mid-logarithmic จึงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจะลดลงเมื่อเซลล์เจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ Late-logarithmic ในช่วงเวลาที่ 54 ของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากในระยะนี้สาหร่ายมีอัตราการเจริญลดลงจากการขาดอาหาร ส่งผลให้พลังงานภายในเซลล์ถูกใช้ในการประทังชีวิต และมีอิเล็กตรอนที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนลดลง เมื่อสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอายุเซลล์ 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์เจริญเข้าสู่ระยะ Stationary เซลล์จะมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นเนื่องจากสารอาหารหมดไป และเซลล์มีอัตราการผลิตคลอโรฟิลล์ลดลงแสดงให้เห็นการลดลงของประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของเซลล์สาหร่าย และส่งผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ในระยะนี้ลดลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 ที่พบว่าเซลล์ที่เจริญอยู่ใน Early-logarithmic และระยะ Stationary มีการผลิตไฮโดรเจนต่ำ แต่ผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นเมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น โดยการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *C. reinhardtii* สูงสุดเมื่อเซลล์อยู่ในระยะ Late-logarithmic (Kim et al., 2005) ทั้งนี้อายุเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว ตลอดจนสภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายอีกด้วย จากนั้น จึงนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง มาศึกษาระยะเวลาของการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.4.2 ผลของระยะเวลาของการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการบ่มในอาหาร TAP-N ในขวดเพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ไปพ่นไล่อากาศและบ่มในสภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2, 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ในที่มีแสงภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 0.824 ± 0.040 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นอัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์จะลดลง (รูปที่ 4.8)



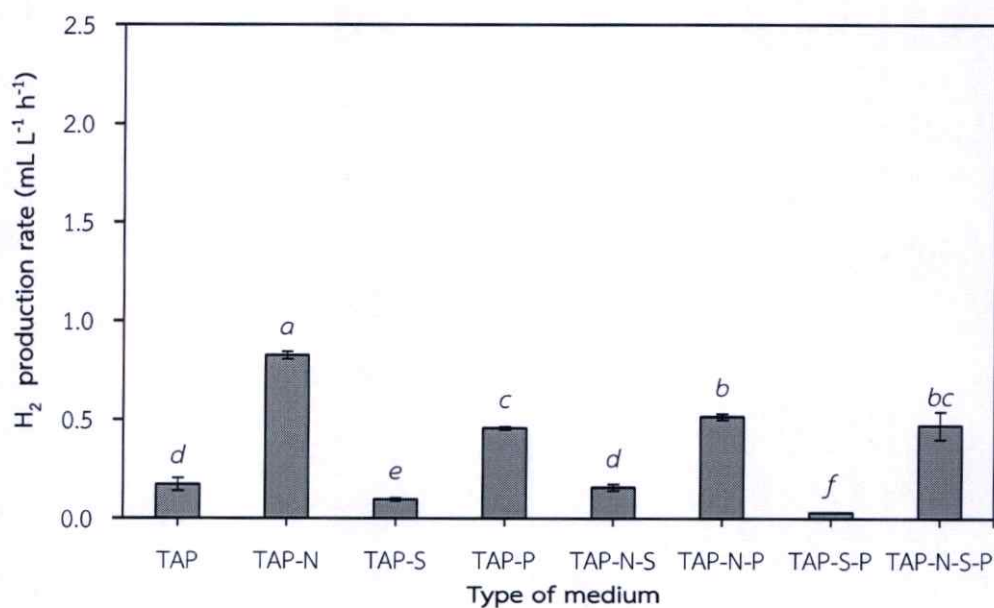
รูปที่ 4.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่แปรผันระยะเวลาของการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศในอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มาทำการศึกษาระยะเวลาการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศพบว่า สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดใน 2 ชั่วโมงแรกของการบ่มเซลล์ เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีประสิทธิภาพสูงสุดในช่วงเริ่มต้นของการปรับตัวภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ (Miura *et al.*, 1986) หลังจากนั้น อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 จะลดลง เนื่องจากสภาวะที่มีแสง เซลล์จะผลิตออกซิเจนเพิ่มขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ออกซิเจนจะไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง (Forestier *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2005) ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจึงนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่มีระยะเวลาการบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มาศึกษาสภาวะการขาดแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.4.3 ผลของการขาดแหล่งอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการบ่มในอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ อาหาร TAP-N, TAP-S, TAP-P, TAP-N-S, TAP-N-P, TAP-S-P และ TAP-N-S-P โดยใช้อาหาร TAP ปกติที่มีแหล่งอาหารสมบูรณ์เป็นตัวควบคุม จากนั้น ทำการบ่มเป็นเวลา 24

ชั่วโมง ก่อนนำเซลล์ไปเหนี่ยวนำให้ผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า การขาดแหล่งอาหารเพียงชนิดเดียวมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มากกว่าการขาดแหล่งอาหารแบบรวม เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่ขาดแหล่งอาหารแบบเดียวพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ทำการบ่มในอาหาร TAP-N มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 0.825 ± 0.005 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่า 4.8 เท่าของอัตราการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP (รูปที่ 4.9) สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-P มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงรองลงมาจากเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-N โดยมีค่าเท่ากับ 0.457 ± 0.008 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่า 2.6 เท่าของอัตราการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP ในขณะที่การขาดซิลเฟอร์ไม่ช่วยส่งเสริมการเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 โดยสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-S มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP (รูปที่ 4.9) จากผลการขาดแหล่งอาหารแบบรวมพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N-P มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 0.516 ± 0.015 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างกับอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-N-S-P ที่มีค่าเท่ากับ 0.473 ± 0.070 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-N-S มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนไม่แตกต่างกับสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP และสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-S-P มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำสุด (รูปที่ 4.9)



รูปที่ 4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ภายใต้สภาวะการขาดแหล่งอาหารแบบเดียวและแบบรวม (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

จากผลการทดลองพบว่า การขาดแหล่งอาหารแบบเดียวมีผลต่อการเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มากกว่าการขาดแหล่งอาหารแบบรวม โดยการขาดไนโตรเจนทำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด (รูปที่ 4.9) เนื่องจากธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก และโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ และยังเป็นองค์ประกอบสำคัญของคลอโรฟิลล์ เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน เซลล์มีการสังเคราะห์โปรตีนดูดซับพลังงานแสง โปรตีนศูนย์กลางปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสง และกิจกรรมของเอนไซม์ RuBisCo ลดลง (Peltier and Schmidt, 1991) และทำให้โครงสร้าง Oxygen-evolving complex (OEC) ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำเกิดความเสียหาย (Zhang *et al.*, 2014) ส่งผลให้สาหร่ายลดปริมาณการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และลดประสิทธิภาพของการดูดซับพลังงานของระบบแสงสอง เมื่อกิจกรรมของระบบแสงสองของสาหร่ายลดลง ปริมาณออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำลดลงด้วย โดยออกซิเจนภายในระบบบางส่วนจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจ (Cournac *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2015) เมื่อภายในระบบมีปริมาณออกซิเจนต่ำลง กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงไม่ถูกยับยั้งจากออกซิเจน ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจนสูงขึ้น นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เห็นชัดเจนของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนคือ เซลล์มีการสะสมแป้งเพิ่มขึ้น (Philipps *et al.*, 2012) การสะสมแป้งที่สูงขึ้นของเซลล์เป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ ADP-glucose pyrophosphorylase ที่ถูกกระตุ้นในสภาวะการขาดไนโตรเจน โดยเอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน Glucose-1-phosphate ไปเป็น ADP-glucose และจะถูกเปลี่ยนเป็นอะไมโลสต่อไป (Zhu *et al.*, 2014) เมื่อเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ถูกบ่มในอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่มีแสงและออกซิเจน ส่งผลให้เซลล์สาหร่ายมีการสะสมแป้งเพิ่มขึ้น จากนั้น เมื่อทำการย้ายเซลล์สาหร่ายเข้าสู่ช่วงการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ เซลล์จะสลายแป้งมาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 จึงเพิ่มขึ้นภายใต้การขาดไนโตรเจน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้นในสาหร่ายสีเขียวน้ำทะเล *Chlorella pyrenoidosa* IOAC707S ภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจน (Li *et al.*, 2015)

จากผลการทดลองยังพบอีกว่า การขาดฟอสฟอรัสส่งผลให้สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นรองลงมาจากขาดไนโตรเจน (รูปที่ 4.9) สาหร่ายสีเขียวที่บ่มในอาหาร TAP-P ทำให้การถ่ายเทอิเล็กตรอนของระบบแสงถูกขัดขวาง เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบสำคัญของสารตัวกลางที่ได้จากวิถีเพนโทสฟอสเฟต คือ ATP และ NADPH ซึ่งทำหน้าที่ในการถ่ายเทพลังงานภายในเซลล์ เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ขาดฟอสฟอรัส ส่งผลให้สารตัวกลางที่ได้จากวิถีเพนโทสฟอสเฟตลดลง นำไปสู่การลดกิจกรรมการถ่ายเทอิเล็กตรอนของระบบแสง (Brook, 1986) ประสิทธิภาพการถ่ายเทอิเล็กตรอนของระบบแสงที่ลดลง ทำให้สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการอิ่มตัวของแสง (Light-saturated rate) ลดลง ส่งผลให้เกิดการ

ยับยั้งการสังเคราะห์ออกซิเจนในระบบแสงสอง (Brook, 1986; Batyrova *et al.*, 2012) เซลล์จะเริ่มเข้าสู่สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน ส่งผลให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการขาดฟอสฟอรัสในสาหร่ายสีเขียวน้ำทะเล *Chlorella sp.* ที่พบว่าการขาดฟอสฟอรัสสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ออกซิเจนภายในเซลล์และการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้ (Batyrova *et al.*, 2015) จากการทดลองนี้ ยังพบอีกว่า สาหร่ายที่บ่มอยู่ในอาหาร TAP ปกติ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่อยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.9) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการบ่มเซลล์ในสูตรอาหาร TAP ปกติ ทำให้เซลล์มีประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงสองสมบูรณ์ ปริมาณออกซิเจนที่เกิดจากปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองมีปริมาณมาก ทำให้ออกซิเจนไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ทำหน้าที่ในการผลิตไฮโดรเจน ส่งผลให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนในปริมาณต่ำ

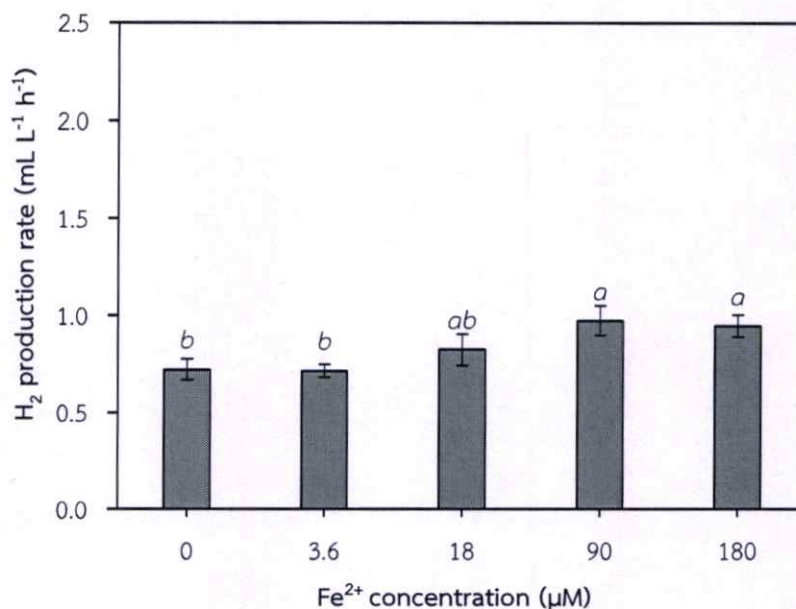
การขาดซัลเฟอร์ไม่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 โดยเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-S มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ต่ำกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-S-P มีอัตราการผลิตต่ำที่สุด (รูปที่ 4.9) มีรายงานพบว่า การขาดซัลเฟอร์สามารถเหนี่ยวนำการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* อย่างเด่นชัด (Melis *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Kosourov *et al.*, 2007) การขาดซัลเฟอร์ในอาหารเป็นสาเหตุของการยับยั้งกิจกรรมของระบบแสงสอง และทำให้อัตราการอิมตัวของแสงลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการขาดซัลเฟอร์ส่งผลให้การสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเทอีนและเมทไธโอนีนลดลง ซึ่งเป็นกรดอะมิโนสำคัญของโปรตีน D1 ที่อยู่บริเวณศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของระบบแสงสอง เมื่อโปรตีน D1 เสียหายจะทำให้กระบวนการซ่อมแซมของระบบแสงสองบกพร่องและทำให้การแตกตัวของน้ำลดลง การสังเคราะห์ออกซิเจนจึงลดลง ออกซิเจนจะถูกนำมาใช้ในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ทำให้เกิดสภาวะปราศจากอากาศได้อย่างรวดเร็ว แต่การขาดซัลเฟอร์ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 ไม่ทำให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่า การขาดซัลเฟอร์เพียงแหล่งเดียวไม่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Chlorella sorokintana* KU204 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการจำกัดไนโตรเจนร่วมกับการขาดซัลเฟอร์และสภาวะการจำกัดไนโตรเจนร่วมกับการขาดฟอสฟอรัส โดยสาหร่ายสีเขียว *C. sorokintana* KU204 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่จำกัดไนโตรเจนร่วมกับการขาดซัลเฟอร์ มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเป็น 2 เท่าของการขาดซัลเฟอร์เพียงแหล่งเดียว (Pongpadung *et al.*, 2015)

ในการทดลองนี้ การขาดแหล่งอาหารแบบรวมทั้งแบบการขาดธาตุอาหาร 2 ชนิดและการขาดธาตุอาหาร 3 ชนิด ไม่ส่งเสริมประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 เมื่อเปรียบเทียบกับ การขาดไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว ถึงแม้ว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่ขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (TAP-N-P) มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่ขาด

ฟอสฟอรัสเพียงแหล่งเดียว (TAP-P) แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่เด่นชัด (รูปที่ 4.9) แสดงให้เห็นว่า การขาดซิลเฟออร์ร่วมกับการขาดแหล่งอาหารชนิดอื่นทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ต่ำลง เนื่องจากการขาดแหล่งอาหารรวมกันทำให้กระบวนเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์สาหร่ายถูกยับยั้งพร้อมกัน รวมถึงเมแทบอลิซึมของการผลิตไฮโดรเจนด้วย จากการทดลองสรุปได้ว่า การขาดแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีค่าสูงสุด ดังนั้น ในการทดลองต่อไป จะทำการศึกษาความเข้มข้นของเหล็กไอออนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ในสภาวะการขาดไนโตรเจน

4.4.4 ผลของความเข้มข้นของเหล็กไอออนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-N ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของเหล็กไอออน (Fe^{2+}) สุดท้าย 0, 3.6, 18, 90 และ 180 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้ายของเหล็กไอออนในอาหาร TAP สูตรปกติคือ 18 ไมโครโมลาร์) ทำการบ่มในสภาวะเขย่าในที่มีแสงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำเซลล์มาเหนี่ยวนำให้ผลิตไฮโดรเจนในสภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 0.973 ± 0.076 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.10) ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 180 และ 18 ไมโครโมลาร์ โดยผลิตไฮโดรเจนได้ 0.947 ± 0.057 และ 0.826 ± 0.081 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 3.6 ไมโครโมลาร์และในอาหารที่ไม่เติมแหล่งเหล็กไอออนมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.10 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กไอออน (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กไอออนตั้งแต่ 0 ถึง 180 ไมโครโมลาร์พบว่า สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออนเท่ากับ 90 ไมโครโมลาร์ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นเหล็กไอออนเท่ากับ 18 และ 180 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.10) แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของเหล็กไอออนที่สูงและต่ำไปไม่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ทั้งนี้เหล็กเป็นธาตุอาหารรองอนินทรีย์ที่มีความสำคัญกับกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการหายใจและการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Küpper *et al.*, 2008) สาหร่ายสีเขียวต้องการธาตุเหล็กมาใช้เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส โดยเหล็กเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของบริเวณกระตุ้นในเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ (FeFe-hydrogenase) อิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านเฟอร์รีดอกซินและถ่ายทอดไปยังเหล็กอะตอมที่อยู่ในบริเวณศูนย์กลางโมเลกุลของเอนไซม์ เพื่อกระตุ้นปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและผลิตไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Forestier *et al.*, 2003) ถึงแม้ว่าปริมาณเหล็กไอออนในอาหารเพาะเลี้ยงไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่า เหล็กไอออนไม่มีผลต่อการลดปริมาณออกซิเจนและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *C. reinhardtii* C137⁺ (Ghirardi *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม การเพิ่มเข้มข้นของเหล็กไอออนเท่ากับ 90 ไมโครโมลาร์ ทำ

ให้สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น ดังนั้น จึงเลือกสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ มาศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.4.5 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

4.4.5.1 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-N ที่ขาดแหล่งคาร์บอน (TAP-N-C) ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนดังนี้ กรดอะซิติก โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต โซเดียมอะซิเตท น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโทส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลแลกโทส และน้ำตาลซูโครส ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร (เท่ากับ ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอะซิติกในอาหาร TAP สูตรปกติ) จากนั้น นำเซลล์มาเหนี่ยวนำการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2, 6, 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงอย่างชัดเจนในอาหารที่ใช้กรดอะซิติก โซเดียมอะซิเตทและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยจะพบว่าใน 6 ชั่วโมงแรกของการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำ และสาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการบ่มเซลล์ โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 1.317 ± 0.029 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4.3) ซึ่งมากกว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่ใช้โซเดียมอะซิเตทและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 1.147 ± 0.065 และ 1.029 ± 0.100 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนในปริมาณน้อยมากเมื่อบ่มในอาหารที่ใช้ น้ำตาลมอลโทสและน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน รวมถึงในสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่ขาดแหล่งคาร์บอน เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตไฮโดรเจน พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 48.280 ± 1.919 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อบ่มในอาหารที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อบ่มเซลล์ในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโทส น้ำตาลแลกโทสและโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน สาหร่ายไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ใน 24 ชั่วโมงของการบ่มเซลล์ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 อัตราการผลิตและผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2, 6, 24 และ 48 ชั่วโมง

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	อัตราการผลิตไฮโดรเจน (mL L ⁻¹ h ⁻¹)				ผลผลิตไฮโดรเจน (mL L ⁻¹)			
	2 h	6 h	24 h	48 h	2 h	6 h	24 h	48 h
กรดอะซีติก	0.108 ± 0.023 ^b	0.420 ± 0.046 ^a	1.317 ± 0.029 ^a	1.017 ± 0.183 ^a	0.214 ± 0.046 ^b	2.492 ± 0.276 ^a	33.507 ± 2.476 ^a	48.280 ± 1.919 ^a
โซเดียมอะซิเตท	0.145 ± 0.014 ^a	0.434 ± 0.041 ^a	1.147 ± 0.065 ^b	0.909 ± 0.067 ^a	0.286 ± 0.027 ^a	2.577 ± 0.242 ^a	24.439 ± 2.377 ^b	42.844 ± 2.488 ^b
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	n.d.	n.d.	n.d.	0.004 ± 0.000 ^c	n.d.	n.d.	n.d.	0.178 ± 0.001
น้ำตาลกลูโคส	0.050 ± 0.004 ^c	0.166 ± 0.013 ^b	1.029 ± 0.100 ^c	0.708 ± 0.023 ^b	0.098 ± 0.007 ^c	0.984 ± 0.079 ^b	27.633 ± 2.926 ^b	33.585 ± 1.068 ^c
น้ำตาลฟรักโทส	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
น้ำตาลมอลโทส	n.d.	n.d.	0.005 ± 0.000 ^d	0.010 ± 0.000 ^c	n.d.	n.d.	0.124 ± 0.176 ^c	0.460 ± 0.013 ^d
น้ำตาลแลกโทส	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
น้ำตาลซูโครส	n.d.	n.d.	0.022 ± 0.001 ^d	0.012 ± 0.001 ^c	n.d.	n.d.	0.512 ± 0.026 ^c	0.548 ± 0.024 ^d
ไม่เติมแหล่งคาร์บอน	n.d.	n.d.	0.013 ± 0.003 ^d	0.009 ± 0.001 ^c	n.d.	n.d.	0.299 ± 0.066 ^c	0.413 ± 0.078 ^d

หมายเหตุ 1) n.d. : ไม่สามารถตรวจสอบได้

2) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจนหรือผลผลิตไฮโดรเจน

จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่ขาดแหล่งคาร์บอนมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนที่ต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับ สาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีกรดอะซิติก โซเดียมอะซิเตท และน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 โดยในการทดลองสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เนื่องจากการเติมกรดอะซิติกในอาหารภายใต้สภาวะปราศจากอากาศสามารถเพิ่มอิเล็กตรอนและโปรตอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนได้ ในสารละลาย กรดอะซิติกสามารถแตกตัวเป็นโปรตอนและอะซิเตท อะซิเตทจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติล-โคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) และเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid (TCA) cycle) และวัฏจักรไกลออกซีเลท (Glyoxylate cycle) ในไมโทคอนเดรียและไซโตพลาสซึม ตามลำดับ (Gibbs *et al.*, 1986; Jurado-Oiller *et al.*, 2015) จากนั้น ซักซิเนต (Succinate) ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากวัฏจักรไกลออกซีเลทจะเข้าสู่คลอโรพลาสต์และถูกเปลี่ยนเป็นฟูมาเลต (Fumarate) มาเลต (Malate) และออกซาโลอะซิเตท (Oxaloacetate) ตามลำดับ ออกซาโลอะซิเตทภายในคลอโรพลาสต์จะถูกสลายไปเป็นไพรูเวต (Pyruvate) ไพรูเวทจะสลายไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อะซิติล-โคเอนไซม์เอ และอิเล็กตรอนด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไพรูเวตเฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส (Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase) เฟอร์รีดอกซินจะรับอิเล็กตรอนที่ปลดปล่อยออกมาและส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Gibbs *et al.*, 1986; Noth *et al.*, 2013; Jurado-Oiller *et al.*, 2015) การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหารที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนมีส่วนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว เมื่อกรดอะซิติกถูกนำเข้าสู่ไมโทคอนเดรียและถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติล-โคเอนไซม์เอเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหายใจของเซลล์ สาหร่ายในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Gibbs *et al.*, 1986; Melis and Happe, 2001; Goulding and Merrett, 1966; Jurado-Oiller *et al.*, 2015) ปริมาณออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะลดลงเนื่องจากการใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ จึงทำให้การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสูงขึ้น

การใช้โซเดียมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ช่วยเร่งอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายให้สูงขึ้นและผลิตไฮโดรเจนได้สูงรองลงมาจากการใช้กรดอะซิติก (ตารางที่ 4.3) กรดอะซิติกและโซเดียมอะซิเตทประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมจำนวน 2 อะตอมเท่ากัน แต่แตกต่างกันที่ปฏิกิริยาการแตกตัวของสาร โซเดียมอะซิเตทจะแตกตัวได้อะซิเตท (CH_3COO^-) และโซเดียมไอออน (Na^+) สำหรับกรดอะซิติกจะแตกตัวได้อะซิเตทและโปรตอน (H^+) ออกมา โปรตอนที่ได้จากการแตกตัวของกรดอะซิติกถูกใช้เป็นสับสเตรทของกระบวนการผลิตไฮโดรเจนได้ ทำให้สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าการใช้โซเดียมอะซิเตท เมื่อเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเกือบทุกชนิด ยกเว้นน้ำตาลกลูโคส ทั้งนี้เป็น

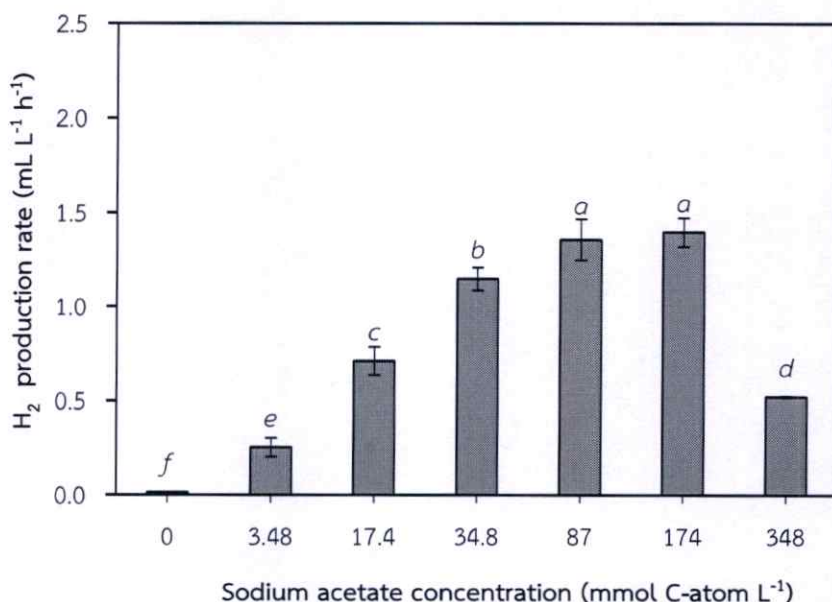
เพราะว่าน้ำตาลที่ใช้ทดสอบเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ที่มีคาร์บอน 6 และ 12 อะตอม สาหร่ายจึงดูดซึมน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ได้ยากกว่าอะซีเตทที่มีคาร์บอน 2 อะตอม อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้ยังพบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส ทำให้สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงรองลงมาจากการใช้ กรดอะซีติกและอะซีเตท อาจเป็นเพราะว่าสาหร่ายดูดซึมน้ำตาลกลูโคสได้ดีและมีวิถีเมแทบอลิซึมของ พลังงานที่เกิดจากการย่อยกลูโคสดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ กลูโคสจะ ถูกแคแทบอลิซึมด้วยปฏิกิริยาในวิถีไกลโคไลซิสและได้ ATP, NADH และไพรูเวตออกมาเป็น ผลิตภัณฑ์ จากนั้น ไพรูเวตจะเร่งปฏิกิริยาการสลายด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ไพรูเวตเพอร์ริดอกซิน ออกซิโดรีดักเทสและปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมา เพอร์ริดอกซินจะรับอิเล็กตรอนและส่งต่อไปยัง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้ผลิตไฮโดรเจนต่อไป (Catalanotti *et al.*, 2013) ทั้งนี้ความสามารถในการ ใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตไฮโดรเจนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่าย มีรายงานพบว่า การเติมน้ำตาลกลูโคสทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ตรึงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* เพิ่มขึ้น (Song *et al.*, 2011) ส่วนการเติมกรดอะซีติกลงในอาหาร ASW ช่วยให้ผลผลิตไฮโดรเจนของ สาหร่าย *C. pyrenoidosa* เพิ่มขึ้น 20 เท่า (He *et al.*, 2015)

จากผลการทดลองนี้พบว่า กรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต ไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 แต่การศึกษาผลของความเข้มข้นของกรด อะซีติกต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติกทำได้ยาก เนื่องจากการเพิ่ม ความเข้มข้นของกรดอะซีติกจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้อาหารมีฤทธิ์ เป็นกรดมากขึ้น จากผลการทดลองในตารางที่ 4.3 พบว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีโซเดียมอะซีเตท มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนรองลงมาจากสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีกรดอะซีติก ดังนั้น ในการศึกษา ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน จึงเลือกใช้โซเดียมอะซีเตท เป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้กรดอะซีติก

4.4.5.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งโซเดียมอะซีเตทต่อการผลิตไฮโดรเจนของ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N-C ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออนเท่ากับ 90 ไมโครโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของโซเดียม อะซีเตทตั้งแต่ 0, 3.48, 8.7, 17.4, 34.8, 87, 174 และ 348 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร มา วิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตทจนถึง 174 มิลลิโมล คาร์บอนอะตอมต่อลิตรทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายเพิ่มขึ้น โดยสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตท 174 มิลลิโมล คาร์บอนอะตอมต่อลิตรภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีอัตราการผลิต ไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1.396 ± 0.076 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.11) ซึ่งไม่แตกต่างกันมี

นัยสำคัญกับอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตท 87 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ที่มีค่าเท่ากับ 1.355 ± 0.110 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง เมื่อบ่มในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตทเท่ากับ 348 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ในขณะที่สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำสุดเมื่อทำการบ่มเซลล์ในอาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 4.11)



รูปที่ 4.11 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตทภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

จากการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตทที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 พบว่า สาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตทเพิ่มขึ้นถึง 174 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ส่งผลให้สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.11) เนื่องจากโซเดียมอะซิเตทที่มีอยู่ในปริมาณมากในอาหารจะแตกตัวได้อะซิเตท ทำให้เซลล์สาหร่ายสามารถดูดซึมอะซิเตทเข้าสู่เซลล์ได้เพิ่มขึ้น อะซิเตทจะถูกเร่งปฏิกิริยาการสลายเป็นอะซีติล-โคเอนไซม์เอ เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกและวัฏจักรไกลออกซีเลท โดยระหว่างกระบวนการจะมีอิเล็กตรอนถูกปลดปล่อยออกมา เมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ อิเล็กตรอนที่มีอยู่มากภายในเซลล์จะถูกส่งไปยังเฟอร์ริดอกซิน และส่งต่อไปให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำให้สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Atteia et al., 2013; Jurado-

Oiller *et al.*, 2015) นอกจากนี้ อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตต อาจเป็นผลมาจากการลดลงของปริมาณออกซิเจนภายในเซลล์เนื่องจากออกซิเจนถูกใช้ในกระบวนการหายใจมากขึ้นจากระบวนการสลายแหล่งคาร์บอนที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่พบว่า อัตราการหายใจของสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* สูงขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตตเป็น 40 มิลลิโมลาร์ (Wang *et al.*, 2011)

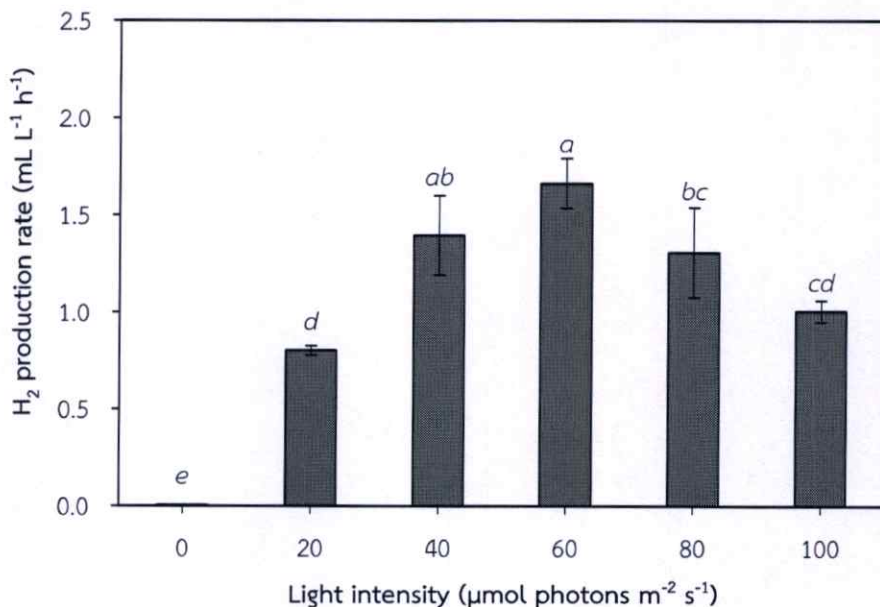
จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตต 348 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร มีผลยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายลดลง 2.7 เท่า เปรียบเทียบกับอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (รูปที่ 4.9) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าโซเดียมที่ละลายอยู่ในอาหารจำนวนมาก ส่งผลให้อาหารมีความเข้มข้นของไอออนบวกมาก จนทำให้เซลล์สาหร่ายไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ ในขณะที่ความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตตที่ต่ำกว่า 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารปกติ มีผลทำให้เซลล์สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนลดลงเนื่องจากมีสปีสเตรทของแหล่งอิเล็กตรอนไม่เพียงพอสำหรับการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ ผลการทดลองยังพบว่า สาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหารที่ไม่เติมโซเดียมอะซีเตต ดังนั้น ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนจึงจัดเป็นปัจจัยสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว และความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตตที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 คือ 174 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สามารถสรุปได้ว่า อาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์และมีความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตต 174 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตรเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และตั้งชื่ออาหารสูตรที่เหมาะสมนี้ว่า อาหาร Optimized TAP-N ในการทดลองต่อจากนี้ จะทำการศึกษาความเข้มแสงและรูปแบบการให้แสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร Optimized TAP-N

4.4.6 ผลของความเข้มแสงและรูปแบบการให้แสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

4.4.6.1 ผลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการบ่มในอาหาร TAP-N-C ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เติมโซเดียมอะซีเตตให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 174 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร นำเซลล์ไปเหนี่ยวนำการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่

ปราศจากอากาศ และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที วิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนเปรียบเทียบกับเซลล์ที่บ่มในที่มืด จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในที่มืด มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุด แต่ในสภาวะที่มีแสง สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่บ่มในสภาวะมืดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อบ่มในสภาวะที่มีความเข้มแสงเพิ่มขึ้น สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นและมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 1.663 ± 0.129 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อบ่มในสภาวะที่มีความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงเมื่อบ่มในสภาวะที่มีความเข้มแสงสูงกว่า 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (รูปที่ 4.12)



รูปที่ 4.12 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหารสูตรที่เหมาะสม (Optimized TAP-N medium) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ โดยแปรผันความเข้มแสง (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

ในการศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สาหร่ายที่บ่มในสภาวะมืดมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าสาหร่ายที่บ่มในที่ที่มีแสงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายชนิดนี้ผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง เมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายภายใต้สภาวะความเข้มแสงต่ำ สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำ (รูปที่ 4.12) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าเซลล์สาหร่ายถูกจำกัดการให้แสง (Light limitation) ส่งผลให้การดูดซับพลังงานแสงของหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ลดลง อิเล็กตรอนที่ถูกให้ปลดปล่อยออกจาก

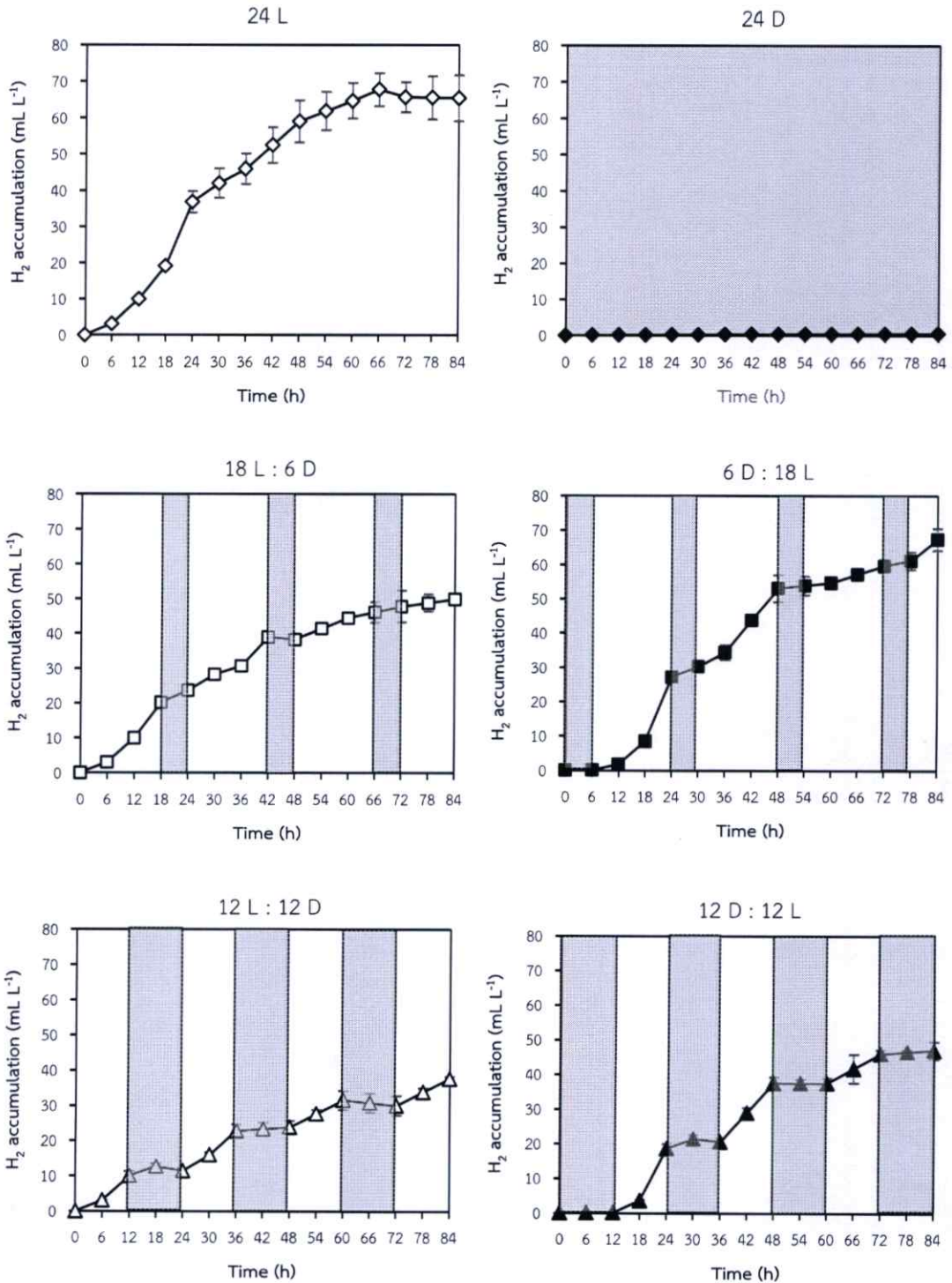
โมเลกุลของคลอโรฟิลล์จึงมีปริมาณลดลง โดยอิเล็กตรอนจะถูกถ่ายทอดผ่านตัวรับอิเล็กตรอนต่างๆ ในระบบแสงและส่งไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน เมื่ออิเล็กตรอนที่ใช้เป็นสับสเตรท สำหรับการผลิตไฮโดรเจนมีปริมาณน้อย ทำให้สาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนลดลง (Kim *et al.*, 2006; Antal *et al.*, 2016) การเพิ่มความเข้มแสงทำให้สาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น โดยสาหร่ายมี อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดภายใต้สภาวะความเข้มแสงเท่ากับ 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตร ต่อวินาที (รูปที่ 4.12) ทั้งนี้เป็นเพราะว่า ความเข้มแสงที่มากขึ้นส่งผลให้เซลล์มีความเข้มข้นของ คลอโรฟิลล์สูงขึ้น (Kim *et al.*, 2006) และกระตุ้นปริมาณอิเล็กตรอนที่เกิดจากปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองให้ผลิตเพิ่มขึ้น อิเล็กตรอนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะถ่ายทอดผ่านตัวรับอิเล็กตรอนต่างๆ ไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือเฟอร์รีดอกซิน และส่งต่อไปให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน อย่างไรก็ตาม การแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองนอกจากจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นอิเล็กตรอนแล้ว ยังได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจนและโปรตอนอีกด้วย เมื่อบ่มเซลล์ในสภาวะที่มีความเข้มแสงที่สูงกว่า 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที จึงทำให้สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง (รูปที่ 4.2) เนื่องจากออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Wang *et al.*, 2011) นอกจากนี้ ความเข้มแสงสูงทำให้เกิดการยับยั้งด้วยแสง (Photo-inhibition) จากโปรตีนของระบบแสงที่ถูกทำลายและปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลง (Kim *et al.*, 2006; Antal *et al.*, 2016) ทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายลดลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานที่พบมาก่อนหน้านี้ว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มภายใต้สภาวะความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เนื่องจากเป็นความเข้มแสงที่เหมาะสมที่ทำให้เซลล์มีอัตราการผลิตออกซิเจนต่ำ และเข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจนได้อย่างรวดเร็วภายใต้การขาดซัลเฟอร์ (Wang *et al.*, 2011) จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า ความเข้มแสงมีอิทธิพลต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 โดยสาหร่ายจะมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อทำการควบคุมความเข้มแสงให้ต่ำกว่าระดับความเข้มแสงที่อิ่มตัว ดังนั้นจึงเลือกสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที มาศึกษาารูปแบบการให้แสงที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.4.6.2 ผลของรูปแบบการให้แสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

Chlorella sp. LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหารที่เหมาะสมภายใต้สภาวะการให้แสงที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที มาทำการแปรผันรูปแบบการให้แสง 6 รูปแบบดังนี้ (1) การบ่มเซลล์ในที่มีแสงต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง (2) การบ่มเซลล์ในที่มีมืดต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง (3) การบ่มเซลล์ในที่มีแสง 18 ชั่วโมงสลับกับในที่มีมืด 6 ชั่วโมง (4) การบ่มเซลล์ในที่มีมืด 6 ชั่วโมงสลับกับในที่มีแสง 18 ชั่วโมง (5) การบ่มเซลล์ในที่มีแสง 12 ชั่วโมงสลับกับในที่มีมืด 12 ชั่วโมง และ (6) การบ่มเซลล์ในที่มีมืด 12 ชั่วโมงสลับกับในที่มีแสง 12 ชั่วโมง ทำการวัดการผลิตไฮโดรเจนทุก 6 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดโดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด 1.661 ± 0.054 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมงในชั่วโมงที่ 24 ของการบ่มเซลล์ และมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 67.764 ± 4.488 มิลลิลิตรต่อลิตรในชั่วโมงที่ 66 ของการบ่มเซลล์ (รูปที่ 4.13) ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มในที่มีมืดต่อเนื่องตลอดระยะเวลา 84 ชั่วโมงมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนต่ำมาก โดยมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเพียง 0.494 ± 0.057 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูปที่ 4.13) ภายใต้สภาวะการบ่มในที่มีแสงสลับมืดหรือมืดสลับแสงนั้น เซลล์ที่อยู่ในสภาวะที่มีแสงจะมีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น แต่เซลล์บ่มในที่มีมืดจะผลิตไฮโดรเจนได้น้อยลง โดยอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายในสภาวะการบ่มที่ให้แสงสลับมืดหรือมืดสลับแสงมีค่าต่ำกว่าสาหร่ายในสภาวะที่ให้แสงต่อเนื่อง (รูปที่ 4.13)

จากการศึกษารูปแบบการให้แสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 พบว่าการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะการให้แสงต่อเนื่อง โดยเซลล์จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดในช่วง 6 ถึง 24 ชั่วโมงแรกของการบ่ม (รูปที่ 4.13) และมีการผลิตไฮโดรเจนในระยะยาวได้นานถึง 66 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้าม สาหร่ายที่บ่มในที่มีมืดอย่างต่อเนื่องมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนต่ำมากเมื่อเทียบกับในสภาวะที่มีแสง แสดงให้เห็นว่าแสงเป็นปัจจัยสำคัญของการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว โดยสาหร่ายจะใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำให้เกิดอิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองและเกิดการสลายแบ่งมาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน (Melis and Happe, 2001; Hemschemeier *et al.*, 2009)



รูปที่ 4.13 ปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหารสูตรที่เหมาะสม (Optimized TAP-N medium) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศโดยแปรผันรูปแบบการให้แสงต่างๆ โดยสัญลักษณ์ L และพื้นหลังสีขาวแสดงถึงการบ่มในที่ที่มีแสงที่มีความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และสัญลักษณ์ D และพื้นหลังสีดำแสดงถึงการบ่มในที่มืด

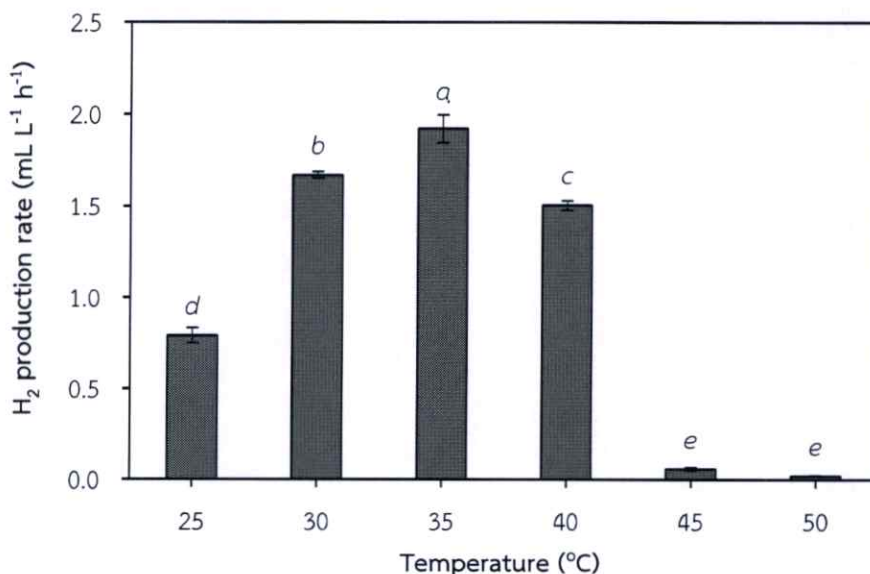
ในสภาวะการให้แสงสลั้มิตหรือมิตสลั้มิตแสง สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าเซลล์ที่บ่มในสภาวะการให้แสงอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 4.13) เนื่องจากการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจะลดลงเมื่ออยู่ในที่มืด แต่การผลิตไฮโดรเจนจะเพิ่มขึ้นเมื่อให้แสงสว่าง โดยทั่วไป กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวสามารถแบ่งตามวิธีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในระบบแสงได้ 2 แบบ คือ การผลิตไฮโดรเจนที่ขึ้นกับระบบแสงสอง (PSII dependent) และการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่ขึ้นกับระบบแสงสอง (PSII independent) (Melis and Happe, 2001; Chochois *et al.*, 2009) ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่ขึ้นกับระบบแสงสองนั้น อิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจะได้อาจมาจากปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำในกระบวนการสังเคราะห์แสง ส่วนการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่ขึ้นกับระบบแสงสองนั้น อิเล็กตรอนจะได้รับจากการสลายแป้งที่เก็บสะสมไว้ในเซลล์ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสลายแป้งภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง (Noth *et al.*, 2013) ในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 อิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองมากกว่าอิเล็กตรอนจากการสลายแป้งจึงพบการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ที่บ่มในที่มืดสูงกว่าในที่มืด จากผลการผลิตไฮโดรเจนใน 12 ชั่วโมงของการบ่มเซลล์พบว่า สาหร่ายที่ให้แสงสลั้มิตหรือมิตสลั้มิตแสงใช้ระยะเวลาปรับตัวในการผลิตไฮโดรเจนนานกว่าเซลล์ที่ให้แสงอย่างต่อเนื่อง จะเห็นได้ว่าเซลล์ที่ได้รับแสงต่อเนื่องมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดในช่วงเริ่มต้นของการบ่ม ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะมีประสิทธิภาพสูงสุดในระยะเริ่มต้นของการบ่ม โดยเซลล์มีสัดส่วนเทรทที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนอยู่เป็นจำนวนมาก ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งพบว่า การให้แสงต่อเนื่องเป็นรูปแบบการให้แสงที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *C. reinhardtii* และสภาวะการให้แสง 18 ชั่วโมงสลั้มิตกับในที่มืด 6 ชั่วโมงเป็นสภาวะที่ดีที่สุดในรูปแบบการสลั้มิตแสง แต่ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดยังต่ำกว่าในสภาวะที่มีแสงต่อเนื่อง โดยสภาวะการให้แสงสลั้มิตมีผลต่อระยะเริ่มต้นของการผลิตไฮโดรเจน (Lag time) นานขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการให้แสงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเซลล์จะผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีแสงแต่จะไม่ผลิตไฮโดรเจนเมื่ออยู่ในที่มืด (Oncel and Sukan, 2011)

จากการทดลองพบว่า ระยะเวลาของการให้แสงสลั้มิตมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ด้วยเช่นกัน (รูปที่ 4.13) สาหร่ายที่บ่มภายใต้การให้แสงสลั้มิตหรือมิตสลั้มิตสว่างเป็นระยะเวลา 18:6 และ 6:18 ชั่วโมง มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่บ่มภายใต้การให้แสงสลั้มิตหรือมิตสลั้มิตสว่างเป็นระยะเวลา 12:12 ชั่วโมง ในที่มืดของการให้แสงสลั้มิต สาหร่ายจะมีการผลิตไฮโดรเจนต่ำ (รูปที่ 4.13) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเซลล์ต้องการพลังงานแสงเพื่อใช้ในการผลิตไฮโดรเจน การเพิ่มระยะเวลาการบ่มเซลล์ในที่มืดให้นานขึ้นทำให้อิเล็กตรอนที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์แสงเพื่อใช้สำหรับการผลิตไฮโดรเจนต่ำลงด้วย ถึงแม้ว่าเซลล์ที่อยู่ในช่วงที่ไม่มีแสงสว่างจะมีปริมาณออกซิเจนลดลงเนื่องจากไม่เกิดกระบวนการสังเคราะห์แสง

และออกซิเจนจะถูกใช้ในกระบวนการหายใจของเซลล์ แต่การย้ายเซลล์ไปบ่มในที่มืดหลังจากการให้แสงทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้ จากการทดลองยังพบว่าในช่วงท้ายของการบ่มเซลล์สาหร่ายในที่มืด 6 ชั่วโมงสลับแสง 18 ชั่วโมง สาหร่ายมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดใกล้เคียงกับสถานะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 4.13) ดังนั้น ระยะเวลาการให้แสงสลับมืดที่เหมาะสมจะทำให้การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสูงขึ้นได้ ถึงแม้ว่าสาหร่ายที่บ่มในที่มืด 6 ชั่วโมงสลับแสง 18 ชั่วโมง จะมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงใกล้เคียงกับสถานะการให้แสงต่อเนื่อง แต่เซลล์ยังใช้ระยะเวลาการปรับตัวในการผลิตไฮโดรเจนในช่วงเริ่มต้นนานกว่า ดังนั้น จึงคัดเลือกสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที มาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.4.7 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มาเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วทำการบ่มเซลล์ในอาหารสูตร TAP-N-C ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เติมนิโคเตียมอะซีเตทให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 174 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร นำเซลล์ไปเหนี่ยวนำการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ ทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสถานะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยแปรผันอุณหภูมิการบ่มเท่ากับ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน จากการทดลองพบว่า การเพิ่มอุณหภูมิการบ่มเซลล์ทำให้สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นจนถึงที่อุณหภูมิการบ่ม 35 องศาเซลเซียส สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยมีค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 1.921 ± 0.076 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.14) การเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส ทำให้สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง โดยที่อุณหภูมิการบ่มเท่ากับ 45 และ 50 องศาเซลเซียส สาหร่ายจะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.14)



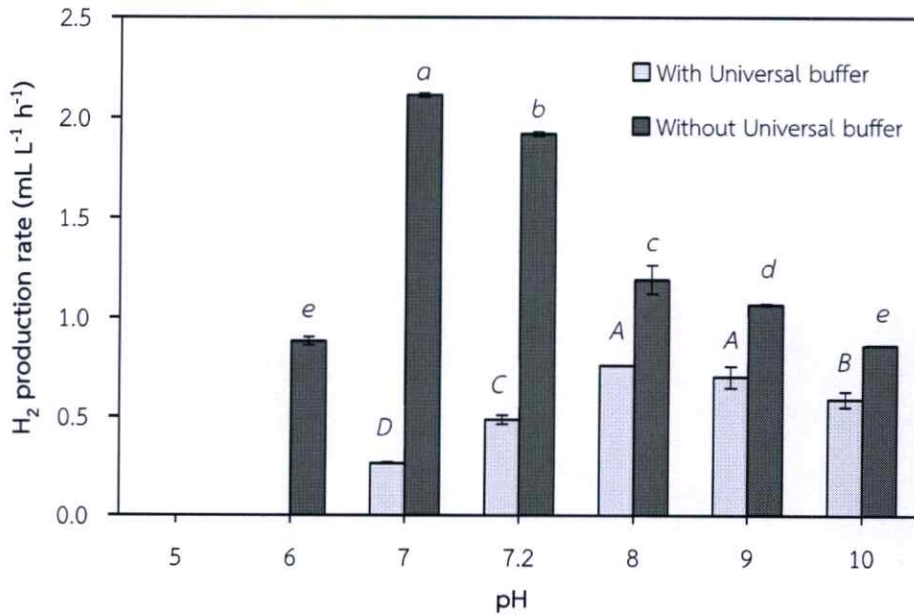
รูปที่ 4.14 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหารสูตรที่เหมาะสม (Optimized TAP-N medium) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศในที่มีความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยแปรผันอุณหภูมิการบ่มเซลล์ (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 พบว่าเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สาหร่ายจะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจาก กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นจากการทำงานที่อุณหภูมิที่เหมาะสม แต่ในสภาวะที่อุณหภูมิการบ่มต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Song *et al.*, 2011) สาหร่ายจึงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำ จากการทดลองยังพบอีกว่า ที่อุณหภูมิการบ่ม 45 และ 50 องศาเซลเซียส สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เป็นเพราะว่าเซลล์สาหร่ายไม่สามารถปรับตัวให้มีกิจกรรมของเอนไซม์สำหรับเมแทบอลิซึมต่างๆ ได้เหมือนเดิม โดยสังเกตได้จากลักษณะสีของสาหร่ายในขวดเพาะเลี้ยงจะกลายเป็นสีเหลืองจากการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานที่พบว่า อุณหภูมิการบ่ม 36 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) แต่ตรงข้ามกับสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ที่พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมของกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสคือ 60 องศาเซลเซียส (Happe and Naber, 1993) ดังนั้น จึงเลือกอุณหภูมิการบ่มสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสมาศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.4.8 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

Chlorella sp. LSD-W2

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และบ่มเซลล์ในอาหารสูตร TAP-N-C ที่มีความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 90 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหาร Optimized TAP-N ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตท 174 มิลลิโมลาร์ และปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 5, 6, 7, 7.2, 8, 9 และ 10 ในบัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล (Universal buffer) ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 25 มิลลิโมลาร์ ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารโดยไม่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล จากนั้น นำเซลล์ไปเหนี่ยวนำให้ผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ โดยทำการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน จากการทดลองพบว่า ภายหลังจากการบ่มเซลล์ในสภาวะที่ปราศจากอากาศไปแล้ว 24 ชั่วโมง สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหารที่ปรับพีเอชในบัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าสาหร่ายที่ปรับพีเอชในอาหารที่ไม่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล ประมาณ 1.5 ถึง 7.8 เท่า (รูปที่ 4.15) โดยในชุดการทดลองที่ไม่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัลพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.116 ± 0.010 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อทำการบ่มเซลล์ในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 แต่จะไม่พบการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ที่บ่มในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 (รูปที่ 4.15) ในขณะที่ชุดการทดลองที่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อทำการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นอาหารเท่ากับ 8.0 (รูปที่ 4.15) ในการทดลองยังพบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารระหว่างการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นโดยไม่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล ค่าพีเอชของอาหารจะเพิ่มขึ้นจากค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 0.4 ถึง 0.8 ในขณะที่พีเอชของอาหารที่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัลจะเพิ่มขึ้นน้อยกว่า โดยมีค่าพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้นจากค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 0.1 ถึง 0.3 เท่านั้น (ตารางที่ 4.4)



รูปที่ 4.15 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหารสูตรที่เหมาะสม (Optimized TAP-N medium) ที่แปรผันพีเอชเริ่มต้น โดยกราฟแท่งสีเทาเข้มแสดงถึงชุดการทดลองที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารในบัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล และกราฟแท่งสีเทาอ่อนแสดงถึงชุดการทดลองที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารโดยไม่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล แต่ใช้กรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการปรับค่าพีเอช (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

ตารางที่ 4.4 ค่าพีเอชเริ่มต้นและค่าพีเอชหลังจาก 24 ชั่วโมงของอาหารที่ใช้และไม่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล

พีเอชที่ต้องการ	อาหารที่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล		อาหารที่ไม่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล	
	พีเอชเริ่มต้น	พีเอชชั่วโมงที่ 24	พีเอชเริ่มต้น	พีเอชชั่วโมงที่ 24
5.0	5.03 ± 0.04	5.30 ± 0.01	5.01 ± 0.01	5.50 ± 0.01
6.0	6.03 ± 0.01	6.13 ± 0.01	6.03 ± 0.01	6.85 ± 0.00
7.0	7.02 ± 0.02	7.08 ± 0.02	7.04 ± 0.01	7.78 ± 0.02
7.2	7.24 ± 0.02	7.34 ± 0.06	7.23 ± 0.01	7.96 ± 0.01
8.0	8.03 ± 0.02	8.15 ± 0.00	8.00 ± 0.03	8.65 ± 0.00
9.0	9.04 ± 0.00	9.18 ± 0.01	9.00 ± 0.04	9.41 ± 0.00
10.0	10.04 ± 0.03	10.13 ± 0.03	10.02 ± 0.01	10.35 ± 0.04

ในการทดลองนี้ ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัลในการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร เนื่องจากบัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัลสามารถควบคุมพีเอชได้ในช่วงกว้างตั้งแต่พีเอช 2.0 ถึง 12.0 (Lopez, 2001) ทำให้สามารถใช้บัฟเฟอร์เพียงระบบเดียวในการควบคุมค่าพีเอชของอาหารได้ โดยการใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัลจะช่วยทำให้ค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงคงที่หรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย จากผลการทดลองในรูปที่ 4.15 พบว่าการใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล ในการควบคุมพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง มีผลทำให้สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ได้ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัลในการควบคุมพีเอช ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสารละลายบัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัลเป็นบัฟเฟอร์ที่สามารถควบคุมพีเอชได้ในช่วงกว้าง และมีองค์ประกอบของสารหลายชนิดประกอบไปด้วยกรดซิตริก (Citric acid) โพแทสเซียมฟอสเฟต (Potassium phosphate) โซเดียมเตตระโบเรต (Sodium tetraborate) ทริส (Tris) และโพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride) ซึ่งปริมาณเกลือและไอออนที่ได้จากการแตกตัวของสารในบัฟเฟอร์ Universal มีผลต่อทำให้เกิดแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) สมดุลของไอออนภายในเซลล์และกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์สาหร่าย (Maneeruttanarungroj and Phunpruch, 2017) มีรายงานการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัลในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* (Taikhao et al., 2015) และมีรายงานผลของพีเอชต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิด ได้แก่ บัฟเฟอร์อะซิเตท (Acetate buffer) บัฟเฟอร์ซิเตรท (Citrate buffer) และบัฟเฟอร์ทริส (Tris buffer) ในควบคุมพีเอชแต่ละช่วง (Maneeruttanarungroj et al., 2010)

จากการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ไม่เติมบัฟเฟอร์ Universal พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 อยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง (พีเอช 7.0 และ 7.2) (รูปที่ 4.15) โดยสาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0 และภายหลังจากการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงจะเพิ่มขึ้นเป็น 7.78 (ตารางที่ 4.4) ค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นในช่วงการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจากในกระบวนการสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียวสามารถใช้อะซิเตทในอาหารเพาะเลี้ยงในกระบวนการหายใจของเซลล์และเป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน (Melis et al., 2000; Wang et al., 2011) โดยโซเดียมอะซิเตทที่ละลายในอาหารจะแตกตัวให้โซเดียมไอออน (Na^+) และอะซิเตทไอออน (CH_3COO^-) จากนั้น CH_3COO^- จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้เป็นไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงมีค่าเป็นเบสเพิ่มขึ้น (Kosourov et al., 2003)

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่สูงขึ้น ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 7.0 ถึง 7.2 เนื่องจากเป็นพีเอชที่เหมาะสม โดยทำให้ระยะเวลาการปรับตัวเข้าสู่กระบวนการผลิตไฮโดรเจนเร็วขึ้น (Antal et al., 2016) ในช่วงค่าพีเอชเป็นกลางเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว โดยมีรายงานพบว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* มีกิจกรรมของ

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงพีเอชตั้งแต่ 7.0 ถึง 7.4 (Kosourov *et al.*, 2003) ในการทดลองนี้ สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารมีค่าเท่ากับ 6.0 และสาหร่ายไม่มีการผลิตไฮโดรเจนในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ทั้งนี้เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสถูกยับยั้งในช่วงพีเอชเป็นกรด (Kosourov *et al.*, 2003) และที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 โปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์สาหร่ายเสียหาย และส่งผลให้สาหร่ายไม่สามารถมีชีวิตต่อไปได้ สังเกตได้จากสีของสาหร่ายที่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง หลังจากการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายแต่ละชนิดของสาหร่ายสีเขียวแตกต่างกัน สาหร่ายสีเขียว *Chlorococcum littorale* ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่พีเอช 7.5 (Schnackenberg *et al.*, 1996) ในขณะที่สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 (Maneeruttanarungroj and Phunpruch, 2017) จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า การปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมในช่วงการผลิตไฮโดรเจนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายได้ โดยที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 24 ของการบ่มในสภาวะปราศจากอากาศ ในการทดลองต่อไป จึงเลือกใช้สาหร่ายสีเขียวที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 โดยปรับพีเอชในอาหารที่ไม่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัลมาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับและสภาวะปกติต่อไป

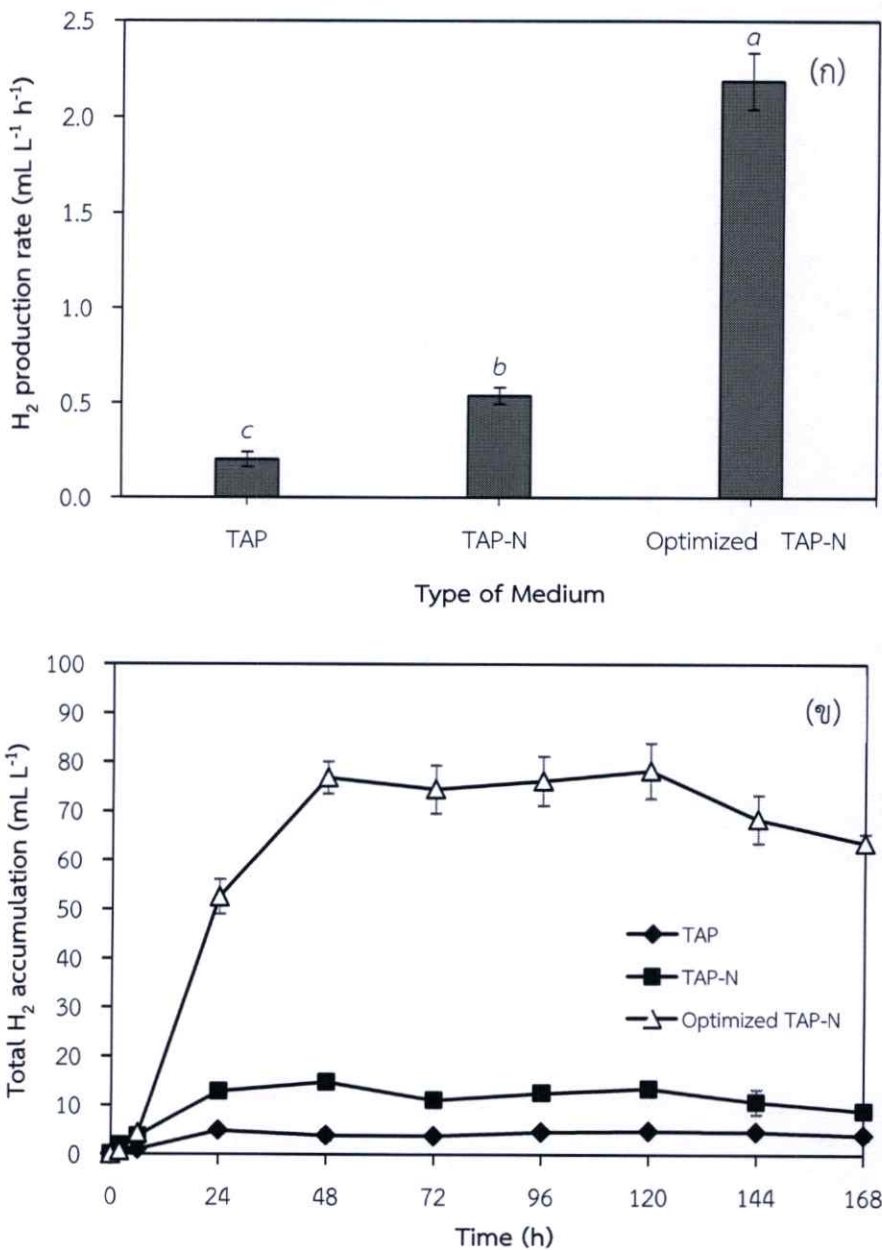
4.4.9 การเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในสภาวะที่เหมาะสมและสภาวะปกติ

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มาเพาะเลี้ยงและบ่มในอาหารชนิดต่างๆ คือ (1) อาหาร TAP (2) อาหาร TAP-N และ (3) อาหารสูตรที่เหมาะสม (Optimized TAP-N) และโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนเทียบกับสภาวะปกติ (ตารางที่ 4.5) เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.188 ± 0.147 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อทำการบ่มเซลล์ในอาหาร Optimized TAP-N ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร 7.0 ภายใต้สภาวะการให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโวลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-N ถึง 8 และ 3 เท่า ตามลำดับ (รูปที่ 4.16ก) เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร Optimized TAP-N มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 78.239 ± 5.625 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้น การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจะไม่เพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 120 ของการบ่ม จากนั้น การผลิตไฮโดรเจนจะลดลง ซึ่งผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่เซลล์ผลิตได้มีค่าสูงกว่าในอาหาร TAP และ TAP-N ถึง 16 และ 5 เท่า ตามลำดับ (รูปที่ 4.16ข)

ตารางที่ 4.5 สภาวะที่ใช้ในการเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP อาหาร TAP-N และอาหาร Optimized TAP-N

สภาวะ	ชนิดของอาหาร		
	TAP	TAP-N	Optimized TAP-N
อายุเซลล์ (h)	36	36	36
การขาดแหล่งอาหาร	-	ไนโตรเจน	ไนโตรเจน
ชนิดของแหล่งคาร์บอน	กรดอะซีติก	กรดอะซีติก	โซเดียมอะซิเตท
ความเข้มข้นของชนิดของแหล่งคาร์บอน (mmol C-atom L ⁻¹)	34.8	34.8	174
ความเข้มข้นของเหล็กไอออน (μM)	18	18	90
ความเข้มแสง (μmol photon m ⁻² s ⁻¹)	40	40	60
อุณหภูมิ (°C)	30	30	35
พีเอชเริ่มต้นของอาหาร	7.2	7.2	7.0

จากการทดลองในรูปที่ 4.16ก พบว่า สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อบ่มในอาหาร Optimized TAP-N และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-N และอาหาร TAP ตามลำดับ จึงเป็นการสนับสนุนผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่บ่งชี้ว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนที่ได้ศึกษามาในหัวข้อก่อนหน้านี้ว่า ปัจจัยและสภาวะเหล่านี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ได้ จากการทดลองนี้ ยังพบว่า สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-N ประมาณ 3 เท่า แสดงให้เห็นว่าการขาดไนโตรเจนมีผลต่อการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายชนิดนี้ เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตไฮโดรเจนพบว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร Optimized TAP-N มีปริมาณไฮโดรเจนสะสมเพิ่มขึ้นจนถึง 120 ชั่วโมงของการบ่ม ซึ่งมากกว่าผลผลิตไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP และอาหาร TAP-N ภายใต้สภาวะปกติ จากการทดลองนี้ สรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารและปัจจัยภายนอกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 อย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.16 อัตราการผลิตไฮโดรเจน (ก) และปริมาณไฮโดรเจนสะสมทั้งหมด (ข) ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP อาหาร TAP-N และอาหาร Optimized TAP-N ภายใต้สภาวะการบ่มในช่วงการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

จากการเปรียบเทียบอัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 กับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* สายพันธุ์อื่นๆ ในสภาวะการเจริญและสภาวะการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกันได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6 จากรายงานการศึกษาโดยส่วนใหญ่พบว่า แหล่งไนโตรเจนมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Chlorella* โดยการจำกัดแหล่งไนโตรเจนร่วมกับการขาดซิลเฟออร์ทำให้สาหร่าย *Chlorella* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าการขาดแหล่งซิลเฟออร์เพียงชนิดเดียว (He et al., 2012; Pongpadung et al., 2015; He et al., 2015; Li et al., 2015; Zhang et al., 2015) ในการเปรียบเทียบพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเช่นเดียวกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella protothecoides* ในรายงานของ He และคณะ (2012) โดยมีสภาวะการบ่มภายใต้ความเข้มแสงใกล้เคียงกันคือประมาณ 35 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และการขาดซิลเฟออร์ชนิดเดียวไม่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. protothecoides* นอกจากนี้ ยังพบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella sorokiniana* ce ที่บ่มในอาหารที่ขาดซิลเฟออร์เพียงชนิดเดียว (Chader et al., 2009) สำหรับการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตททำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 สูงขึ้นเช่นเดียวกับการศึกษาของ Wang และคณะ (2011) ที่รายงานว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตทที่ระดับเหมาะสมทำให้เซลล์สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* มีอัตราการหายใจของเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ระบบเข้าสู่สภาวะปราศจากอากาศได้อย่างรวดเร็วภายหลังจากการขาดแหล่งอาหาร เมื่อพิจารณาผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่าย *Chlorella* แต่ละสายพันธุ์พบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 มีค่าผลผลิตไฮโดรเจนไม่สูงมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตไฮโดรเจนที่ได้รายงานไว้เป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 มีค่าสูงกว่าผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *C. pyrenoidosa* (Wang et al., 2011) และสาหร่าย *Chlorella* sp. IOAC707S (Batyrova et al., 2015) จากการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร Optimized TAP-N ภายใต้สภาวะการบ่มที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนและเหมาะสมต่อการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

ตารางที่ 4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 เปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* สายพันธุ์อื่นๆ ภายใต้สภาวะการเจริญและสภาวะการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน

สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	สภาวะการเจริญ	สภาวะการผลิตไฮโดรเจน	อัตราการผลิตไฮโดรเจน	ผลผลิตไฮโดรเจน	เอกสารอ้างอิง
<i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	TAP medium, 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 °C, pH 7.2	TAP-N medium (90 $\mu\text{M Fe}^{2+}$, 174 mmol C-atom L^{-1} sodium acetate), 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 35 °C, Initial pH 7.0	2.19 $\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$	78.24 mL L^{-1}	This study
<i>Chlorella sorokiniana</i> ce	TAP medium, 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 °C, pH 7.2	TAP-S medium, 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 °C, pH 7.2	1.35 $\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$	n.d.	Chader <i>et al.</i> , 2009
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	TAP medium, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 °C	TAP-S medium (40 mM sodium acetate), 30 $\mu\text{ photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$	n.d.	43.20 mL L^{-1}	Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>Chlorella</i> sp. NIER-10003	MA medium, 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 °C, pH 8.6, bubbled at a rate of 0.3 vvm, 5% (v/v) CO_2	Immobilized cell in agar, MA-S medium + 30 mM glucose, 40 °C	n.d.	238 mL L^{-1}	Song <i>et al.</i> , 2011
<i>Chlorella protothecoides</i>	TAP medium (0.35 mM NH_4Cl), 25 - 35 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (light:dark = 14:10), 25 °C, pH 7.3	TAP-S medium (0.35 mM NH_4Cl), 40 - 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 °C	2.19 $\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$	233.70 mL L^{-1}	He <i>et al.</i> , 2012
<i>Chlorella sorokiniana</i> KU204	TAP medium (7 mM NH_4Cl), 35 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (light:dark = 14:10), 25 °C, pH 7.3	TAP-S medium (0.7 mM NH_4Cl), 35 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (light:dark = 14:10), 25 °C	1.30 $\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$	90 mL L^{-1}	Pongpadung <i>et al.</i> , 2015

n.d. : not detected

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) อัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 เปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* สายพันธุ์อื่นๆ ภายใต้สภาวะการเจริญและสภาวะการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน

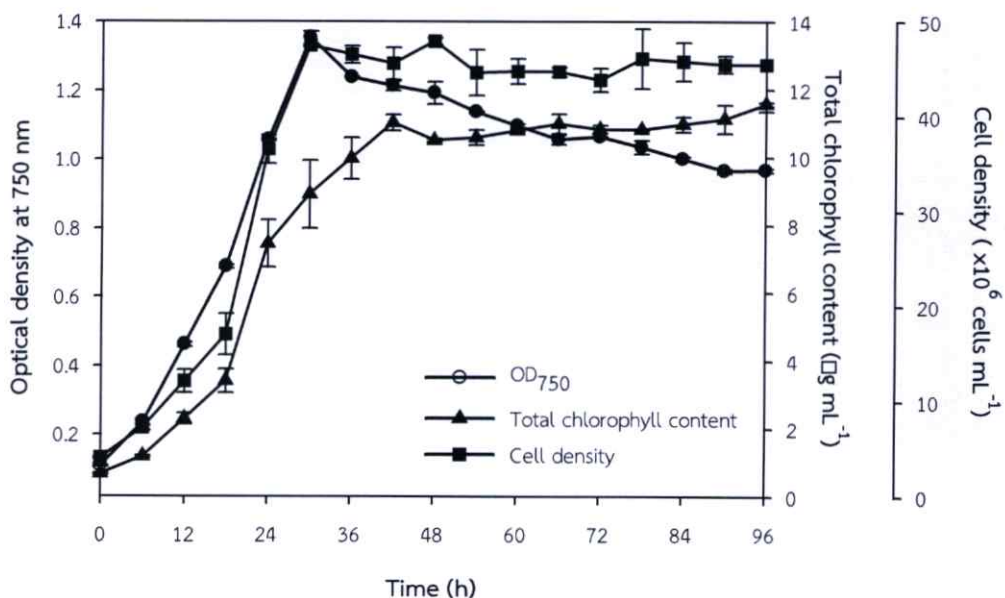
สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	สภาวะการเจริญ	สภาวะการผลิตไฮโดรเจน	อัตราการผลิตไฮโดรเจน	ผลผลิตไฮโดรเจน	เอกสารอ้างอิง
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> 707S	TAP medium (0.7 mM NH ₄ Cl), 25 - 35 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (light:dark = 14:10), 25 °C, pH 7.8	TAP-S medium (0.7 mM NH ₄ Cl), 35 - 45 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 °C	n.d.	98.82 mL L ⁻¹	He <i>et al.</i> , 2015
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> IOAC707S	L1+HAc-N medium (N-deprived L1 medium + 1 mL L ⁻¹ acetic acid), 25-30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 °C, pH 7.8	L1+HAc-N medium, 60-65 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 °C	0.55 mL mgchl ⁻¹ h ⁻¹	26.26 mL mgchl ⁻¹	Li <i>et al.</i> , 2015
<i>Chlorella protothecoides</i>	TAP medium (0.35 mM NH ₄ Cl), 30 - 35 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (light:dark = 14:10), 25 °C, pH 7.3	TAP-S medium (0.35 mM NH ₄ Cl), 30 - 35 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 °C	n.d.	82.20 mL L ⁻¹	Zhang <i>et al.</i> , 2015
<i>Chlorella</i> sp. IOAC707S	TAP/NaCl medium (TAP medium + 30 g L ⁻¹ NaCl), 25 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 28 °C, pH 7.2	TAP-P/NaCl medium + 10% (v/v) CO ₂ , 45 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 °C	n.d.	20 mL L ⁻¹	Batyrova <i>et al.</i> , 2015
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	TAP medium (2 g L ⁻¹ sodium acetate), 180 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 28 °C, pH 7.0	TCP medium (10 mM NaHCO ₃) + DCMU at 9 h after illumination, 180 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 28 °C, pH 7.0	n.d.	93.86 mL L ⁻¹	Liu <i>et al.</i> , 2016

n.d. : not detected

4.5 ผลการศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

4.5.1 ผลการเจริญของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน (Stirred tank bioreactor)

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มาเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank ขนาด 3 ลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 2 ลิตร ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.10.1 และทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยเซลล์ไปวัดค่าความขุ่นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ และความหนาแน่นของเซลล์จากการนับจำนวนเซลล์พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการเจริญเติบโตภายใน 6 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเข้าสู่ระยะ Logarithmic phase ในช่วง 30 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรสูงสุดเท่ากับ 1.353 และมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 4.75×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ) เท่ากับ 0.073 ต่อชั่วโมง จากนั้น สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตคงที่เข้าสู่ระยะ Stationary phase หลังชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.17) นอกจากนี้ ยังพบว่า สาหร่ายมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดเท่ากับ 11.033 ± 0.234 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 42 ชั่วโมง (รูปที่ 4.17)



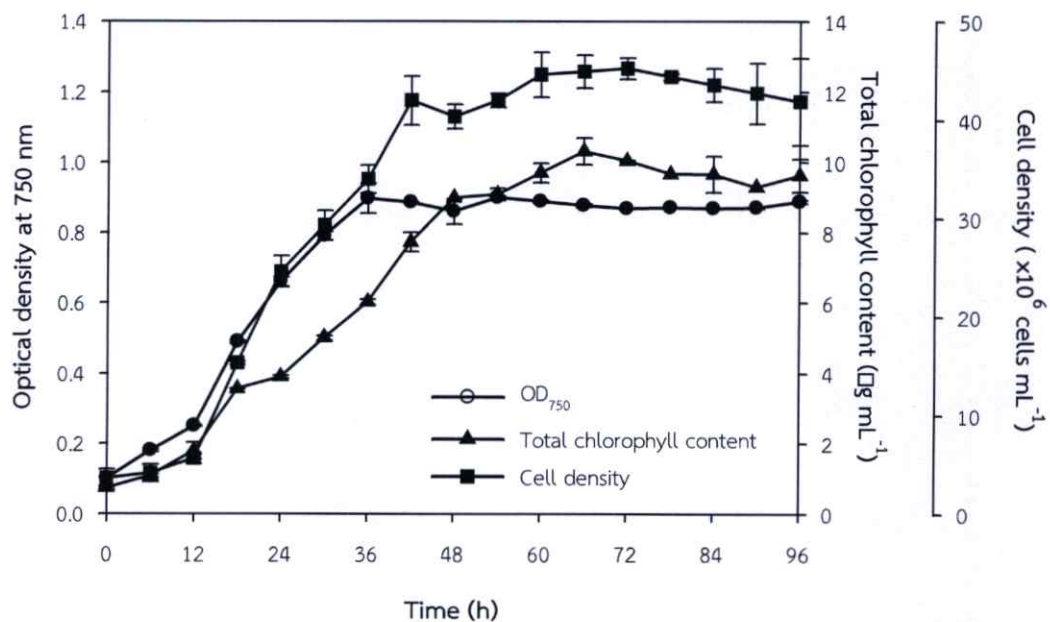
รูปที่ 4.17 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP 2 ลิตร ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank ขนาด 3 ลิตร จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (●) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (▲) และความหนาแน่นของเซลล์ (■)

จากผลของการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์สาหร่ายในระยะ Logarithmic phase มากกว่าเซลล์สาหร่ายที่เจริญในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ประมาณ 1.2 เท่า เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในถังปฏิกรณ์แบบ Stirred tank มีระบบการผสมโดยอาศัยชุดแกนกวนที่มี 2 ใบพัด และมีระบบการให้อากาศ ทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้เร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงที่ใช้แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar) ในการกวนผสม ในการทดลองนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 แบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก โดยใช้แสงฟลูออเรสเซนต์เป็นแหล่งพลังงานและใช้กรดอะซิติกที่เป็นสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน จึงทำให้สาหร่ายมีรูปแบบการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นเมื่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank เนื่องจากถังปฏิกรณ์นี้มีระบบการกวนที่ทำให้เซลล์สาหร่ายกับอาหารเพาะเลี้ยงผสมกันอย่างทั่วถึง สารอาหารและอากาศภายในถังปฏิกรณ์กระจายตัวสม่ำเสมอ และเซลล์สาหร่ายได้รับแสงในปริมาณที่เท่ากันในถังปฏิกรณ์ โดยสังเกตได้จากปริมาณคลอโรฟิลล์ที่เพิ่มขึ้นสูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 42 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสง โดยทั่วไปแล้ว การกวนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีผลต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียว การเพิ่มความเร็วในการกวนจะทำให้เซลล์สาหร่ายสัมผัสกับอาหารและอากาศผสมเท่ากันทุกๆ จุดในถังปฏิกรณ์มากขึ้น แต่ความเร็วในการกวนที่มากเกินไปจะส่งผลให้อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายลดลง เนื่องจากเซลล์สาหร่ายถูกทำลาย ในการทดลองนี้ใช้ความเร็วในการกวน 120 รอบต่อนาที ซึ่งอยู่ในความเร็วที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว (Oncel and Vardar-Sukan, 2009) นอกจากนี้ ถังปฏิกรณ์ยังมีระบบการให้อากาศจากด้านล่างของถังผ่านหัวพ่นอากาศ (Air sparger) ทำให้อากาศกระจายตัวอย่างทั่วถึงในถัง การเพาะเลี้ยงที่มีทั้งระบบการกวนและการให้อากาศจึงช่วยทำให้อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 สูงขึ้น ระยะเวลาในการปรับตัวในระยะ Lag phase สั้นลง สาหร่ายจึงเข้าสู่ระยะ Logarithmic phase ได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ ระบบการกวนจะช่วยป้องกันการตกตะกอนของเซลล์อีกด้วย

4.5.2 ผลการเจริญของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว (Air-lift bioreactor)

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มาเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 3 ลิตร ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.10.2 และทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยเซลล์ไปวัดค่าความขุ่นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ และความหนาแน่นของเซลล์จากการนับจำนวนเซลล์พบว่า สาหร่ายมีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้าใน 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นระยะที่สาหร่ายปรับตัวอยู่ในระยะ Lag phase จากนั้น สาหร่ายจะมี

อัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วอยู่ในระยะ Logarithmic phase ในช่วงชั่วโมงที่ 12 ถึงประมาณ ชั่วโมงที่ 36 โดยสาหร่ายมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรสูงสุดเท่ากับ 0.898 ใน ชั่วโมงที่ 36 และมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 4.20×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 42 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.18) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่ายมีค่าเท่ากับ 0.064 ต่อ ชั่วโมง หลังจากนั้น การเจริญเติบโตของสาหร่ายจะเริ่มคงที่เข้าสู่ระยะ Stationary phase ใน ชั่วโมง 48 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.18) จากการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่า เซลล์มีอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณคลอโรฟิลล์สอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงและความหนาแน่นเซลล์ โดย ปริมาณคลอโรฟิลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 4.18)



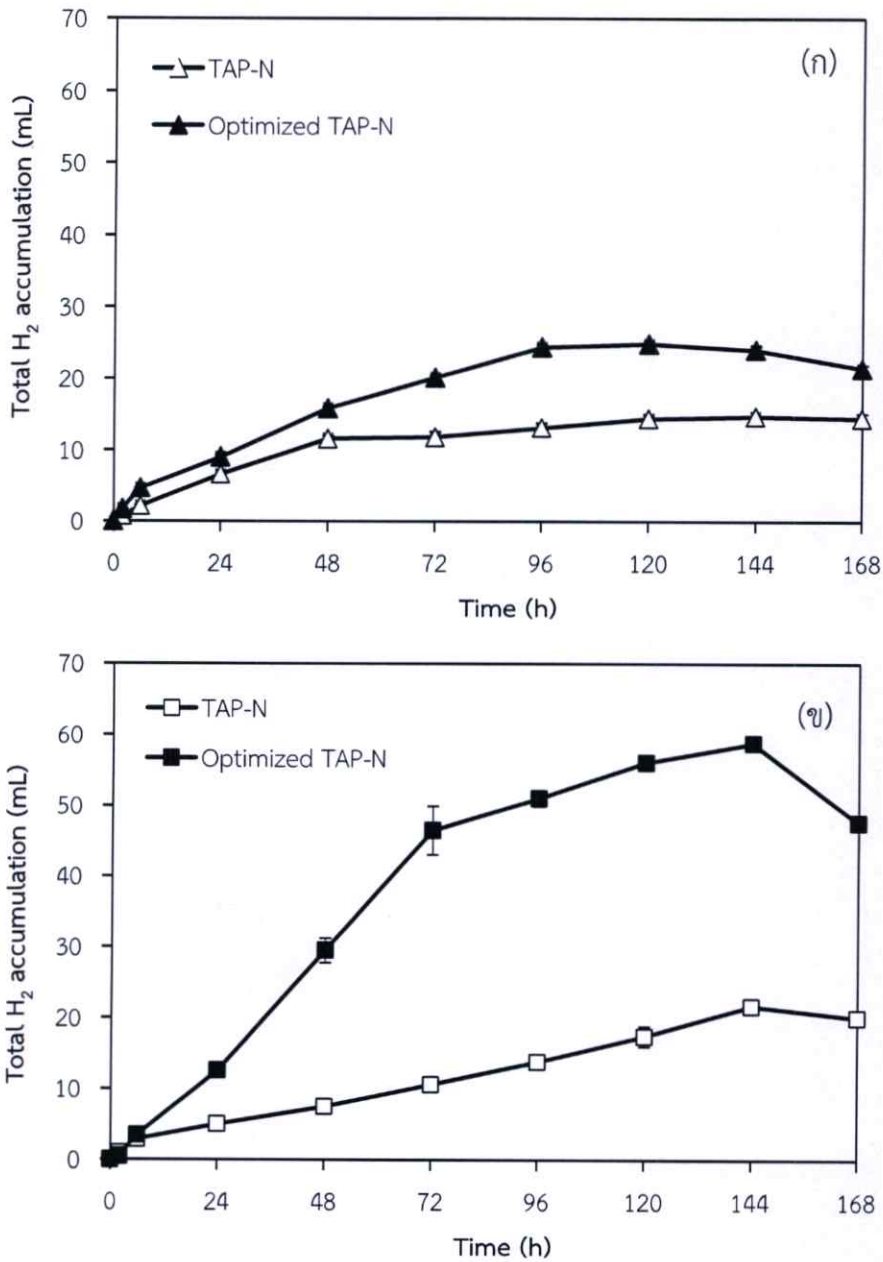
รูปที่ 4.18 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP 3 ลิตรที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.7 ลิตร จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (●) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (▲) และความหนาแน่นของเซลล์ (■)

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift เมื่อวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่าสาหร่ายใช้ระยะเวลาการปรับตัวในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงค่อนข้างช้าโดยใช้เวลาถึง 12 ชั่วโมง ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะน้อยกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank (ข้อ 4.5.1) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift มีการเพิ่มปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเป็น 3 ลิตร ขนาดของตัวถังที่ใหญ่ขึ้นทำให้สาหร่ายใช้เวลากการปรับตัวในอาหารเพาะเลี้ยงนานขึ้น ทั้งนี้การเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายจะขึ้นอยู่กับระบบการผสมในถังปฏิกรณ์ที่ทำให้เกิดสภาพการแขวนลอยอย่างสม่ำเสมอ โดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift เป็นถังหมักที่มีระบบการผสมแบบไม่มีการกวน แต่มีเพียงการให้อากาศ จึงทำให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญช้ากว่า

สาหร่ายที่เจริญในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift การไหลเวียนของสารแขวนลอยเซลล์เกิดจากการควบคุมแรงดันอากาศที่ผ่านท่อส่งผ่านอากาศ (Draft tube) ทำให้เซลล์สาหร่ายสัมผัสกับอาหารเพาะเลี้ยงได้อย่างทั่วถึง และเซลล์สามารถกระจายตัวให้รับแสงอย่างสม่ำเสมอส่งผลให้การสังเคราะห์แสงของสาหร่ายมีประสิทธิภาพ ข้อดีของการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบ Air-lift คือ มีแรงเฉือนต่ำเหมาะแก่การเพาะเลี้ยงเซลล์พืช (Skjånes *et al.*, 2016) มีรายงานวิจัยการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sorokiniana* (Kumar and Das, 2012) และสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* (Sadeghizadeh *et al.*, 2017)

4.5.3 ผลการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank และ Air-lift

งานวิจัยนี้ สนใจศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยนำสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในระดับเขย่ามาใช้ การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในอาหาร TAP ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแต่ละชนิดเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ก่อนนำมาบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-N ที่ขาดแหล่งคาร์บอนและมีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะการบ่มโดยการกวนหรือให้อากาศในถังปฏิกรณ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น ทำการเติมโซเดียมอะซิเตทที่ความเข้มข้น 174 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร และปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 ด้วยการทำงานของชุดควบคุมพีเอช ทำการพ่นก๊าซอาร์กอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือจนกว่าปริมาณออกซิเจนภายในระบบต่ำกว่า 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จากนั้น ปิดระบบการกวนและการให้อากาศ แล้วทำการบ่มภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-N จากการทดลองพบว่า ผลผลิตไฮโดรเจนทั้งหมดที่สาหร่ายผลิตได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift มีค่าสูงกว่าผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายในถังปฏิกรณ์แบบ Stirred tank (รูปที่ 4.19) โดยสาหร่ายที่บ่มในอาหาร Optimized TAP-N ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 9.298 ± 0.686 มิลลิลิตรต่อวัน และมีผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุด 58.757 ± 0.131 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 144 ของการบ่มเซลล์ ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-N มีผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 21.689 ± 0.682 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.19ข) จากการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank พบว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร Optimized TAP-N ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 4.072 ± 0.064 มิลลิลิตรต่อวัน และมีผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุด 24.871 ± 0.469 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 120 ของการบ่ม ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเพียง 14.709 ± 0.047 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 144 ของการบ่ม (รูปที่ 4.22ก)



รูปที่ 4.19 ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N (อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน) และอาหาร Optimized TAP-N (อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจนและมีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตท 174 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank (ก) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift (ข)

จากการเปรียบเทียบผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ระหว่างอาหาร Optimized TAP-N ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน กับอาหาร TAP-N ภายใต้สภาวะการบ่มปกติเป็นสภาวะควบคุม พบว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร Optimized TAP-N ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift มีการสะสมไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-N ถึง 2.7 เท่า (รูปที่ 4.19ข) ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มในอาหาร Optimized TAP-N ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank มีปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-N ประมาณ 1.7 เท่า (รูปที่ 4.19ก) แสดงให้เห็นว่าอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจากการศึกษาข้างต้น สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในระดับถังปฏิกรณ์เช่นเดียวกับระดับขวดเพาะเลี้ยง

การขยายขนาดการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่มีอาหารปริมาตร 3 ลิตร สามารถผลิตไฮโดรเจนสะสมเพิ่มขึ้นประมาณ 2.4 เท่าของการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank ที่มีอาหารปริมาตร 2 ลิตร แสดงให้เห็นว่าการผลิตไฮโดรเจนขึ้นกับชนิดและระบบของถังปฏิกรณ์ นอกจากนี้ พื้นที่ในการรับแสงของถังทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกัน โดยถังปฏิกรณ์แบบ Stirred tank จะมีพื้นที่รับแสงที่น้อยกว่าเนื่องจากถูกบดบังจากตัวล้อคูดทำความร้อน สังเกตได้จากรูปที่ 3.2 แต่ถังปฏิกรณ์แบบ Air-lift มีลักษณะทรงสูงและไม่มีสิ่งบดบังแสง ถึงแม้ว่าจะบ่มเซลล์ภายใต้ความเข้มแสงที่เท่ากัน แต่โอกาสที่เซลล์สาหร่ายจะสัมผัสกับแสงได้อย่างทั่วถึงแตกต่างกัน ดังนั้น พื้นที่การรับแสงจึงมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในการบ่มเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทั้ง 2 ชนิด เพื่อผลิตไฮโดรเจนจะต้องทำการพ่นอาร์กอนเพื่อทำให้ในถังเป็นระบบที่ปราศจากอากาศ หลังจากนั้น จะทำการปิดระบบการกวนและให้อากาศ ซึ่งมีผลให้เซลล์สาหร่ายเกิดการตกตะกอนที่ก้นถัง จึงทำให้เซลล์สาหร่ายดูดซับพลังงานแสงมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจนได้น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนในขวดเพาะเลี้ยงที่สามารถเขย่าไม่ให้เซลล์ตกตะกอน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank โดยการบ่มเซลล์ในอาหารสูตรที่เหมาะสมภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในระดับถังปฏิกรณ์ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ได้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยที่เก็บรวบรวมไว้ในห้องปฏิบัติการมาศึกษาการศึกษาศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน และนำสาหร่ายที่คัดเลือกมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร และขยายขนาดการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ สรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1) สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 ที่แยกได้จากน้ำทะเลของหาดแหลมเสด็จในจังหวัดจันทบุรี มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลทชนิดอื่นที่มีในห้องปฏิบัติการ โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.722 ± 0.028 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจน

2) จากการระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 โดยการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA พบว่าสาหร่ายมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.33 ± 0.77 ไมโครเมตร และจัดอยู่ในจีนัส *Chlorella* โดยตั้งชื่อสาหร่ายสีเขียวไอโซเลทนี้ว่า *Chlorella* sp. LSD-W2

3) จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 120 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ สรุปได้ดังนี้

3.1) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง ซึ่งจัดอยู่ในระยะกึ่งกลางของการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

3.2) การขาดแหล่งไนโตรเจนทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สูงขึ้น โดยมีค่าสูงกว่าการขาดแหล่งซัลเฟอร์หรือการขาดฟอสฟอรัส และมีค่าสูงกว่าการขาดแหล่งไนโตรเจนที่ร่วมกับการขาดแหล่งอาหารอื่นๆ

3.3) ความเข้มข้นของเหล็กไอออนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 คือ 90 ไมโครโมลาร์

3.4) ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 คือ กรดอะซิติกและโซเดียมอะซิเตท และพบว่าความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตทที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนคือ 174 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร โดยให้ค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจน 1.355 ± 0.110 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง

3.5) การเพิ่มความเข้มแสงทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 เพิ่มขึ้น โดยความเข้มแสงที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนคือ 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีและให้แสงต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง

3.6) อุณหภูมิการบ่มเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 คือ 35 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการบ่มเซลล์สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจะลดลงอย่างรวดเร็ว

3.7) พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 คือ 7.0 โดยไม่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัลในการปรับพีเอชของอาหาร

3.8) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด เมื่อบ่มเซลล์ในอาหารสูตรที่เหมาะสม (อาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน และมีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตท 174 มิลลิโมลาร์บอนอะตอมต่อลิตร) และสภาวะที่เหมาะสม (สภาวะที่ให้แสงต่อเนื้อที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสและค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0) โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.188 ± 0.147 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 78.239 ± 5.625 มิลลิลิตรต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 ของการบ่มเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* สายพันธุ์อื่นๆ พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella protothecoides* และมากกว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* สายพันธุ์อื่นๆ ประมาณ 1.6 ถึง 4 เท่า

4) จากการศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank และแบบ Air-lift สรุปได้ดังนี้

4.1) สาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบ Stirred tank มีการเจริญเติบโตสูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.073 และ 0.064 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

4.2) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายที่บ่มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank โดยสาหร่ายที่บ่มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 9.298 ± 0.686 มิลลิลิตรต่อวัน และมีผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 58.757 ± 0.131 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 144 ของการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) ภายใต้การขาดแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อพิจารณาผลผลิตไฮโดรเจนสะสมของเซลล์ในอาหารที่เหมาะสม (Optimized TAP-N medium) ที่มีการขาดแหล่งไนโตรเจนร่วมกับการเติมแหล่งคาร์บอน พบว่าสาหร่ายมีผลผลิตไฮโดรเจนสะสมไม่สูงมากนัก อาจเนื่องจากการขาดไนโตรเจนจะมีผลต่อการทำงานของคลอโรฟิลล์และระบบการสังเคราะห์แสง ดังนั้น จึงควรทำการศึกษาความ

เข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยอาจไม่จำเป็นต้องขาดแหล่งไนโตรเจน เพียงแค่จำกัดปริมาณไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือทดลองร่วมกับการขาดแหล่งอาหารชนิดอื่นๆ

2) เนื่องจากกลไกการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหารสูตรที่เหมาะสมและสภาวะการป่มที่เหมาะสมยังไม่ทราบแน่ชัด จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสง วิเคราะห์ปริมาณการสะสมแป้ง วิเคราะห์อัตราการหายใจระดับเซลล์ เพื่อให้เข้าใจกลไกการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่เหมาะสมของสาหร่ายชนิดนี้

3) ในการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพพบว่า สาหร่ายมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนไม่สูงนัก จึงควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirred tank และ Air-lift โดยการศึกษาการแปรผันสภาวะในถังปฏิกรณ์ เช่น อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ และความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ช่อลัดดา ผิวเพชร ธนพร เก็บไว้ และนราวดี รจนพันธ์. 2552. “การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากนาข้าวในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย.”
- โครงการพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ธรรมบุญ ศรีทะวงศ์. 2550. “ผลิตพลังงานไฮโดรเจนโดยกระบวนการเร่งปฏิกิริยาเคมี.” วารสารส่งเสริมและเทคโนโลยี. 34(195) : 136-143.
- รัชนีกร วันจันทร์ทิ. 2554. “แก๊สไฮโดรเจน : ความคาดหวังเพื่อเป็นแหล่งพลังงานที่ยั่งยืน.” วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 16(1) : 131-140.
- รัตนลักษณ์ หิรัญวิริยะ อมรรัตน์ พ่วงพลับ และอัจฉรา ใจธรรม. 2556. “การผลิตไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำของนาข้าวในประเทศไทย.” โครงการพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- มณีทิพย์ สำแดงเกียรติ ศุภฤกษ์ ทยานศิลป์ และสมิตรา ขวัญจิราธาดา. 2555. “การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ที่แยกได้ในประเทศไทย.” โครงการพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ยุวดี พิรพรพิศาล. 2546. **สาหร่ายวิทยา (Phycology)**. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สุรัตน์ตีพร รัตน์ะ. 2554. “การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Scenedesmus* sp. KMITL-01.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Amutha, K.B. and Murugesan, A.G. 2011. “Biological hydrogen production by the algal biomass *Chlorella vulgaris* MSU 01 strain isolated from pond sediment.” *Bioresource Technology*. 102 : 194-199.
- Antal T.K., Kukarskikh, G.P., Volgusheva, A.A., Krendeleva, T.E., Tyystjärvi, E. and Rubin, A.B. 2016. “Hydrogen photoproduction by immobilized S-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*: Effect of light intensity and spectrum, and initial medium pH.” *Algal Research*. 17 : 38-45.

- Appel, J. and Schulz, R. 1996. "Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)-dehydrogenase (complex I)." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1298 : 141-147.
- Atteia, A., Lis, V.R., Tielens, A. G. and Martin, W. F. 2013. "Anaerobic energy metabolism in unicellular photosynthetic eukaryotes." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1827 : 210-223.
- Balat, M. 2008. "Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems." *International Journal of Hydrogen Energy*. 33 : 4013-4029.
- Bassham, J.A., Benson, A.A. and Calvin, M. 1950. "The path of carbon in photosynthesis. VIII. The role of malic acid." *The Journal of Biological Chemistry*. 185 : 781-787.
- Batyrova, K.A., Tsygankov, A.A. and Kosourov, S.N. 2012. "Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37 : 8834-8839.
- Batyrova, K., Gavrishcheva, A., Ivanova, E., Liu, J. and Tsygankov, A. 2015. "Sustainable hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived marine green microalgae *Chlorella* sp." *International journal of molecular sciences*. 16 : 2705-2716.
- Brooks, A. 1986. "Effects of phosphorus nutrition on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activation, photosynthetic quantum yield and amounts of some Calvin-cycle metabolites in spinach leaves." *Australian Journal of Plant Physiology*. 13 : 221-237.
- Burris, J.E. 1977. "Photosynthesis, photorespiration, and dark respiration in eight species of algae." *Marine Biology*. 39(4) : 371-379.
- Catalanotti, C., Yang, W., Posewitz, M.C. and Grossman, A.R. 2013. "Fermentation metabolism and its evolution in algae." *Frontiers in Plant Science*. 150(4) : 1-17
- Chader, S., Hacene, H. and Agathos, S.N. 2009. "Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara" *International Journal of Hydrogen Energy*. 34 : 4941-4946.

- Chen, F. 1996. "High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth." *Trends in Biotechnology*. 14 : 421-416.
- Chochois, V., Dauvillee, D., Beyly, A., Tolleter, D., Cuine, S., Timpano, H., Ball, S., Cournac, L. and Peltier, G. 2009. "Hydrogen production in *Chlamydomonas*: photosystem II-dependent and -Independent pathways differ in their requirement for starch metabolism." *Plant Physiology*. 151 : 631-640.
- Cohen, J., Kim, K., Posewitz, M., Ghirardi, M.L., Schulten, K., Seibert, M. and King, P. 2005. "Molecular dynamics and experimental investigation of H₂ and O₂ diffusion in Fe-hydrogenase." *Biochemical Society Transactions*. 33 : 80-82.
- Cournac, L., Redding, K., Ravenel, J., Rumeau, D., Josse, E.-M., Kuntz, M. and Peltier, G. 2000. "Electron flow between PSII and oxygen in chloroplasts of PSI deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration." *The Journal of Biological Chemistry*. 275(23) : 17256-17262.
- Dubini, A. 2011. "Green energy: Biofuel production from *Chlamydomonas reinhardtii*." *The Biochemical Society : Bioenergy*. 20-23.
- Deng, X., Fei, X. and Li, Y. 2011. "The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*." *African Journal of Microbiology Research*. 5(3) : 260-270.
- Enger, B.C., Lødeng, R. and Holmen, A. 2008. "A review of catalytic partial oxidation of methane to synthesis gas with emphasis on reaction mechanisms over transition metal catalysts." *Applied Catalysis A: General*. 346 : 1-27.
- Fay, P. 1992. "Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria." *Microbiol Reviews*. 56 : 340-373.
- Forestier M, King P, Zhang L, Posewitz M, Schwarzer S, Happe T, Ghirardi M.L. and Seibert M. 2003. "Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions." *European Journal of Biochemistry*. 270 : 2750-2758.
- Frey, M. 2002. "Hydrogenases: hydrogen-activating enzymes." *ChemBioChem*. 3 : 153-160.
- Gaffron, H. 1939. "Reduction of CO₂ with H₂ in green plants." *Nature*. 143 : 204-205.
- Gaffron, H. and Rubin, J. 1942. "Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae." *The Journal of General Physiology*. 26 : 219-240.

- Gaudernack, B. 1998. "Photoproduction of hydrogen : Annex 10 of the IEA Hydrogen Programme." In *Proceedings of the 12th WHEC, Hydrogen energy progress XII*. vol.3 : 2011-2023.
- Ghirardi, M.L., Togasaki, R.K. and Seibert, M. 1997. "Oxygen sensitivity of algal H₂-production." *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 63 : 141-151.
- Ghirardi, M.L., Kosourov, S., Tsygankov, A. and Seibert, M. 2000. "Two-Phase Photobiological Algal H₂-Production System." In *Proceedings of the 2000 DOE Hydrogen Programme Review* [NREL/CP-570-28890] Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory.
- Gibbs, M., Gfeller, R. P. and Chen, C. 1986. "Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: III. Photoassimilation of acetate." *Plant Physiology*. 82 : 160-166.
- Goulding, K.H. and Merrett, M.J. 1966. "Photometabolism of acetate by *Chlorella pyrenoidosa*." *Journal of Experimental Botany*. 17 : 678-689.
- Grossman, A. and Takahashi, H. 2001. "Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions." *Annual Review of Plant Physiology*. 52 : 163-210.
- Hallenbeck, P.C. and Benemann, J.R. 2002. "Biological hydrogen production: fundamentals and limiting processes." *International Journal of Hydrogen Energy*. 27(11-12) : 1185-1193.
- Happe, T. and Naber, J.D. 1993. "Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *European Journal of Biochemistry*. 214 : 475-481.
- Harris, E.H. 1989. **The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use**. San Diego : Academic Press.
- He, M.L., Li, L. and Liu, J.G. 2012. "Isolation of wild microalgae from natural water bodies for high hydrogen producing strains." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37 : 4046-4056.
- He, M.L., Li, L., Liu, J.G. and Zhang, L.T. 2015. "Improvement of H₂ photoproduction in *Chlorella pyrenoidosa* in artificial and natural seawater by addition of acetic acid and control of nutrients." *Algal Research*. 10 : 104-109.
- Healey, F.P. 1970. "Hydrogen evolution by several algae." *Planta*. 91 : 220-226.

- Hemschemeier, A., Fouchard, S., Cournac, L., Peltier, G. and Happe, T. 2008. "Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron sources and sinks." *Planta*. 227 : 397-407.
- Hemschemeier, A., Melis, A. and Happe, T. 2009. "Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae." *Photosynthesis Research*. 102 : 523-540.
- Hopkins, W. G. and Hüner, N. P. A. 2004. **Introduction to Plant Physiology**. 3rd ed. New Jersey, USA : John Wiley & Sons.
- Hydrogen analysis resource center. 2008. **Lower and higher heating values of fuels**. [Online]. Available : <http://hydrogen.pnl.gov/tools/lower-and-higher-heating-values-fuels>.
- IEA. 2006. "World energy outlook 2006." International Energy Agency, OECD Publication Service, OECD, Paris.
- Jurado-Oller, J.L., Dubini, A., Galván, A., Fernández, E. and González-Ballester, D. 2015. "Low oxygen levels contribute to improve photohydrogen production in mixotrophic non-stressed *Chlamydomonas* cultures." *Biotechnology for biofuels*. 8, 149.
- Khanal, S.K., Chen, W.H., Li, L. and Sung, S. 2004. "Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products." *International Journal of Hydrogen Energy*. 29 : 1123-1131.
- Kim, J.P., Kang, C.D., Sim, S.J., Kim, M.S., Park, T.H., Lee, D., Kim, D., Kim, J.H., Lee, Y.K. and Pak, D. 2005. "Cell age optimization for hydrogen production induced by sulfur deprivation using a green alga *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90." *Journal of Microbiology Biotechnology*. 15 : 131-135.
- Kim, J.P., Kang, C.D., Park, T.H., Kim, M.S., and Sim, S.J. 2006. "Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture." *International Journal of Hydrogen Energy*. 31 : 1585-1590.
- Konstantinov, A.A., Vygodina, T., Capitano, N. and Papa, S. 1998. "Ferrocyanoide-peroxidase activity of cytochrome *c* oxidase." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1363 : 11-23.

- Kosourov, S., Seibert, M. and Ghirardi, M.L. 2003. "Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures." *Plant and Cell Physiology*. 44(2) : 146-155.
- Kosourov, S., Patrusheva, E., Ghirardi, M.L., Seibert, M. and Tsygankov, A. 2007. "A comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions." *Journal of Biotechnology*. 128 : 776-787.
- Kruse, O. and Hankamer, B. 2010. "Microalgal hydrogen production." *Current Opinion in Biotechnology*. 21: 238-243.
- Kumar, N and Das, D. 2000. "Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08." *Process Biochemistry*. 35 : 589-593.
- Kumar, K and Das, D. 2012. "Growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* in airlift and bubble column photobioreactors." *Bioresource Technology*. 116 : 307-313.
- Küpper, H., Šetlik, I., Seibert, S., Prášil, O., Šetlikova, E., Strittmatter, M., Levitan, O., Lohscheider, J., Adamska, I. and Berman-Frank, I. 2008. "Iron limitation in the marine cyanobacterium *Trichodesmium* reveals new insights into regulation of photosynthesis and nitrogen fixation." *New Phytologist*. 179 : 784-798.
- Lee, Y. K. and Shen, H. 2004. Basic Culturing Techniques. In A. Richmond (Ed.), **Handbook of microalgal culture** (pp. 40-56). Oxford, UK : Blackwell Science.
- Lehr, F., Morweiser, M., Sastre, R.R., Kruse, O. and Posten, C. 2012. "Process development for hydrogen production with *Chlamydomonas reinhardtii* based on growth and product formation kinetics." *Journal of Biotechnology*. 162 : 89-96.
- Levin, D.B., Pitt, L. and Love, M. 2004. "Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application." *International Journal of Hydrogen Energy*. 29(2) : 173-185.
- Lewis, L.A. and McCourt, R.M. 2004. "Green algae and the origin of land plants." *American Journal of Botany*. 91(10) : 1535-1556.
- Li, L., Zhang, Litao. and Liu, Jianguo. 2015. "The enhancement of hydrogen photoproduction in marine *Chlorella pyrenoidosa* under nitrogen deprivation." *International Journal of Hydrogen Energy*. 40 : 14784-14789.

- Liu, J.Z., Ge, Y.M., Xia, S.Y., Sun, J.Y. and Mu, J. 2016. "Photoautotrophic hydrogen production by *Chlorella pyrenoidosa* without sulfur-deprivation." *International Journal of Hydrogen Energy*. 41 : 8427-8432.
- Lopez, H. 2001. **Universal indicators and absorption spectrophotometry to determine the pH of Unknown Solutions.** [Online]. Available : www.seas.upenn.edu/~belab/LabProjects/2001/be210s01r6.doc
- Mateos-Pedrero, C., Cellier, C., Eloy, P. and Ruiz, P. 2007. "Partial oxidation of methane towards hydrogen production over a promising class of catalysts: Rh supported on Ti-modified MgO." *Catalysis Today*. 128 : 216-222.
- Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. 2010. "A newly isolated green algae, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production." *International Journal of Hydrogen Energy*. 35 : 13193-13199.
- Maneeruttanarungroj, C. and Phunpruch, S. 2017. "Effect of pH on biohydrogen production in green alga *Tetraspora* sp. CU2551." *Energy Procedia*. 138 : 1085-1092.
- Maness, P.C., Yu, J., Eckert, C., and Ghirardi, M. G. 2009. "Photobiological hydrogen production-prospects and challenges. *Microbe*. 4(6) : 275-280.
- Márquez-Reyes, L.A., Sánchez-Saavedra, M.D.P. and Valdez-Vazquez, I. 2015. "Improvement of hydrogen production by reduction of the photosynthetic oxygen in microalgae cultures of *Chlamydomonas gloeopara* and *Scenedesmus obliquus*." *International Journal of Hydrogen Energy*. 40 : 7291-7300.
- McHugh, K. 2005. **Hydrogen production methods.** Report MPR-WP-0001. Virginia: MPR Associates Inc. February. [Online]. Available : www.mpr.com/pubs.
- Melis, A., Zhang, L.P., Forestier, M., Ghirardi, M.L. and Seibert, M. 2000. "Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *Journal of Plant Physiology*. 122 : 127-135.
- Melis, A. and Happe, T. 2001. "Hydrogen production green algae as a source of energy." *Plant Physiology*. 127 : 740-748.

- Miura, Y., Ohta, S., Mano, M. and Miyamoto K. 1986. "Isolation and characterization of a unicellular marine green alga exhibiting high activity in dark hydrogen production." *Agricultural and Biological Chemistry*. 50(11) : 2837-2844.
- Noth, J., Krawietz, D., Hemschemeier, A. and Happa, T. 2013. "Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is coupled to light-independent hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*." *The Journal of Biological Chemistry*. 288 : 4368-4377.
- Oncel, S. and Vardar-Sukan, F. 2009. "Photo-bioproduction of hydrogen by *Chlamydomonas reinhardtii* using a semi-continuous process regime." *International Journal of Hydrogen Energy*. 34 : 7592-7602.
- Oncel, S. and Sukan, F.V. 2011. "Effect of light intensity and the light: dark cycles on the long term hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by batch cultures." *Biomass and Bioenergy*. 35(3) : 1066-1074.
- Oncel, S. and Kose, A. 2014. "Comparison of tubular and panel type photobioreactors for biohydrogen production utilizing *Chlamydomonas reinhardtii* considering mixing time and light intensity." *Bioresource Technology*. 151 : 265-270.
- Peltier, G. and Schmidt, GW. 1991. "Chlororespiration: an adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 : 4791-4795.
- Perry, J.H. 1963. **Chemical engineers handbook**. New York : McGraw-Hill.
- Peschek, G.A. 1979. "The role of the Calvin Cycle for anoxygenic CO₂ photoassimilation in *Anacystis nidulans*." *Febs Letters*. 106(1) : 34-38.
- Philipps, G., Happe, T. and Hemschemeier, A. 2012. "Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Planta*. 235(4) : 729-745.
- Pongpadung, P., Liu, J., Yokthongwattanad, K., Techapinyawat, S. and Juntawong, N. 2015. "Screening for hydrogen-producing strains of green microalgae in phosphorus or sulphur deprived medium under nitrogen limitation." *ScienceAsia*. 97-107.
- Rasoul-Amini, S., Ghasemi, Y., Morowat, M. H. and Mohagheghzadeh, A. 2009. "PCR amplification of 18S rRNA, single cell protein production and fatty acid

- evaluation of some naturally isolated microalgae." *Food Chemistry*. 116 : 129-136.
- Rorrer, G.L., Cheney, D.P. 2004. "Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds." *Aquacultural engineering*. 32 : 11-41.
- Saleem, M., Chakrabarti, M.H., Raman, A.A.A., Hasan, D.B. Daud, W.M.A.W. and Mustafa, A. 2012. "Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii* in a two-stage process with and without illumination at alkaline pH." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37 : 4930-4934.
- Sadeghizadeh, A., Dad, F.F, Moghaddasi, L. and Rahimi, R. 2017. "CO₂ capture from air by *Chlorella vulgaris* microalgae in an airlift photobioreactor." *Bioresource Technology*. 243 : 441-447.
- Salvucci, M.E. and Crafts-Brandner, S.J. 2004. "Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis." *Physiologia Plantarum*. 120 : 179-186.
- Santos, D.M.F. and Sequeira, C.A.C. 2013. "Hydrogen production by alkaline water electrolysis." *Quimica Nova*. 36(8) : 1176-1193.
- Schnackenberg, J. Ikemoto, H. and Miyachi, S. 1996. "Photosynthesis and hydrogen evolution under stress conditions in a CO₂-tolerant marine green alga, *Chlorococcum littorale*." *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*. 34(1) : 59-62.
- Skjånes, K., Knutsen, G., Kallqvist, T. and Lindblad, P. 2008. "H₂ production from marine and fresh water species of green algae during sulfur starvation and considerations for bioreactor design." *International Journal of Hydrogen Energy*. 33 : 511-521.
- Skjånes, K., Andersen, U., Heidorn, T. and Borgvang, S.A. 2016. "Design and construction of a photobioreactor for hydrogen production, including status in the field." *Journal of Applied Phycology*. 28 : 2205-2223.
- Song, W., Rashid, N., Choi, W. and Lee, K. 2011. "Biohydrogen production by immobilized *Chlorella* sp. using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis." *Bioresource Technology*. 102 : 8676-8681.
- Srirangan, K., Pyne, M.E. and Chou, C.P. 2011. "Biochemical and genetic engineering strategies to enhance hydrogen production in photosynthetic algae and cyanobacteria." *Bioresource Technology*. 102 : 8589-8604.

- Stal, L.J. and Krumbein, W.E. 1985. "Oxygen protection of nitrogenase in the aerobically nitrogen fixing, non-heterocystous Cyanobacterium *Oscillatoria* sp." *Archives of Microbiology*. 143 : 72-76.
- Stephenson, M. and Stickland, L.H. 1931. "Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen." *Biochemical Journal*. 25 : 205-214.
- Tamagnini, P., Costa, J.L., Almeida, L., Oliveira, M. J., Salema, R. and Lindblad, P. 2000. "Diversity of cyanobacterial hydrogenases, a molecular approach." *Current Microbiology*. 40 : 356-361.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindblad, P., Oxelfelt, F. and Wonschiers, R. 2002. "Hydrogenase and hydrogenase metabolism of cyanobacteria." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66 : 1-20.
- Tinpranee, N., Incharoensakdi, A. and Phunpruch, S. 2016. "Hydrogen production by unicellular green alga *Chlorella* sp. LSD-W2 isolated from seawater in Thailand." *KKU Research Journal*. 22(1) : 256-266.
- Torzillo, G., Scoma, A., Faraloni, C. and Ena, A. 2009. "Increased hydrogen photoproduction by means of a sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* D1 protein mutant." *International Journal of Hydrogen Energy*. 34 : 4529-4536.
- Wang, H., Fan, X., Zhang, Y., Yang, D. and Guo, R. 2011. "Sustained photo-hydrogen production by *Chlorella pyrenoidosa* without sulfur depletion." *Biotechnology Letters*. 33 : 1345-1350.
- White, A. and Melis, A. 2006. "Biochemistry of hydrogen metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* wild type and a Rubisco-less mutant." *International Journal of Hydrogen Energy*. 31: 455-464.
- Wünschiers, R. and Lindblad, P. 2002. "Hydrogen in education a biological approach." *International Journal of Hydrogen Energy*. 27 : 1131-1140.
- Wykoff, D.D., Davies, J.P., Melis, A. and Grossman, A.R. 1998. "The Regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Journal of Plant Physiology*. 117 : 129-139.
- Zhang, L.P., Happe, T. and Melis, A. 2002. "Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga)." *Planta*. 214 : 552-561.

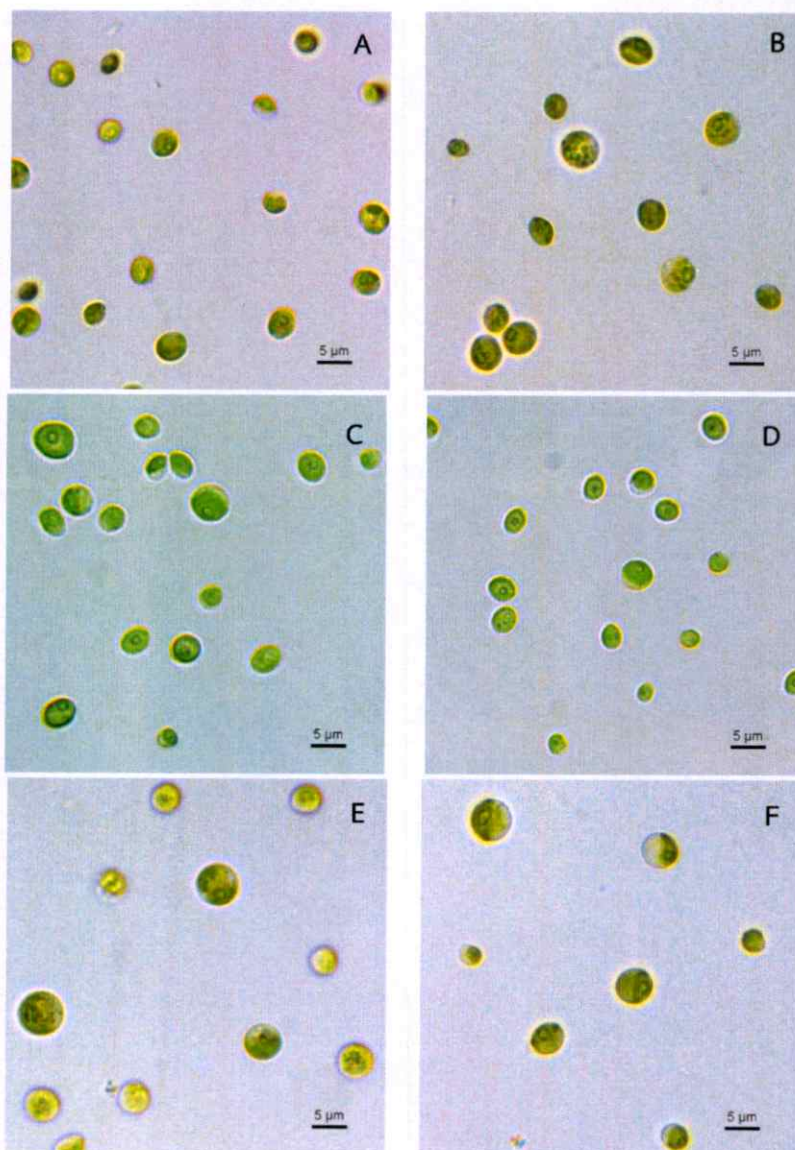
- Zhang, L.T., He, M.L. and Liu, J.G. 2014. "The enhancement mechanism of hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides* under nitrogen limitation and sulfur deprivation." *International Journal of Hydrogen Energy*. 39 : 8969-8976.
- Zhang, L.T., He, M.L., Liu, J.G. and Li, L. 2015. "Role of the mitochondrial alternative oxidase pathway in hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides*." *Planta*. 241 : 1005-1014.
- Zhu, S., Wang, Y., Huang, W., Xu, J. and Yuan, Z. 2014. "Enhanced accumulation of carbohydrate and starch in *Chlorella zofingiensis* induced by nitrogen starvation." *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 174(7) : 2435-2445.

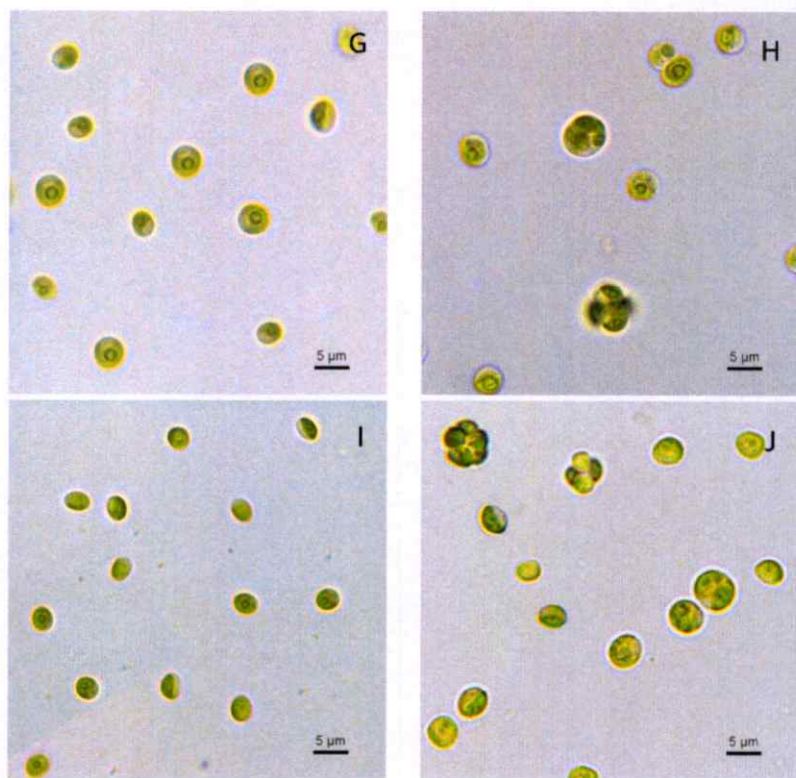
ภาคผนวก ก

สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง

จากการนำสาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 24 ไอโซเลท มาศึกษาลักษณะรูปร่างโดยส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่างด้วยกำลังขยายภาพ 1,000 เท่า และถ่ายภาพเซลล์โดยใช้โปรแกรม NIS-Elementn สามารถแบ่งกลุ่มสาหร่ายสีเขียวได้เป็น 6 กลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้

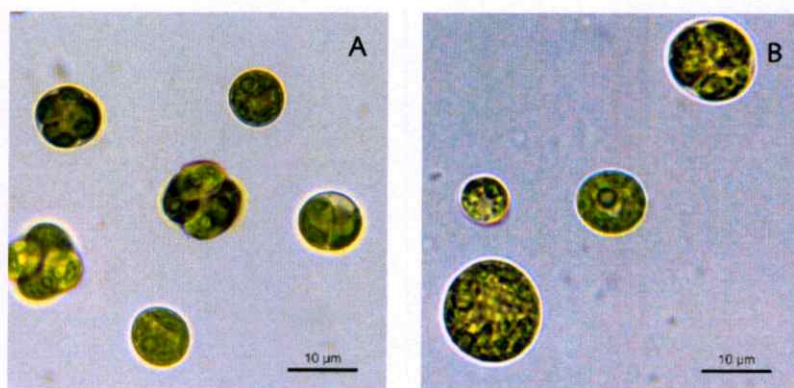
1) สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 5 ไมโครเมตร มีจำนวนทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท 1SinS1.1, 2SinS4, 2TKS2.1, 2TKS2.2, 8260, A25.1, ChiW1, CirGreen, LSD-W2 และ NakS4 (รูป ก 1)

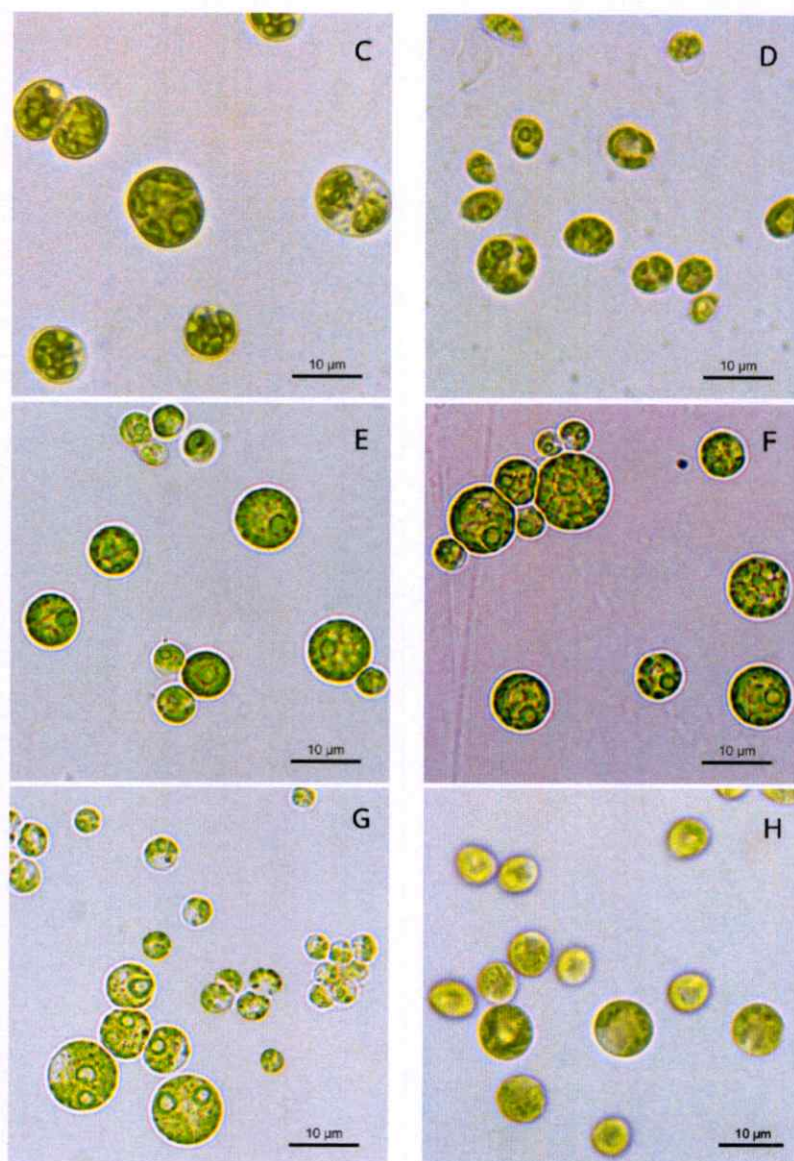




รูปที่ 1 สาหร่ายสีเขียวไฮโซเลท 1SinS1.1 (A), 2SinS4 (B), 2TKS2.1 (C), 2TKS2.2 (D), A25.1 (E), ChiW1 (F), CirGreen (G), LSD-W2 (H), NakS4 (I) และ TISTR 8260 (J)

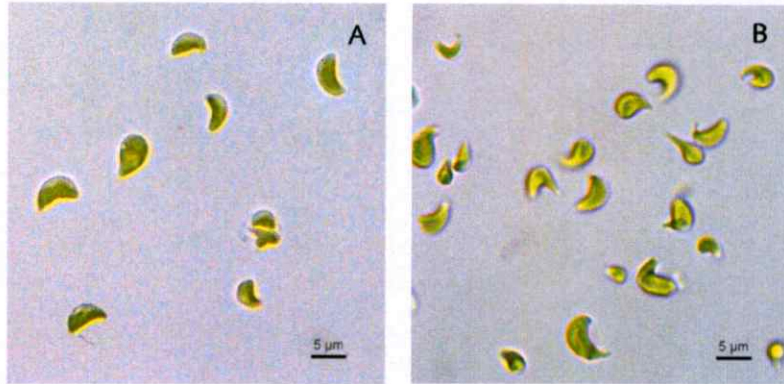
2) สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 ไมโครเมตร มีจำนวน 8 ไฮโซเลท ประกอบด้วยไฮโซเลท 2C2, CH, ChiS4, SD, TISTR 8412, TISTR 8562, TISTR 8568 และ TT (รูป ก 2)





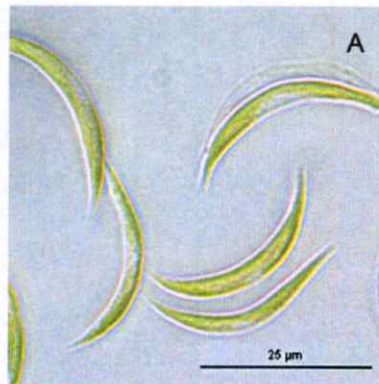
รูปที่ ๒ สหรัยสีเขียวไอโซเลท 2C2 (A), CH (B), ChiS4 (C), SD (D), TISTR 8412 (E), TISTR 8562 (F), TISTR 8568 (G), และ TT (H)

3) สาหร่ายสีเขียวรูปปร่างรี ปลายเซลล์โค้งงอและบิด เป็นเซลล์เดี่ยว มีขนาดความกว้างประมาณ 2.5 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 5 ไมโครเมตร ประกอบด้วยไอโซเลท B35.1 และ OvalGreen (รูป ก 3)



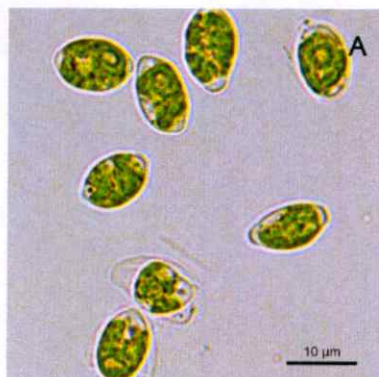
รูปที่ ก 3 สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท B35.1 (A) และ OvalGreen (B)

4) สาหร่ายสีเขียวคล้ายพระจันทร์เสี้ยว ปลายเซลล์ทั้งสองข้างเรียวแหลม เป็นเซลล์เดี่ยว มีขนาดความกว้างประมาณ 3 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 25 ไมโครเมตร ได้แก่ ไอโซเลท 8553 (รูป ก 4)



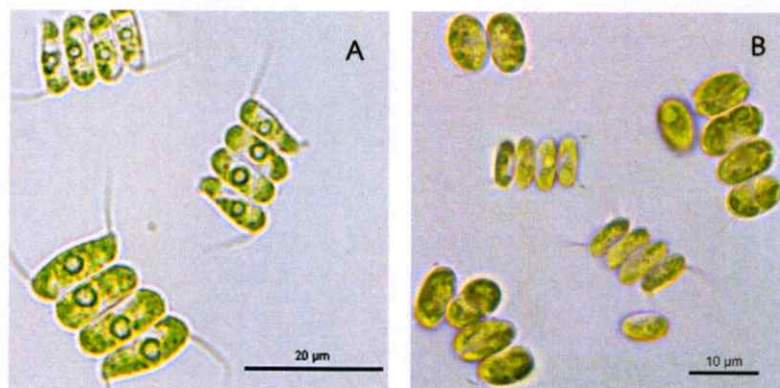
รูปที่ ก 4 สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 8553

5) สาหร่ายสีเขียวรูปปร่างรี คล้ายกระสวย ปลายเซลล์โค้งมน เป็นเซลล์เดี่ยว มีขนาดความกว้างประมาณ 5 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 10 ไมโครเมตร ได้แก่ ไอโซเลท 8486 (รูป ก 5)



รูปที่ ก 5 สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 8486

6) สาหร่ายสีเขียวรูปรางรี คล้ายกระสวย ปลายเซลล์โค้งมน เป็นเซลล์เดี่ยว มีขนาดความกว้างประมาณ 5 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 10 ถึง 15 ไมโครเมตร ได้แก่ ไอโซเลท 8486 (รูป ก 6)



รูปที่ ก 6 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ไอโซเลท 8641 (A) และ L (B)

ภาคผนวก ข

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

อาหาร TAP 1 ลิตร ประกอบด้วย

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

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2 สำหรับอาหารแข็งให้เติมอะการ์ 15 กรัมต่อ 1 ลิตรของอาหาร

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

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

ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

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

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

ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนประกอบ 1M Potassium phosphate

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

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

ตารางที่ ข 1 อาหารเชื้อสูตร TAP ที่ขาดแหล่งอาหารต่างๆ

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร TAP	องค์ประกอบของอาหาร		
	2X Filner's Beijernicks Solution	Trace Mineral Solution	Phosphate solution
TAP ขาดแหล่งไนโตรเจน (TAP-N)	ไม่มี NH_4Cl	ปกติ	-
TAP ขาดแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)	ใช้ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ แทน $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	ใช้ $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ แทน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ใช้ ZnCl_2 แทน $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ใช้ CuCl_2 แทน $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-
TAP ขาดแหล่งฟอสฟอรัส (TAP-P)	ไม่มี NH_4Cl	ปกติ	ใช้ KCl แทน KH_2PO_4 และ K_2HPO_4
TAP ขาดแหล่งไนโตรเจน และซัลเฟอร์ (TAP-N-S)	ไม่มี NH_4Cl ใช้ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ แทน $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	ใช้ $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ แทน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ใช้ ZnCl_2 แทน $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ใช้ CuCl_2 แทน $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-
TAP ขาดแหล่งไนโตรเจน และฟอสฟอรัส (TAP-N-P)	ไม่มี NH_4Cl	ปกติ	ใช้ KCl แทน KH_2PO_4 และ K_2HPO_4
TAP ขาดแหล่งซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส (TAP-S-P)	ใช้ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ แทน $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	ใช้ $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ แทน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ใช้ ZnCl_2 แทน $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ใช้ CuCl_2 แทน $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	ใช้ KCl แทน KH_2PO_4 และ K_2HPO_4
TAP ขาดแหล่งไนโตรเจน ซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส (TAP-N-S-P)	ไม่มี NH_4Cl ใช้ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ แทน $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	ใช้ $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ แทน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ใช้ ZnCl_2 แทน $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ใช้ CuCl_2 แทน $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	ใช้ KCl แทน KH_2PO_4 และ K_2HPO_4

ภาคผนวก ค

สารละลายบัฟเฟอร์ Universal (Universal buffer) (Lopez, 2001)

การเตรียม Universal buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

กรดซิตริก ($C_6H_8O_7$)	21.01	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	13.61	กรัม
โซเดียมเตตระโบเรตเดคะไฮเดรต ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)	12.11	กรัม
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน ($NH_2C(CH_2OH)_3$)	2.42	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	7.46	กรัม

ละลายแต่ละส่วนประกอบในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

ภาคผนวก ง

สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA (TBE)

การเตรียมบัฟเฟอร์ TBE 5 เท่า

ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base) (ความเข้มข้น 0.45 โมลาร์)	54	กรัม
กรดบอริก (Boric acid) (ความเข้มข้น 0.45 โมลาร์)	27.5	กรัม
ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA) (ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์)	20	มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายและปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

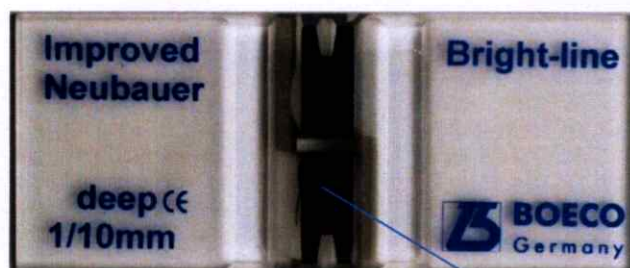
การเตรียมบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า

เมื่อต้องการใช้บัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า ในการเตรียมเจลสำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เตรียมได้จาก Stock บัฟเฟอร์ TBE 5 เท่า 100 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

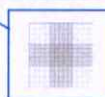
ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ความหนาแน่นของสาหร่ายสีเขียว

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



รูป จ 1 ฮีมาไซโตมิเตอร์



การนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

1) นับเซลล์สาหร่ายสีเขียวดำแหน่งกลางตาราง (25 ช่องใหญ่ ซึ่งภายในตารางขนาดเล็กจำนวน 16 ช่อง) (รูป จ 2) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายภาพ 400 เท่า

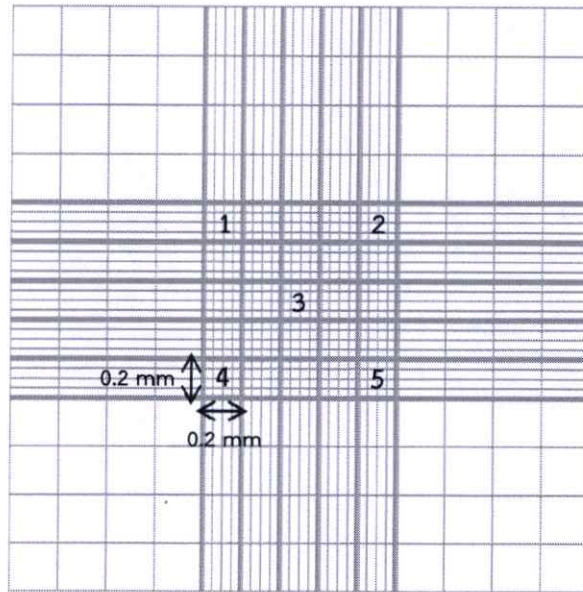
2) นับจำนวน 5 ช่อง ช่อง 1, 2, 3, 4 และ 5 แสดงดังรูป จ 2 ซึ่งแต่ละช่องมีความกว้างและความยาวเท่ากับ 0.2 มิลลิเมตร และความลึกของพื้นที่ที่นับเท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร ดังนั้น ปริมาตรสารละลายเซลล์ของแต่ละช่องได้จาก ความกว้าง × ความยาว × ความลึก

$$\begin{aligned} \text{ปริมาตรสารละลายเซลล์แต่ละช่อง} &= 0.2 \times 0.2 \times 0.1 \text{ ลูกบาศก์มิลลิเมตร} \\ &= 4 \times 10^{-4} \text{ ลูกบาศก์มิลลิเมตร} \\ &= 4 \times 10^{-6} \text{ ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ } 4 \times 10^{-6} \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

3) นำค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์สาหร่ายสีเขียวในช่อง 1, 2, 3, 4 และ 5 มาหารปริมาตรของสารละลายเซลล์แต่ละช่อง จะได้หน่วยเป็นเซลล์สาหร่ายสีเขียวต่อมิลลิลิตร หรือ cells mL^{-1}

4) นับจำนวนเซลล์สาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ตาราง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

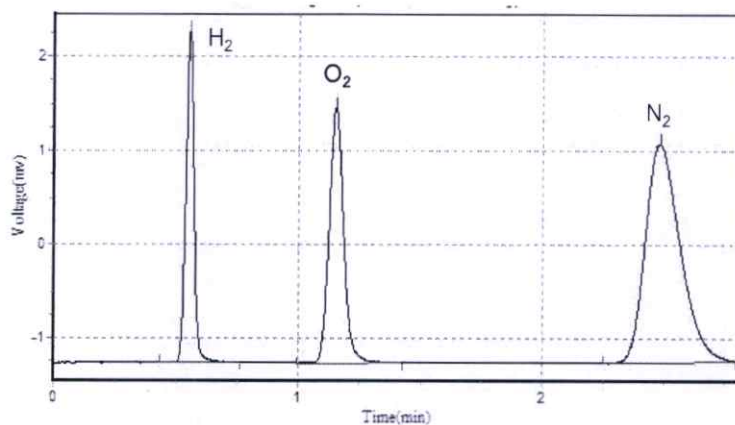
หมายเหตุ : ถ้าเซลล์สาหร่ายสีเขียวทับเส้น ให้เลือกนับสาหร่ายบนเส้นแนวนบนและเส้นแนวขวา ไม่นับเส้นแนวซ้ายและเส้นแนวล่าง



รูป จ 2 พื้นที่ตารางและตำแหน่งช่องสำหรับการนับเซลล์สำหรับยีสี่เขียวบนฮีมาไซโตมิเตอร์

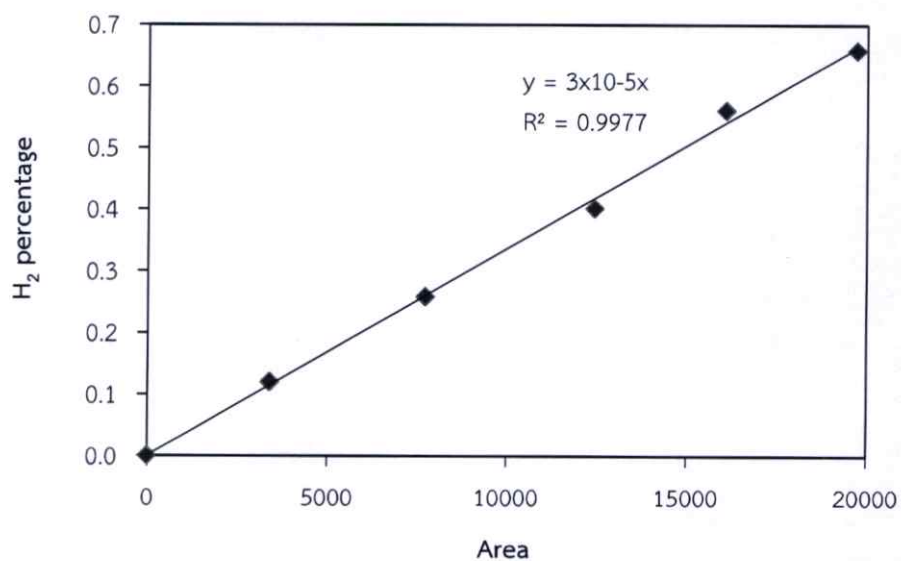
ภาคผนวก ฉ

โครมาโตแกรมของก๊าซไฮโดรเจน



Results						
Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.	
1		0.557	3451.875	8193.900	19.2404	
2		1.157	2693.765	11218.600	26.3428	
3		2.482	2332.394	25174.400	54.4167	
Total			8478.034	42586.900	100.0000	

รูปที่ ฉ 1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของก๊าซไฮโดรเจนที่วิเคราะห์จากเครื่อง GC-TCD



รูปที่ ฉ 2 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของไฮโดรเจน (เปอร์เซ็นต์)

การคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

- 1) นำพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ ($\%H_2$) จากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ฉ 2)
- 2) นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ มาเปรียบเทียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร โดยคิดเทียบจากพื้นที่ของช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) ที่ใช้ในการทดลอง
- 3) นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาคิดเทียบกับอาหารเพาะเลี้ยง 1 ลิตร จะได้ปริมาณไฮโดรเจนต่อลิตร
- 4) นำปริมาณไฮโดรเจนต่อลิตรที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมง จะได้หน่วยเป็นมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง หรือ $mLH_2 L^{-1} h^{-1}$

ภาคผนวก ข

ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA

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

ตารางที่ ข 1 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีอายุเซลล์ 18, 36, 54 และ 72 ชั่วโมง (รูปที่ 4.7)

Duncan^a

Cell age (h)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
18	2	.13200			
72	2		.51950		
54	2			.59900	
36	2				.82400
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 2 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่แปรผันระยะเวลาของการบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศในอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) (รูปที่ 4.8)

Duncan^a

Adaptation time	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
72	2	.29250			
48	2	.35150			
24	2		.48050		
6	2			.68700	
2	2				.82400
Sig.		.055	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 3 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ภายใต้สภาวะการขาดแหล่งอาหารแบบเดี่ยวและแบบรวม (รูปที่ 4.9)

Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
TAP-S-P	2	.03090					
TAP-S	2		.09628				
TAP-N-S	2			.15770			
TAP	2			.17342			
TAP-P	2				.45747		
TAP-N-S-P	2				.47272	.47272	
TAP-N-P	2					.51594	
TAP-N	2						.82524
Sig.		1.000	1.000	.446	.459	.052	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 4 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กไอออน (รูปที่ 4.10)

Duncan^a

Fe ²⁺ concentration (µM)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4	2	.71615	
0	2	.72230	
18	2	.82555	.82555
180	2		.94670
90	2		.97320
Sig.		.150	.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 5 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผล อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่แปรผัน ชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Carbon deprivation	2	.00000			
Fructose	2	.00000			
Lactose	2	.00000			
Maltose	2	.00000			
NaHCO ₃	2	.00000			
Sucrose	2	.00000			
Glucose	2		.04950		
Acetic acid	2			.10800	
CH ₃ COONa	2				.14450
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 6 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผล อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่แปรผัน ชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Carbon deprivation	2	.00000		
Fructose	2	.00000		
Lactose	2	.00000		
Maltose	2	.00000		
NaHCO ₃	2	.00000		
Sucrose	2	.00000		
Glucose	2		.16550	
Acetic acid	2			.42000
CH ₃ COONa	2			.43450
Sig.		1.000	1.000	.508

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 7 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Fructose	2	.00000			
NaHCO ₃	2	.00000			
Lactose	2	.00050			
Maltose	2	.00500			
Carbon deprivation	2	.01300			
Sucrose	2	.02150			
Glucose	2		1.02950		
CH ₃ COONa	2			1.14700	
Acetic acid	2				1.31750
Sig.		.636	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 8 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Fructose	2	.00000		
Lactose	2	.00150		
NaHCO ₃	2	.00400		
Carbon deprivation	2	.00850		
Maltose	2	.01000		
Sucrose	2	.01200		
Glucose	2		.70800	
CH ₃ COONa	2			.90900
Acetic acid	2			1.01750
Sig.		.868	1.000	.131

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 9 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Carbon deprivation	2	.00000			
Fructose	2	.00000			
Lactose	2	.00000			
Maltose	2	.00000			
NaHCO ₃	2	.00000			
Sucrose	2	.00000			
Glucose	2		.09800		
Acetic acid	2			.21350	
CH ₃ COONa	2				.28600
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 10 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Carbon deprivation	2	.00000		
Fructose	2	.00000		
Lactose	2	.00000		
Maltose	2	.00000		
NaHCO ₃	2	.00000		
Sucrose	2	.00000		
Glucose	2		.98400	
Acetic acid	2			2.49200
CH ₃ COONa	2			2.57700
Sig.		1.000	1.000	.514

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 11 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Fructose	2	.00000		
NaHCO ₃	2	.00000		
Lactose	2	.01100		
Maltose	2	.12400		
Carbon deprivation	2	.29950		
Sucrose	2	.51200		
CH ₃ COONa	2		24.43850	
Glucose	2		27.63350	
Acetic acid	2			33.50700
Sig.		.758	.063	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 12 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP-N ที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Fructose	2	.01150			
Lactose	2	.07850			
NaHCO ₃	2	.17850			
Carbon deprivation	2	.41250			
Maltose	2	.46000			
Sucrose	2	.54750			
Glucose	2		33.58450		
CH ₃ COONa	2			42.84350	
Acetic acid	2				48.28050
Sig.		.662	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 13 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของเหล็กไอออน 90 ไมโครโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตทภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.11)

Duncan^a

Sodium acetate concentration (mmol C-atom L ⁻¹)	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	2	.01367					
3.48	2		.25136				
348	2			.52064			
17.4	2				.70990		
34.8	2					1.14694	
87	2						1.35511
174	2						1.39635
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.547

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 14 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหารสูตรที่เหมาะสม (Optimized TAP-N medium) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ โดยแปรผันความเข้มแสง (รูปที่ 4.12)

Duncan^a

Light intensity ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	2	.00684				
20	2		.80221			
100	2		1.00514	1.00514		
80	2			1.30747	1.30747	
40	2				1.39630	1.39630
60	2					1.66315
Sig.		1.000	.194	.072	.546	.103

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 15 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผล
อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหารสูตรที่เหมาะสม
(Optimized TAP-N medium) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศในที่มีความเข้มข้น 60 ไมโครโมล
โฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยแปรผันอุณหภูมิการบ่มเซลล์ (รูปที่ 4.14)

Duncan^a

Temperature (°C)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
50	2	.02164				
45	2	.05892				
25	2		.79149			
40	2			1.50464		
30	2				1.66751	
35	2					1.92092
Sig.		.361	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 16 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผล
อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหารสูตรที่เหมาะสม
(Optimized TAP-N medium) ที่แปรผันพีเอชเริ่มต้น ที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารใน
บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล (รูปที่ 4.15)

Duncan^a

Initial pH	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
5.0	2	.00000				
6.0	2	.00000				
7.0	2		.26750			
7.2	2			.48600		
10.0	2				.58950	
9.0	2					.70150
8.0	2					.76100
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.107

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 17 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหารสูตรที่เหมาะสม (Optimized TAP-N medium) ที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้น ที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารโดยไม่ใช้บัฟเฟอร์ยูนิเวอร์ซัล แต่ใช้กรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการปรับค่าพีเอช (รูปที่ 4.15)

Duncan^a

Initial pH	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
5.0	2	.00000					
10.0	2		.86135				
6.0	2		.88330				
9.0	2			1.06615			
8.0	2				1.19070		
7.2	2					1.92090	
7.0	2						2.11615
Sig.		1.000	.561	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข 18 ผลทดสอบสมมติฐานโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลอัตราการผลิตไฮโดรเจน (ก) ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP อาหาร TAP-N และอาหาร Optimized TAP-N ภายใต้สภาวะการบ่มในช่วงการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.16ก)

Duncan^a

Type of medium	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
TAP	3	.27133		
TAP-N	3		.84100	
Optimized TAP-N	3			2.18800
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวอมรรัตน์ พ่วงพลับ
วัน เดือน ปีเกิด	16 สิงหาคม 2535
ที่อยู่ปัจจุบัน	280/27 ซอยลาดพร้าว 87 ถนนลาดพร้าว แขวงคลองเจ้าคุณสิงห์ เขตวังทองหลาง กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	(2553) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.34 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) (2561) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 4.00 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ สจล.
ผลงานทางวิชาการ	1. Puangplub, A. Incharoensakdi, A. and Phunpruch, S. 2017. "Screening of green algae isolated from natural water sources in Thailand for H ₂ production." 199-206. In Proceeding of 55th Kasetsart University Annual Conference 2017 . Bangkok: Kasetsart University. 2. Puangplub, A. and Phunpruch, S. 2017. "Effects of light intensity and light pattern on hydrogen production by unicellular green alga <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2." 157-163. In Proceeding of the 7th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products and The 12th Asian Biohydrogen & Biorefinery Symposium . Khon Kaen: Pullman Khon Kaen Raja Orchid Khon Kaen.