สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *SCENEDESMUS* SP. KMITL-O1

HYDROGEN PRODUCTION BY UNICELLULAR GREEN ALGA *SCENEDESMUS* SP. KMITL-O1

T116943

สุรัตน์ติพร รัตนะ

SURATTIPORN RATTANA

ว.ท.
ส 2577
2554

ลงพมู่ 116943
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 17 มี.ค. 2554

b 12331211
i

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2554

KMITL-2011-SC-M-020-018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HYDROGEN PRODUCTION BY UNICELLULAR GREEN ALGA *SCENEDESMUS* SP. KMITL-O1

SURATTIPORN RATTANA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOI

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2011

KMITL-2011-SC-M-020-018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2011

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *SCENEDESMUS* SP.KMITL-O1

HYDROGEN PRODUCTION BY UNICELLULAR GREEN ALGA *SCENEDESMUS* SP.KMITL-O1

นักศึกษา นางสาวสุรัตน์ติพร รัตนะ

รหัสประจำตัว 50068305

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สมชาย	ไกรรักษ์	
ผศ.ดร.สรัญญา	พันธุ์พฤกษ์	
ผศ.ดร.สุวรรณี	จรรยาพูน	
ศ.ดร.อรัญ	อินเจริญศักดิ์	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ วันจันทร์ที่ 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2554 เวลา 13.00-16.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง 422 ชั้น 4 อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 25 **เดือน** พ.ค. **พ.ศ.** 54

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสุรัตน์ติพร รัตนะ
รหัสประจำตัว	50068305
ปริญญาวิชา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2554
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากให้พลังงานสูงระหว่างการเผาไหม้และก่อให้เกิดมลพิษในอากาศน้อยกว่าพลังงานอื่น การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการนำเอาพลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัด มาใช้ผลิตไฮโดรเจนโดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติและมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตไฮโดรเจน จากการทดลองพบว่า ในบรรดาสาหร่ายที่แยกได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลท สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดและผลิตได้มากกว่าสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาชนิดของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA พบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 มีความเหมือนกับสาหร่ายในจีนัส *Scenedesmus* ถึงร้อยละ 99.47-99.74 ดังนั้น จึงตั้งชื่อสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 นี้ว่า *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 หลังจากนั้น ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ใน 2 สภาวะของการเพาะเลี้ยงคือ สภาวะโฟโตออโตโทรปและสภาวะเฮเทอโรโทรป พบว่า ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป สาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และให้ระยะเวลาปรับตัวภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM สูตรที่เหมาะสม คืออาหารที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนและแมกนีเซียมซัลเฟต มีโซเดียมไนเตรท 0.075 มิลลิโมลาร์ และเฟอร์รัสซัลเฟต 18 ไมโครโมลาร์ ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.895 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง โดยมีค่าสูงกว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM สูตรปกติ ถึง 2.27 เท่า ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป สาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Hydrogen Production by Unicellular Green Alga *Scenedesmus* sp. KMITL-O1
Student	Miss Surattiporn Rattana
Student ID	50068305
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2011
Thesis Adviser	Assist. Prof. Dr. Saranya Phunpruch

ABSTRACT

Hydrogen is one of alternative interesting energy sources nowadays. It provides high energy during combustion and causes less air-pollution than other energy sources. Hydrogen production by green algae shows a good advantage in using unlimited sunlight energy to evolve hydrogen via photosynthesis. This thesis aims to study optimal cultivation condition for growth and hydrogen production of the high hydrogen producing algae isolated from natural ponds. Results revealed that among 12 isolates purified from natural ponds, the green alga isolate GA8 produced the highest hydrogen and even compared with other green algae and cyanobacteria available in our laboratory. Species identification using 18S rDNA nucleotide sequence analysis of the green alga isolate GA8 revealed 99.47-99.74% homology to *Scenedesmus* sp. Therefore, the isolate GA8 was designated as *Scenedesmus* sp. KMITL-O1. The optimal condition for growth and hydrogen production of the green alga *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 was investigated under photoautotrophic and heterotrophic conditions. Under photoautotrophic condition, *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 showed the highest hydrogen production when cultivated in BBM medium for 1 week followed by anaerobic adaptation for 2 hours. Cultivation of *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 in the optimal BBM medium lacking carbon source and magnesium sulfate but containing 0.075 mM sodium nitrate and 18 μM ferrous sulfate showed the highest hydrogen production of 0.895 μmol H_2/mgChl/h, which was 2.27 folds higher than hydrogen produced in a normal BBM medium. Under heterotrophic condition, *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 grown in TAP medium under the light for 18 hours followed by 2 hours anaerobic adaptation produced the highest hydrogen. The optimum temperature and light intensity for hydrogen production were

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35 ^{0}C and 2,000 lux, respectively. In addition, β-mercaptoethanol was the best reducing agent for hydrogen production in *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 and could enhance 1.8 folds hydrogen production when 5 mM β-mercaptoethanol was present in the growth medium. Finally, *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 cultivated in the optimal TAP medium containing 34.8 mmolC/L sodium acetate as a carbon source, 0.49 mM ammonium chloride, 0.1 mM magnesium sulfate and 4.5 μM ferrous sulfate showed the highest hydrogen production of 5.067 μmol H_2/mgChl/h, which was approximately 3 folds higher than hydrogen produced in a normal TAP medium.

Keywords : hydrogen production, green algae, autotrophic and heterotrophic condition

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำในการทำวิจัยตลอดมา รวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน และ ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาตรวจสอบให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ พี่พยอม พี่ทัต พี่อ๊อด พี่ปราณี พี่หนิง และพี่ๆ ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกและคำแนะนำต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณ น.ส.ศรินยา ใจตรง น.ส. วิชาณี แบนคีรี นายสามารถ ต่ายขาว น.ส.รัตติยา อ่องมะลิ น.ส.อังคนางค์ โสวจัสสตากุล น.ส.รัตนาภรณ์ แสงพันธุ์ไม้ นายเชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ น.ส.วิภาวี แบบประเสริฐ และ น.ส. วันทนีย์ เขตต์กรณ์ รวมทั้งคณาจารย์ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในสาขาวิชาชีววิทยาทุกท่านที่คอยช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ นายสากล รัตนะ นางไพรศรี รัตนะ นายพิสิทธิ์ รัตนะ และคุณยายสา สวิล บิดา มารดา น้องชาย และคุณยายของข้าพเจ้า ที่ให้ความรัก กำลังใจ ความเข้าใจ และสนับสนุนส่งเสริมด้านการศึกษาให้แก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำเล่มวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

สุรัตน์ติพร รัตนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ III

กิตติกรรมประกาศ V

สารบัญ VI

สารบัญตาราง XIV

สารบัญรูป XV

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 4

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 ไฮโดรเจน 5

2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน 7

2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล 7

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า 7

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี 8

2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต 8

2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจน 9

2.3.1 แบคทีเรีย 9

2.3.2 ไซยาโนแบคทีเรีย 9

2.3.3 สาหร่ายสีเขียว 10

2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว 10

2.5 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว 11

2.6 สาหร่ายสีเขียว 13

2.7 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp 14

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 21
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 21
3.2 สารเคมี 21
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย 21
3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ *E. coli* 21
3.2.3 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ 21
3.2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ 23
3.2.5 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน 23
3.2.6 ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 23
3.2.7 เอนไซม์ 23
3.2.8 สารเคมีสำหรับสกัด-วิเคราะห์ดีเอ็นเอและการเตรียม competent cell 23
3.2.9 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 24
3.2.10 ชุดทดสอบ (Kit) 24
3.3 อุปกรณ์ 25
3.4 วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำ การคัดแยกสาหร่าย และการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 25
3.4.1 การเก็บตัวอย่างน้ำและคัดแยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 25
3.4.2 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย 26
3.4.3 วิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* 27
3.5 วิธีการวัดการเจริญเติบโต 27
3.5.1 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว 27
3.5.2 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย 28
3.6 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ 28
3.6.1 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว 28
3.6.2 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย 28
3.7 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย 28
3.8 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 29
3.9 วิธีการศึกษาชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน18S *r*DNA 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.9.1 วิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ.....30
3.9.2 วิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส.....30
3.9.3 วิธีการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 31
3.9.4 วิธีการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์.....32
3.9.5 วิธีการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์.....32
3.9.6 วิธีการเตรียม Competent cell *E. coli* DH5α และการทรานสฟอร์มเมชัน.....32
3.9.7 วิธีการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ.....33
3.9.8 วิธีการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 33
3.9.9 วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA.....34
3.10 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะโฟโตออโตโทรป.....34
3.10.1 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง.....34
3.10.2 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ.....35
3.10.3 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารคัดเลือก.....35
3.10.4 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณของไนโตรเจนในอาหารคัดเลือก.....35
3.10.5 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารคัดเลือก.....36
3.10.6 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณของเหล็กซัลเฟตในอาหารคัดเลือก.....36
3.10.7 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหารสูตรปกติ.....36
3.11 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป.....37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.11.1 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง....37

3.11.2 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ....37

3.11.3 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะมืดและสว่าง....37

3.11.4 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง....38

3.11.5 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการ แปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยง....38

3.11.6 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเติมสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน....38

3.11.7 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ....39

3.11.8 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือก....39

3.11.9 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ....39

3.11.10 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ....40

3.11.11 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณของเหล็กซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ....40

3.11.12 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหารสูตรปกติ....40

3.11.13 การวิเคราะห์ข้อมูล....41

บทที่ 4 ผลการทดลอง....42

4.1 ผลการคัดแยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติในบริเวณเขตลาดกระบัง....42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ.....44
4.3 ผลการศึกษาชนิดของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ที่ผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA.....48
4.3.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8.....48
4.3.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....49
4.3.3 ผลการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ pDrive และการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α.....51
4.3.4 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ.....51
4.3.5 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI.....52
4.3.6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA.....53
4.4 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะโฟโตออโตโทรป.....55
4.4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง.....55
4.4.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ.....57
4.4.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน.....58
4.4.4 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันปริมาณของไนโตรเจน.....60
4.4.5 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต.....63
4.4.6 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันปริมาณของเหล็กซัลเฟต.....65
4.4.7 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM สูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหาร BBM สูตรปกติ.....67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป 69
4.5.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง 69
4.5.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ 71
4.5.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะมืดและสว่าง 72
4.5.4 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 74
4.5.5 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยง 76
4.5.6 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเติมสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน 78
4.5.7 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน 79
4.5.8 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตท 81
4.5.9 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันปริมาณของไนโตรเจน 83
4.5.10 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต 85
4.5.11 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันปริมาณของเหล็กซัลเฟต 87
4.5.12 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ 89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง 92

5.1 การคัดแยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติในบริเวณเขตลาดกระบัง 92

5.2 การศึกษาการเจริญติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ 93

5.3 ผลการศึกษาชนิดของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 18S rDNA 95

5.4 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 96

5.4.1 ผลของชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 96

5.4.2 ผลของอายุของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 97

5.4.3 ผลของระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะไร้อากาศต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 98

5.4.4 ผลของชนิดของคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 98

5.4.5 ผลของปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 100

5.4.6 ผลของปริมาณของซัลเฟอร์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 102

5.4.7 ผลของปริมาณของเหล็กต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 103

5.4.8 ผลของแสงต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป 103

5.4.9 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป 104

5.4.10 ผลของตัวรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.4.11 การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหารสูตรปกติ 105

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง 107

บรรณานุกรม 110

ภาคผนวก 116

ประวัติผู้เขียน 132

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจน ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวีตีดีเทคเตอร์ 29

3.2 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 31

3.3 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกด้วยด้วยเทคนิค ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 31

3.4 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 34

4.1 จำนวนไอโซเลทของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากบ่อน้ำในบริเวณต่างๆ 42

4.2 รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและโรงเรียนพรตพิทยพยัต 43

4.3 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน 55

5.1 ความเข้มข้นของคาร์บอน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์และเหล็กในสูตรที่เหมาะสมและสูตรปกติของอาหาร BBM และ TAP 106

ฉ 1 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way anova ของการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป 125

ฉ 2 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way anova ของการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป 128

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 การเปรียบเทียบพลังงานจากเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ 6

2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า 8

2.3 การสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวจากกระบวนการสังเคราะห์แสง 11

2.4 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กอยู่ในบริเวณกระตุ้น (Fe-hydrogenase) ในสาหร่ายสีเขียว 13

3.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยการเตรียมพาสเจอร์ปิเปต 26

3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียในฟลาสก์ 27

4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 45

4.2 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำธรรมชาติ 46

4.3 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 47

4.4 การเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดแยกได้ไอโซเลท GA8 กับสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ 48

4.5 จีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 จากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ 49

4.6 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA จากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ 52

4.7 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของโคโลนีสีขาวจากการสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป High-Speed plasmid mini kit 53

4.8 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pF1R1 1.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 54

4.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 55

4.10 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ 56

4.11 การผลิตไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่มีอายุ 1, 2 และสัปดาห์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 57

4.12 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศ 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.13 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ 59

4.14 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารBBM ปกติ และอาหาร BBM ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 60

4.15 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 61

4.16 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 62

4.17 การผลิตไฮโดรเจนต่อโมลไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 63

4.18 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 64

4.19 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 65

4.20 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟต 66

4.21 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟต 67

4.22 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM สูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหาร BBM สูตรปกติ 68

4.23 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหาร BBM สูตรปกติ 69

4.24 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง 70

4.25 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีอายุเซลล์ 12, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง 71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.26 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP โดยการแปรผันระยะเวลาการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ 72

4.27 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะมืดและที่มีแสงสว่าง 73

4.28 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะมีแสงและมืดที่เป็นเวลา 18 และ 24 ชั่วโมง 74

4.29 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันความอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง 75

4.30 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงต่างๆ 76

4.31 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยง 77

4.32 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยงต่างๆ 78

4.33 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน 79

4.34 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ 80

4.35 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน 81

4.36 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตท 82

4.37 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตท 83

4.38 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากแอมโมเนียมคลอไรด์ 84

4.39 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.40 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟต 86
4.41 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 87
4.42 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟต 88
4.43 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟต 89
4.44 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหารสูตรปกติ 90
4.45 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ 91
จ 1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของก๊าซไฮโดรเจนที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง GC-TCD 124
จ 2 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของไฮโดรเจน 124

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบันพลังงานมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์เป็นอย่างมาก ทำให้เกิดความสะดวกสบายในชีวิตประจำวัน พลังงานส่วนใหญ่ที่ผลิตขึ้นจะถูกนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม การคมนาคมและการผลิตกระแสไฟฟ้า โดยผลิตมาจากน้ำมัน ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ ซึ่งพลังงานเหล่านี้เป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัด และคาดว่ากำลังจะหมดไปในระยะเวลาอีกไม่นานนัก นอกจากนี้ การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของพลังงานเหล่านี้ยังก่อให้เกิดมลพิษ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เถ้าและฝุ่นละออง เป็นต้น สำหรับปริมาณพลังงานทรัพยากรเชื้อเพลิงสำรองภายในประเทศไทย พบว่ามีปริมาณน้ำมัน 0.714 พันล้านบาร์เรล ซึ่งสามารถใช้ได้อีกประมาณ 20 ปี มีปริมาณก๊าซธรรมชาติ 33 ล้านล้านลูกบาศก์ฟุต ซึ่งสามารถใช้ได้อีกประมาณ 30 ปี และมีปริมาณถ่านหิน 0.984 พันล้านตัน ซึ่งใช้ได้อีกประมาณ 60 ปี (ชัยชาญ ฤทธิเกริกไกร, 2547) ประเทศไทยมีการนำเข้าพลังงานคิดเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าการนำเข้าสินค้าทั้งหมด ซึ่งพลังงานที่นำเข้ามาส่วนใหญ่คือ น้ำมันเชื้อเพลิง (ชัยชาญ ฤทธิเกริกไกร, 2547) ดังนั้น เพื่อป้องกันปัญหาการขาดแคลนพลังงานในอนาคต จึงต้องมีการศึกษาค้นคว้าพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ โดยพลังงานทดแทนนั้นจะต้องไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างพลังงานทดแทน ได้แก่ พลังงานลม พลังงานความร้อนใต้พิภพ พลังงานน้ำพุร้อน พลังงานในมหาสมุทร พลังงานคลื่นทะเล รวมถึงพลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน เป็นต้น (ชัชวาลย์ ชัยชนะ, 2547; ภานุทัศน์ อินใจมา, 2550)

พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่ให้ความร้อนสูง โดยสามารถให้ความร้อนสูงถึง 142 เมกกะจูลต่อกิโลกรัม เมื่อทำการเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ในอากาศจะเกิดเป็นออกไซด์ของไนโตรเจน ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าพลังงานอื่นๆ กระบวนการในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในอุตสาหกรรมมีหลายวิธี เช่น การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิลโดยกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (steam reforming) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (water electrolysis) กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีเทอร์โมเคมิสทรี (thermochemistry) และการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ (biohydrogen) เป็นต้น ในปัจจุบัน มีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนในโรงงานอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนจรวดและในการขับดันยานอวกาศ นอกจากนี้ ยังมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การประดิษฐ์รถยนต์ที่ใช้พลังงานไฮโดรเจนในการขับเคลื่อน ซึ่งในการผลิตไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิลโดยวิธีสตีมรีฟอร์มมิงเป็นวิธีการที่ยังต้องใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล ซึ่งมีอยู่ในปริมาณจำกัด ส่วนการผลิตไฮโดรเจนจากการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยไฟฟ้านั้นต้องใช้ความดันสูงและมีความเสี่ยงต่อการระเบิดสูง ด้วยเหตุนี้ ในช่วงหลายปีที่ผ่านมานักวิจัยทั่วโลกจึงหันมาให้ความสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่า **"ไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen)"**

สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสง ไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว ฯลฯ แบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักน้ำตาลหรือสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เพื่อให้ได้โปรตอนและอิเล็กตรอนมากพอสำหรับใช้ในการผลิตไฮโดรเจน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนในแบคทีเรียคือเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็นหลายกลุ่ม ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Alcaligenes eutrophus*, *Escherichia coli*, *Clostridium butylicum* และ *Thermohydrogenium kirishis* เป็นต้น ส่วนแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและไซยาโนแบคทีเรียจะผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ตัวอย่างของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* และ *Rhodopseudomonas sphaeroides* เป็นต้น ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Anabaena variabilis*, *Anabaena cylindrica, Synechocystis* sp. PCC 6803 และ *Nostoc muscorum* เป็นต้น และสำหรับสาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงซึ่งใช้แสงและน้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิต นอกจากนี้ ยังสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการหมักน้ำตาลอีกด้วย สาหร่ายสีเขียวที่สามารถผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* และ *Scenedesmus obliquus* เป็นต้น

ในบรรดาสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาข้างต้น การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมีความได้เปรียบในแง่ของการเพาะเลี้ยงที่สามารถทำได้ง่ายทั้งในสภาวะโฟโตออโตโทรป และสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรป โดยสามารถเลือกใช้คาร์บอนไดออกไซด์หรือสารประกอบอินทรีย์ เช่น น้ำตาลกลูโคสและกรดอะซีติก ฯลฯ เป็นแหล่งคาร์บอนได้ นอกจากนี้ ยังใช้พลังงานแสงซึ่งมีอยู่อย่างไม่จำกัดเป็นแหล่งพลังงาน มีรายงานการค้นพบการผลิตไฮโดรเจนเป็นครั้งแรกในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* เมื่อชักนำสาหร่ายให้อยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศในที่มืด (Gaffron, 1939) และเซลล์จะผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนคาร์บอนไดออกไซด์ (Gaffron และ Rubin, 1942) นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่มีแสงได้เช่นกัน โดยการผลิตไฮโดรเจนจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อให้แสงที่มีความเข้มแสงน้อย แต่เมื่อให้ความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยงมากกว่า 500 ลักซ์ การผลิตไฮโดรเจนก็จะลดลง (Gaffron และ Rubin, 1942) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบในสาหร่ายสีเขียวจัดเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์หรือที่เรียกว่า "Iron-hydrogenase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือ Fe-hydrogenase" ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ประกอบด้วยเหล็กและนิกเกิล (NiFe-hydrogenase) เป็นโคแฟกเตอร์ (Schnackenberg และคณะ, 1993) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่มีความไวต่อออกซิเจนเป็นอย่างมาก จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว ถ้ามีออกซิเจนเกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงมาก ออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Greenbaum และ Lee, 1998) ได้มีรายงานการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ในสภาวะที่ขาดซัลเฟอร์จะทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงหยุดลง ส่งผลให้ไม่เกิดออกซิเจนไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Melis, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า เมื่อปรับสภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ หรือเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสงต่ำ การผลิตไฮโดรเจนจะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสภาวะดังกล่าวจะมีผลทำให้กระบวนการหายใจภายในเซลล์ลดลง (Kruse และคณะ, 2005) นอกจากนี้ ยังได้มีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่น เช่น *Chlorella fusca* (Winkler และคณะ, 2002a), *Platymonas subcordiformis* (Guan และคณะ, 2004), *Scenedesmus obliquus* (Abeliovich และ Weisman , 1978) เป็นต้น

งานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่แยกได้จากบ่อน้ำธรรมชาติ ในบริเวณเขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป และโฟโตเฮเทอโรโทรป ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน โดยแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน แปรผันปริมาณไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ แปรผันระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง แปรผันอุณหภูมิ และความเข้มแสง เป็นต้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดแยกสาหร่ายจากน้ำในบ่อน้ำธรรมชาติในบริเวณเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร นำสาหร่ายมาทำให้บริสุทธิ์และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดแยกได้กับสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ

2. เพื่อศึกษาชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำธรรมชาติในเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้ภายใต้การเพาะเลี้ยงในสภาวะโฟโตออโตโทรป และโฟโตเฮเทอโรโทรปในระดับฟลาสก์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำภายในบริเวณเขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร นำน้ำมาคัดแยกสาหร่ายและทำให้สาหร่ายมีความบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค single cell isolation จากนั้น เพาะเลี้ยงสาหร่ายที่คัดแยกในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และ 750 นาโนเมตร ตามลำดับ และศึกษาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนโดยชักนำให้อยู่ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน เปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ หลังจากนั้น นำสาหร่ายที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงมาศึกษาชนิดของสาหร่ายโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA จากนั้น ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโตโทรปและโฟโตเฮเทอโรโทรป โดยในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป ทำการแปรผันระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง เปรียบเทียบชนิดของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง แปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน แปรผันปริมาณซัลเฟอร์ ไนโตรเจน และเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น และในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรป ทำการแปรผันระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง แปรผันอุณหภูมิ และความเข้มแสง แปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน แปรผันปริมาณซัลเฟอร์ ไนโตรเจน เหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบชนิดของสาหร่ายซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งน้ำในธรรมชาติที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง รวมทั้งทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดเลือกในระดับเขย่า เพื่อเป็นแนวทางในการนำสาหร่ายที่คัดเลือกมาผลิตไฮโดรเจนให้มีปริมาณที่สูงขึ้นในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

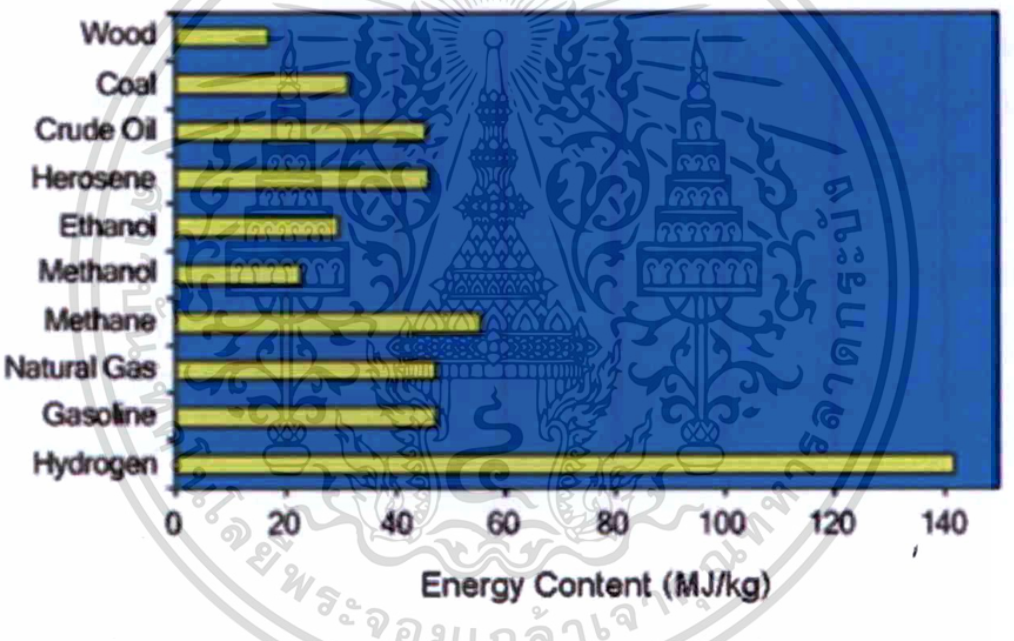
2.1 ไฮโดรเจน

จากวิกฤตการณ์การขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา ประกอบกับการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้น้ำมันมีราคาสูงขึ้นมากจนส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของโลก นอกจากนี้ น้ำมันเชื้อเพลิงส่วนใหญ่ผลิตมาจากแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งกำลังจะหมดไป ด้วยเหตุนี้ ในช่วงระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา จึงได้มีความพยายามในการค้นคว้าและพัฒนาพลังงานแหล่งใหม่ในการนำมาใช้ทดแทนการใช้น้ำมันเชื้อเพลิง โดยพลังงานแหล่งใหม่ที่จะนำมาทดแทนแหล่งพลังงานเดิมนั้นจะต้องเป็นพลังงานที่สะอาด ปลอดภัย และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความสำคัญในการเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญในอนาคต ไฮโดรเจน (อังกฤษ: Hydrogen; ละติน: Hydrogenium) เป็นธาตุลำดับแรกในตารางธาตุ มีสัญลักษณ์ธาตุ คือ H และมีเลขอะตอมเท่ากับ 1 ที่อุณหภูมิห้องและในสภาวะความดันบรรยากาศมาตรฐาน ไฮโดรเจนมีสถานะเป็นก๊าซที่มี 2 อะตอม และมีอิเล็กตรอนชั้นนอกสุดหรือเวเลนซ์อิเล็กตรอนตัวเดียว ไฮโดรเจนสามารถพบในองค์ประกอบของน้ำ ในสารประกอบอินทรีย์ทุกตัว และในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ไฮโดรเจนสามารถทำปฏิกิริยาได้กับคาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน เป็นต้น นอกจากนี้ ไฮโดรเจนซึ่งจัดเป็นธาตุที่เบาที่สุดโดยเบากว่าอากาศถึง 14 เท่า สามารถลอยกระจายไปในอากาศได้อย่างรวดเร็วและไม่ตกค้างบนพื้นดิน เป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย และให้พลังงานเชื้อเพลิงที่มีประสิทธิภาพสูง โดยไฮโดรเจนให้พลังงานต่อหน่วยได้สูงสุดในบรรดาเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ และมีค่าพลังงานเชื้อเพลิงสูงกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงถึง 3 เท่า (รูปที่ 2.1) ไฮโดรเจนสามารถติดไฟได้แต่ไม่ได้ช่วยให้ไฟติด โดยจะต้องอาศัยออกซิเจนในการเผาไหม้ ไฮโดรเจนมีจุดติดไฟที่ 570 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าแก๊สโซลีนที่ติดไฟที่ประมาณ 500 องศาเซลเซียส และมีจุดเดือดที่ต่ำมากที่ -253 องศาเซลเซียส ไฮโดรเจนถือว่ามีอันตรายน้อยกว่าเชื้อเพลิงชนิดอื่นมาก เนื่องจากไฮโดรเจนเบากว่าอากาศ เมื่อมีการรั่วออกมา ไฮโดรเจนจะกระจายตัวขึ้นไปในอากาศอย่างรวดเร็ว และเมื่อเกิดการเผาไหม้ เปลวไฟจะขึ้นข้างบนและจะหมดไปอย่างรวดเร็ว โดยเกิดการเผาไหม้เร็วมากและมีการแผ่รังสีความร้อนในระดับต่ำ ซึ่งต่างจากเบนซินและดีเซล ซึ่งไอของเบนซินและดีเซลหนักกว่าอากาศทำให้มีการลุกไหม้อยู่นานกว่า (ศิริจันทร์ และมานิจ ทองประเสริฐ, 2008) ด้วยคุณสมบัติของไฮโดรเจนที่ไม่เป็นพิษ ทำให้สามารถออกแบบระบบการใช้พลังงานไฮโดรเจนให้มีความปลอดภัยมากกว่าหรืออย่างน้อยเท่ากับระบบเครื่องยนต์แก๊สโซลีน (สิริชนก จันทร์ใบ, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานสะอาด เมื่อทำการเผาไหม้ไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อเผาไหม้ไฮโดรเจนในอากาศจะผลิตออกไซด์ของไนโตรเจน โดยไม่ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจก นอกจากนี้ ก๊าซไฮโดรเจนยังมีค่าอ๊อกเทน (ค่าความต้านทานการน็อคของเครื่องยนต์ : antiknock quality) สูงถึง 120 โดยเชื้อเพลิงที่มีค่าอ๊อกเทนสูงจะทำให้เกิดการเผาไหม้เชื้อเพลิงที่สมบูรณ์ เครื่องยนต์เดินเรียบไม่สะดุด ทำให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อเทียบกับพลังงานอื่นๆ ไฮโดรเจนจึงเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ พลังงานไฮโดรเจนยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทดแทนกับงานที่ต้องใช้พลังงานดั้งเดิม เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับครัวเรือน เครื่องยนต์สันดาปภายใน เครื่องกังหัน และเครื่องไอพ่น เป็นต้น (Bak และคณะ, 2002)



รูปที่ 2.1 การเปรียบเทียบพลังงานจากเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ

ที่มา : http://www.people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent.html

2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีหลายวิธี ทั้งการผลิตด้วยกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพ ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้หลายกระบวนการ ดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

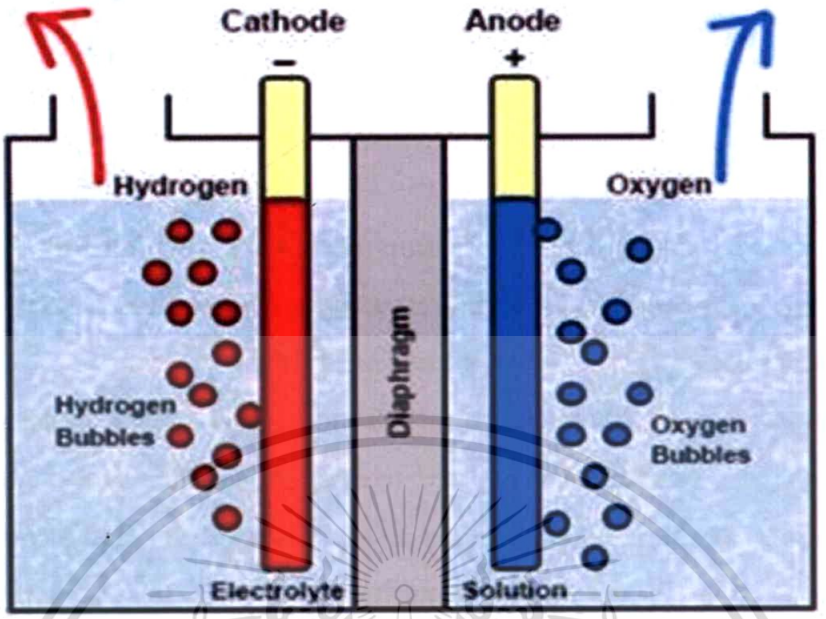
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเคมี และอุตสาหกรรมปิโตรเลียม โดยกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (steam reforming) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับน้ำในรูปของไอน้ำ โดยอาศัยพลังงานความร้อนทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน กระบวนการทางอุตสาหกรรมที่นิยมใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนี้ถูกเรียกว่า coal gasification ข้อเสียของกระบวนการนี้คือ ก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากสารตกค้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เผาไหม้ไม่สมบูรณ์ คาร์บอนไดออกไซด์ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เป็นต้น

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า เป็นวิธีการที่ใช้กระแสไฟฟ้าแยกโมเลกุลของน้ำโดยตรง (water electrolysis) ทำให้ได้ไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอม โดยอาศัยอิเล็กโทรด (electrode) 2 ขั้วที่ตรงข้ามกัน คือ อิเล็กโทรดขั้วบวก (anode) และอิเล็กโทรดขั้วลบ (cathode) วิธีการเตรียมคือจุ่มอิเล็กโทรดลงในน้ำที่ทำให้มีความเป็นตัวนำมากขึ้น โดยการเติมสารพวกอิเล็กโตรไลท์ (electrolyte) เช่น กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ลงไป ไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบและออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะอิเล็กโทรดขั้วบวก (รูปที่ 2.2) วิธีนี้ต้องใช้กระแสไฟฟ้าสูงถึง 90 กิโลวัตต์ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้จะให้ก๊าซไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง ข้อเสียของวิธีการนี้คือ ต้องการกระแสไฟฟ้าจำนวนมากและมีการสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำ และจะต้องทำในสภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียส เพื่อแยกโมเลกุลของน้ำให้ได้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนอะตอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า
ที่มา : http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี

การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี (thermochemistry) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจน โดยการใช้สารประกอบปรอทโบรไมด์และแคลเซียมในกระบวนการผลิต ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยอาศัยความร้อนสูงที่อุณหภูมิประมาณ 200-780 องศาเซลเซียส ข้อดีของกระบวนการนี้คือ สามารถนำความร้อนของถังปฏิกรณ์นิวเคลียร์มาผลิตไฮโดรเจนได้ โดยพลังงานทั้งหมดจึงจะถูกนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และผลผลิตที่ได้สามารถแยกออกได้ง่าย แต่ข้อเสียก็คือ เกิดปัญหามลพิษจากการใช้สารประกอบโลหะหนัก อันได้แก่ ปรอท และโบรไมด์

2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต

การผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่าไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด ยกตัวอย่าง เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิตไฮโดรเจนได้โดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสง แบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก สาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียใช้แสงและน้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจน และไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Kosaric และ Lyng, 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจน

ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพนั้น จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มี 3 ชนิดดังนี้

2.3.1 แบคทีเรีย (bacteria)

แบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

2.3.1.1 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (phototrophic bacteria)

แบคทีเรียพวกนี้สามารถสังเคราะห์แสงได้ โดยไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (anoxygenic phototrophic bacteria) แบคทีเรียในกลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) แบคทีเรียสีม่วงไม่สะสมกำมะถัน (non-sulfur purple bacteria) ได้แก่ *Athiorhodaceae* sp. และ *Rhodospirillaceae* sp. (2) แบคทีเรียสีม่วงที่สะสมกำมะถัน (sulfur purple bacteria) ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceaes* sp. (3) แบคทีเรียสีเขียวที่สะสมกำมะถัน (green sulfur bacteria) ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp. แบคทีเรียในกลุ่มนี้ผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสง มีรงควัตถุที่ต่างไปจากรงควัตถุของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว ในกระบวนการสังเคราะห์แสง แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์และสามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์ ซัลเฟอร์ ไธโอซัลเฟต สารประกอบอินทรีย์ หรือโมโลกุลไฮโดรเจนเป็นสารให้อิเล็กตรอน

2.3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมัก (dark fermentation bacteria)

แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถหมักน้ำตาลหรือแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น เพื่อผลิตตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับใช้ในการผลิตไฮโดรเจน แบคทีเรียที่มีความสามรถในการผลิตไฮโดรเจนได้ในกลุ่มนี้ ยกตัวอย่างเช่น *Enterobacter aerogenes*, *Clostidium butyricum*, *Dessulfovibrio vulgaris*, *Magashaera elsdenii*, *Citrobacter intermedius* และ *Escherichia coli* เป็นต้น

2.3.2 ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตที่สังเคราะห์แสงแล้วได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (oxygenic phototrophic prokaryote) ประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ และมีกระบวนการสังเคราะห์แสงและชนิดของคลอโรฟิลล์เหมือนสาหร่ายสีเขียวและพืช กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียคล้ายกับสาหร่ายโดยผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์แสง แต่ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนได้ ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Anabaena* sp., *Aphanocapsa* sp., *Calothrix* sp., *Mastigocladus* sp. และ *Nostoc* sp. เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 สาหร่ายสีเขียว (green algae)

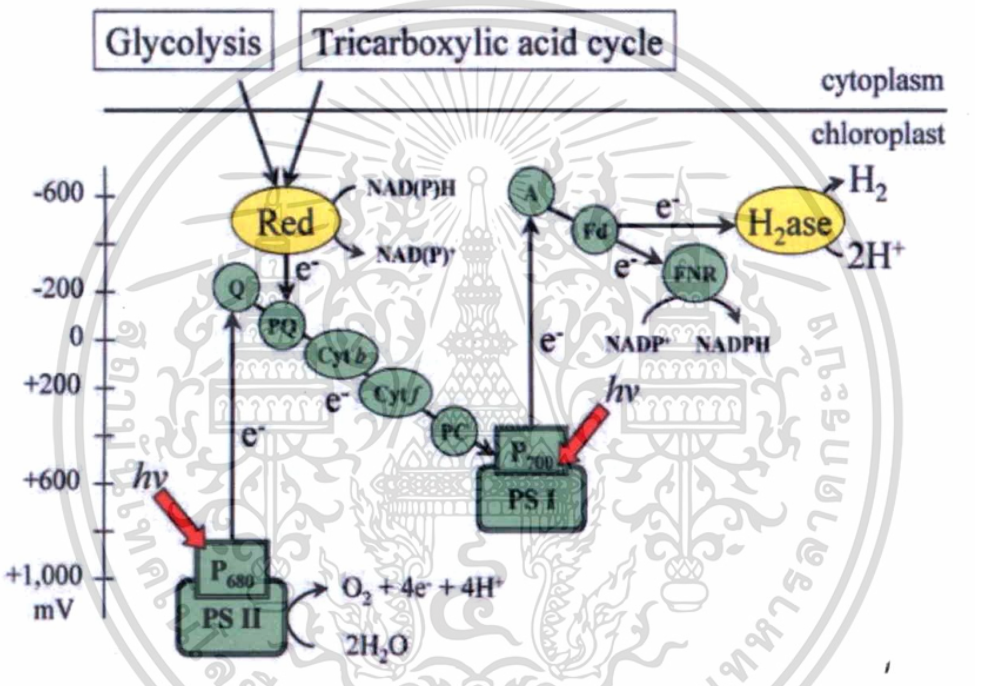
สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการปรับตัวที่ไม่มีออกซิเจน ทั้งในที่มืดและที่มีแสง การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสงถูกเรียกว่า photohydrogen production สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp., *Codium* sp., *Scenedesmus* sp. เป็นต้น ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสงต่ำจะเกิดการกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้น กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่มีการผลิตก๊าซออกซิเจน โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง จากสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการพัฒนาและนำมาผลิตก๊าซไฮโดรเจน เนื่องจากเพาะเลี้ยงได้ง่ายโดยสามารถเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปและโฟโตเฮเทอโรโทรป นอกจากนี้ ในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายจะใช้เพียงน้ำและแสงที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยใช้เพียงแสงและน้ำในการผลิตไฮโดรเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานแสง (antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิดทั้งแคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง แล้วส่งพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (reaction center) ซึ่งอยู่ภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์เอ เมื่อโมเลกุลคลอโรฟิลล์เอได้รับพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์เอจะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้นและพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนนี้ให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เมื่อมีพลังงานในรูปของแสงมาตกกระทบในบริเวณระบบแสงสอง (PSII) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ระบบแสงสองจะถูกกระตุ้นให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ควิโนนซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Q : primary electron acceptor of PSII) อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (PQ : plastoquinone) ต่อมาเมื่อน้ำมีการแตกตัวออกหรือที่เรียกว่า water splitting ได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงสองไปแทนที่อิเล็กตรอนที่คลอโรฟิลล์ที่สูญเสียไปในระบบ จากนั้น อิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนนจะถูกส่งต่อไปยังไซโตโครมบี (cytochrome b) ไซโตโครมเอฟ (cytochrome f) พลาสโตไซยานิน (plastocyanin) และเข้าไปยังระบบแสงหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(PSI) ระบบแสงหนึ่งจะประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อระบบแสงหนึ่งถูกกระตุ้นจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (A : primary electron acceptor of PSI) และเมื่อมีโฟตอนหรือแสงมากระตุ้นคลอโรฟิลล์ภายในระบบแสงหนึ่ง (PSI) คลอโรฟิลล์จะปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin : Fd) แล้วเมื่ออิเล็กตรอนออกจากเฟอร์รีดอกซินจะไปรวมกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนขึ้น (Melis และ Happe, 2001) (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์แสง
ที่มา : Melis และ Happe (2001)

2.5 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว

การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Gaffron ในปี ค.ศ. 1939 จากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase : acceptor oxidoreductase, EC1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99.1) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นไฮโดรเจนและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ดังสมการที่ 1.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$H_2 \xleftrightarrow{\text{hydrogenase}} 2H^+ + 2e^- \qquad \text{สมการที่ 1.1}$$

Stephenson และ Stickland (1931) บัญญัติศัพท์ "hydrogenase" ขึ้นเป็นครั้งแรกหลังการค้นพบการผลิตไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมทธิลีนบลู (methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต โดยสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

1. unidirectional หรือ uptake hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน

2. bidirectional หรือ reversible hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

นอกจากนี้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถแบ่งตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้เป็น 3 ชนิด (Schulz และคณะ, 1998) ดังนี้

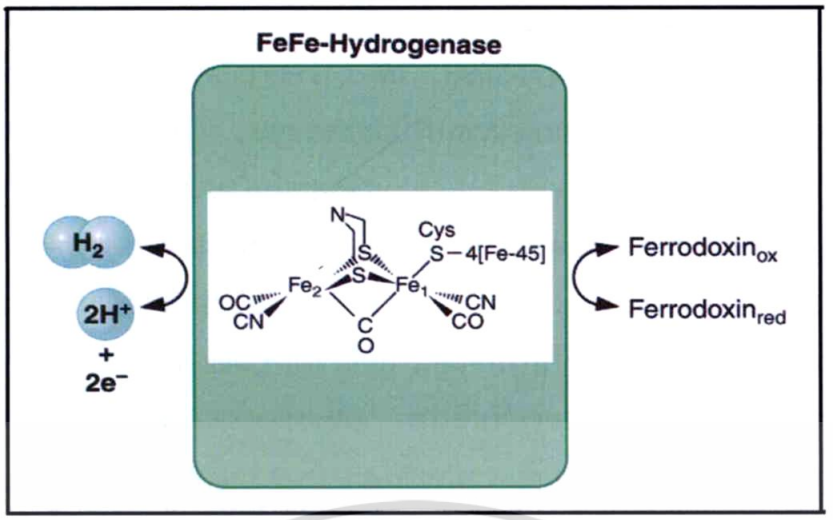
1. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (NiFe–hydrogenase)

2. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์เท่านั้น (Fe-hydrogenase)

3. ไฮโดรจีเนสที่ไม่พบโลหะใดเป็นองค์ประกอบในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (Metal-free hydrogenase)

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวเป็นเอนไซม์ชนิดที่บริเวณกระตุ้นประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็กเท่านั้น (Fe–hydrogenase) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย มีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* (Gaffron และ Rubin, 1942), *Chlamydomonas reinhardtii* (Hartman และ Krasma, 1963), *Chlorella fusca* (Kessler, 1974) และ *Chlamydomonas moewusii* (Healey, 1970) และพบยีนไฮโดรจีเนสที่สามารถถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 48 กิโลดาลตัน (kDa) โดยมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนในสาหร่ายสีเขียวประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมี 1 หน่วยย่อย มีบริเวณกระตุ้นหรือบริเวณ H-cluster ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็ก 2 อะตอม เหล็กจะจับเข้ากับซัลเฟอร์ในกรดอะมิโนซีสเทอีน (cysteine) และทำหน้าที่เป็น Fe-S cluster นอกจากอะตอมของเหล็กที่อยู่ตรงกลางของบริเวณนี้จะจับกับซีสเทอีนแล้ว ยังจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และไซยาไนด์ (CN) อีกด้วย (Maness และคณะ, 2009) (รูปที่ 2.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กอยู่ในบริเวณกระตุ้น (Fe-hydrogenase) ในสาหร่ายสีเขียว

ที่มา : Maness และคณะ (2009)

2.6 สาหร่ายสีเขียว (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2546)

สาหร่ายสีเขียวแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ สาหร่ายสีเขียวที่พบในทะเลซึ่งมีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายทั้งหมด สาหร่ายทะเลมักจะพบบริเวณน้ำตื้นตามแนวชายฝั่ง อาจจะมีบ้างที่พบในระดับความลึกถึง 300 ฟุต ที่แสงสามารถส่องถึง อีกชนิดหนึ่งก็คือสาหร่ายน้ำจืด ซึ่งมีประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายทั้งหมด สาหร่ายที่อยู่ในน้ำจืดจะเจริญอยู่ในน้ำตื้น หรือน้ำลึกบางชนิดขึ้นอยู่บนก้อนหิน ทราย โคลน เปลือกหอย บนพืช สัตว์ หรืออาจเจริญอยู่ในพืชก็ได้ สาหร่ายสีเขียวจะเจริญแตกต่างกันตามสภาพอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มของแสง และความสมบูรณ์ของอาหาร

สาหร่ายสีเขียวมีรงควัตถุที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ที่ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ที่ประกอบด้วย แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ ซึ่งเป็นรงควัตถุชนิดเดียวกับที่พบในพืชชั้นสูง ผนังเซลล์ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น (แต่บาง Class ก็ไม่มีผนังเซลล์ มีเยื่อหุ้มเซลล์แทน) ผนังชั้นนอกประกอบด้วยสารจำพวกเพคติน ผนังชั้นในเป็นสารจำพวกเซลลูโลส บางชนิดมีหนวด (flagella) ซึ่งพบเฉพาะในสาหร่ายที่เคลื่อนไหวได้ หนวดมีลักษณะเรียบคล้ายแส้ (acronematic type) หรือเป็นวง ถ้ามีหนวดมากกว่า 1 เส้น ความยาวของหนวดจะเท่ากันทุกเส้น สาหร่ายที่มีหนวดจะมีออร์กาเนลล์ที่มีสีเรียกว่าตา (eye spot or stigma) ทำหน้าที่รับแสงแล้วส่งไปยังหนวด สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างหลายแบบมีทั้งเซลล์เดี่ยว (unicellular) อยู่รวมกลุ่มเป็นโคโลนี (colony) และเป็นเส้นสาย (filament) พวกที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีมีทั้งที่เคลื่อนไหวได้และ

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคลื่อนไหวไม่ได้ พวกที่เป็นเส้นสายมีทั้งที่แตกแขนงและไม่แตกแขนง สาหร่ายสีเขียวมีนิวเคลียส 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 อัน ผลผลิตจากการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวเป็นอาหารสะสมประเภทแป้ง และสะสมแป้งในส่วนของเซลล์ที่เรียกว่า ไพรีนอยด์ โดยแป้งประกอบด้วยอะไมโลส และอะไมโลเพคติน

วัฏจักรชีวิตของสาหร่ายสีเขียวมี 2 แบบ คือ แบบแฮพลอนติก (haplontic type) เป็นการลดจำนวนโครโมโซมเกิดในระยะไซโกตแบ่งตัวเพื่อสร้างสปอร์ วัฏจักรนี้พบใน Order Volvocales และแบบดิบพลอนติก (diplontic type) เป็นการเพิ่มจำนวนโครโมโซมซึ่งเกิดในระยะสร้างแกมีท พบในบางสกุลของ Order Chlorococcales การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวมีทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการรวมกันของแกมีท ซึ่งมีทั้งแบบ isogamy, anisogamy และ oogamy ส่วนแบบไม่อาศัยเพศมีทั้งการแบ่งเซลล์ สร้างสปอร์ และสร้างอะคินีต (akinete) เป็นต้น

2.7 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

เมื่อจัดจำแนกสาหร่าย *Scenedesmus* sp. ตามหลักอนุกรมวิธานของ Desikachary (1959) พบว่า *Scenedesmus* sp. จัดอยู่ใน

Kingdom Plantae
Division Chlorophyta
Class Chlorophyceae
Order Chlorococcales
Family Scenedesmaceae
Genus *Scenedesmus*

สาหร่ายในแฟมิลีนี้เป็นแพลงก์ตอนพืชอาศัยอยู่ในน้ำนิ่ง หรืออาจจะพบในดิน สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแกมีทที่มีแฟลกเจลลัม 2 เส้น *Scenedesmus* เป็นโคโลนีที่ประกอบด้วยเซลล์จำนวน 4 หรือ 8 หรือ 16 เซลล์ รูปร่างของเซลล์มีหลายแบบ เช่น รูปกระสวย รูปไข่ รูปวงเดือน หรือรูปรี มาเรียงต่อกันด้านข้างตามความยาวของเซลล์ เซลล์ที่อยู่ด้านริมสุดทั้งสองด้านอาจมีหนาม (spine) ยื่นออกมา มีคลอโรพลาสต์ขนาดใหญ่ 1 แผ่นอยู่ที่ขอบเซลล์ บางชนิดก็ไม่มีคลอโรพลาสต์เป็นแผ่นเต็มเซลล์ มีไพรีนอยด์และนิวเคลียส 1 อันต่อเซลล์ สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างออโตสปอร์ ซึ่งในแต่ละเซลล์จะสร้างออโตสปอร์เท่ากับจำนวนเซลล์ปกติของ *Scenedesmus* ชนิดนั้น เมื่อแก่ก็จะหลุดออกมาจากผนังเซลล์ของแม่จับกันเป็นโคโลนีใหม่ ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างแกมมีทที่มีแฟลกเจลลา 2 เส้น มีการรวมกันแบบไอโซแกมมี แต่ถ้านำ *Scenedesmus* มาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ เซลล์จะไม่จับกันเป็นโคโลนี แต่มักจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Gaffron (1939) ศึกษากระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. เป็นครั้งแรก โดยภายหลังการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และชักนำให้เซลล์อยู่ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศในที่มืด พบว่าเซลล์สามารถสร้างและสลายไฮโดรเจนได้

Gaffron และ Rubin (1942) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. โดยพบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ในอาหารที่มีการเติมกลูโคส เซลล์สาหร่ายจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ นอกจากนี้ ยังพบว่าสาหร่ายจะสร้างและสลายไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นตามความเข้มแสง และเมื่อเติมสารไดไนโตรฟีนอลไปยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนในที่มืด พบว่าเซลล์จะถูกกระตุ้นให้ผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีแสงได้เช่นกัน

Abeliovich และ Weisman (1978) ศึกษาการเจริญของสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรปในที่มืด และให้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรป ที่ใช้อากาศและไม่มีการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. obliquus* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรปโดยการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรพบว่า เซลล์มีความสามารถในการเจริญได้สูงมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ และค่าการดูดซึมกลูโคสในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรปมากกว่าในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรปถึง 5 เท่า

Mahro และ Grimme (1982) ศึกษาความเข้มแสงและช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมของการบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนในที่มืดต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella fusca* โดยใช้โซเดียมไดไทโอไนต์ (Na-dithionite) เป็นตัวให้อิเล็กตรอน พบว่า เซลล์การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงสูงประมาณ 30,000 ลักซ์ (580 วัตต์ต่อตารางเมตร) และบ่มไว้ในที่มืดมากกว่า 5 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schnackenberg และคณะ (1993) ศึกษาตัวให้อิเล็กตรอนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* สายพันธุ์ D3 ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป และทำการทดสอบปฏิกริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสโดยใช้เมทิลไวโอโลเจน (methylviologen) ฟีโนซาฟรานีน (phenosafranine) เบนซิลไวโอโลเจน (benzylviologen) เจนัส-กรีน (janus-green) เมทิลีนบลู (methylene blue) และโซเดียมไดไทโอไนท์ (Na-dithionite) พบว่าเมทิลไวโอโลเจนกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เพราะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่มีศักย์รีดิวซ์คล้ายกับเฟอร์รีดอกซินที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus*

Florin และคณะ (2001) ศึกษาวิธีการทำเอนไซม์ Fe-hydrogenase ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรปให้บริสุทธิ์ จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของเอนไซม์ Fe-hydrogenase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่า ใน 2 ชั่วโมงแรก

Wünschiers และ Lindblad (2002) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 10–14 วัน หลังจากนั้น นำเซลล์มาชักนำให้อยู่ในสภาวะปราศจากออกซิเจน โดยการพ่นก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากอยู่ในสภาวะที่ปราศจากอากาศแล้วเติมโซเดียมไดไทโอไนท์ หลังจากนั้น นำสาหร่ายมาลงถังหมักระบบปิดแบบกะ ถังหมักระบบเปิดแบบกะ และถังหมักแบบต่อเนื่อง พบว่าเซลล์ที่ไม่ได้ถูกชักนำให้อยู่ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนจะไม่มีการผลิตไฮโดรเจน ส่วนเซลล์สาหร่ายที่ถูกชักนำให้อยู่ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนแล้วเติมโซเดียมไดไทโอไนต์ และให้แสงสว่างจะผลิตไฮโดรเจนได้ 6.7 ไมโครโมลต่อชั่วโมง นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิตไฮโดรเจน พบว่าเมื่อเติมน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ ในอาหารพบว่าสาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนลดลง

Winkler และคณะ (2002a) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella fusca* โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป แล้วชักนำให้อยู่ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน หลังจากนั้น นำสาหร่ายมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดในชั่วโมงที่ 2 ของการชักนำให้ปราศจากออกซิเจน หลังจากนั้น การผลิตไฮโดรเจนคงที่จนถึงชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ที่ 4 ส่วนสาหร่ายสีเขียว *C. fusca* ผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และผลิตได้มากที่สุดในชั่วโมงที่ 3 แต่การผลิตไฮโดรเจนจะลดลงในชั่วโมงที่ 4 นอกจากนี้ ยังพบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่ายสีเขียว *C. fusca*

Winkler และคณะ (2002b) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* 137C(+), *Scenedesmus* sp. 276-6 UTEX 393 และ *Scenedesmus vucuolatus* (*Chlorella fusca*) โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 150 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อนาที เก็บเซลล์ในระยะที่มีการเจริญสูงสุด (mid-exponential phase) นำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ (TAP-S) หลังจากนั้น ชักนำเซลล์ให้อยู่ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน แล้วเติมโซเดียมไดไทโอไนท์ และเมทิลไวโอโลเจน แล้วนำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii, S. vucuolatus* และ *S. obliquus* ผลิตไฮโดรเจนได้อย่างรวดเร็ว และผลิตได้มากที่สุดในชั่วโมงที่ 4 และสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นโดยผลิตได้ 200 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง

Guan และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Platymonas subcordiformis* ที่คัดแยกมาจากน้ำทะเล โดยเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารน้ำทะเลที่มีและขาดซัลเฟอร์ พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารน้ำทะเลที่ขาดซัลเฟอร์ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารน้ำทะเลปกติถึง 13 เท่า นอกจากนี้ ยังศึกษาผลของพีเอช อะซีเตท และน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิตไฮโดรเจน พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเท่ากับ 8 จะผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเท่ากับ 6 และ 10 ประมาณ 7.8 และ 5.4 เท่า ตามลำดับ และสาหร่ายจะผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตทเท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์ หรือความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 37.5 มิลลิโมลาร์

Kojima และ Lin (2004) ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* ในคอลัมน์แก้วที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร ปริมาตร 650 มิลลิลิตร โดยเติมโซเดียมไดไทโอไนต์ และเมทิลไวโอโลเจน โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกันระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยปิดผิวของคอลัมน์ด้วยฟิล์มพลาสติกที่ปล่อยให้แสงผ่านได้และในคอลัมน์ที่ไม่ปิดด้วยฟิล์ม พบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในคอลัมน์ที่ปิดเพิ่มด้วยฟิล์มมีพลาสติกสูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในคอลัมน์ที่ไม่ปิดด้วยฟิล์มพลาสติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
116943

Fouchard และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะ คือ สภาวะมิกโซโทรปและโฟโตออโตโทรป โดยในสภาวะมิกโซโทรปนั้น จะทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ และเติมสาร3-(3,4-dichlorophenyl) 1-1 dimethyl urea (DCMU) เป็นตัวยับยั้งการทำงานของระบบแสงสอง พบว่าสาหร่ายจะมีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น พร้อมกับการสะสมแป้ง แต่ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปจะไม่มีการผลิตไฮโดรเจนและไม่มีการสะสมแป้งเกิดขึ้น

Cepak และคณะ (2006) ศึกษาผลของแสงสีต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 400 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยให้แสงสว่าง 14 ชั่วโมงสลับกับไม่ให้แสงสว่าง 10 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าหลังจากเลี้ยงครบ 3 วัฏจักรของเซลล์ เซลล์จะสร้างเซลล์ลูกขึ้นมา 8 เซลล์ หลังจากนั้น นำมาทำการเพาะเลี้ยงต่อ โดยให้แสงสีฟ้า สีแดง สีเขียว และสีขาว ที่ความเข้มแสง 50 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าการให้แสงสีแดงในการเพาะเลี้ยงทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยให้แสงสีฟ้า สีเขียว และขาว (ชุดควบคุม) โดยอัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในแสงสีแดงจะมีอัตราการเจริญสั้นกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีฟ้า สีขาว และสีเขียว คือ 11, 12, 14 และ 19 ชั่วโมง ตามลำดับ

Kim และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Clamydomonas reinhardtii* โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ และแปรผันความเข้มแสง 60-200 ไมโครโมลไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มแสง 300 ไมโครโมลไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที สาหร่าย *C. reinhardtii* เจริญเติบโตได้ดีที่สุด และที่ความเข้มแสงเท่ากับ 200 ไมโครโมลไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที สาหร่ายจะผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดคือ 225 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร

Tsygankov และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Clamydomonas reinhardtii* โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. reinhardtii* ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์และให้อะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะที่มีแสงสว่าง โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้ความเข้มแสงต่ำ 25 ไมโครโมลไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที และให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง พบว่าสาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 56.4 ± 16.7 มิลลิลิตรต่อลิตร หรือ 56.4×10^{-3} ลูกบาศก์เมตรต่อลูกบาศก์เมตรของสารละลายเซลล์ และพบว่าถ้าให้ความเข้มแสงสูงประมาณ 110-120 ไมโครโมลไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที จะส่งผลให้มีการผลิตออกซิเจนมากขึ้น แต่ถ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ความเข้มแสงในปริมาณต่ำประมาณ 20-25 ไมโครโมลไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ออกซิเจนจะถูกใช้ ส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น

Kosourov และคณะ (2007) ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ในการเพาะเลี้ยง 3 สภาวะ คือ สภาวะโฟโตออโตโทรป ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร HS ส่วนสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรป ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ที่เติมอะซีเตท 17.4 มิลลิโมลาร์ ในการเพาะเลี้ยงในสภาวะโฟโตมิกโซโทรป ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ที่มีการเติมคาร์บอนไดออกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการเพาะเลี้ยง จากการทดลองพบว่า ทั้งอะซีเตทและคาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองให้ทำงานได้ลดลง ทำให้มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น และยังพบว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้ในสภาวะโฟโตออโตโทรป ออกซิเจนจะผลิตออกมาได้น้อยที่สุด นอกจากนี้ อะซีเตทยังช่วยให้มีการสะสมแป้งในเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรป ภายใต้สภาวะมิกโซโทรปที่ปราศจากออกซิเจน สาหร่ายจะผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าในสภาวะอื่นคือประมาณ 6.9 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อลิตร รองลงมาคือ ภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรป และสภาวะโฟโตออโตโทรป สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้ประมาณ 4.0 และ 2.8 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะมิกโซโทรปและสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรปที่มีอะซีเตทและคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่าภายใต้สภาวะมิกโซโทรป สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้ 4.5±1.6 มิลลิโมลต่อลิตร ขณะที่ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป สาหร่ายจะผลิตไฮโดรเจนได้น้อยกว่าคือ 1.1±0.4 มิลลิโมลต่อลิตร

Ust'ak และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* และ *Scenedesmus obliquus* โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าสาหร่าย *S. obliquus* ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่าย C. *reinhardtii* จากนั้น นำสาหร่าย *S. obliquus* มาทดลองต่อโดยชักนำให้อยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศแล้วเติมโซเดียมไดไทโอไนท์ร่วมกับการให้แสง พบว่าสาหร่ายจะผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเมื่อเติมโซเดียมไดไทโอไนท์เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย เมื่อทำการเติมน้ำตาลกลูโคสร่วมกับการเติมโซเดียมไดไทโอไนท์และให้แสง พบว่าถ้าไม่เติมกลูโคส สาหร่ายจะผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเมื่อเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Skjånes และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 21 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากน้ำทะเล น้ำจืด และจากสิ่งแวดล้อมทั่วไป พบว่ามีสาหร่ายสีเขียว 7 สายพันธุ์ที่สามารถผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากซัลเฟอร์และชักนำให้อยู่ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas noctigama*, *Chlamydomonas euryale*, *Chlamydomonas vectensis*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Desmodesmus subspicatus* และ *Pseudokirchneriella subcapitata* จากนั้น นำสาหร่ายไปเพาะเลี้ยงในถังหมัก โดยเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากซัลเฟอร์ และใช้อะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ให้แสงสว่างและปรับ pH ของอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงให้มีค่าคงที่ จากการทดลองพบว่าส่วนประกอบหลายๆ อย่างที่ใช้ในการทำถังหมัก เช่น ยาง พลาสติกและโลหะผสม (steel alloy) นั้นส่งผลกระทบต่อสาหร่ายหลายชนิดที่เพาะเลี้ยง จากการนำสาหร่ายที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ทั้ง 7 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยง พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด รองลงมาคือ *C. noctigama* และ *C. euryale* ตามลำดับ นอกจากนี้ ในอาหารที่มีค่า pH เท่ากับ 7.9 สาหร่ายสีเขียว *C. noctigama* เจริญเติบโตได้ดีที่สุด

Chader และคณะ (2009) ศึกษาอัตราการผลิตไฮโดรเจนจากการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* 3 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากดินและแหล่งน้ำ foggara ในซาฮารา ประเทศแอลจีเรีย ได้แก่ *Chlorella sorokiniana* สายพันธุ์ Ce, *Chlorella salina* สายพันธุ์ Mt, *Chlorella* สายพันธุ์ Pt6 พบว่าสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ขาดซัลเฟอร์ โดยพบว่า *C. sorokiniana* สายพันธุ์ Ce ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดคือ 147 มิลลิลิตร ณ เวลา 222 ชั่วโมง ที่ความดันของออกซิเจน 2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* ทั้ง 3 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับ *C. reinhardtii* พบว่าสาหร่าย *Chlorella* ทั้ง 3 สายพันธุ์ผลิตไฮโดรเจนได้น้อยกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

1. สาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในเขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร
2. สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)
3. ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* TISTR 8012, *Ankistodesmus falcatus* TISTR 8557, *Calothrix agarth* TISTR 8110, *Fischerella muscicola* TISTR 8215, *Nostoc carneum* TISTR 8159, *Synechococcus* sp. PCC 7942 ที่ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)
4. ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α [*supE*44 Δ*lac* U169 (ϕ80 *lacZ* ΔM15) *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1] (Invitrogen, Carlsbad, USA)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย (ภาคผนวก ก)

1. อาหาร BBM (Bold's Basal medium) (Bold และ Wynne, 1971)
2. อาหาร BG11 (Blue-Green medium) (Rippka และคณะ, 1979)
3. อาหาร N8 (Vonshak, 1986)
4. อาหาร TAP (Tris acetate phosphate medium) (Harris, 1989)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ *E. coli* (ภาคผนวก ข)

1. อาหาร LB (Luria Bertani medium) (Sambrook และคณะ, 1989)
2. อาหาร SOB (Super Optimal Broth) (Hanahan, 1983)

3.2.3 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. กรดบอริก (H_3BO_3) (Analytical grade, Merck, Germany)
2. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) (Analytical grade, J.T. Baker, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กรดซิตริก (Citric acid) (Analytical grade, Analar, England)
4. กรดอะซีติก (CH_3COOH) (Analytical grade, Merck, Germany)
5. กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) (Analytical grade,,Carlo Erba, Italy)
6. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
7. คิวปริกคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, J.T. Baker, USA)
8. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) (Analytical grade, Analar®, England)
9. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
10. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$) (Analytical grade, Fluka, Switzerland)
11. โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2.6H_2O$) (Analytical grade, Univar, Australia)
12. ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) (Analytical grade, Fluka, Switzerland)
13. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Fluka, Switzerland)
14. ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
15. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Analytical grade, Univar, Australia)
16. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
17. โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
18. โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4.2H_2O$) (Analytical grade, BDH chemical, England)
19. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
20. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
21. โซเดียมไฮโดรซัลไฟด์ ($Na_2O_4S_2$) (Analytical grade, Sigma, USA)
22. ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA) (Analytical grade, Promega, USA)
23. ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไอรอนซอลท์ (Fe.EDTA) (Analytical grade, Fluka, Switzerland)
24. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) (Analytical grade, Merck, Germany)
25. ไดไทโอทรีอิทอล ($C_4H_{10}O_2S_2$) (Analytical grade, Sigma, USA)
26. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Analytical grade, Univar, Australia)
27. เบต้า-นิโคตินามายด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต เตตระโซเดียมซอลท์ไฮเดรต ($C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_3.xH_2O$) (Analytical grade, Sigma, USA)
28. เบต้า-นิโคตินามายด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ ไดโซเดียมซอลท์ไฮเดรต ($C_{21}H_{27}N_7Na_2O_{14}P_2.xH_2O$) (Analytical grade, Sigma, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการอ้างอิงเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

29. เบต้า-เมอแคปโทเอทานอล ($HSCH_2CH_2OH$) (Analytical grade, Pharmacia Biotech, Sweden)
30. แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone) (Analytical grade, BioMark™, India)
31. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
32. โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
33. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
34. ฟรุกโตส ($C_6H_{12}O_6$) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
35. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
36. เฟอร์รีดอกซิน (Feredixin from spinach) (Analytical grade, Sigma, USA)
37. เฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_2$) (Analytical grade, Fluka, Switzerland)
38. เฟอริคแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4$ citrate) (Analytical grade, BDH, England)
39. เมทิลไวโลเจนไดคลอไรด์ไฮเดรต ($C_{12}H_{14}C_{12}N_2.xH_2O$) (Analytical grade, Sigma, USA)
40. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($MgSO_4.6H_2O$) (Analytical grade, Carlo Erba, Italy)
41. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) (Analytical grade, Univar, Australia)
42. ยีสต์สกัด (Yeast-extract) (Analytical grade, Himedia®, India)
43. อลูมิเนียมซัลเฟตออกตะเดคะไฮเดรต ($Al_2(SO_4)_3.18H_2O$) (Analytical grade, J.T. Baker, USA)
44. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (Analytical grade, Univar, Australia)

3.2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

เมทานอล (CH_3OH) (Analytical grade, Scharlau, Spain)

3.2.5 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

1. ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอน (TIG, Thailand)
2. ก๊าซอาร์กอน (TIG, Thailand) (ความบริสุทธิ์ 99.999%)

3.2.6 ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

กานามัยซิน (Kanamycin) (Sigma, USA)

3.2.7 เอนไซม์

1. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (Biolab, USA)
2. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Promega, Germany)
3. เอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme) (Amresco, USA)

3.2.8 สารเคมีสำหรับการสกัด-วิเคราะห์ดีเอ็นเอและการเตรียม competent cell

1. กลีเซอรอล (Glycerol) (Analytical grade, Fluka, Switzerland)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) (Analytical grade, Analar®, England)
3. เจลสตาร์ (Gelstar) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
4. โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) (Analytical grade, Merck, Germany)
5. โซเดียมอะซีเตท (CH_3COONa) (Analytical grade, Scharlau, Spain)
6. ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) (Analytical grade, Promega,USA)
7. ทริสไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) (Analytical grade, Scharlau, Spain)
8. โบรโมฟีนอลบลู (Bromophenol blue) (Analytical grade, Sigma, USA)
9. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) (Analytical grade, Merck, Germany)
10. โพแทสเซียมอะซีเตท (CH_3COOK) (Analytical grade, Riedel-dehaen, Germany)
11. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) (Analytical grade, Univar, Australia)
12. อะกาโรส (Agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
13. ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA) (Analytical grade, BDH, England)
14. เอทานอล (C_2H_5OH) (Analytical grade, Fischer, USA)
15. IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (Analytical grade, Bio Basic, USA)
16. X-gal (5-Bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactoside) (Analytical grade, Bio Basic, USA)

3.2.9 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ฝ่าจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (Invitrogen, USA)

3.2.10 ชุดทดสอบ (Kit)

1. ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้เวกเตอร์ pDrive (PCR cloning Kit) (Qiagen, Germany)
2. ชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Germany)
3. ชุดสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Wizard® SV Genomic DNA Purification System Kit) (Promega, USA)
4. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (DNA High- Speed Plasmid Mini Kit) (Geneaid, Taiwan)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) (Olympus, CH30, Japan)
2. ขวดแก้ว (Headspace vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร (National Scientific, C4020-210, USA)
3. คิวเวต (Semimicro cuvette rectangular 10 mm) (Hellma, USA)
4. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares) (Pyrex, USA)
5. เครื่องแก๊สโครโมโตกราฟ (Gas Chromatograph) (Shimadzu 15-A, Kyoto, Japan)
6. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490188, UK)
7. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermoblock) (Labnet, Accu Block™ digital dry bath, USA)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Spectrafuge 16M, Labnet, USA)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortech Z383K, Germany)
10. เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)
11. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycler) (Perkin Elmer 480, USA)
12. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1601, Japan)
13. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Cyberscan 2000^{pH}, Singapore)
14. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ (12-well cell culture plate) (Multidishes, Nunclon™ Delta Surface, Denmark)
15. ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipment) (Advance, Mupid® - exu, Japan)
16. ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (Gel documentation) (Syngene, MD1 1019, Japan)
17. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
18. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Binder, D-78532 control E2, Thailand)
19. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Lab focus, Contherm Thermotec 2000, Thailand)

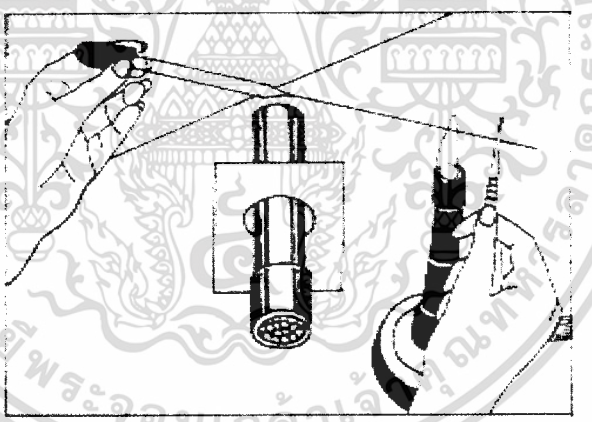
3.4 วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำ การคัดแยกสาหร่าย และการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.4.1 การเก็บตัวอย่างน้ำและคัดแยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณเขตสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง และภายในบริเวณโรงเรียนพรตพิทยพยัต เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร ในช่วงเวลาระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2551 โดยใช้ขวด duran ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในน้ำจนกระทั่งน้ำเต็มขวด นำตัวอย่างน้ำที่มีสาหร่ายมาทำการคัดแยกเชื้อ โดยเริ่มจากการเตรียมพาสเจอร์ปิเปตเพื่อทำเป็นอุปกรณ์สำหรับดูดเซลล์สาหร่ายใช้ปากคีบจับปลายด้านหนึ่งของพาสเจอร์ปิเปต แล้วเผาปลายหลอดด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์จนกระทั่งพาสเจอร์ปิเปตอ่อนตัว ขณะเดียวกันให้ใช้ปากคีบดึงหลอดแก้วเพื่อให้หลอดยาวขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดจะเล็กลง (รูปที่ 3.1) เมื่อได้ขนาดตามที่ต้องการแล้ว ใช้ปากคีบดึงส่วนที่ไม่ต้องการทิ้ง ส่วนอีกด้านหนึ่งของพาสเจอร์ปิเปตใส่จุกยางเพื่อใช้ในการดูดเซลล์ นำตัวอย่างน้ำที่มีสาหร่ายหยดลงบนสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบเซลล์สาหร่ายให้จุ่มปลายพาสเจอร์ปิเปต โดยกะระยะให้ปลายพาสเจอร์ปิเปตอยู่บนเซลล์พอดี แล้วใช้ปลายปิเปตกดลงบนเซลล์ที่ต้องการ เซลล์นั้นจะถูกดูดขึ้นมา นำเซลล์ที่ถูกดูดขึ้นมาใส่ในจานหลุมเลี้ยงสาหร่าย (12-well cell culture plate) ที่บรรจุอาหาร BG11 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการดูดอาหารขึ้นลงอย่างน้อย 3-4 ครั้ง เพื่อให้เซลล์สาหร่ายหลุดออกจากปลายพาสเจอร์ปิเปตลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง จากนั้น ทำการล้างปิเปตโดยทำการดูดขึ้นลงในหลุมที่เตรียมไว้สำหรับการล้างพาสเจอร์ปิเปต เมื่อดูดสาหร่ายจนครบทุกหลุมแล้ว วางจานเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่แต่ละหลุมมีเซลล์สาหร่ายในที่มีแสงสว่างเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโต



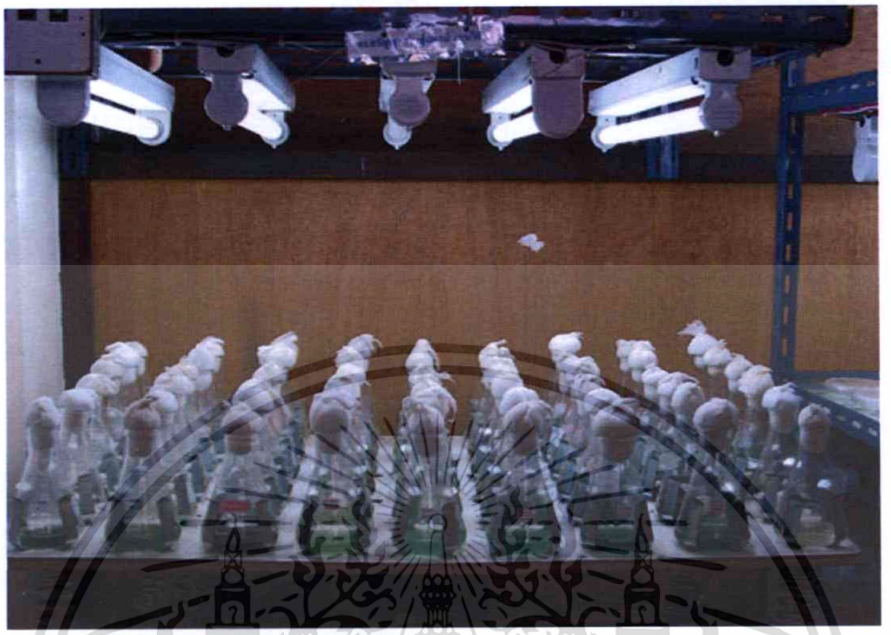
รูปที่ 3.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยการเตรียมพาสเจอร์ปิเปต
ที่มา : ลัดดา (2542)

3.4.2 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน (รูปที่ 3.2) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-3 สัปดาห์ ในการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีมาลากบนจานที่มีอาหารแข็ง BG11 นำไปบ่มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-3 สัปดาห์



รูปที่ 3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียในฟลาสก์

3.4.3 วิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli*

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ในการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงจะนำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้ 0.4 มิลลิลิตร ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง

3.5 วิธีการวัดการเจริญเติบโต

3.5.1 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวชนิดต่างๆ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการศึกษาการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการศึกษาการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร

3.6 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

3.6.1 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวตามหัวข้อ 3.4.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เติมเมทานอล 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 45 วินาที ห่อฟอยล์ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ดูดสารละลายสีเขียวใส่หลอดใหม่ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร และ 650 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Lee และ Shen (2004) ดังสมการที่ 3.1

ปริมาณคลอโรฟิลล์ (a+b) (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $(4.0 \times A_{665}) + (25.5 \times A_{650}) \times 10$ สมการที่ 3.1

3.6.2 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย

นำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวตามหัวข้อ 3.4.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เติมเมทานอล 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 45 วินาที ห่อฟอยล์ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น ดูดสารละลายสีเขียวใส่หลอดใหม่ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ ตามวิธีการของ Mackinney (1941) ดังสมการที่ 3.2

ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $12.7 \times A_{650} \times 10$ สมการที่ 3.2

3.7 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย

นำสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามวิธีในหัวข้อ 3.4.2 มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งสารละลาย จากนั้น ทำการกระจายเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปิเปตสารละลายเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรที่ห่อฟอยล์ ปิดฝาขวด นำตัวอย่างไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที แล้วคว่ำขวดบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำก๊าซตรงบริเวณส่วนบนของขวด (head space) ไปวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (GC) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจน แสดงในตารางที่ 3.1 และโครมาโตแกรมของก๊าซไฮโดรเจนที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง GC-TCD แสดงดังรูปที่ จ 1 (ภาคผนวก จ) แล้วนำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ไปคำนวณการผลิตไฮโดรเจน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของไฮโดรเจน รูปที่ จ 2 (ภาคผนวก จ) และคำนวณค่าการผลิตไฮโดรเจนที่ได้ตามวิธีในภาคผนวก ฉ

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ [Gas Chromatograph- Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)]

พารามิเตอร์	**สภาวะในการเดินระบบ**
Column	Pack column 2 m; Molecular sieve 5°A 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 flow rate 20 ml/min (99.999 % purity)

3.8 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

นำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวชนิดต่างๆ ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 และ 750 นาโนเมตร (สำหรับไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว ตามลำดับ) ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ วัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรและที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 1 สัปดาห์ นำเซลล์ไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในหัวข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในหัวข้อ 3.6 จากนั้น คัดเลือกสาหร่ายสีเขียวหรือไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดมาศึกษาชนิดของสาหร่ายต่อไป

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 วิธีการศึกษาชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

3.9.1 วิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง โดยใช้ชุด Wizard® SV Genomic DNA Purification System Kit (Promega, USA) โดยเขี่ยเชื้อสาหร่ายสีเขียวลงบนอาหารแข็ง BG11 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้น เขี่ยเชื้อทั้งหมดมากระจายในบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (TE) พีเอช 7.5 ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งสารละลาย แตกเซลล์ด้วยสารละลายสำหรับแตกเซลล์ (lysis buffer) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ปิเปตขึ้นลงเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ปิเปตส่วนใสใส่ในคอลัมน์ Wizard® SV minicolumn แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ปิเปตสารละลายสำหรับล้าง (wash solution) ปริมาตร 650 ไมโครลิตรลงไปในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 3 รอบ ทำการปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าเพื่อทำให้ปราศจากเอทานอล เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์มาใส่หลอดใหม่ ปิเปตน้ำที่ปราศจากนิวคลีเอส 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้น ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.9.2 วิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

เตรียมอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 0.16 กรัม ในฟลาสก์ที่มีบัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA (TBE) พีเอช 8.0 ที่ประกอบด้วย Tris 0.089 โมลาร์ Boric acid 0.089 โมลาร์ และ EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้อะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันในตู้ไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้ได้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้น เติมเจลสตาร์ในอัตราส่วนเจลสตาร์ 1 ส่วนต่ออะกาโรส 10,000 ส่วน เทใส่แม่พิมพ์ ทิ้งไว้ให้แข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้น นำเจลมาวางบนอ่าง (chamber) เทบัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA ลงไปในอ่างจนท่วมเจล หยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานและดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาที่ผสมสีย้อม (tracking dye) (ภาคผนวก ค) ลงไป ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.3 วิธีการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายที่คัดเลือกด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือไพรเมอร์ 18S rDNA F1 (5'CTGCGAATGGCTCATTAA ATC-3') และไพรเมอร์ 18S rDNA R1 (5'AAGGCCAGGGACGTAATCAA-3') (Rasoul-Amini และคณะ, 2009) โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากสาหร่ายที่คัดเลือกเป็นดีเอ็นเอแม่แบบและใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา องค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.2 และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ 3 ขั้นตอน ดังตารางที่ 3.3 นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ดังแสดงในหัวข้อ 3.9.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์ PCR (5 เท่า)	10
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (10 มิลลิโมลาร์)	1
ไพรเมอร์ 18S rDNA F1 (5 มิลลิโมลาร์)	2.5
ไพรเมอร์ 18S rDNA R1 (5 มิลลิโมลาร์)	2.5
แมกนีเซียมคลอไรด์ (25 มิลลิโมลาร์)	3
เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5
จีโนมิกดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	28.5
ปริมาตรสุทธิ	50

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
Initial Denaturation	94	5 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	35 รอบ
Annealing	48	45 วินาที	
Primer Extension	72	90 วินาที	
Final Extension	72	10 นาที	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.4 วิธีการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

หลังจากวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสดังวิธีในข้อ 3.9.2 แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) โดยเติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายทั้งหมดลงคอลัมน์ QIAprep® spin column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่า เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดใหม่ ปิเปตบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์

3.9.5 วิธีการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.9.4 มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pDrive โดยใช้ PCR cloning kit (Qiagen, Germany) แผนที่ยีนของเวกเตอร์ pDrive แสดงในภาคผนวก ง ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ ligation 1 เท่า ที่มีเอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต pDrive 50 นาโนกรัม ผลิตภัณฑ์ PCR 20 นาโนกรัม และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลาย ligation mixture บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

3.9.6 วิธีการเตรียม Competent cell *E. coli* DH5α และการทรานสฟอร์มเมชัน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α 1 โคโลนีในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ดูดเซลล์แขวนลอย 0.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร SOB (ภาคผนวก ข) 100 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงต่อโดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง เทสารละลายเซลล์แขวนลอยใส่ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ 100 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น กระจายตะกอนเซลล์ในสารละลาย RF1 (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 33.3 มิลลิลิตร (1 ใน 3 เท่าของปริมาตร SOB) แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส กระจายตะกอนเซลล์ในสารละลาย RF2 (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (1 ใน 25 เท่าของปริมาตร SOB) ปิเปต competent cell ที่ได้ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดละ 100 ไมโครลิตร ในการทำทรานสฟอร์มเมชัน นำส่วนผสมของปฏิกิริยา ligation 10 ไมโครลิตรที่ได้จากข้อ 3.9.5 มาเติมลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ที่มี competent cell 100 ไมโครลิตร วางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำมาวางบนน้ำแข็งอีกครั้ง นาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อมากระจายบนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-Gal ความเข้มข้นสุดท้าย 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิด pDrive ซึ่งมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR จากคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินและการทำปฏิกิริยากับ X-Gal และ IPTG โดยเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งเกิดจากพลาสมิด pDrive หลังจากที่ได้รับผลิตภัณฑ์ PCR จะสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเพื่อย่อย X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงิน จึงทำให้ได้โคโลนีเป็นสีขาว

3.9.7 วิธีการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ DNA High-Speed plasmid mini kit (Geneaid, Taiwan) โดยนำโคโลนีสีขาวที่ได้จากข้อ 3.9.6 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ PD1 ที่มี RNase ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PD2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสใส่คอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ปิเปตบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน PD column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้น ปิเปตสารละลายสำหรับล้าง (wash solution) ที่เติมเอทานอลปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้น เทส่วนใสทิ้งแล้วปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่า เป็นเวลา 3 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่หลอดใหม่ ปิเปตบัฟเฟอร์สำหรับชะพลาสมิด (elution buffer) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ เป็นเวลา 2 นาที เก็บพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.9.8 วิธีการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

ทำการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.4 นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง จากนั้น นำดีเอ็นเอไปวิเคราะห์โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสดังหัวข้อ 3.9.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์เอช (10 เท่า)	1
พลาสมิดดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	6
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ	2
ปริมาตรสุทธิ	10

3.9.9 วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA

นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7 และ SP6 หยุดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye™ Terminator Reactions kit (Perkin Elmer, USA) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับยีน 18S rDNA ของสาหร่ายชนิดอื่นๆ ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม Blastn

3.10 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะโฟโตออโตโทรป

3.10.1 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BBM, BG11 และ N8 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส จากนั้น กระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม คือ BBM, BG11 และ N8 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แก้วขนาด 10 มิลลิลิตรที่ห่อฟอยล์ ปิดฝาขวด นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.10.2 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือก (จากผลข้อ 3.10.1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม (จากผลข้อ 3.10.1) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 โดยการเก็บเกี่ยวเซลล์ นำตัวอย่างไปพ่นในอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที คว่ำขวดบ่มภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.10.3 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารคัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$), ซูโครส ($C_{12}H_{24}O_{11}$), ฟรุกโทส ($C_6H_{12}O_6$), โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$), โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และโซเดียมอะซีเตท (CH_3COONa) โดยให้มีจำนวนโมลของคาร์บอนเท่ากัน คือเท่ากับ 189 ไมโครโมลคาร์บอนต่อลิตร (มาจากจำนวนโมลของคาร์บอนของโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 189 ไมโครโมลาร์ในอาหาร BG11) และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.10.4 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณของไนโตรเจนในอาหารคัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) เท่ากับ 0, 0.075, 0.15, 0.3, 0.75, 1.5 และ 6 มิลลิโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.10.5 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารคัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) เท่ากับ 0, 0.039, 0.078, 0.155, 0.31, 0.62 และ 1.55 มิลลิโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.10.6 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณของเหล็กซัลเฟตในอาหารคัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของเหล็กซัลเฟต ($FeSO_4$) เท่ากับ 0, 2.25, 4.5, 9, 18, 36และ 90 ไมโครโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.10.7 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหารสูตรปกติ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BBM สูตรที่เหมาะสม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับอาหาร BBM สูตรปกติ จากนั้น นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป

3.11.1 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP แปรผันระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 ทุก 3 ชั่วโมงและเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบ 12, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.11.2 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม ทำการเตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 โดยทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศที่เวลา 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.11.3 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะมืดและสว่าง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและภายใต้สภาวะสว่างให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ส่วนภายใต้สภาวะมืดไม่ให้แสงสว่างตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง เพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11.4 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที โดยแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 ทุก 3 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.11.5 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยแปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 500, 1,000, 2,000, 3,000 และ 4,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 ทุก 3 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.11.6 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเติมสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.7 หลังจากนั้น เติมสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ได้แก่ เมทิลไวโอโลเจน(methylviologen) ไดไทโอไนท์ (dithionite) ไดไทโอทรีอิทอล (dithiothreitol) เบต้า-เมอแคปโทเอทานอล (β-mercaptoethanl) นิโคตินามายด์อะดินีนไดนิวคลีโอไทด์ (NADH) กลูโคส (glucose) ฟรุกโตส (fructose) และซูโครส (sucrose) ที่ผ่านการพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ จากนั้น นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11.7 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันแหล่งของคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) ซูโครส ($C_{12}H_{24}O_{11}$) ฟรุกโทส ($C_6H_{12}O_6$) โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และโซเดียมอะซีเตท (CH_3COONa) โดยให้มีจำนวนโมลของคาร์บอนเท่ากัน คือเท่ากับ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร (มาจากจำนวนโมลของคาร์บอนในกรดอะซีติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ ในอาหาร TAP) และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 ทุก 3 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.11.8 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของโซเดียมอะซีเตทที่คัดเลือกเท่ากับ 0, 4.35, 8.7, 17.4, 34.8, 69.6 และ 174 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 ทุก 3 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.11.9 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันปริมาณของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เท่ากับ 0, 0.245, 0.49, 0.98, 1.96, 3.92 และ 9.8 มิลลิโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 ทุก 3 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11.10 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารแปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) เท่ากับ 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 ทุก 3 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.11.11 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันปริมาณของเหล็กซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของเหล็กซัลเฟต ($FeSO_4$) เท่ากับ 0, 2.25, 4.5, 9, 18, 36 และ 90 ไมโครโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 ทุก 3 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.11.12 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหารสูตรปกติ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ ซึ่งมีความเข้มข้นของของอะซีเตทเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 1.96 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.4 มิลลิโมลาร์ และเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 18 ไมโครโมลาร์ จากนั้น นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายและนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11.13 การวิเคราะห์ข้อมูล

ออกแบบชุดการทดลอง (experimental design CRD) เป็นแบบปัจจัยเดียว วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนโดยวิธี one way anova แล้ววัดค่าความแตกต่างของข้อมูลตามวิธีของ Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics ver. 17.0 โดยตั้งสมมติฐานคือยอมรับสมมติฐาน H_0 เมื่อค่า $P \leq 0.05$ มีปัจจัยอย่างน้อย 1 ปัจจัยที่แตกต่างกัน และปฏิเสธสมมติฐาน H_1 เมื่อค่า $P > 0.05$ คือมีปัจจัยอย่างน้อย 1 ปัจจัยที่มีค่าไม่แตกต่างกัน ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะแสดงดังในตารางที่ ฉ 1 และ ฉ 2 (ภาคผนวก ฉ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดแยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติในบริเวณเขตลาดกระบัง

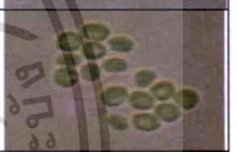
จากการเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้งสิ้น 5 บริเวณดังนี้ บ่อน้ำภายในบริเวณเขตสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 4 บ่อ ได้แก่ บ่อน้ำบริเวณตึกแอล คณะเทคโนโลยีการเกษตร บ่อน้ำบริเวณตึกพระเทพฯ บ่อน้ำบริเวณคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ บ่อน้ำหน้าป้ายคณะวิศวกรรมศาสตร์ และบ่อน้ำภายนอกสถาบันฯ 1 บ่อ คือ บ่อน้ำภายในบริเวณโรงเรียนพรตพิทยพยัต ในเดือนมกราคม-เดือนมีนาคม พ.ศ. 2551 จากนั้น นำตัวอย่างน้ำมาส่องกล้องจุลทรรศน์และคัดแยกเชื้อสาหร่ายที่พบในน้ำให้บริสุทธิ์โดยวิธี single cell isolation พบว่าสามารถแยกสาหร่ายสีเขียวได้ทั้งหมด 9 ไอโซ-เลท และไซยาโนแบคทีเรียได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลท จากแหล่งน้ำทั้ง 5 บริเวณ โดยสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้ 9 ไอโซเลท มาจากบ่อน้ำบริเวณตึกแอล คณะเทคโนโลยีการเกษตร 2 ไอโซเลท (GA1, GA2) บ่อน้ำบริเวณตึกพระเทพฯ 2 ไอโซเลท (GA3, GA4) บ่อน้ำบริเวณคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ 2 ไอโซเลท (GA5, GA6) บ่อน้ำหน้าป้ายคณะวิศวกรรมศาสตร์ 1 ไอโซเลท (GA7) และบ่อน้ำภายในบริเวณโรงเรียนพรตพิทยพยัต 2 ไอโซเลท (GA8, GA9) ไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 3 ไซโอเลท จากแหล่งน้ำทั้ง 3 บริเวณ โดยไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้มาจากบ่อน้ำบริเวณตึกแอล คณะเทคโนโลยีการเกษตร 1 ไอโซเลท (CY1) บ่อน้ำบริเวณตึกพระเทพฯ 1 ไอโซเลท (CY2) และบ่อน้ำบริเวณคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ 1 ไอโซเลท (CY3) (ตารางที่ 4.1) จากนั้น นำสาหร่ายที่คัดแยกได้มาศึกษารูปร่างลักษณะของสาหร่ายแต่ละไอโซเลท ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลทของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากบ่อน้ำในบริเวณต่างๆ

บริเวณ	จำนวนของสาหร่ายสีเขียว (ไอโซเลท)	จำนวนของไซยาโนแบคทีเรีย (ไอโซเลท)
1. ตึกแอล คณะเทคโนโลยีการเกษตร	2	1
2. ตึกพระเทพฯ	2	1
3. ตึกคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์	2	1
4. หน้าป้ายคณะวิศวกรรมศาสตร์	1	0
5. โรงเรียนพรตพิทยพยัต	2	0

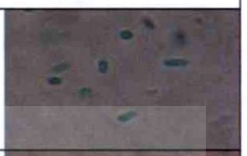
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและโรงเรียนพรตพิทยพยัต (GA= Green algae, CY= Cyanobacteria) (กำลังขยายภาพ 1,000X)

ไอโซเลท	บริเวณที่คัดแยก	ลักษณะ	ภาพถ่าย
GA1	ตึกแอล คณะเทคโนโลยีการเกษตร	โคโลนีติดกัน 4 เซลล์ รูปร่างเซลล์รีหรือคล้ายกระสวย	
GA2	ตึกแอล คณะเทคโนโลยีการเกษตร	เซลล์เดี่ยว รูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว	
GA3	ตึกพระเทพฯ	เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม	
GA4	ตึกพระเทพฯ	เซลล์จับกันเป็นโคโลนี 8 เซลล์ รูปร่างกลม	
GA5	คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์	เซลล์เดี่ยว รูปร่างคล้ายกระสวย	
GA6	คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์	เซลล์คล้ายเม็ดถั่วจับกัน	
GA7	ป้ายหน้าคณะวิศวกรรมศาสตร์	เซลล์จับกันเป็นโคโลนี 4-6 เซลล์ รูปร่างคล้ายกระสวย	
GA8	โรงเรียนพรตพิทยพยัต	เซลล์เดี่ยว รูปร่างรี บางเซลล์คล้ายกระสวย	
GA9	โรงเรียนพรตพิทยพยัต	เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม	
CY1	คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์	เซลล์เดี่ยว รูปร่างท่อนยาว	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

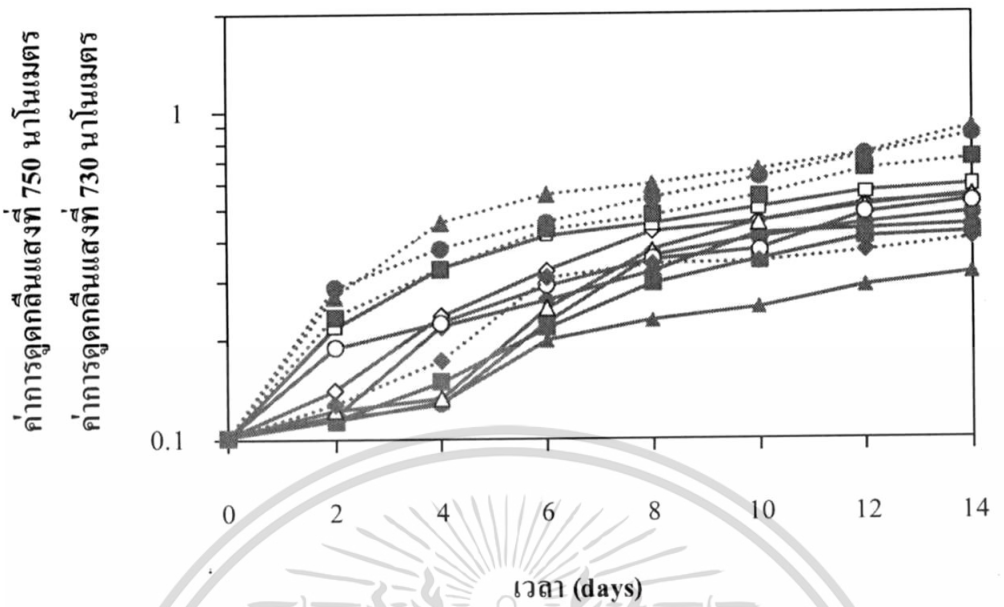
ตารางที่ 4.2 (ต่อ) รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และโรงเรียนพรตพิทยพยัต (GA= Green algae, CY= Cyanobacteria) (กำลังขยายภาพ 1,000X)

ไอโซเลท	บริเวณที่คัดแยก	ลักษณะ	ภาพถ่าย
CY2	ตึกพระเทพฯ	เซลล์เดี่ยว รูปร่างท่อนสั้น	
CY3	ตึกคณะเทคโนโลยีการเกษตร	เส้นสายยาว มีผนังกั้น	

4.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

นำสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท มาทดลองเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของแต่ละไอโซเลท โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 และ 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 และ 730 นาโนเมตร ตามลำดับ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย CY1, CY2 และ CY3 มีการเจริญเติบโตที่สูงกว่าสาหร่ายสีเขียวอย่างเห็นได้ชัด โดยไซยาโนแบคทีเรีย CY2 มีการเจริญเติบโตสูงสุด (รูปที่ 4.1) เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว พบว่าสาหร่ายสีเขียวแต่ละไอโซเลทมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน โดยมีช่วงการเจริญเติบโตในระยะ lag phase ที่แตกต่างกัน จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA6 มีการเจริญสูงสุดในบรรดาสาหร่ายสีเขียว และสาหร่ายไอโซเลท GA3 มีการเจริญเติบโตต่ำที่สุด (รูปที่ 4.1)

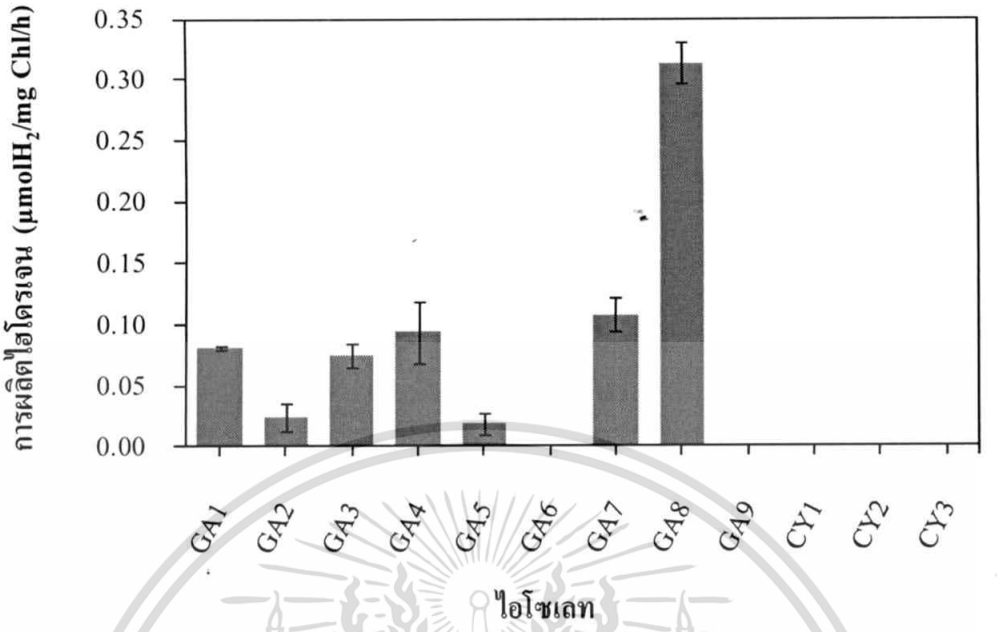
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท GA1 (-◆-), GA2 (-■-), GA3 (-▲-), GA4 (-●-), GA5 (-◇-), GA6 (-□-), GA7 (-☆-), GA8 (-○-), GA9 (◆), CY1 (■), CY2 (▲) และ CY3 (●) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในแต่ละไอโซเลทที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC–TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดเท่ากับ 0.313 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.2) โดยผลิตได้มากกว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA1, GA2, GA3, GA4, GA5 และ GA7 ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 0.081, 0.024, 0.074, 0.094, 0.019 และ 0.105 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA6 และGA9 รวมทั้งไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท CY1 CY2 และ CY3 ไม่พบการผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 4.2)

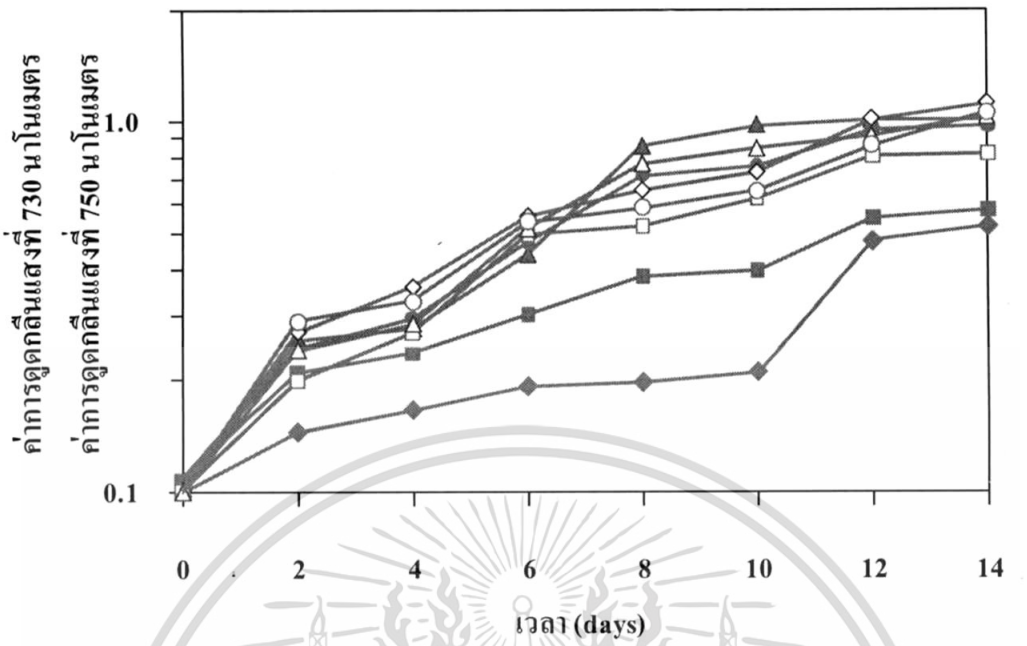
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำธรรมชาติ

หลังจากนั้น นำสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ที่ผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่สูงกว่าสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลทอื่นที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำธรรมชาติ มาทดลองเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนกับสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ *Anabaena siamensis* TISTR 8012, *Ankistodesmus falcatus* TISTR 8557, *Calothrix agarth* TISTR 8110, *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261, *Nostoc carneum* TISTR 8159, *Synechococcus* sp. PCC 7942 และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 และ 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 และ 730 นาโนเมตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดมีการเจริญเติบโตในอาหาร BG11 ใกล้เคียงกันและสูงกว่าสาหร่ายสีเขียวอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.3) โดยเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 กับสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 พบว่าสาหร่ายไอโซเลท GA8 มีการเจริญเติบโตสูงกว่าสาหร่าย *C. vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 (รูปที่ 4.3)

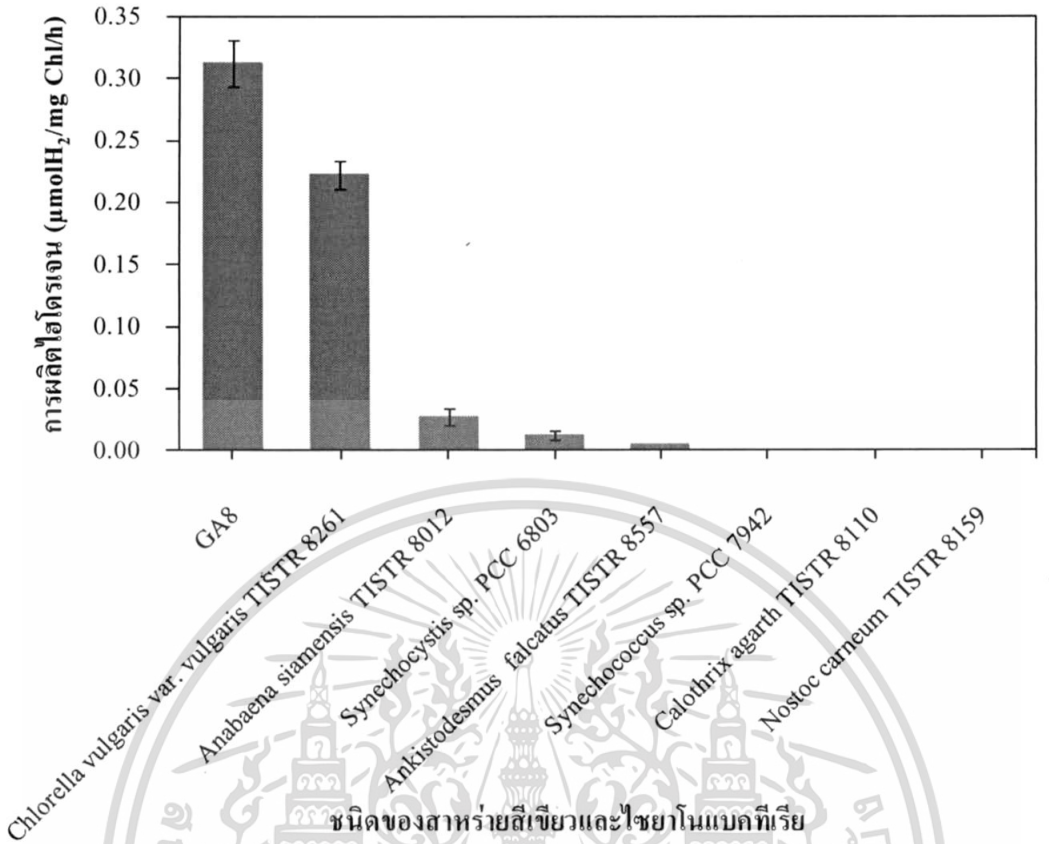
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว GA8 (-■-) และ *C. vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 (-◆-) และไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* TISTR 8012 (-○-), *A. falcatus* TISTR 8557 (-□-), *C. agarth* TISTR 8110 (-▲-), *N. carneum* TISTR 8159 (-●-), *Synechococcus* sp. PCC 7942 (-△-) และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 (-◇-) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 สาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC–TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดเท่ากับ 0.328 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.4) โดยผลิตได้มากกว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* TISTR 8012, *Synechocystis* sp. PCC 6803 และ *A. falcatus* TISTR 8557 ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 0.222, 0.028 และ 0.055 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.4) และไม่พบการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. PCC 7942, *C. agarth* TISTR 8110 และ *N. carneum* TISTR 8159 ดังนั้น จึงเลือกสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 มาศึกษาชนิดและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 การเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดแยกได้ไอโซเลท GA8 กับสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ

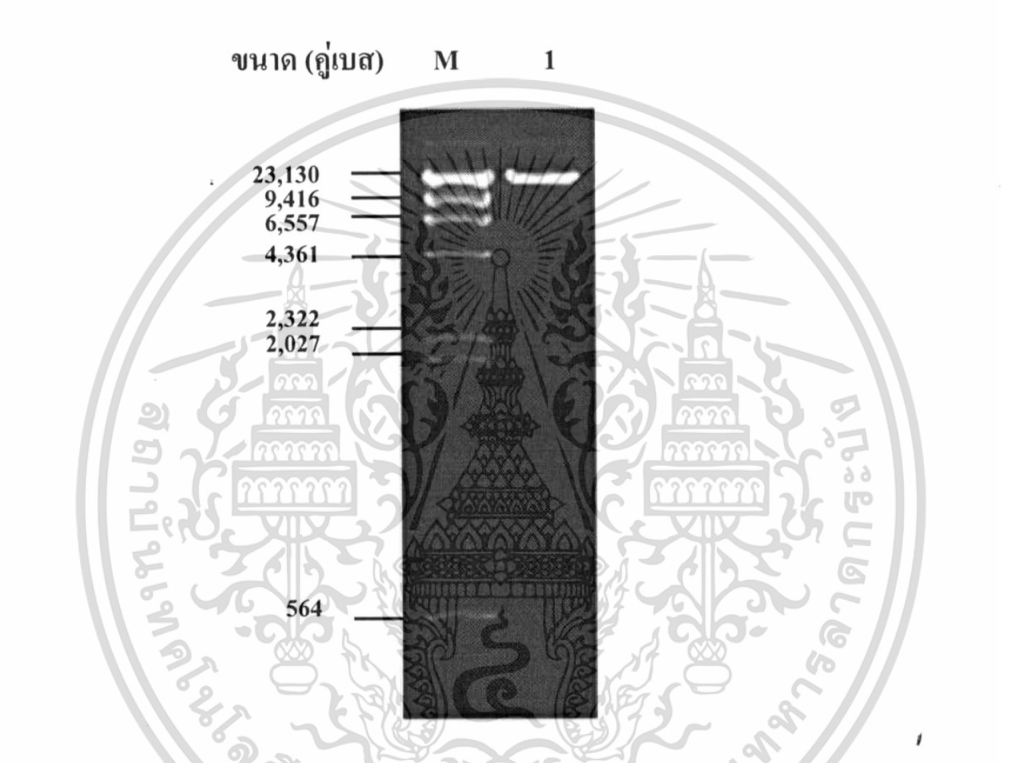
4.3 ผลการศึกษาชนิดของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ที่ผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

4.3.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8

จากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ที่ผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงโดยใช้ชุด Wizard® SV Genomic DNA Purification System Kit โดยเขี่ยเชื้อสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 บนอาหารแข็ง BG11 เพาะเลี้ยงประมาณ 2 สัปดาห์ นำเซลล์ที่ได้มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลโดยให้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต พบว่า ปรากฏแถบจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 1 แถบ (รูปที่ 4.5) เมื่อเปรียบเทียบขนาดและปริมาณของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท GA8 มีขนาดสูงกว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 23,130 คู่เบสของดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจะเพาะ *Hin*dIII และมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 มีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากปรากฏแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ไม่มีรอยปื้นของแถบจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกย่อย และไม่ปรากฏแถบของอาร์เอ็นเอที่อยู่ต่ำกว่าแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอ จากนั้น นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป



รูปที่ 4.5 จีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 จากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

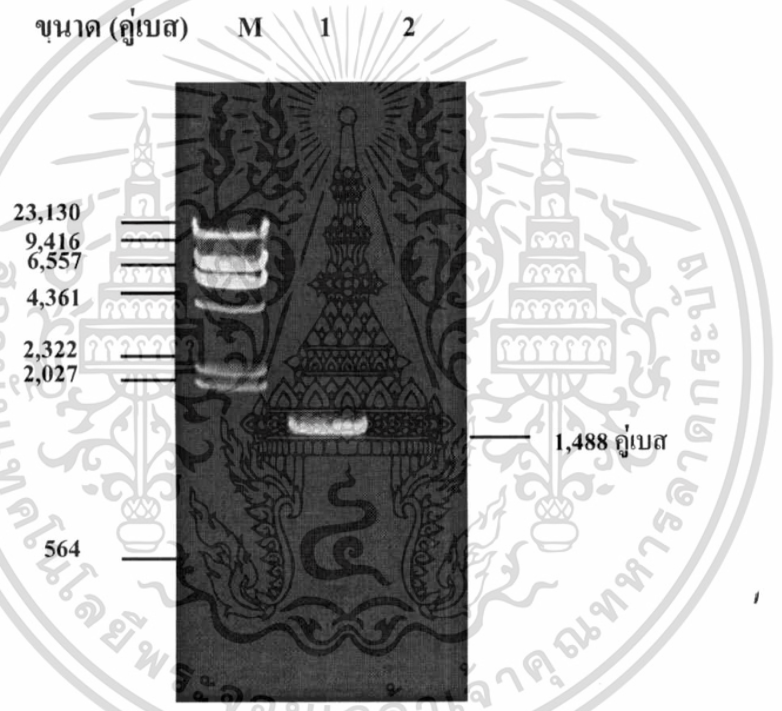
1 จีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8

4.3.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR)

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 มาเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังวิธีการในข้อ 3.9.3 ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือไพรเมอร์ 18S rDNA F1 และไพรเมอร์ 18S rDNA R1 และใช้อุณหภูมิในการจับตัว (annealing temperature) ที่ 48 องศาเซลเซียส นำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 1 แถบ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 มีขนาดประมาณ 1,400-1,500 คู่เบส (รูปที่ 4.6) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้คือ 1,498 คู่เบส จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick® PCR Purification Kit นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปเชื่อมกับเวคเตอร์ pDrive ต่อไป



รูปที่ 4.6 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA จากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8

2 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เมื่อไม่เติมจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (negative control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

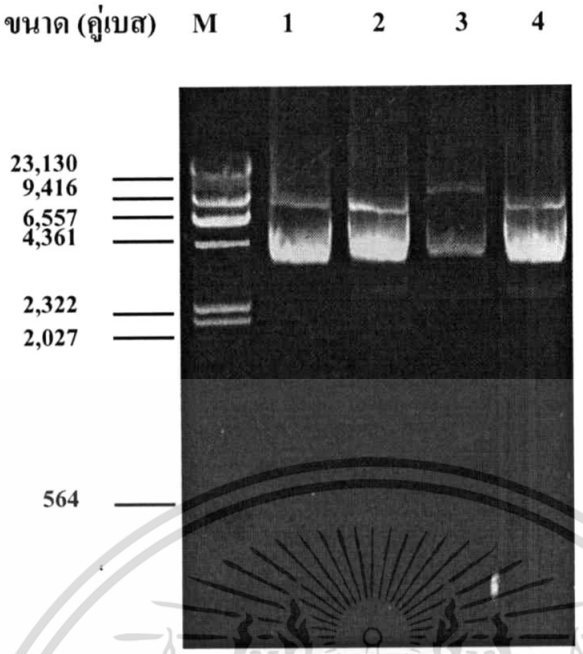
4.3.3 ผลการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ pDrive และการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ขนาดประมาณ 1,400-1,500 คู่เบส ไปเชื่อมต่อเข้าไปในเวคเตอร์ pDrive โดยใช้อัตราส่วนปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวคเตอร์เท่ากับ 10:1 และทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α พบว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation efficiency) เท่ากับ $1.7x10^6$ ซีเอฟยูต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ และได้โคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน X-Gal และ IPTG ทั้งหมด 842 โคโลนี หลังจากนั้น คัดเลือกโคโลนีสีขาว 4 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินและนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

4.3.4 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

จากการนำโคโลนีสีขาว 4 โคโลนีที่ได้จากการทรานสฟอร์มเมชันในข้อ 4.3.3 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ นำเซลล์ที่ได้มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป High-Speed plasmid mini kit ตั้งชื่อพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ว่า pF1R1 1.1, 1.2, 1.3 และ 1.4 แล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสี่ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่า พลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสี่มีขนาดใกล้เคียงกัน และมีดีเอ็นเอประมาณ 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.7) จากนั้น คัดเลือกเฉพาะพลาสมิดดีเอ็นเอ pF1R1 1.1 ไปทำการตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของโคโลนีสีขาวจากการสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป High-Speed plasmid mini kit

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pF1R1 1.1

2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pF1R1 1.2

3 พลาสมิดดีเอ็นเอ pF1R1 1.3

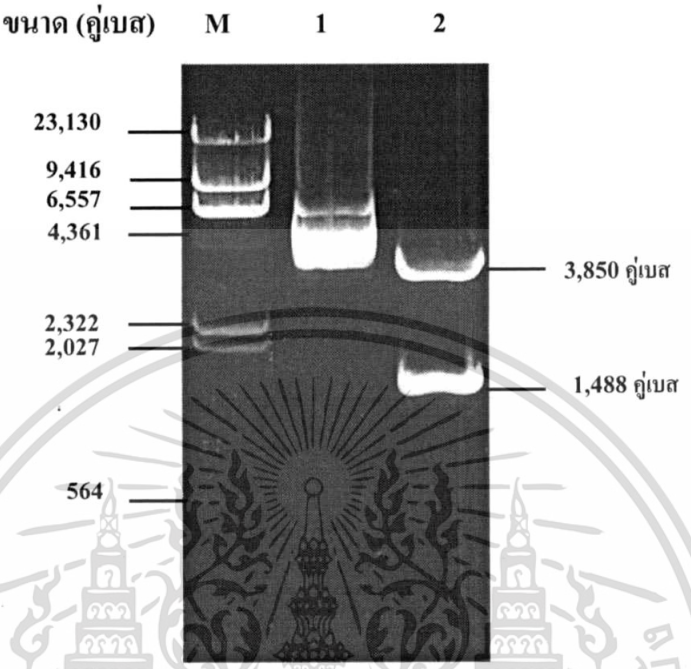
4 พลาสมิดดีเอ็นเอ pF1R1 1.4

4.3.5 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

จากนำพลาสมิดดีเอ็นเอของ pF1R1 1.1 ที่สกัดได้จากข้อ 4.3.4 มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และวิเคราะห์ผลการตัดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพลาสมิด pF1R1 1.1 ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดต่างกัน (รูปที่ 4.8) แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ 2 แถบนี้ แถบบนมีขนาดเท่ากับ 3,850 คู่เบสเป็นแถบของเวคเตอร์ pDrive ที่ไม่มี Insert แถบล่างคือแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 1,488 คู่เบส เนื่องจากพลาสมิด pF1R1 1.1 มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ในบริเวณ multicloning site 2 บริเวณ ดังนั้น เมื่อตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ก็จะได้เวคเตอร์ pDrive ที่ปราศจากผลิตภัณฑ์ PCR และแถบของผลิตภัณฑ์ PCR จากผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถสรุปได้ว่าพลาสมิด pF1R1 1.1 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pDrive กับผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8



รูปที่ 4.8 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pF1R1 1.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pF1R1 1.1

2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pF1R1 1.1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

4.3.6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7 และ SP6 หยุดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye™ Terminator Reactions kit วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 1,488 คู่เบส (รูปที่ 4.9) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีไทด์ของยีน 18S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม Blastn จากการเปรียบเทียบพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ที่คัดแยกมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติและมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวในจีนัส *Scenedesmus* ถึงร้อยละ 99.47-99.74 (ตารางที่ 4.3) ดังนั้น จึงตั้งชื่อสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 นี้ว่า *Scenedesmus* sp. KMITL-O1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(KMITL หมายถึง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, O1 หมายถึง สาหร่ายมีรูปร่างรี (Oval shape) ตัวที่ 1)

5'—ไพรเมอร์ 18S rDNA F1 → 3'

CTGCGAATGGCTCATTAAATC

```
1     AGTTATAGTTTATTTGGTGGTACCTTACTACTCGGATAACCGTAGTAATT     50
51    CTAGAGCTAAGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATATATTAGATAA    100
101   AAGGCCGACCGAGCTTTGCTCGACCCGCGGTGAATCATGATATCTTCACG    150
151   AAGCGCATGGCCTTGTGCCGGCGCTGTTCCATTCAAATTTCTGTGACGGA    200
201   GGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC    250
251   CAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGATACGGGGAGGTA    300
301   GTGACAATAAATAACAATACCGGGCATTTCATGTCTGGTAATTGGAATGA    350
351   GTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGTAAGTCTGGTGC    400
401   CAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCA    450
451   GTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGTTCTAGCGGTCCGCCTAT    500
501   GGTGAGTACTGCTATGGCCTTCCTTTCTGTCGGGGACGGGCTTCTGGGCT    550
551   TCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGACGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTG    600
601   TTCAAAGCAGGCTTACGCCAGAATACTTTAGCATGGAATAACACGATAGG    650
651   ACTCTGGCCTATCTTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGG    700
701   ACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTT    750
751   ATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAAT    800
801   CAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTC    850
851   AACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCGAATGTTTTTTTAATGACTT    900
901   CGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAAGTAT    950
951 GGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCG  1,050
1,001 TGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCA  1,100
1,051 GACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTG  1,150
1,101  GTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCC  1,200
1,151  GGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCTCAGTTGCTTTTTGCA 1,250
1,201  GCTGACTGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGTTTAGTCAATGGAAGTATG 1,300
1,251 AGGCAATAACAGGCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGC 1,350
1,301  TACACTGATGCATTCAACAAGCCTATCCTTGACCGAAGGGTCTGGGTAAT 1,400
1,351 CTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAGTCTTC  1,450
1,401  AACAAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCG             1,488
```

ไพรเมอร์18S rDNA R1

3' ← AAGGCCATTTACGTAATCAA —5'

รูปที่ 4.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

ลำดับ	สายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)
1	*Scenedesmus deserticola* isolate BCP-HAF2-VF10	99.74
2	*Scenedesmus deserticola* isolate BCP-YPGChar	99.74
3	*Scenedesmus deserticola* isolate BCP-EM2-VF3	99.74
4	*Scenedesmus deserticola* isolate BCP-SNI-2	99.60
5	*Scenedesmaceae deserticola* BCP-HAF2-VF10	99.60
6	*Scenedesmus pectinatus*	99.60
7	*Scenedesmus acutus*	99.60
8	*Scenedesmus obliquus*	99.53
9	*Scenedesmus littoralis*	99.47
10	*Scenedesmus acuminatus*	99.47

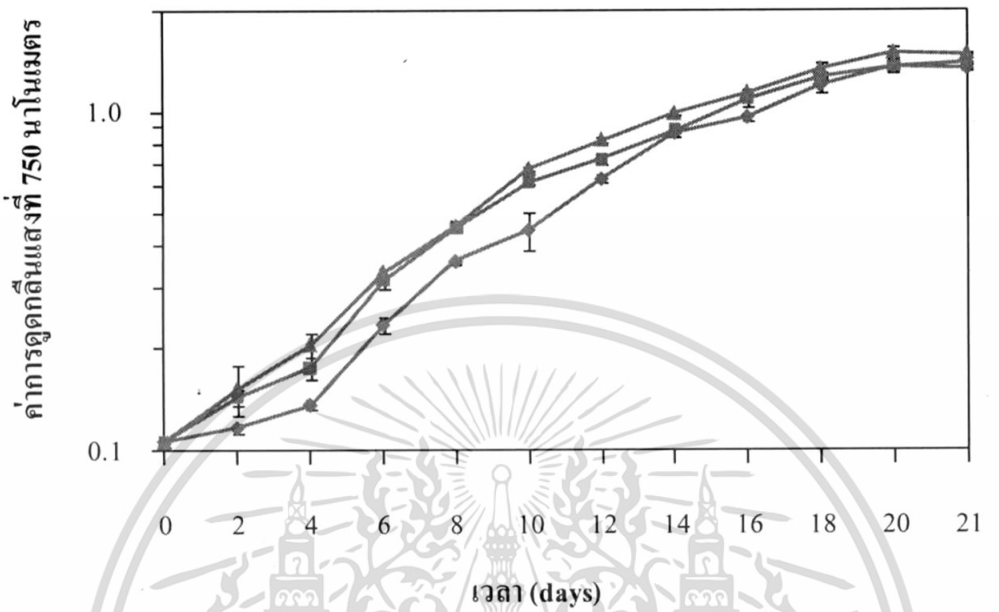
4.4 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะโฟโตออโตโทรป

4.4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว BBM, BG11 และ N8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้นประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 3 ชนิด โดยพบว่าสาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว N8 และมีค่าใกล้เคียงกับการเจริญของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BBM (รูปที่ 4.10) ส่วนสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BG11 จะมีการเจริญช้ากว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N8 และ BBM ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

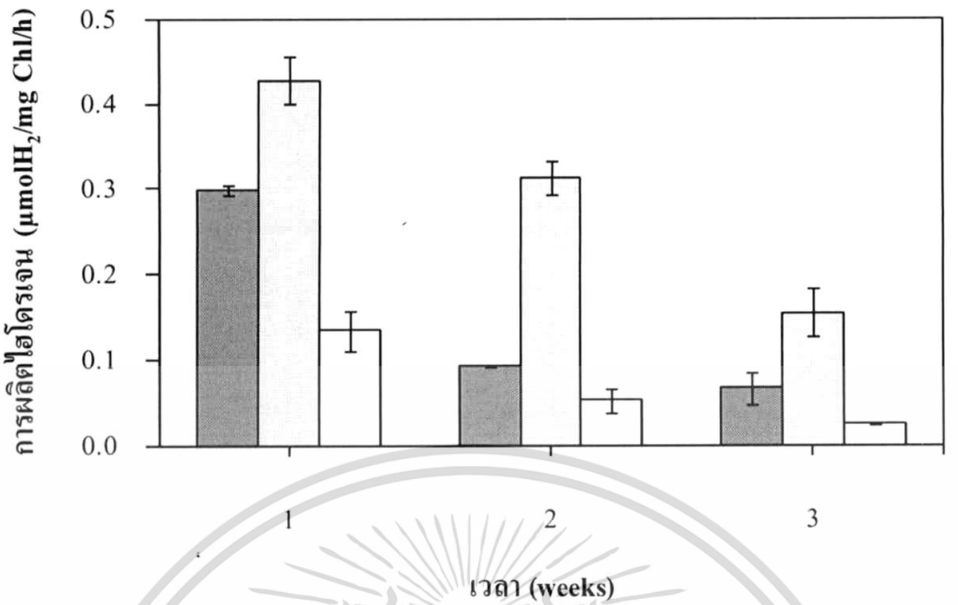
12 วันแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น การเจริญของสาหร่ายในอาหารทั้ง 3 ชนิด จะใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.10 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 (-▲-), BBM (-■-) และ N8 (-●-) เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM และมีอายุเซลล์ 1 สัปดาห์ ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดเท่ากับ 0.423 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.11) และมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM ที่มีอายุเชื้อ 2 และ 3 สัปดาห์ ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 0.312 และ 0.154 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 และ N8 ในทุกสัปดาห์ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.11) ดังนั้นจึงทำการเลือกเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร BBM เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



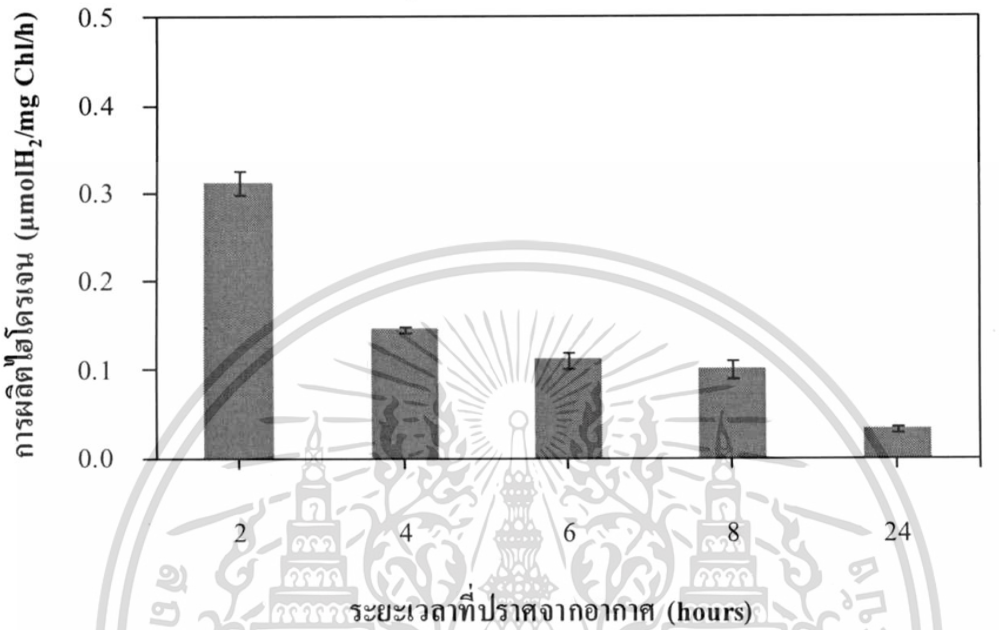
รูปที่ 4.11 การผลิตไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่มีอายุ 1, 2 และ 3 สัปดาห์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 (■), BBM (▣) และ N8 (□)

4.4.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว BBM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำไปเซลล์เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เก็บเซลล์สาหร่ายและนำมากระจายในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปิเปตลงในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ที่ห่อฟอยล์พ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที บ่มในสภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเมื่อปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 0.312 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.12) ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่ปรับตัวให้อยู่ใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณไฮโดรเจน 0.146, 0.112, 0.102 และ 0.033 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อนำค่าการผลิตไฮโดรเจนไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติ พบว่าปริมาณไฮโดรเจนที่สาหร่ายผลิตได้หลังจากระยะเวลาปรับตัวในสภาวะไร้อากาศ 2 ชั่วโมง มีค่าสูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับปริมาณไฮโดรเจนที่สาหร่ายผลิตได้หลังจาก

เอกสารนี้ถือเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลาปรับตัวในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 4, 6, 8, และ 24 ชั่วโมง ดังนั้น จึงได้เลือกระยะเวลาในการบ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศ 2 ชั่วโมง ก่อนนำสาหร่ายไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในการทดลองต่อไป



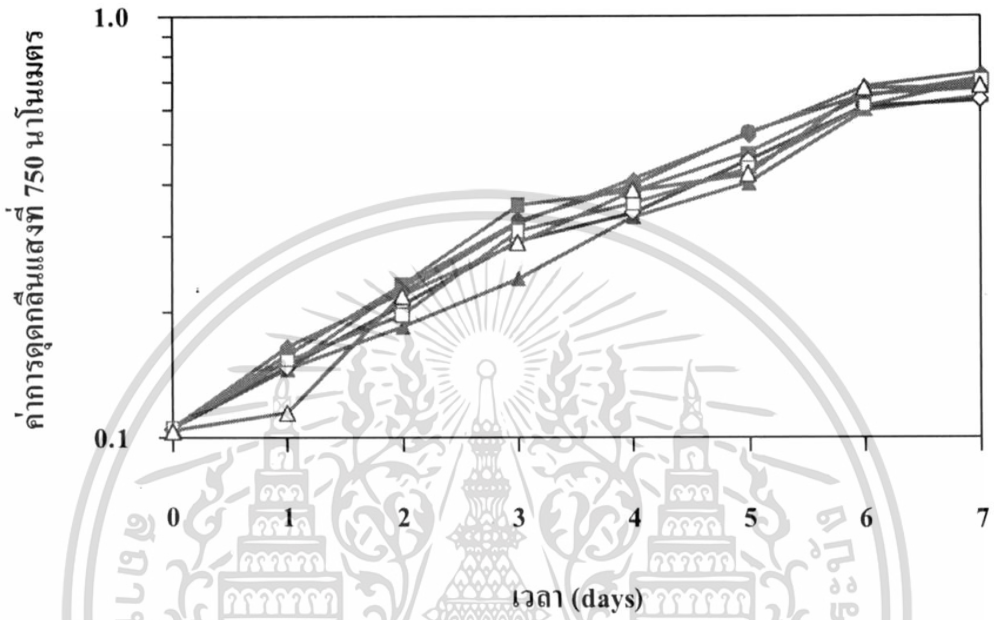
รูปที่ 4.12 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศ

4.4.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว BBM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส, ซูโครส, ฟรุกโทส, โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต, โซเดียมคาร์บอเนต และโซเดียมอะซีเตท ให้มีจำนวนโมลของคาร์บอนเท่ากัน คือเท่ากับ 189 ไมโครโมลคาร์บอนต่อลิตร (เนื่องจากสูตรอาหาร BBM ไม่มีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ จึงนำค่านี้มาจากจำนวนโมลของคาร์บอนของโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 189 ไมโครโมลาร์ในอาหาร BG11) จำนวนโมลของคาร์บอนอะตอมของสูตรอาหาร BG11 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 มีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากวันที่ 1 จันถึงวันที่ 6 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน โดยที่เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร BBM ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน สาหร่ายจะเข้าสู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะ log phase หลังวันที่ 2 ซึ่งช้ากว่าการเจริญของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่เติมแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 4.13) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 สามารถใช้คาร์บอเนต อะซีเตท น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และน้ำตาลโมเลกุลคู่เป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยให้ผลการเจริญที่ใกล้เคียงกัน

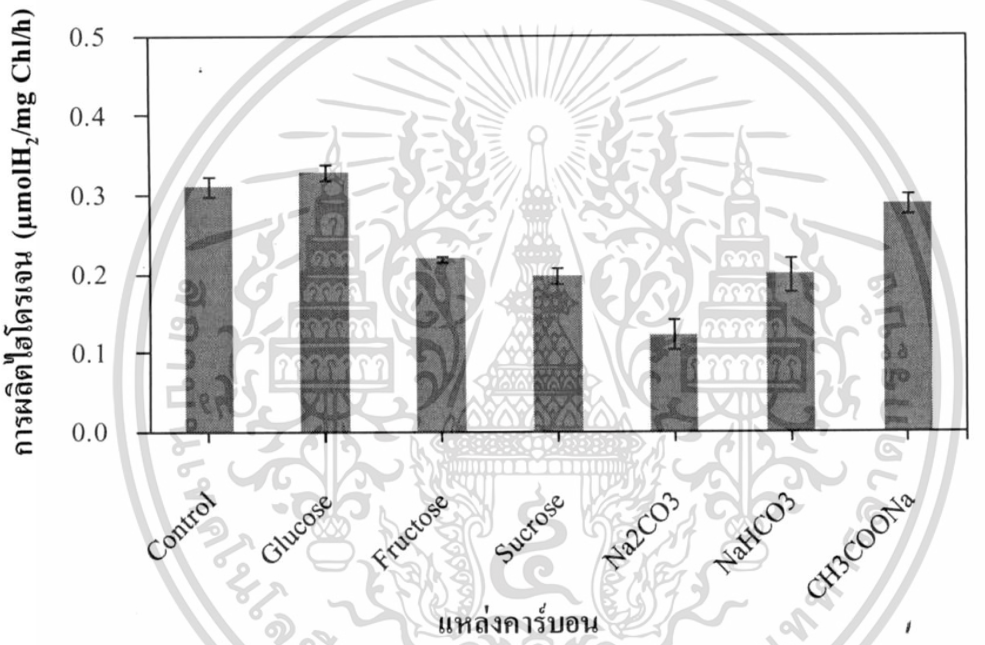


รูปที่ 4.13 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ปราศจากแหล่งคาร์บอน (-◆-) อาหาร BBM ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ กลูโคส (-◆-), ฟรุกโตส (-■-), ซูโครส (-▲-), โซเดียมคาร์บอเนต (-●-), โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (-▼-) และ โซเดียมอะซีเตท (-○-)

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่ให้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 0.329 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง โดยมีค่าใกล้เคียงกับไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.312 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่มีการเติมฟรุกโทส ซูโครส โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต และโซเดียมอะซีเตท ซึ่งมีปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้เท่ากับ 0.220, 0.198, 0.123, 0.200 และ 0.288 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.14) จากการทดลองพบว่าอาหารที่มีกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแหล่งคาร์บอนทำให้สาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ผลิตไฮโดรเจนได้สูง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM สูตรปกติ พบว่า ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป พบว่าไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ก็สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้จากอากาศและนำไปใช้ในการเจริญเติบโต การผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงใกล้เคียงกับสาหร่ายที่เจริญในอาหารที่มีกลูโคสและอะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอน



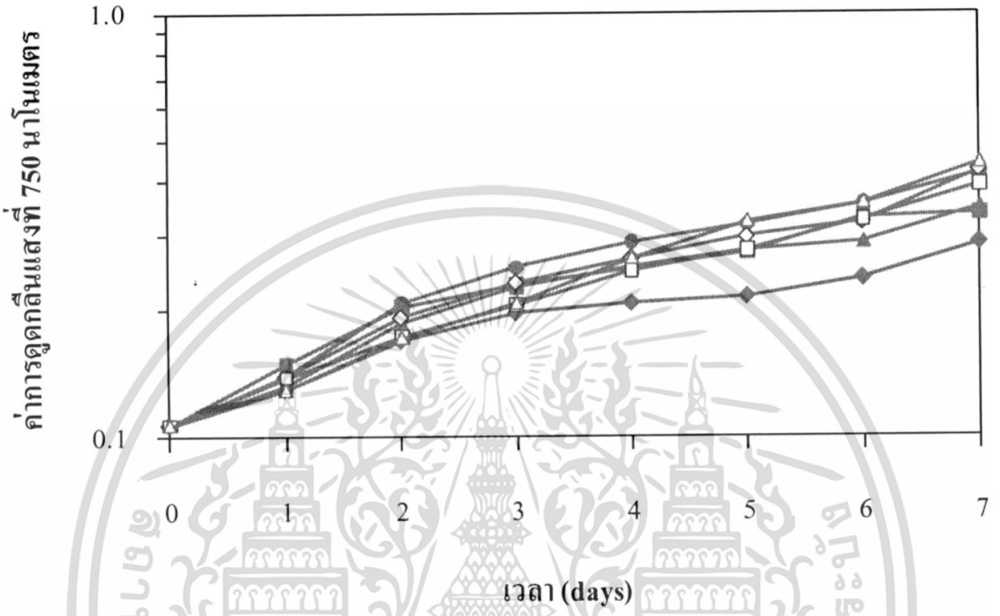
รูปที่ 4.14 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ปกติ และอาหาร BBM ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.4.4 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันปริมาณของไนโตรเจน

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BBM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 0.075, 0.15, 0.3, 0.75, 1.5 และ 6 มิลลิโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 มีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ยกเว้นเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร BBM ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท สาหร่ายจะมีการเจริญต่ำกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะอื่นหลังวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.15)

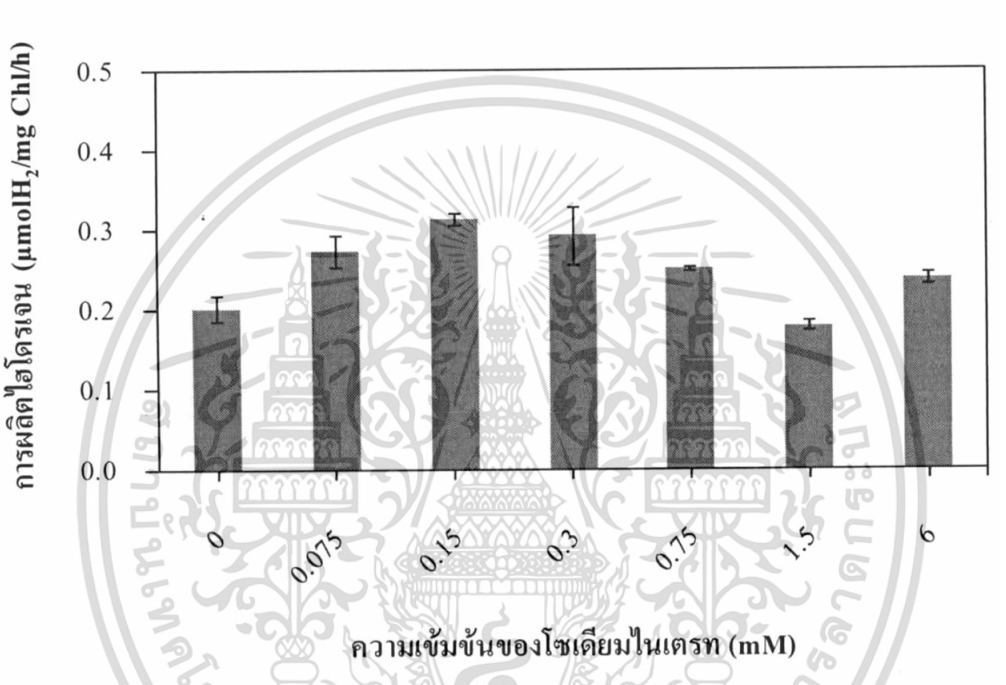


รูปที่ 4.15 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0 (-•-), 0.075 (-■-), 0.015 (-▲-), 0.30 (-●-), 0.75 (-◇-), 1.5 (-□-) และ 6.0 (-△-) มิลลิโมลาร์

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันปริมาณของโซเดียมไนเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเท่ากับ 0.075, 0.15 และ 0.3 มิลลิโมลาร์ ผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงสุดคือ 0.273, 0.313 และ 0.292 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยมีค่ามากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท และในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 6 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้เท่ากับ 0.201, 0.251, 0.179 และ 0.238 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.16) จากการทดลองพบว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเท่ากับ 0.075, 0.15 และ 0.3 มิลลิโมลาร์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

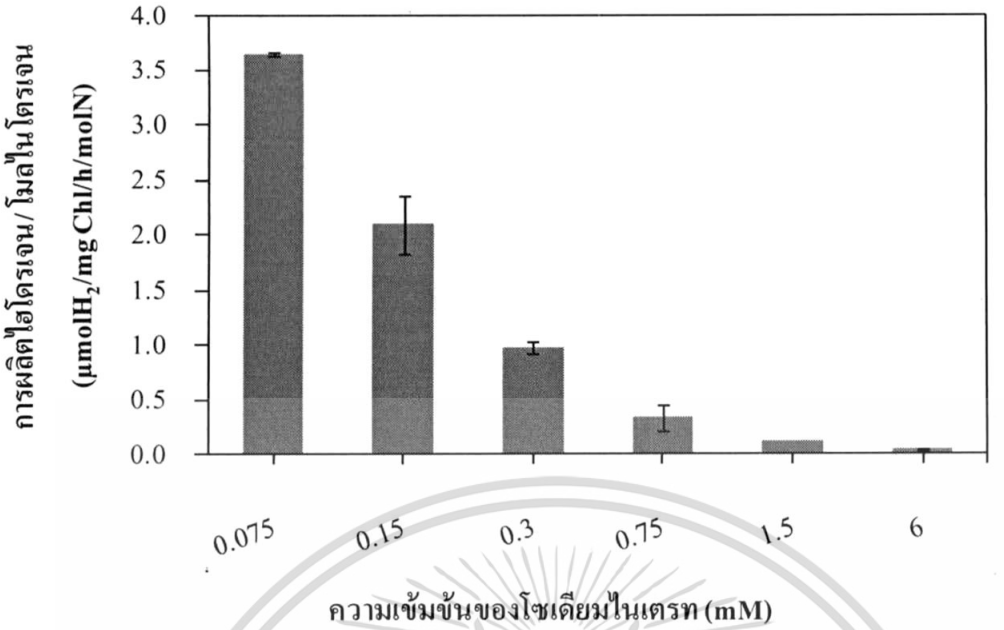
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้น จึงนำค่าไฮโดรเจนที่ได้จากผลการทดลองไปคำนวณคิดเป็นการผลิตไฮโดรเจนต่อโมลของไนโตรเจน พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร BBM ที่มีโซเดียมไรเตรท 0.075 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายจะผลิตไฮโดรเจนต่อโมลของไนโตรเจนสูงสุด (รูปที่ 4.17) ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเท่ากับ 0.075 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป



รูปที่ 4.16 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

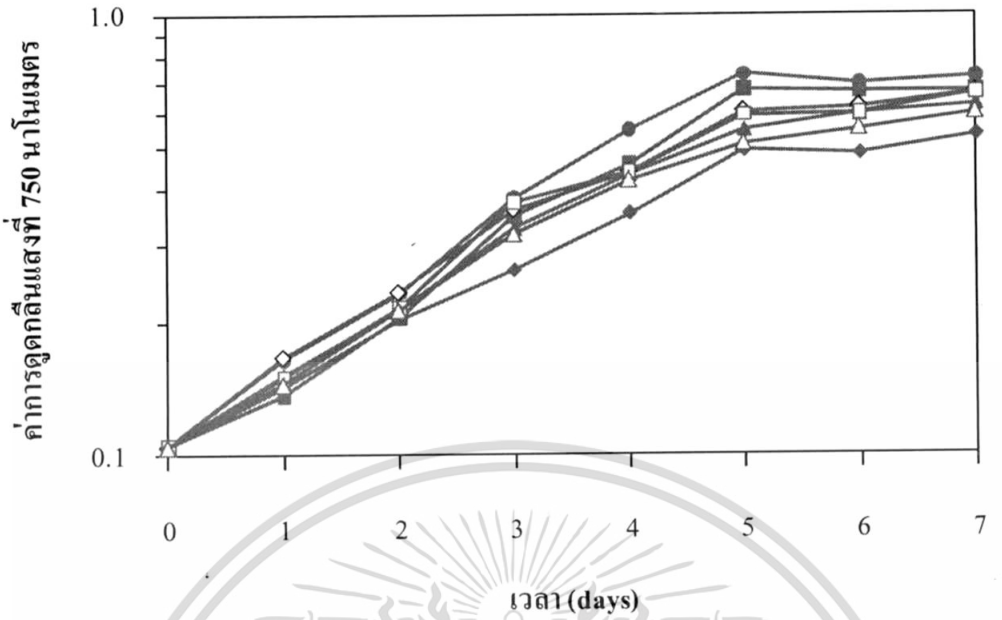


รูปที่ 4.17 การผลิตไฮโดรเจนต่อโมลไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท

4.4.5 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BBM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) เท่ากับ 0, 0.039, 0.078, 0.155, 0.31, 0.62 และ 1.55 มิลลิโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 มีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ยกเว้นเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร BBM ที่ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตสาหร่ายจะมีการเจริญต่ำกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะอื่นเล็กน้อย (รูปที่ 4.18)

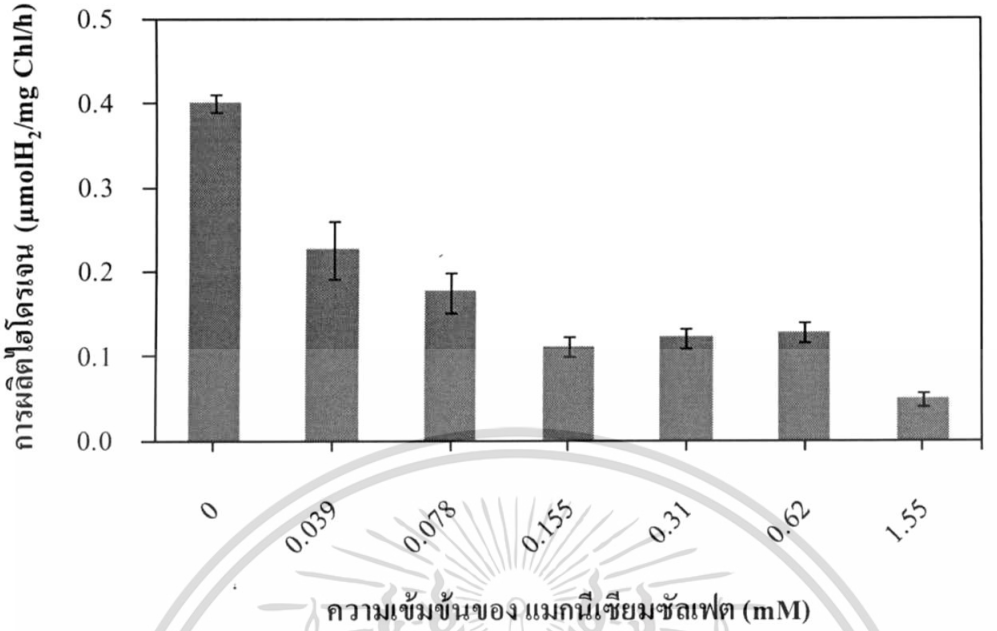
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0 (-◆-), 0.039 (-■-), 0.078 (-▲-), 0.155 (-●-), 0.31 (-◇-), 0.62 (-□-) และ 1.55 (-△-) มิลลิโมลาร์

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีแมกนีเซียมซัลเฟต ผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงสุดคือ 0.401 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง โดยมีค่ามากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.039, 0.078, 0.155, 0.31, 0.62 และ 1.55 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้เท่ากับ 0.227, 0.176, 0.112, 0.122, 0.128 และ 0.048 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.19) จากการทดลองพบว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกอาหาร BBM ที่ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นอาหารที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

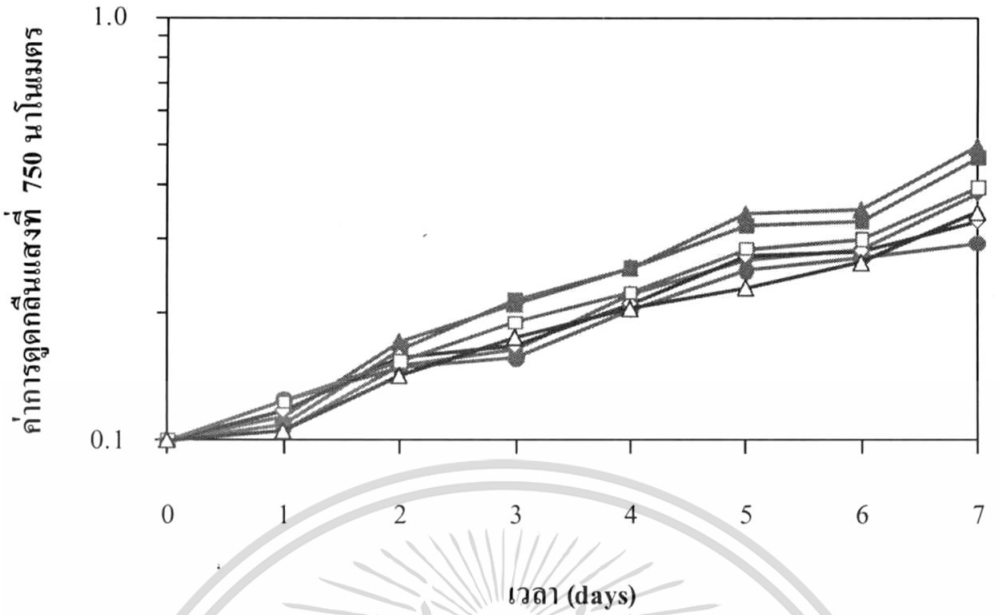


รูปที่ 4.19 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต

4.4.6 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันปริมาณของเหล็กซัลเฟต

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BBM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของเหล็กซัลเฟต ($FeSO_4$) เท่ากับ 0, 2.25, 4.5, 9, 18, 36 และ 90 มิลลิโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดค่าการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.20)

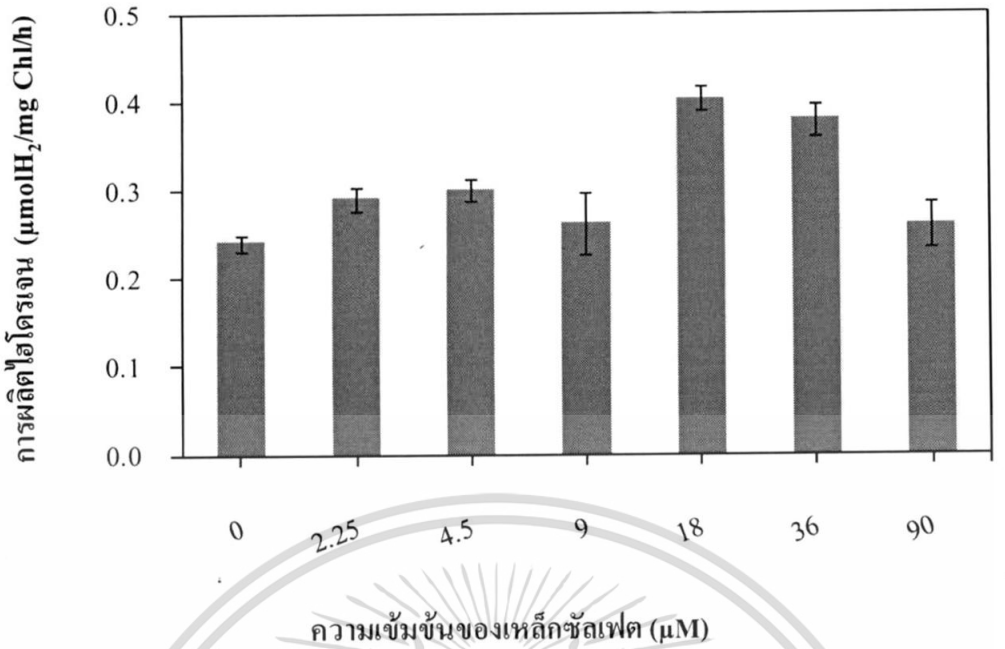
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 0 (-◆-), 2.25 (-■-), 4.5 (-▲-), 9 (-●-), 18 (-▽-), 36 (-○-) และ 90 (-□-) ไมโครโมลาร์

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 18.0 และ 36.0 ไมโครโมลาร์ ผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงสุด คือ 0.403 และ 0.379 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยมีค่ามากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่ปราศจากเหล็กซัลเฟต และในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตที่ความเข้มข้น 2.25, 4.5, 9.0 และ 90 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้เท่ากับ 0.241, 0.290, 0.301, 0.262, และ 0.259 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.21) จากการทดลองพบว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแปรผันความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 18.0 และ 36.0 ไมโครโมลาร์ ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดและไม่มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 18.0 ไมโครโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นปกติในสูตรอาหาร BBM สูตรปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

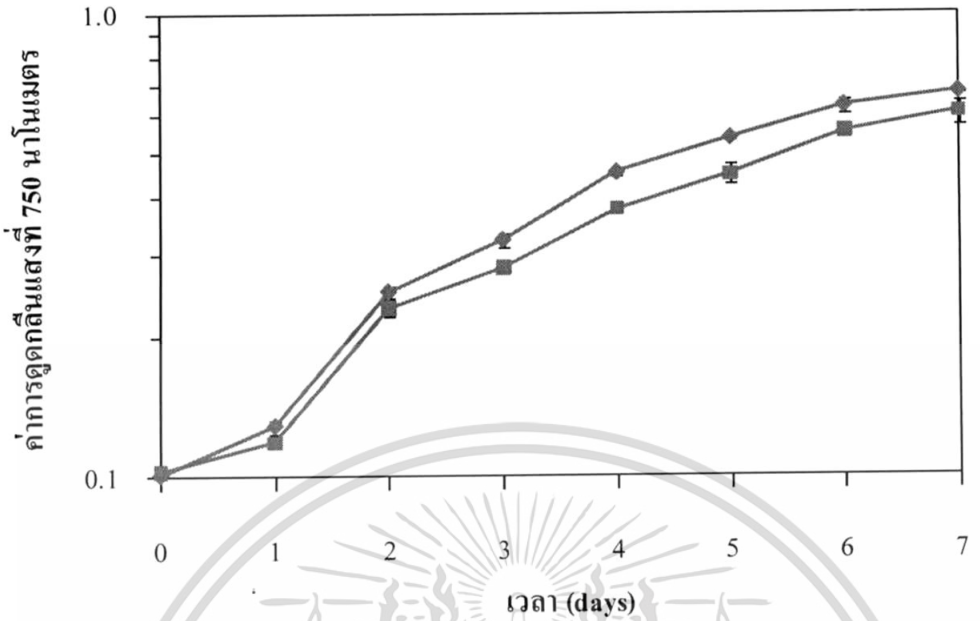


รูปที่ 4.21 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟต

4.4.7 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM สูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหาร BBM สูตรปกติ

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BBM สูตรที่เหมาะสมปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของเหล็กซัลเฟต ($FeSO_4$) เท่ากับ 18 ไมโครโมลาร์ ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน คาร์บอน และซัลเฟอร์ เปรียบเทียบกับอาหาร BBM สูตรปกติที่มีความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 18 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเท่ากับ 0.75 มิลลิโมลลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.31 มิลลิโมลลาร์ และปราศจากแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 จากนั้น นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดค่าการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM สูตรปกติเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นได้ดีกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM สูตรที่เหมาะสม โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM สูตรที่เหมาะสมจะค่อยๆเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างๆช้าๆ เนื่องจาก มีสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตน้อยกว่าในอาหาร BBM สูตรปกติ (รูปที่ 4.22)

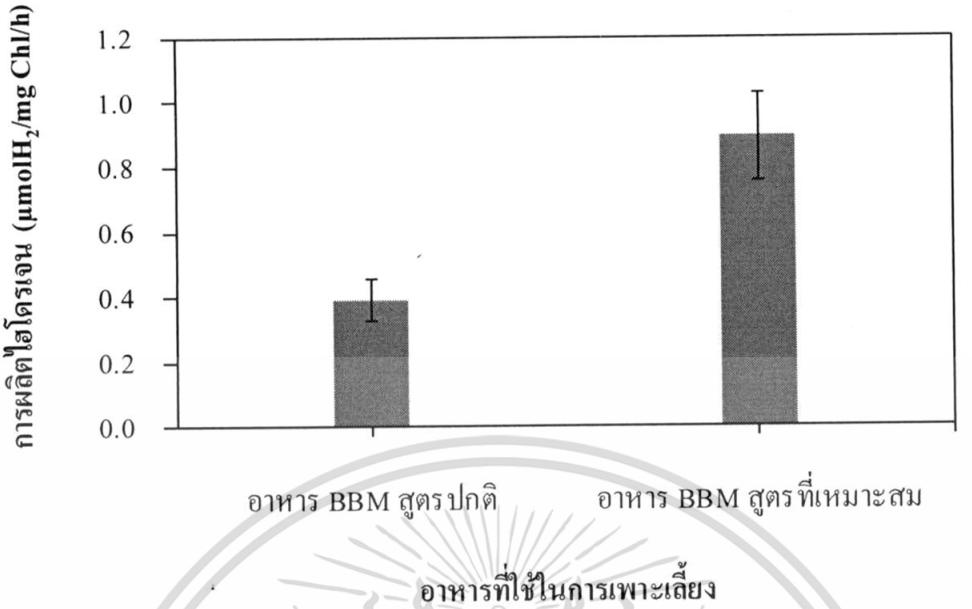
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.22 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM สูตรที่เหมาะสม (-■-) เปรียบเทียบกับอาหาร BBM สูตรปกติ (-◆-)

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM สูตรที่เหมาะสม และอาหาร BBM สูตรปกติ มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่า สาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เจริญในอาหารเหลว BBM สูตรที่เหมาะสมผลิตไฮโดรเจนได้ 0.895 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM สูตรปกติซึ่งผลิตได้ 0.394 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง โดยคิดเป็น 2.27 เท่า (รูปที่ 4.23) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสม จะให้การผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ แต่ต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงถึง 7 วัน ดังนั้น จึงสนใจศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรปในอาหาร TAP เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการใช้อินทรีย์คาร์บอน เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ อะซีเตท คาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนนอกเหนือจากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศ และยังเป็นการลดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



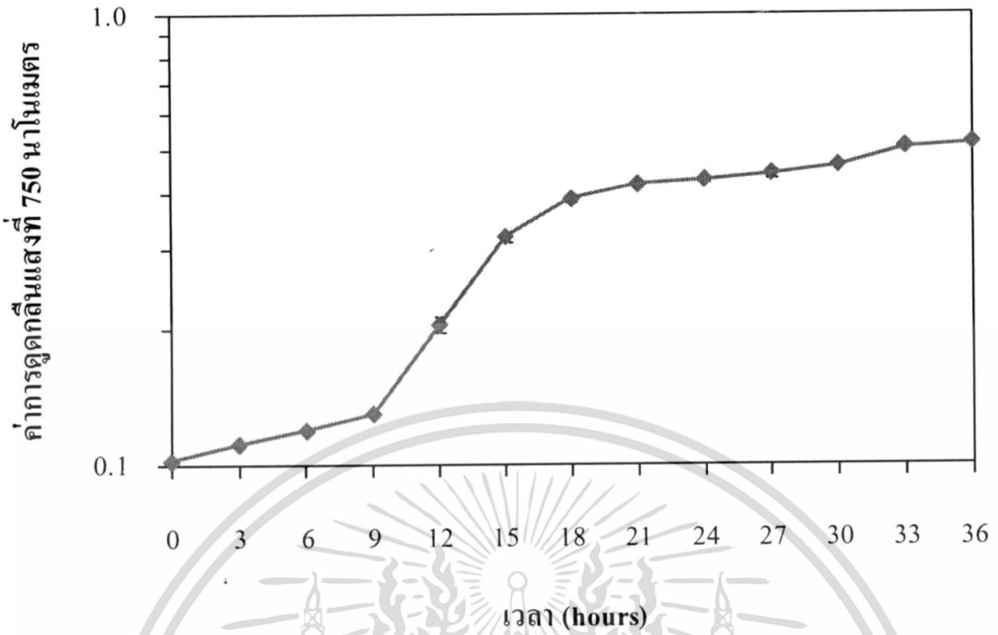
รูปที่ 4.23 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหาร BBM สูตรปกติ

4.5 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป

4.5.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรทุก 3 ชั่วโมง พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เจริญในอาหาร TAP มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (36 ชั่วโมง) เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11, BBM และ N8 (21 วัน) โดยมีรูปแบบของการเจริญเติบโต คือ เข้าสู่ระยะ log phase ใน 9 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากชั่วโมงที่ 9 สาหร่ายมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเข้าสู่ระยะ log phase จนถึงชั่วโมงที่ 21 หลังจากชั่วโมงที่ 21 สาหร่ายจะเจริญเติบโตน้อยลงและเข้าสู่ระยะ stationary phase (รูปที่ 4.24)

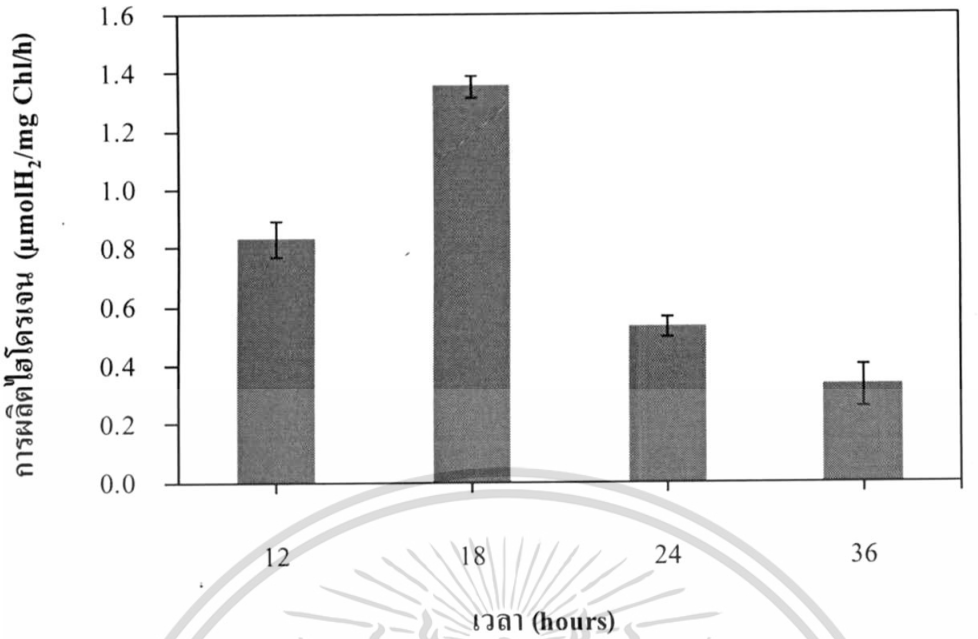
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.24 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นระยะเวลา 12, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่มีอายุเซลล์ 18 ชั่วโมง ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยผลิตได้ 1.356 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมากกว่าเซลล์ที่มีอายุเชื้อ 12, 24 และ 36 ชั่วโมง ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 0.832, 0.534 และ 0.334 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.25) และพบว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลาอื่นๆ ดังนั้น จึงเลือกระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีอายุเชื้อที่เหมาะสมและมีความพร้อมในการผลิตไฮโดรเจนมาใช้ในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

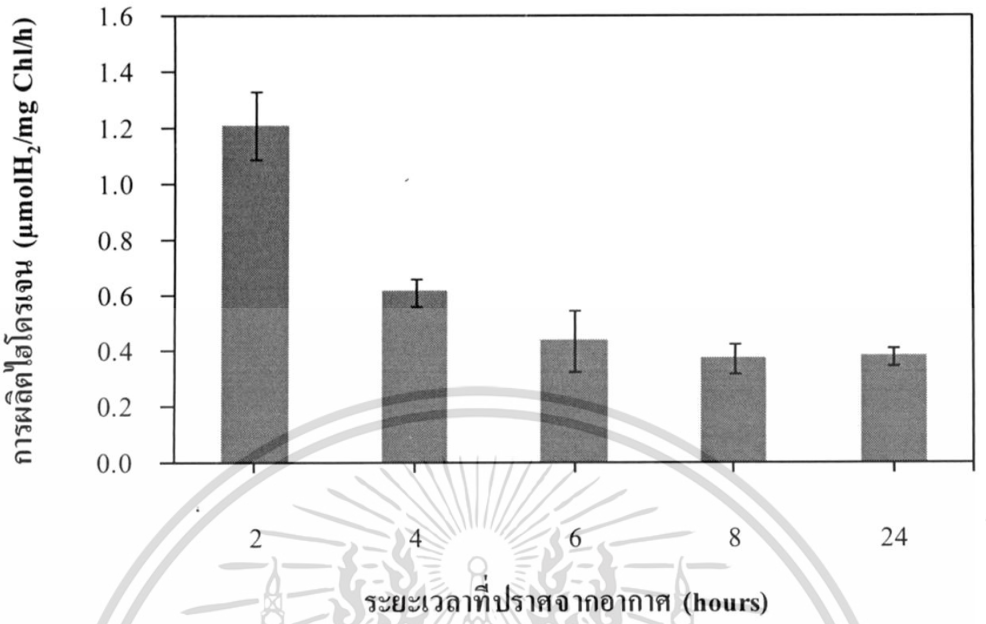


รูปที่ 4.25 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีอายุเซลล์ 12, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง

4.5.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเพาะเลี้ยงครบระยะเวลา 18 ชั่วโมง นำสาหร่ายมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเมื่อปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลิตไฮโดรเจนได้ 1.210 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง โดยผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่ปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 0.620, 0.440, 0.380 และ 0.380 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.26) จากการทดลองพบว่าสาหร่ายจะผลิตไฮโดรเจนได้มากในช่วงระยะแรกของการปรับตัวที่ปราศจากอากาศ ทั้งนี้เนื่องจากการมีตัวให้อิเล็กตรอนในปริมาณสูง ภายหลังจากการใช้ตัวให้อิเล็กตรอนไปหมด อัตราการผลิตไฮโดรเจนจึงลดลง จากผลการทดลองนี้ จึงเลือกระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดไปใช้ในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

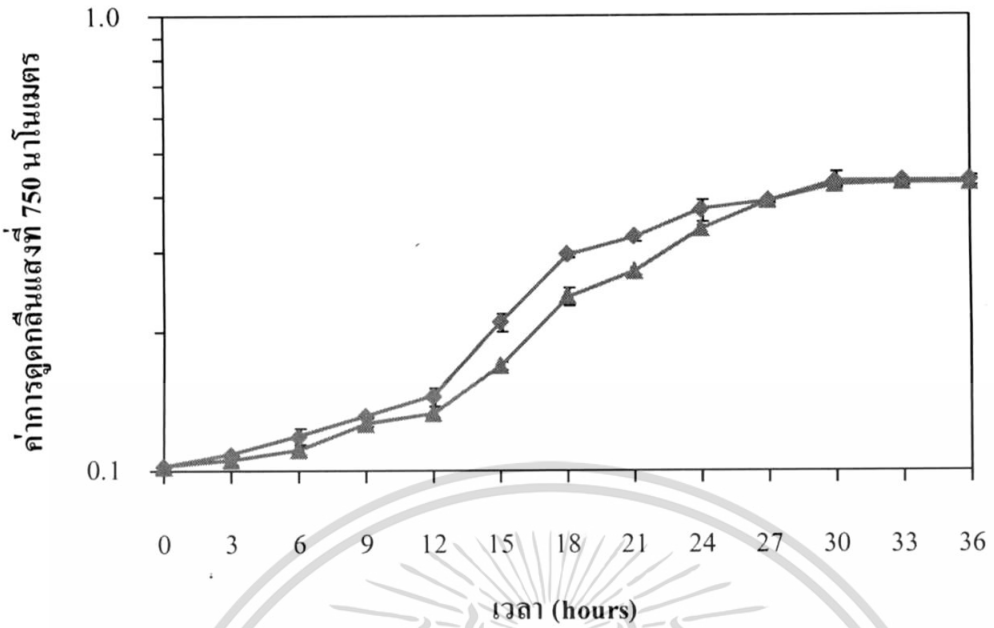


รูปที่ 4.26 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP โดยการแปรผันระยะเวลาการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

4.5.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะมืดและสว่าง

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 ' รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและภายใต้สภาวะมืดและสว่างโดยให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรทุก 3 ชั่วโมง พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 30 หลังจากชั่วโมงที่ 30 การเจริญของสาหร่ายเข้าสู่ระยะ stationary phase (รูปที่ 4.27) และยังพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่มีแสงสว่าง เซลล์จะเจริญเติบโตได้สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะมืดเล็กน้อย (รูปที่ 4.27)

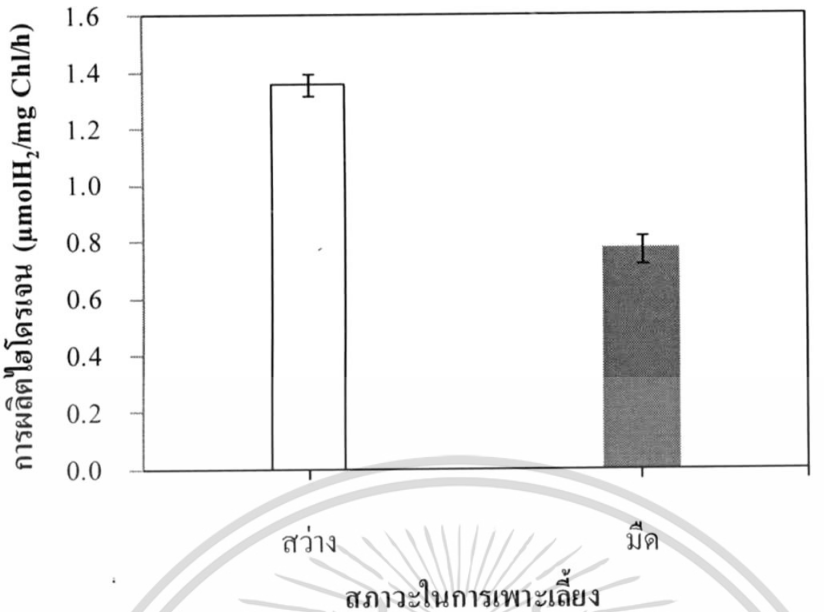
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะมืด (-▲-) และที่มีแสงสว่าง (-◆-)

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในสภาวะที่มีแสงสว่างเป็นเวลา 18 ชั่วโมง สาหร่ายสีเขียวผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดโดยผลิตไฮโดรเจนได้ 1.356 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เปรียบเทียบกับเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะมืดเป็นเวลา 18 ชั่วโมงเช่นกัน สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้ 0.771 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.28)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

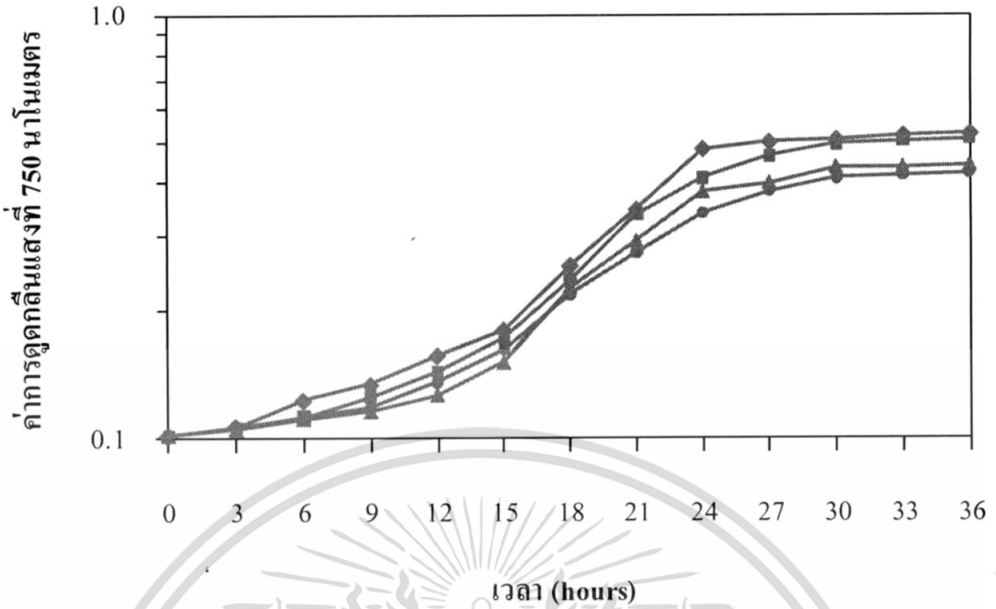


รูปที่ 4.28 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะมีแสงสว่าง (□) และมืด (■) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4.5.4 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที โดยแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่อุณหภูมิทั้งสี่ สาหร่ายมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด ในขณะที่สาหร่ายจะมีการเจริญต่ำสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.29)

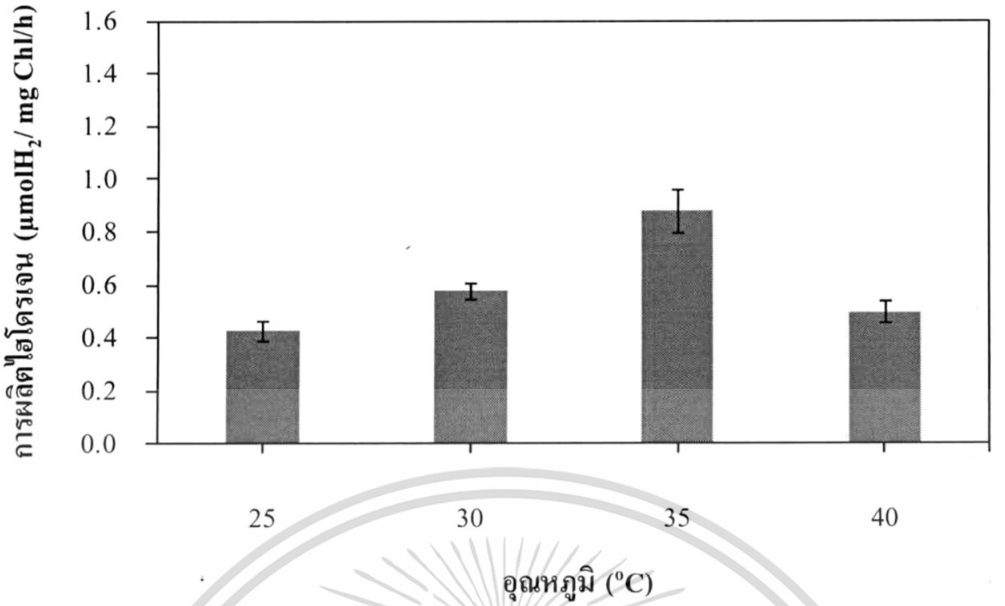
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.29 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันความอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงที่ 25 (→), 30 (→), 35 (→) และ 40 (→) องศาเซลเซียส

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 0.878 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 0.428, 0.578′และ 0.498 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.30) ไฮโดรเจนของสาหร่ายที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ กับปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

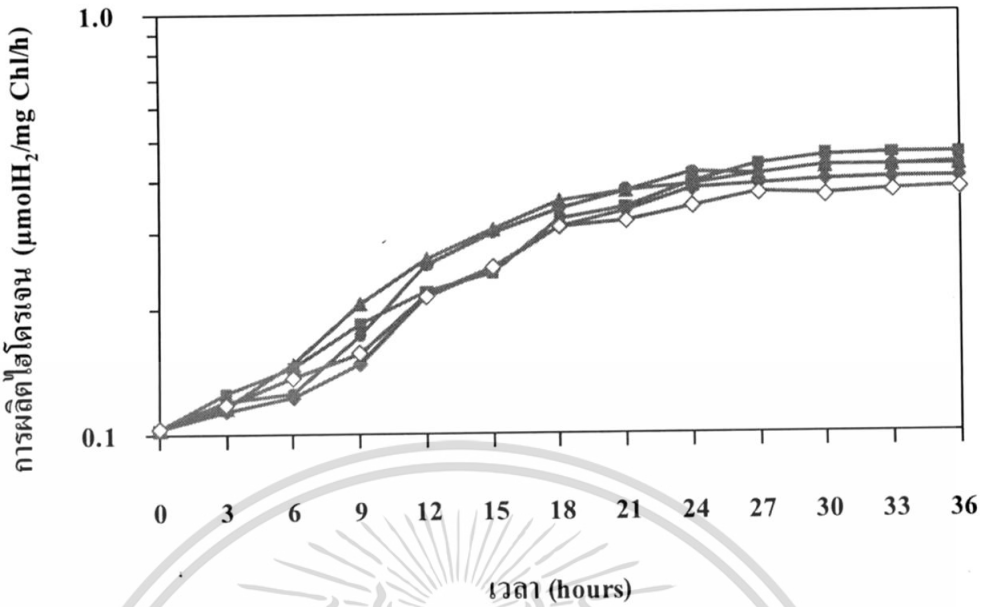


รูปที่ 4.30 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงต่างๆ

4.5.5 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยง

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยแปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 500, 1,000, 2,000, 3,000 และ 4,000 ลักซ์ วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันในทุกความเข้มแสงของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.31)

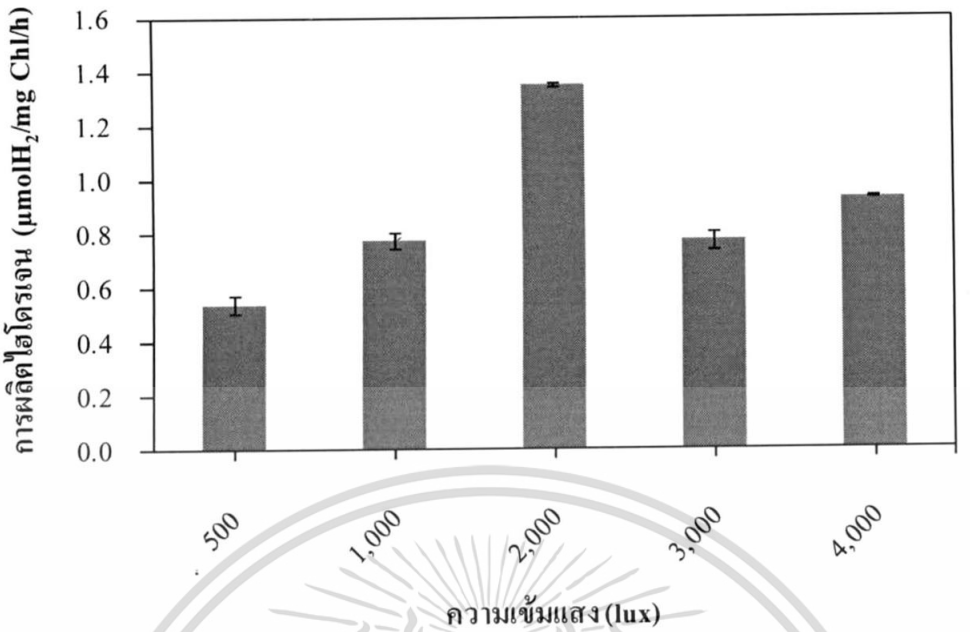
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.31 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยง 500 (—▪—), 1,000 (—●—), 2,000 (—▼—), 3,000 (—◆—) และ 4,000 (—◇—) ลักซ์

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 1.353 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 500, 1,000, 3,000 และ 4,000 ลักซ์ ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 0.540, 0.774, 0.771 และ 0.930 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.32) โดยค่าที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์กับค่าอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



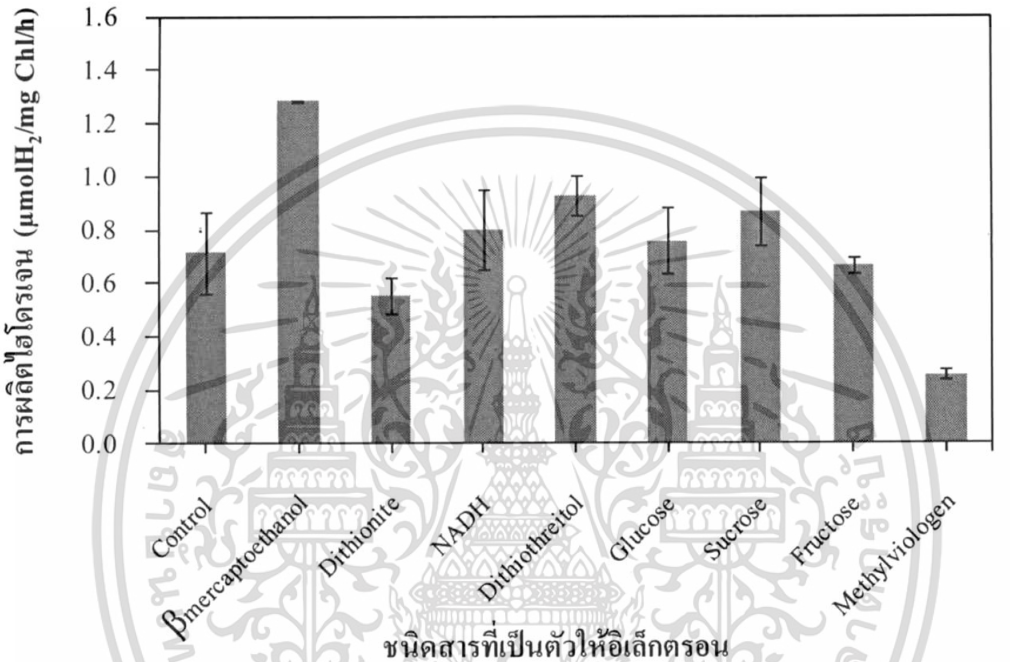
รูปที่ 4.32 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยงต่างๆ

4.5.6 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเติมสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง และให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเซลล์สาหร่ายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วกระจายเซลล์ด้วยอาหาร TAP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้น นำไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่ผ่านการพ่นก๊าซอาร์กอนแล้วเช่นกัน ได้แก่ ไดไทโอไนท์ (dithionite) ไดไทโอทรีอิทอล (dithiothreitol) เบต้า-เมอแคปโทเอทานอล (β-mercaptoethanol) นิโคตินามายด์อะดินีนไดนิวคลีโอไทด์ (NADH) เมทิลไวโอโลเจน (methylviologen) กลูโคส (glucose) ฟรุกโตส (fructose) และ ซูโครส (sucrose) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับสาหร่ายที่ไม่เติมตัวให้อิเล็กตรอน (control) (รูปที่ 4.34) จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดเมื่อเติมเบต้า-เมอแคปโทเอทานอลเป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยผลิตไฮโดรเจนได้ 1.286 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งผลิตได้มากกว่าเซลล์ที่ไม่เติมตัวให้อิเล็กตรอน และสาหร่ายที่เติมสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนคือ ไดไทโอไนท์ นิโคตินามายด์อะดินีนไดนิวคลีโอไทด์ ไดไทโอทรีอิทอล

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคส ซูโครส และฟรุกโตส ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 0.7120, 0.553 0.798, 0.926, 0.758, 0.867 และ 0.667 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.33) นอกจากนี้ยังพบว่าเมทิลไวโอโลเจนเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่ให้ผลการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุด คือผลิตได้ 0.257 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง โดยมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่ตัวให้อิเล็กตรอนอีกด้วย (รูปที่ 4.33)



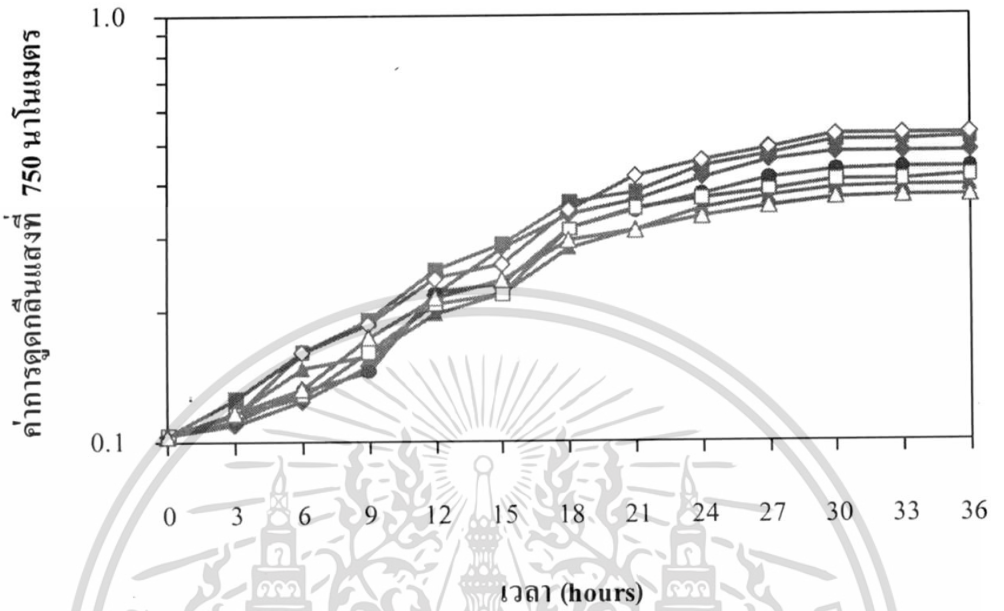
รูปที่ 4.33 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

4.5.7 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันแหล่งของคาร์บอน ได้แก่ กรดอะซีติก กลูโคส ซูโครส ฟรุกโทส โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต โซเดียมคาร์บอเนต และโซเดียมอะซีเตท โดยให้มีจำนวนโมลของคาร์บอนเท่ากัน คือเท่ากับ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร (ค่านี้นำมาจากปริมาณโมลของคาร์บอนอะตอมของกรดอะซีติกในอาหารสูตร TAP) และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร พบว่า สาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

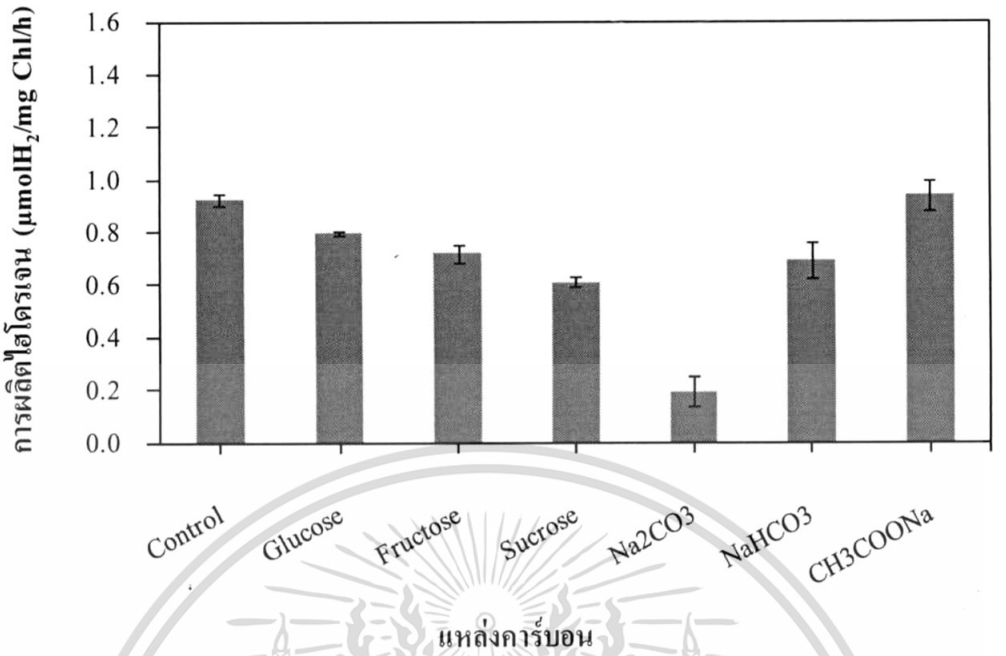
Scenedesmus sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติและอาหาร TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.34)



รูปที่ 4.34 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติ (—□—) และอาหาร TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ กลูโคส (—◆—), ซูโครส (—△—), ฟรุกโตส (—■—), โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (—●—), โซเดียมคาร์บอเนต(—▲—), และโซเดียมอะซีเตท (— ×—)

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP สูตรปกติ และอาหาร TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP และให้อะซีเตท 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 0.937 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติ ที่มีกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีทั้ง 2 ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์กับไฮโดรเจนของอาหาร TAP ที่เติมกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส โซเดียมคาร์บอเนต และ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตซึ่งมีปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้เท่ากับ 0.796, 0.719, 0.608, 0.191, และ 0.689 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.35)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

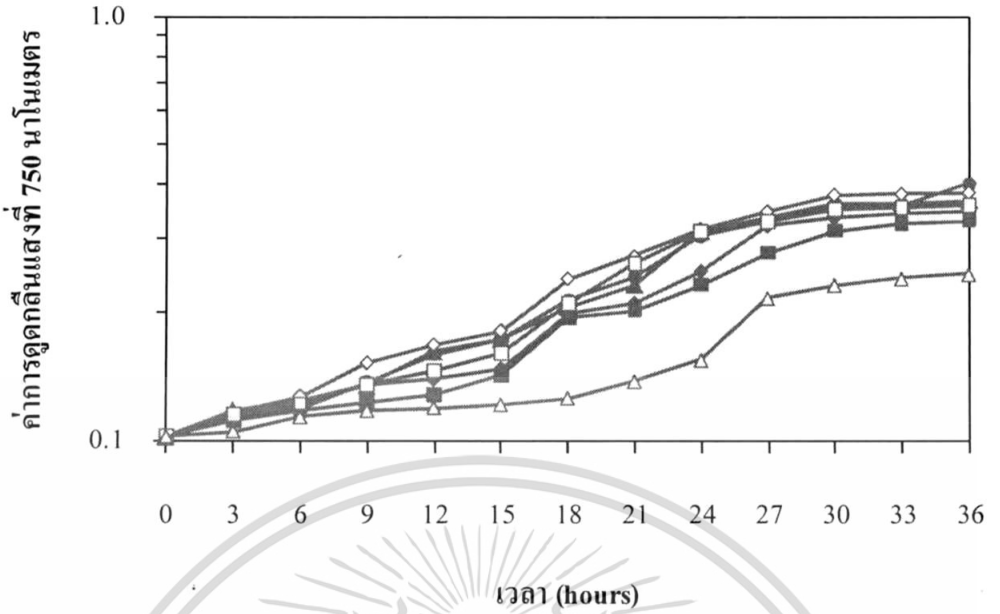


รูปที่ 4.35 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติ และอาหาร TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน

4.5.8 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตท

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของโซเดียมอะซีเตทเท่ากับ 0, 4.35, 8.7, 17.4, 34.8, 69.6 และ 174 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีโซเดียมอะซีเตทความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 4.35, 8.7, 17.4, 34.8 และ 69.6 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ที่เติมโซเดียมอะซีเตทความเข้มข้นเท่ากับ 174 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร เซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตได้ต่ำและช้ากว่าสภาวะอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.36)

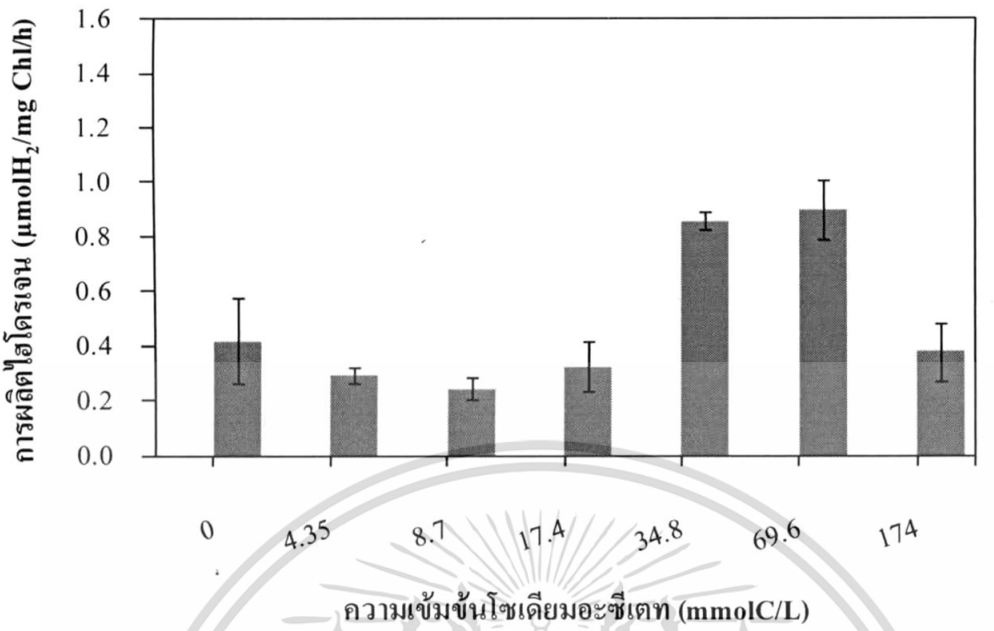
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.36 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตทเท่ากับ 0 (-◆-), 4.35(-■-), 8.7(-▲-), 17.4 (-●-), 34.8 (-○-), 69.6 (-□-) และ 174 (-△-) มิลลิโมล์คาร์บอนต่อลิตร

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตทเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตทเท่ากับ 34.8 และ 69.6 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงสุดคือ 0.731 และ 0.898 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยมีค่ามากกว่าไฮโดรเจนที่ผลิตจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ไม่เติมโซเดียมอะซีเตท และอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตทที่ความเข้มข้น 0, 17.4, 4.35, 8.7 และ 174 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้เท่ากับ 0.419, 0.294, 0.246, 0.324 และ 0.379 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.37) จากการทดลองพบว่าสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตทเท่ากับ 34.8 และ 69.6 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดและใกล้เคียงกัน ดังนั้น จึงนำไปหาความแตกต่างทางสถิติ พบว่า ไม่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตท 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นปกติในสูตรอาหาร TAP สูตรปกติ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

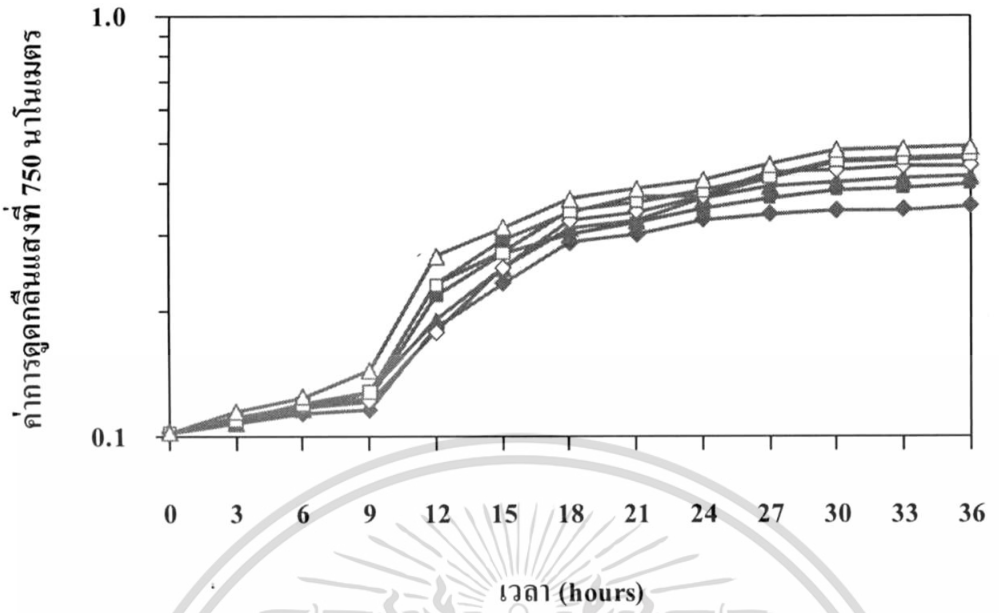


รูปที่ 4.37 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตท

4.5.9 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันปริมาณของไนโตรเจน

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เท่ากับ 0, 0.245, 0.49, 0.98, 1.96, 3.92 และ 9.8 มิลลิโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 มีการเจริญอย่างช้าในระยะแรก หลังจากชั่วโมงที่ 9 เซลล์จะเจริญเข้าสู่ระยะ log phase จนถึงชั่วโมงที่ 21 หลังจากนั้น เซลล์จะเข้าสู่ระยะ stationary phase (รูปที่ 4.38)

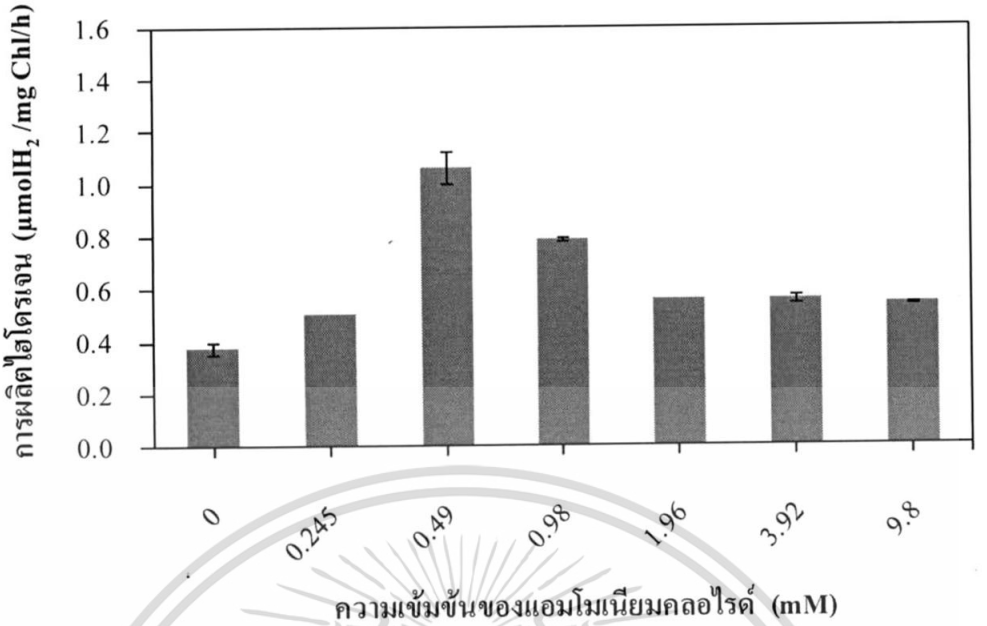
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.38 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากแอมโมเนียมคลอไรด์ (-◆-) และในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.245 (-●-), 0.49 (-▼-), 0.98 (-◆-), 1.96 (-◇-), 3.92 (-□-) และ 9.8 (-△-) มิลลิโมลาร์

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่แปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เท่ากับ 0, 0.245, 0.49, 0.98, 1.96, 3.92 และ 9.8 มิลลิโมลาร์ มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียคลอไรด์เท่ากับ 0.49 มิลลิโมลาร์ ผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงที่สุดคือ 1.064 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากแอมโมเนียมคลอไรด์ และอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.245, 0.98, 1.96, 3.92 และ 9.8 มิลลิโมลาร์ ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 0.376, 0.508, 0.788, 0.564, 0.556 และ 0.540 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.39)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

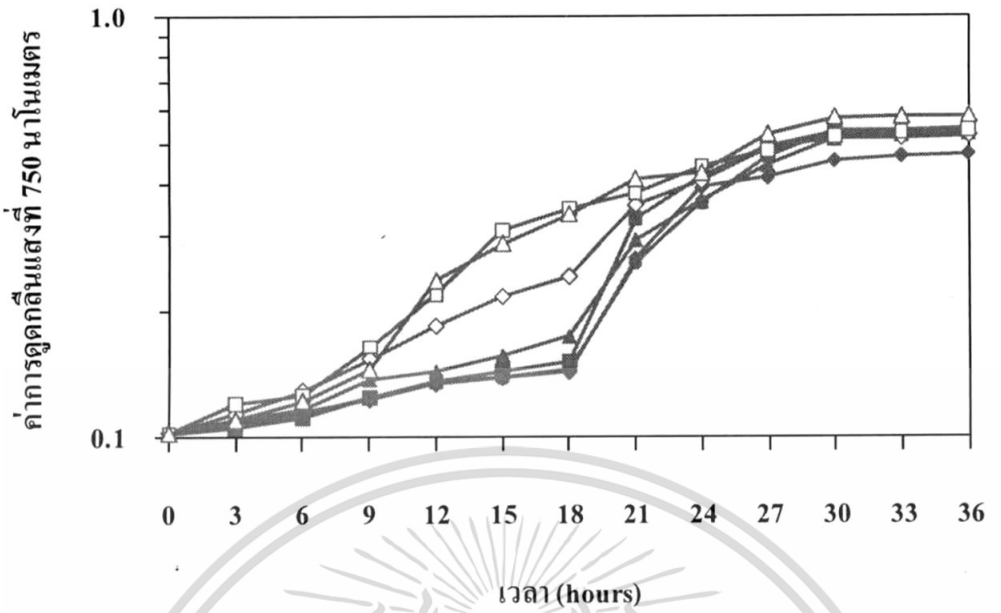


รูปที่ 4.39 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

4.5.10 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) เท่ากับ 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.8 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.40) ในอาหาร TAP ปกติที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.4 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายมีการเจริญต่ำกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.8 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ แต่สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0, 0.05, 0.1 และ 0.2 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.40)

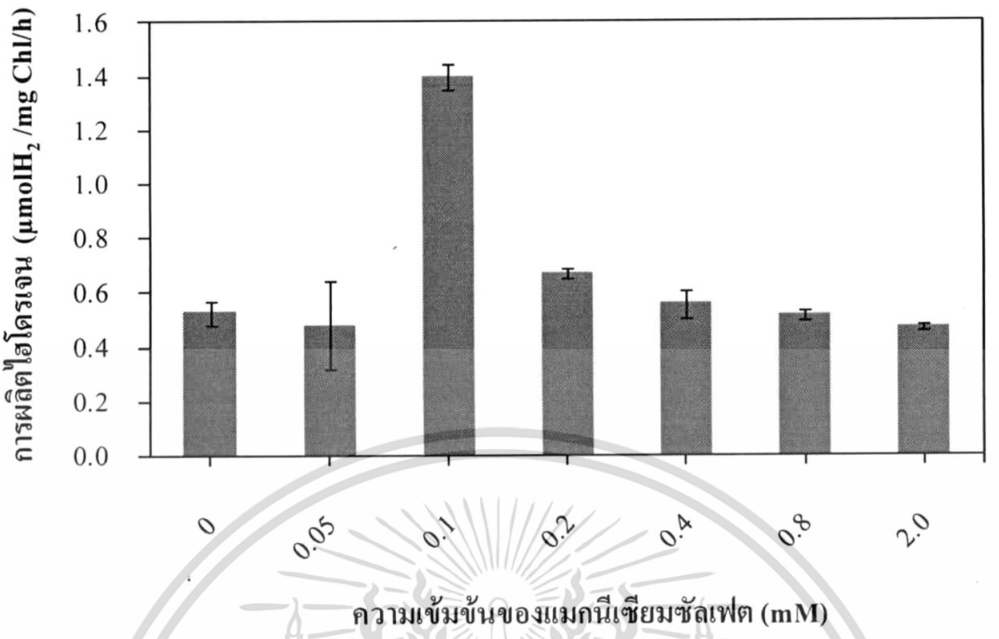
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.40 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟต (-•-) และในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.05 (-•-), 0.1 (-•-), 0.2 (-•-), 0.4 (-○-), 0.8 (-□-) และ2.0 (-△-) มิลลิโมลาร์

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่แปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) เท่ากับ 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ ผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงที่สุดคือ 1.399 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟต และอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.05, 0.2, 0.4, 0.8 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 0.526, 0.480, 0.667, 0.557, 0.516 และ 0.472 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.41) และไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 มิลลิโมลาร์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับไฮโดรเจนที่ผลิตจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

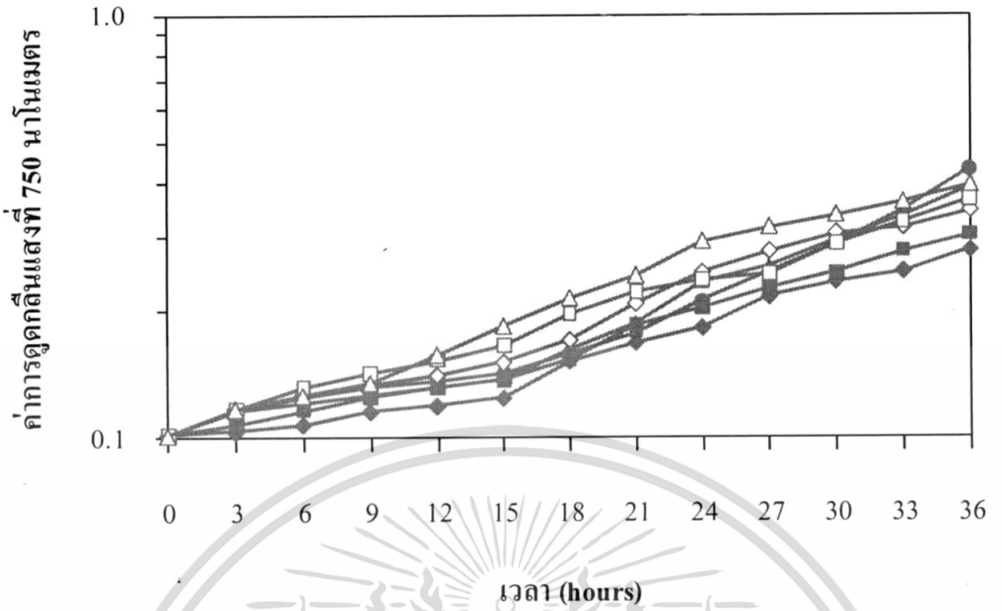


รูปที่ 4.41 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต

4.5.11 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันปริมาณของเหล็กซัลเฟต

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของเหล็กซัลเฟต ($FeSO_4$) เท่ากับ 0, 2.25, 4.5, 9, 18, 36 และ 90 ไมโครโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากเหล็กซัลเฟตและในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตในทุกความเข้มข้นที่เพาะเลี้ยงจะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.42)

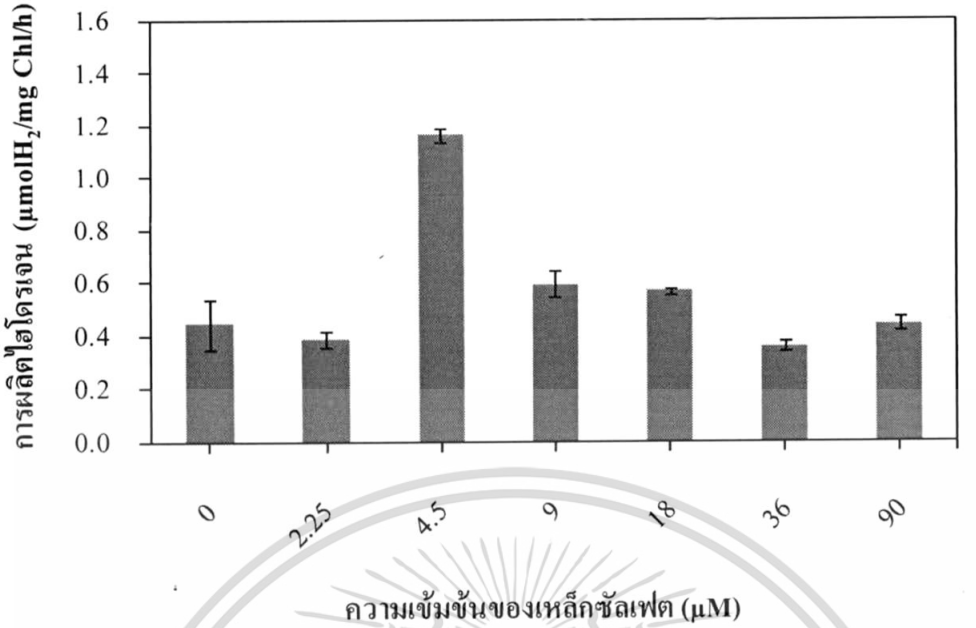
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.42 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากเหล็กซัลเฟต (-✦-) และในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 2.25(-■-), 4.5 (-▲-), 9.0 (-●-), 18 (-▽-), 36.0 (-□-) และ 90.0 (-△-) ไมโครโมลาร์

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่แปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของเหล็กซัลเฟต ($FeSO_4$) เท่ากับ 0, 2.25, 4.5, 9, 18, 36 และ 90 ไมโครโมลาร์ มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 4.5 ไมโครโมลาร์ ผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงที่สุดคือ 1.161 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากเหล็กซัลเฟต และในอาหาร TAPที่มีความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 2.25 9, 18, 36 และ 90 ไมโครโมลาร์ ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 0.444, 0.388, 0.592, 0.563, 0.357 และ 0.442 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.43) และไฮโดรเจนที่ผลิตจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 4.5 ไมโครโมลาร์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับไฮโดรเจนที่ผลิตจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

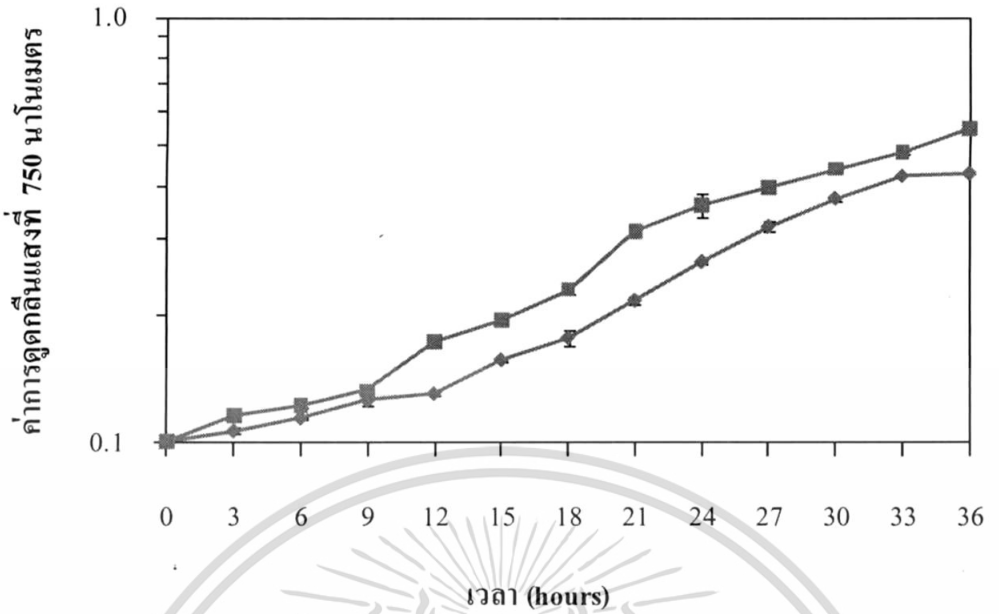


รูปที่ 4.43 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟต

4.5.12 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหาร TAP

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของอะซีเตทเท่ากับ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.49 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ และเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 4.5 ไมโครโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติที่มีความเข้มข้นของอะซีเตทเท่ากับ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 1.96 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.4 มิลลิโมลาร์ และเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 18 ไมโครโมลาร์ จากนั้น นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติจะเจริญเติบโตได้สูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมเพียงเล็กน้อย โดยเซลล์ของสาหร่ายที่เจริญในอาหาร TAP สูตรปกติจะเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 9 แต่เซลล์ของสาหร่ายที่เจริญในอาหาร TAP สูตรที่เหมาะสมจะเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.44)

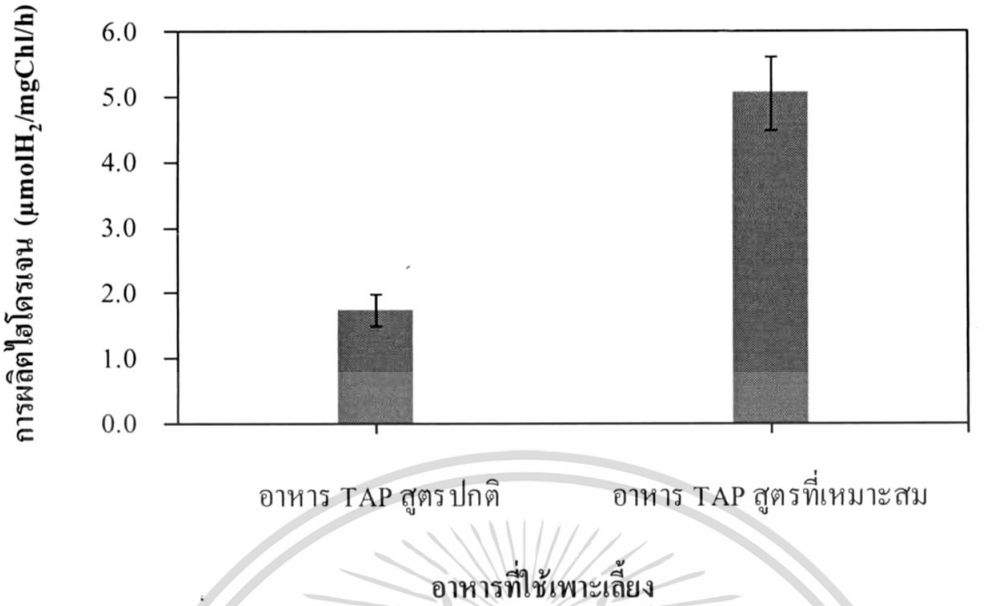
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.44 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสม (-♦-) เปรียบเทียบกับอาหารสูตรปกติ (-■-)

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติ และอาหาร TAP สูตรที่เหมาะสม มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรที่เหมาะสมผลิตไฮโดรเจนได้ 5.067 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 1.743 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งคิดเป็นค่าประมาณ 3 เท่า (รูปที่ 4.45)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.45 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การคัดแยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติในบริเวณเขตลาดกระบัง

จากการเก็บตัวอย่างนั้นจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้งสิ้น 5 บริเวณ ได้แก่ บ่อน้ำบริเวณตึกแอล คณะเทคโนโลยีการเกษตร บ่อน้ำบริเวณตึกพระเทพฯ บ่อน้ำบริเวณคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ บ่อน้ำหน้าป้ายคณะวิศวกรรมศาสตร์ และบ่อน้ำภายในบริเวณโรงเรียนพรตพิทยพยัต ในเดือนมกราคม-เดือนมีนาคม พ.ศ. 2551 และนำตัวอย่างน้ำมาคัดแยกสาหร่ายและทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถแยกสาหร่ายสีเขียวได้ 9 ไอโซเลท และแยกไซยาโนแบคทีเรียได้ 3 ไอโซเลท จะเห็นได้ว่าในแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณดังกล่าว พบสาหร่ายสีเขียวได้มากกว่าไซยาโนแบคทีเรีย ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้ทั้งอนินทรีย์คาร์บอน เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ฯลฯ และอินทรีย์คาร์บอน เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ กรดอะซีติก เป็นต้น ในขณะที่ไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่จะใช้เพียงอนินทรีย์คาร์บอน คือ คาร์บอนไดออกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต เป็นแหล่งคาร์บอนในการเปลี่ยนเป็นน้ำตาล เพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์เท่านั้น (Graham และคณะ, 1946) นอกจากนี้ ในบ่อน้ำธรรมชาติทุกบริเวณที่ทำการทดลองจะพบสาหร่ายเพียง 1-3 ชนิดเท่านั้น ที่มีจำนวนมากและมีลักษณะโดดเด่น โดยจะเป็นสาหร่ายที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและใช้สารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่มีอยู่ในแหล่งน้ำนั้นๆ ได้ ส่วนสาหร่ายที่ใช้อาหารในแหล่งน้ำนั้นได้ยากกว่า จะเจริญเติบโตได้ช้าและพบน้อย

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 จะพบว่าสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้ 9 ไอโซเลท มีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยเมื่อนำสาหร่ายทั้ง 9 ไอโซเลทไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกมาได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 สาหร่ายสีเขียวรูปร่างกลม ได้แก่ ไอโซเลท GA3 ซึ่งมีขนาดใหญ่และไอโซเลท GA4 ซึ่งมีขนาดเล็ก โดยที่ทั้ง 2 ไอโซเลทแยกมาได้จากบ่อน้ำบริเวณตึกพระเทพฯ และไอโซเลท GA9 ซึ่งมีขนาดเล็กและแยกได้จากบ่อน้ำภายในบริเวณโรงเรียนพรตพิทยพยัต โดยส่วนใหญ่สาหร่ายสีเขียวที่มีรูปร่างกลมและพบในธรรมชาตินั้นมักจะเป็นสาหร่ายในจีนัส *Chlorella* ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวหรือรวมกันเป็นกลุ่ม และมีรูปร่างกลม (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542) กลุ่มที่ 2 คือ สาหร่ายสีเขียวรูปร่างรีหรือกระสวย ได้แก่ ไอโซเลท GA1 ซึ่งแยกได้จากบ่อน้ำบริเวณตึกแอล คณะเทคโนโลยีการเกษตร ไอโซเลท GA5 ซึ่งแยกได้จากบ่อน้ำบริเวณคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ ไอโซเลท GA7 ซึ่งแยกได้จากบ่อน้ำหน้าป้ายคณะวิศวกรรมศาสตร์ และไอโซเลท GA8 ซึ่งแยกได้จากบ่อน้ำภายในบริเวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรงเรียนพรตพิทยพยัต สาหร่ายในกลุ่มนี้มีรูปร่างคล้ายกัน คือ เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างรีคล้ายกระสวย แต่มีความแตกต่างกันที่ขนาดของเซลล์และการจับกลุ่มอยู่รวมกัน เช่น ไอโซเลท GA1 มักจะอยู่รวมกันทั้งหมด 4 เซลล์ ในขณะที่ไอโซเลท GA7 จะจับกันเป็นโคโลนี 4-8 เซลล์ ส่วนไอโซเลท GA5 และ GA8 มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวเหมือนกัน ไม่อยู่รวมกัน โดยไอโซเลท GA5 มีลักษณะที่ผอมเพรียว ในขณะที่ไอโซเลท GA8 มีลักษณะที่สั้นและอ้วนกว่า สาหร่ายสีเขียวในกลุ่มนี้คาดว่าน่าจะเป็นสาหร่ายในจีนัส *Scenedesmus* sp. ซึ่งมีลักษณะดังนี้ เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นโคโลนีจับกันแบบ 2, 4, 8 หรือ 32 เซลล์ มีรูปร่างหลายแบบ ได้แก่ รูปร่างรี รูปไข่ หรือกระสวย (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542) กลุ่มที่ 3 คือ สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA2 ซึ่งมีรูปร่างรีคล้ายวงเดือน ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาหร่ายสีเขียวในจีนัส *Selennastrum* sp. และกลุ่มที่ 4 คือสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA6 ซึ่งมีลักษณะรูปเดียว กระสวยบิด คาดว่าน่าจะเป็นสาหร่ายในจีนัส *Kiechnerirlla* sp. (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 จะพบไซยาโนแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกัน คือ ไอโซเลท CY1 ซึ่งคัดแยกได้จากบ่อน้ำบริเวณคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างเส้นสาย เมื่อดูจากลักษณะการเปรียบเทียบทางอนุกรมวิธานคาดว่าน่าจะเป็นสาหร่าย *Gloeothece* sp. ไอโซเลท CY2 ซึ่งคัดแยกได้จากบ่อน้ำบริเวณตึกพระเทพฯ ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างท่อนสั้นๆ คาดว่าน่าจะเป็นสาหร่าย *Synechococcus* sp. และไอโซเลท CY3 ซึ่งคัดแยกได้จากบ่อน้ำภายในบริเวณโรงเรียนพรตพิทยพยัต ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นสาย ขนาดใหญ่ มีผนังกั้นระหว่างเซลล์ โดยคาดว่าน่าจะเป็นสาหร่าย *Oscillatoria* sp. (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

5.2 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

จากการนำสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้งหมด 12 ไอโซเลท มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายทุก 2 วัน พบว่าสาหร่ายแต่ละไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตในอาหาร BG11 ได้ โดยมีระยะเวลาของการปรับตัวในระยะ lag phase ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ ยังพบว่าไซยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้สูงกว่าสาหร่ายสีเขียว ทั้งนี้เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหาร BG11 ซึ่งมีสารอาหารและแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียมากกว่าสาหร่ายสีเขียว (Rippka และคณะ, 1971)

จากการวัดการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท พบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.313 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ในขณะที่ไม่พบการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GA6, GA9 และไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท CY1, CY2 และ CY3 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่สาหร่ายสีเขียวจะผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณที่สูงกว่าไซยาโนแบคทีเรีย อาจเนื่องมาจากการที่สาหร่ายสีเขียวมีคุณสมบัติในการผลิตไฮโดรเจนได้จากทั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีแสง (ความเข้มแสงต่ำ) และจากการเปลี่ยนแป้งหรือน้ำตาลภายในเซลล์ให้เป็นไฮโดรเจน (Florin และคณะ, 2001; Kosourov และคณะ, 2006) ในขณะที่ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนและกระบวนการสังเคราะห์แสง แต่ไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลทไม่พบเซลล์เฮเทอโรซิสต์ ดังนั้น จึงไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนจากการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศได้ การผลิตไฮโดรเจนส่วนใหญ่ของไซยาโนแบคทีเรียที่นำมาศึกษา จึงมาจากกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยใช้เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเท่านั้น เอนไซม์ชนิดนี้จะเร่งปฏิกิริยาการสร้างและการสลายไฮโดรเจน โดยทิศทางของปฏิกิริยาจะขึ้นกับปริมาณของอิเล็กตรอนในเซลล์ ด้วยเหตุนี้ ไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากไซยาโนแบคทีเรียสามารถสลายไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ ทำให้ไม่พบการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียทุกไอโซเลท (รูปที่ 4.2)

เมื่อนำสาหร่ายไอโซเลท GA8 ไปวัดการผลิตไฮโดรเจนเปรียบเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่นที่มีในห้องปฏิบัติการ พบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 และไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* TISTR 8012, *A. falcatus* TISTR 8557 และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 และไม่พบการผิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. PCC 7942, *C. agarth* TISTR 8110 และ *N. carneum* TISTR 8159 โดยปกติสาหร่ายสีเขียวที่พบว่าผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง คือ สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* (Winkler และคณะ, 2002b) และ *Scenedesmus obliquus* (Wünschiers และคณะ, 2001) ส่วนไซยาโนแบคทีเรียนั้นจะพบการผลิตไฮโดรเจนทั้งในเซลล์ที่เป็นเส้นสาย เช่น *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. เป็นต้น และเซลล์เดียว เช่น *Synechocystis* sp. และ *Gloeothece* sp. (Schütz และคณะ, 2004) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง และเหมาะสมในการนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป เนื่องจากผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 ผลการศึกษาชนิดของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

จากการนำสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 มาทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หลังจากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pDrive แล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5α คัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมและนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI แล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 1,480 คู่เบส (รูปที่ 4.9) จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม Blastn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus deserticola* สูงที่สุด โดยสูงถึง 99.60-99.74 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังมีความเหมือนกับสาหร่ายสีเขียวในจีนัส *Scenedesmus* สายพันธุ์อื่นๆ ถึง 99.47-99.60 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 จัดอยู่ในจีนัส *Scenedesmus* ในการระบุสปีชีส์ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 นั้น พบว่าทำได้ยากเนื่องจากมีรายงานอนุกรมวิธานของสาหร่าย *Scenedesmus* ถึง 29 สปีชีส์ในธนาคารยีน แต่ละสปีชีส์มีความใกล้เคียงกันเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ มีรายงานลักษณะของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus deserticola* ซึ่งแยกมาจากดินทะเลทรายของภาคตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกา และมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงสูงที่สุดกับสาหร่ายไอโซเลท GA8 โดยพบว่าเซลล์ของ *Scenedesmus deserticola* มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างตามอายุของเซลล์ ตอนเริ่มต้น เซลล์จะมีรูปร่างคล้ายผลเลมอนปลายเรียว และเมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น จะมีรูปร่างรีไปจนถึงเกือบกลม (Lewis และ Flechtner, 2004) ซึ่งแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ที่มีรูปร่างรีและไม่พบรูปร่างกลมเมื่ออายุของเซลล์มากขึ้น นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบลักษณะรูปร่างของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 กับสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ซึ่งมีรายงานการค้นพบการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวเป็นครั้งแรก พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดในด้านการอยู่รวมกัน โดยสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 จะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว กระจัดกระจาย ไม่รวมกลุ่ม ส่วนสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ชอบอยู่รวมกันเป็น 8 เซลล์ ด้วยเหตุที่การระบุสปีชีส์ต้องใช้นักอนุกรมวิธานของสาหร่ายที่มีความเชี่ยวชาญ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงขอจัดจำแนกสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ให้อยู่ในจีนัส *Scenedesmus* และตั้งชื่อว่า *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยที่ KMITL มาจาก King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang และ O1 มาจาก Oval number 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1

จากรายงานการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย พบว่ามีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย ยกตัวอย่าง เช่น ชนิดของอาหาร ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาปรับตัวในสภาวะไร้อากาศ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง อุณหภูมิ และความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น นอกจากนี้ สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น สภาวะโฟโตออโตโทรปและสภาวะเฮเทอโรโทรป ก็มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนด้วยเช่นกัน

5.4.1 ผลของชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1

ในงานวิจัยนี้ จะทำการศึกษาชนิดของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปเท่านั้น เนื่องจากในสภาวะเฮเทอโรโทรปนั้น อาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงมีเพียงชนิดเดียว คือ อาหาร Tris Acetate Phosphate (TAP) จากการศึกษาการเจริญของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11, N8 และ BBM พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตในอาหารทั้ง 3 ชนิดใกล้เคียงกัน โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 จะมีการเจริญต่ำกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารอื่นเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM และ N8 เป็นอาหารที่มีการปรับธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 เป็นอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียมากกว่า อย่างไรก็ตาม สาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากธรรมชาติทุกไอโซเลทก็สามารถเจริญในอาหาร BG11 ได้เช่นกัน

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11, N8 และ BBM มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด รองลงมาคืออาหาร BG11 และผลิตไฮโดรเจนได้ต่ำที่สุดในอาหาร N8 ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของธาตุอาหารแต่ละชนิดที่มีในปริมาณที่แตกต่างกัน อาหาร BBM เป็นอาหารที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน มีปริมาณไนโตรเจนต่ำคิดเป็น 0.041 กรัมไนโตรเจนอะตอมต่อลิตร (Bold และ Wyne, 1971) เมื่อเทียบกับอาหาร BG11 ที่มีโซเดียมคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน และมีปริมาณไนโตรเจน 0.246 กรัมไนโตรเจนอะตอมต่อลิตร โดยมากกว่าไนโตรเจนที่มีในอาหาร BBM ถึง 6 เท่า (Rippka และคณะ, 1979) และอาหาร N8 เป็นอาหารที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกับอาหาร BBM แต่มีปริมาณไนโตรเจน 0.1385 กรัมไนโตรเจนอะตอมต่อลิตร โดยมากกว่าไนโตรเจนที่มีในอาหาร BBM ถึง 3.4 เท่า (Vonshak, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น ในการเลือกชนิดของอาหารจึงได้ทำการเลือกอาหาร BBM เป็นอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 เนื่องจากสามารถทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีและผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง

5.4.2 ผลของอายุของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปในอาหาร BBM และในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 สามารถเจริญได้ในอาหารทั้ง 2 ชนิด โดยในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วโดยใช้ระยะเวลาปรับตัวในระยะ lag phase เป็นเวลา 9 ชั่วโมง หลังจากนั้น เซลล์จะใช้อะซีเตทที่มีอาหาร TAP เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเจริญเติบโต แบ่งเซลล์ และเข้าสู่การเจริญในระยะ log phase ระหว่างชั่วโมงที่ 12-21 ของการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม เมื่อธาตุอาหารหมดลง เซลล์จะมีอัตราการเกิดเท่ากับอัตราการตาย และเข้าสู่ระยะ stationary phase หลังชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.24) เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของเซลล์ที่อยู่ในระยะ stationary phase พบว่าเซลล์สาหร่ายในระยะนี้จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.5 เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ (รูปที่ 4.10) เนื่องจากต้องตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศนำไปเปลี่ยนเป็นน้ำตาล เข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึมเพื่อผลิตเป็นพลังงานต่อไป จึงทำให้ต้องใช้เวลาในการเจริญเติบโตที่นานกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรปและอยู่ในระยะ stationary phase พบว่ามีค่าประมาณ 1.5 ซึ่งสูงกว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรปและอยู่ในระยะ stationary phase แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรปมีการเจริญได้ยาวนานกว่า

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปในอาหาร BBM มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ที่มีอายุ 1, 2 และ 3 สัปดาห์ พบว่าเซลล์ที่มีอายุ 1 สัปดาห์จะผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ในช่วงอายุอื่นๆ (รูปที่ 4.11) โดยเซลล์ที่มีอายุ 1 สัปดาห์นี้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรประมาณ 0.4 (รูปที่ 4.10) ซึ่งใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่มีอายุ 18 ชั่วโมง หลังจากการเพาะลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป (รูปที่ 4.24) โดยเซลล์ที่มีอายุ 18 ชั่วโมงนี้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ที่มีอายุ 12, 24 และ 36 ชั่วโมง (รูปที่ 4.25) อย่างไรก็ตาม มีรายงานพบว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจะขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ที่นำใช้ในการศึกษา (Chen และคณะ, 2008) และมีรายงานการศึกษาผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนใน *Anabaena siamensis* TISTR 8012 พบว่าเซลล์ที่มีอายุ 4 วันผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด เมื่อทำการทดลองกับเซลล์ที่มีอายุ 0, 2, 4, 7 และ 9 วัน (Khetkorn และคณะ, 2010)

5.4.3 ผลของระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะไร้อากาศต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงทั้งในสภาวะโฟโตออโตโทรปและในสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรป มาพ่นก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้อยู่ในสภาวะที่ปราศจากอากาศ บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมงจะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด (รูปที่ 4.12 และ 4.26) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Miura และคณะ (1986) ได้ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomanas* MGA 1614 ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศในที่มืด พบว่าสาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดภายใน 2 ชั่วโมงแรกของการบ่ม หลังจากนั้น อัตราการผลิตไฮโดรเจนจะลดลง

5.4.4 ผลของชนิดของคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1

คาร์บอนเป็นธาตุอาหารหลักซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์สาหร่าย คาร์บอนที่สาหร่ายนำไปใช้ได้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ อนินทรีย์คาร์บอนที่อยู่ในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เกลือคาร์บอเนตและเกลือไบคาร์บอเนต อินทรีย์คาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่างๆ อะซีเตท เป็นต้น โดยที่ความต้องการปริมาณของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะแตกต่างกันตามชนิดของสาหร่าย (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2543) จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในอาหารที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหาร BBM และ TAP ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต โซเดียมไบคาร์บอเนต และโซเดียมอะซีเตท โดยให้มีจำนวนโมลคาร์บอนเท่ากัน คือ ในอาหาร BBM เติมแหล่งคาร์บอน 189 ไมโครโมลคาร์บอนต่อลิตร และ ในอาหาร TAP เติม 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ซึ่งในอาหาร TAP จะมีปริมาณโมลคาร์บอนมากกว่าในอาหาร BBM ถึง 184 เท่า พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันในอาหารชนิดเดียวกันที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน (รูปที่ 4.13 และ 4.34) ยกเว้นในอาหาร BBM ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน สาหร่ายจะมีระยะเวลาเข้าสู่ log phase ช้ากว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนอื่นๆ (รูปที่ 4.13) แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Scenedesmus sp. KMITL-O1 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่กล่าวมาข้างต้นได้ โดยปริมาณที่แตกต่างกันจะมีผลต่อสภาวะการเพาะเลี้ยง Abeliovich และ Weisman (1978) รายงานผลของสารอาหารต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* ภายใต้เฮเทอโรโทรปพบว่า เมื่อเติมกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ สาหร่ายสีเขียวมีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็วกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ นอกจากนี้ Schnackenberg และคณะ (1993) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ในอาหาร Basal nitrate medium ที่เติมกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และมีการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวอีกหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น ฟรุกโตส ซูโครส โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต และอะซีเตท เป็นต้น

จากการนำสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนและอาหาร BBM ที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนพบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนและอาหารที่เติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด (รูปที่ 4.14) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ดังนั้น ในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป จึงไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนในอาหาร BBM สาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ก็สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนต่อไปได้ โดยในการทดลองไม่ได้ทำการแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ ข้อดีของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปในอาหารที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนคือ สามารถเจริญได้เซลล์จำนวนมากและประหยัดแหล่งคาร์บอน แต่มีข้อเสีย คือ ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนาน

ส่วนในสภาวะเฮเทอโรโทรป จากการนำสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติ (มีกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน) และอาหาร TAP ที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติ และอาหาร TAP ที่เติมโซเดียมอะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด (รูปที่ 4.35) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการผลิตไฮโดรเจนที่ได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น อาหารทั้ง 2 สูตรแท้จริงแล้วเป็นอาหารชนิดเดียวกัน เนื่องจากมีกรดอะซีติกและอะซีเตทที่มีแหล่งคาร์บอนเหมือนกัน กรดอะซีติกหรืออะซีเตทมีคาร์บอน 2 อะตอมเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสาหร่ายสีเขียวจะดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ที่มีคาร์บอน 6 และ 12 อะตอม หลังจากนั้น จะนำไปสลายเป็นพลังงานและได้ NADH หรือ NADPH ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนและโปรตอนกับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อใช้ในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป นอกจากนี้ อะซีเตทยังเป็นสารที่จำเป็นในการยับยั้งการทำงานของระบบแสงสอง (PSII) ทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มมากขึ้น และช่วยในการสะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แป้งภายในเซลล์ของสาหร่าย (Gibbs และคณะ 1986; Ball และคณะ, 1990) มีรายงานการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในสภาวะเฮเทอโรโทรปอีกหลายชนิด เช่น การใช้อะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. reinhardtii* (Chen และ Johns, 1996) การใช้อะซีเตท กลูโคส และเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* (Endo และคณะ, 1977) การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus acutus* (Ogawa และ Aiba, 1981) การใช้อะซีเตท แลกเตท กลูโคส และกลูตาเมต เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* (Gladue และ Maxey, 1994) เป็นต้น จากรายงานที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จะพบว่าอะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอนที่นิยมในการเลี้ยงสาหร่าย ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้โซเดียมอะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้กรดอะซีติก เนื่องจากสะดวกในการแปรผันปริมาณมากกว่า

จากการนำสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีการแปรผันปริมาณของโซเดียมอะซีเตทมาวัดการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกัน ยกเว้นในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตท 174 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร สาหร่ายเจริญได้ต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.36) จากผลการผลิตไฮโดรเจนพบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตท 34.8 และ 69.6 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด (รูปที่ 4.37) จากผลการทดลองเลือกความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตท 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากให้การเจริญเติบโตดีและผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง เทียบเท่ากับความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตท 69.6 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร

5.4.5 ผลของปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1

นอกจากแหล่งของคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 แล้ว ยังมีปัจจัยสำคัญอื่นที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวอีก นั่นคือ ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน แหล่งไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญรองจากคาร์บอนในแง่ของปริมาณ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนทั้งในรูปอนินทรีย์และอินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนส่วนมากมาจากไนเตรท แอมโมเนีย หรือยูเรีย (Grobbelaar, 1995) ไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในสาหร่าย เป็นองค์ประกอบของโปรตีนและเอนไซม์ที่ทำงานภายในเซลล์ของสาหร่าย จากรายงานวิจัยพบว่า การขาดไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลทำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น แต่การเจริญเติบโตลดลง ในงานวิจัยนี้ จึงได้สนใจแปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจนในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเชื้อ ซึ่งแหล่งไนโตรเจนของอาหาร BBM คือโซเดียมไนเตรท และแหล่งไนโตรเจนของอาหาร TAP คือแอมโมเนียมคลอไรด์

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป ในอาหาร BBM ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทพบว่า สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร BBM ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0.075 ถึง 6.0 มิลลิโมลาร์ แต่เจริญได้ลดลงในอาหาร BBM ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท (รูปที่ 4.15) และเซลล์มีสีเหลืองซีดเนื่องมาจากการขาดไนโตรเจนมีผลทำให้มีคลอโรฟิลล์ที่เป็นรงควัตถุในกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลงและมีการสะสมลิปิดของเซลล์เพิ่มขึ้น (Thompson, 1996) และเมื่อนำเซลล์สาหร่ายมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียวมีการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเท่ากับ 0.075, 0.15 และ 0.3 มิลลิโมลาร์ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.16) แต่เมื่อพิจารณาการผลิตไฮโดรเจนโดยคิดต่อโมลไนโตรเจนอะตอมที่ใส่ลงไปในอาหาร พบว่า การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเท่ากับ 0.075 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.17) จึงเลือกความเข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน

ในการศึกษาการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันในอาหาร TAP ที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 ถึง 9.8 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.38) และเมื่อนำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเป็นแหล่งของไนโตรเจนในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.49 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.39) ผลการทดลองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป จะแตกต่างจากผลการทดลองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป ในแง่ของการเจริญเติบโตในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน โดยภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรปที่มีอะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอน สาหร่ายสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วโดยไม่จำเป็นต้องมีแหล่งไนโตรเจนในอาหาร ดังนั้นจึงไม่เห็นผลของการขาดไนโตรเจนต่อการเจริญเด่นชัด ในด้านการผลิตไฮโดรเจน ผลการทดลองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป จะสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป นั่นคือ สาหร่ายจะผลิตไฮโดรเจนได้สูง เมื่อมีความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4.6 ผลของปริมาณของซัลเฟอร์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1

ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารหลักอีกชนิดหนึ่งที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว นอกจากนี้ ยังมีความสำคัญสำหรับการสร้างโปรตีนในเซลล์ โดยเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนซีสเทอีนและเมทไทโอนีน ซัลเฟอร์ที่สาหร่ายส่วนใหญ่ใช้อยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ที่เป็นเกลือของโลหะ ได้แก่ ซัลเฟต ซัลไฟท์ และซัลไฟด์ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2543) ในการแปรผันปริมาณซัลเฟอร์ในอาหาร BBM และ TAP นั้น จะทำการแปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟตเพียงอย่างเดียว เนื่องจากมีปริมาณซัลเฟอร์ที่สูงกว่าซัลเฟอร์ที่พบในเหล็กซัลเฟตถึงประมาณ 15-20 เท่าและสูงกว่าซัลเฟอร์ที่พบในซิงค์ซัลเฟตถึงประมาณ 300 เท่า จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปในอาหาร BBM ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตพบว่า สาหร่ายมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันในอาหาร BBM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0 ถึง 1.55 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.18) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรปในอาหาร TAP ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตพบว่า การขาดแมกนีเซียมซัลเฟตจะมีผลต่อการแบ่งเซลล์ในระยะแรกของการเพาะเลี้ยง โดยจะใช้ระยะเวลาในช่วง lag phase นานขึ้น ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 18 หลังจากชั่วโมงที่ 18 สาหร่ายจะปรับตัวได้และมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ได้ผลการเจริญใกล้เคียงกับในอาหารปกติ (รูปที่ 4.40) ผลการทดลองที่ได้อาจเนื่องมาจากผลของการขาดธาตุที่จำเป็น 2 ชนิด คือ แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ ซึ่งการขาดแมกนีเซียมส่งผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ของสาหร่าย ที่ใช้แมกนีเซียมเป็นโคแฟกเตอร์ และส่งผลต่อองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ที่เป็นรงควัตถุที่สำคัญ นอกจากนี้ การขาดซัลเฟตยังมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ช้า อย่างไรก็ตาม ยังมีซัลเฟอร์ที่อยู่ในรูปของเหล็กซัลเฟตและซิงค์ซัลเฟตในอาหาร ดังนั้นสาหร่ายจะค่อยๆ ปรับตัว และนำซัลเฟอร์จากแหล่งอื่นไปใช้แทน เพื่อให้สามารถแบ่งเซลล์และมีชีวิตรอดได้

จากการสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป ในอาหาร BBM ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนพบว่า การขาดแมกนีเซียมซัลเฟตทำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด (รูปที่ 4.19) และเมื่อศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป พบว่าสาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตต่ำ (0.1 มิลลิโมลาร์) (รูปที่ 4.41) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การขาดซัลเฟอร์มีผลทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น โดยการขาดซัลเฟอร์หรือมีซัลเฟอร์ในปริมาณน้อยในอาหาร จะช่วยในการลดการทำงานของระบบแสงที่สอง ทำให้เกิดการผลิตออกซิเจนลดลง จึงไม่มีออกซิเจนมากพอที่จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Kosourov และคณะ, 2005; Melis และคณะ, 2000) นอกจากนี้ ยังพบว่าเมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ สาหร่ายจะมีการสะสมแป้งตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง โดยทำให้มีการหายใจลดลงและผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณมากขึ้น (Kosourov และคณะ, 2007) (Melis และคณะ, 2000) จากผลการทดลองเลือกความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 0 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปและเฮเทอโรโทรป ตามลำดับ

5.4.7 ผลของปริมาณของเหล็กต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1

เหล็กเป็นธาตุอาหารรองอนินทรีย์ชนิดหนึ่ง ที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่ายเกือบทุกชนิด เป็นธาตุที่มีความสำคัญและจำเป็นต่อเซลล์สาหร่าย เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการหายใจ กระบวนการตรึงไนโตรเจน และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Hardie และคณะ, 1983) นอกจากนี้ เหล็กยังเป็นส่วนประกอบของบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ไอรอน-ไฮโดรจีเนส (Fe-hydrogenase) ในสาหร่ายสีเขียว โดยเอนไซม์จะรับอิเล็กตรอนจากตัวรีดิวซ์และถ่ายทอดไปยังโมเลกุลของเหล็ก ซึ่งจะส่งไปยังโปรตอนเพื่อเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนต่อไป (Vignais และคณะ, 2001) จากการศึกษาการเจริญของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ในสภาวะโฟโตออโตโทรปและสภาวะเฮเทอโรโทรปที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่ 0 ถึง 90 ไมโครโมลาร์ พบว่าสาหร่ายมีการเจริญใกล้เคียงกันในทุกความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตในอาหารชนิดเดียวกัน (รูปที่ 4.20 และ 4.43) และนำเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนพบว่า ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM ที่มีความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 18 ไมโครโมลาร์ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด ซึ่งความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นปกติของเหล็กในอาหาร BBM สูตรปกติ (รูปที่ 4.21) ส่วนภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 4.5 ไมโครโมลาร์ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด (รูปที่ 4.43) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายต้องการเหล็กในปริมาณเพียงเล็กน้อยสำหรับการเจริญเติบโตและสำหรับการใช้เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังนั้น การขาดหรือการเพิ่มเหล็กในอาหารจึงไม่ส่งผลกระทบให้เห็นเด่นชัด

5.4.8 ผลของแสงต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป

แสง หรือ ความเข้มแสงเป็นปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง และการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Dubinsky และคณะ, 1995) สาหร่ายแต่ละชนิดจะมีความต้องการปริมาณแสงที่แตกต่างกัน โดยปกติ เมื่อความเข้มแสงมาก ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และสารสีอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ ซี ไฟโคบิลิโปรตีน และคาโรทีนอยด์จะลดลง เซลล์สาหร่ายจะมีการผลิตและสะสมอาหารประเภทแป้งหรือพอลิแซคคาไรด์ (Friedman และคณะ, 1991) นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบว่าแสงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในวัฏจักรคัลวิน (calvin cycle) อีกด้วย (Schürmann และ Jacquot 2000; Balmer และคณะ, 2003) จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติในที่มืดและสว่าง พบว่าสาหร่ายเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีแสงสว่างได้ดีกว่าภายใต้สภาวะมืดเล็กน้อย (รูปที่ 4.27) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจาก ในสภาวะมืด เซลล์สาหร่ายไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ทำให้ใช้อะซีเตทที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว แต่ในสภาวะที่มีแสง เซลล์สามารถสังเคราะห์แสงได้ และได้น้ำตาลจากวัฏจักรคัลวิน ถึงแม้ว่าการสังเคราะห์แสงจะทำได้เพียงเล็กน้อย เนื่องจากเซลล์นิยมใช้อะซีเตทที่มีในปริมาณสูงก่อน

จากการนำสาหร่ายอายุ 18 ชั่วโมงที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ในที่มืดและที่มีแสงไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจน พบว่า สาหร่ายที่มีอายุเซลล์ 18 ชั่วโมงที่เจริญในที่มีแสงผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่ายอายุเท่ากันที่เลี้ยงในที่มืด และสาหร่ายที่มีอายุเซลล์อื่นๆ (รูปที่ 4.28) และเมื่อทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ที่ความเข้มแสง 500 ถึง 4,000 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ (รูปที่ 4.32) แสดงให้เห็นว่าแสงมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนเป็นอย่างมาก เนื่องจากแสงเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง เมื่อมีแสงตกกระทบยังระบบแสงสอง ทำให้มีการแตกตัวของน้ำและได้อิเล็กตรอนไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจน (Melis และ Happe, 2001) อย่างไรก็ตาม ความเข้มแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงก็มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายเช่นกัน โดยอัตราการผลิตไฮโดรเจนจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้น (Kojima และ Lin, 2004) แต่ถ้าหากความเข้มแสงสูงเกินไป จะทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์แสงมาก ออกซิเจนที่ได้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง

5.4.9 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าสาหร่ายเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกัน โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้สูงที่สุด และที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส สาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ต่ำที่สุด (รูปที่ 4.29) แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของสาหร่าย โดยอุณหภูมิปกติที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียจะเท่ากับ 25 องศาเซลล์เซียส (Allen และ Stanier, 1968) อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงจะมีผลต่อลักษณะทางกายภาพหรือทางชีวภาพของเซลล์ ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิต่ำ เซลล์จะถูกชักนำให้มีการสะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอะมิโนและลิปิดภายในเซลล์ (Thompson และคณะ, 1992) จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติที่อุณหภูมิต่างๆ มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด เนื่องจากการที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียสนั้น สาหร่ายมีการเจริญเติบโตค่อนข้างดี เซลล์แบ่งตัวได้เร็ว มีการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการทำงานของกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำให้ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งออกซิเจนนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง ในขณะที่ เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากสภาวะเครียดที่ต้องปรับตัวให้มีชีวิตรอดที่อุณหภูมิสูง ทำให้ต้องใช้พลังงานที่มีนำไปใช้ในการปรับระบบเมตาบอลิซึมและสร้างสารที่จำเป็นต่อการอยู่รอด

5.4.10 ผลของตัวรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป

นอกจากปัจจัยที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ตัวให้อิเล็กตรอนหรือตัวรีดิวซ์ก็เป็นสารอีกชนิดที่สามารถใส่ลงไปในเซลล์ เพื่อเพิ่มปริมาณไฮโดรเจน จากการศึกษาชนิดของตัวให้อิเล็กตรอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 พบว่า ตัวให้อิเล็กตรอนที่ดีที่สุดคือ เบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล ซึ่งเมื่อใส่ลงไปในเซลล์สาหร่ายจะทำให้การผลิตสูงขึ้นประมาณเกือบ 2 เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ใส่ตัวให้อิเล็กตรอน (รูปที่ 4.33) ผลการทดลองสอดคล้องกับ Maneeruttanarungroj (2010) ที่พบว่าตัวรีดิวซ์ที่ดีสำหรับสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU551 คือ เบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล ซึ่งจะเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนประมาณ 2 เท่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25 ถึง 1.25 มิลลิโมลาร์

5.4.11 การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหารสูตรปกติ

จากผลการทดลองแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์และเหล็กในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปและเฮเทอโรโทรป สามารถสรุปสูตรอาหารที่เหมาะสม ได้ตารางที่ 5.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5.1 ความเข้มข้นของคาร์บอน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์และเหล็กในสูตรที่เหมาะสมและสูตรปกติของอาหาร BBM และ TAP

องค์ประกอบ	สภาวะโฟโตออโตโทรป		สภาวะเฮเทอโรโทรป	
	สูตรปกติ	สูตรที่เหมาะสม	สูตรปกติ	สูตรที่เหมาะสม
-ชนิดของอาหาร	BBM	BBM	TAP	TAP
-ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	-	-	กรดอะซีติก 34.8 mmolC/L	โซเดียมอะซีเตท 34.8 mmolC/L
-ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน	โซเดียมไนเตรท 0.75 mM	โซเดียมไนเตรท 0.075 mM	แอมโมเนียมคลอไรด์ 1.96 mM	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.49 mM
-ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต	0.31 mM	0 mM	0.4 mM	0.1 mM
-ความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟต	18 μM	18 μM	18 μM	4.5 μM

จากการนำสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหาร BBM และอาหาร TAP สูตรปกติและสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 เจริญได้ใกล้เคียงกันในอาหารสูตรปกติและสูตรที่เหมาะสมในอาหารชนิดเดียวกัน (รูปที่ 4.22 และ 4.44) ในขณะที่เมื่อวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เพาะลี้ยงในอาหารปกติและสูตรที่เหมาะสม พบว่าสาหร่ายที่เพาะลี้ยงในอาหาร BBM สูตรที่เหมาะสมจะผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าสาหร่ายที่เพาะลี้ยงในอาหาร BBM สูตรปกติ 2.27 เท่า โดยผลิตได้ 0.895 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.23) ในขณะที่สาหร่ายที่เพาะลี้ยงในอาหาร TAP สูตรที่เหมาะสมจะผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าสาหร่ายที่เพาะลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติประมาณ 3 เท่า โดยผลิตได้ 5.067 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.45) แสดงให้เห็นว่าอาหารสูตรที่เหมาะสมสามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว ซึ่งการเพาะเลี้ยงในทั้ง 2 สภาวะมีข้อได้เปรียบและเสียเปรียบแตกต่างกัน คือ ในการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโตโทรปจะใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนาน ทำให้เสียเวลา แต่ไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนลงไปในอาหาร ทำให้ประหยัดค่าสารอาหาร นอกจากนี้ ยังมีประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อมในการลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์จากความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศอีกด้วย ในการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรป สาหร่ายจะใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่ามาก ทำให้ไม่เสียเวลาในการเพาะเลี้ยง แต่สาหร่ายจะเจริญเติบโตได้น้อยกว่า และต้องเสียค่าใช้จ่ายของแหล่งคาร์บอนที่ต้องเติมลงไปในอาหาร ดังนั้น ทางเลือกที่น่าจะเป็นแนวทางในการทำวิจัยต่อไป คือ หาแหล่งคาร์บอนที่สาหร่ายใช้ได้และมีราคาถูกมาใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดแยกจากบริเวณเขตลาดกระบังและนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน สรุปได้ดังนี้

1. สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดียว มีรูปร่างรี และคัดแยกได้จากน้ำในบ่อน้ำธรรมชาติของโรงเรียนพรตพิทยพยัต ผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายไอโซเลทอื่นๆ ที่คัดแยกได้และสูงกว่าสาหร่ายที่มีในห้องปฏิบัติการ

2. จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA พบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 คือสาหร่าย *Scenedesmus* sp. จึงตั้งชื่อว่า *Scenedesmus* sp. KMITL-O1

3. จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป สรุปได้ดังนี้

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ BBM เป็นอาหารที่เหมาะสมในการศึกษาการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 และ N8

3.2 อายุของเชื้อมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยสาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BBM เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3.3 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด ภายหลังการปรับตัวให้อยู่ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.4 จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยแปรผันแหล่งของคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM สาหร่ายก็ให้การผลิตไฮโดรเจนใกล้เคียงกับสาหร่ายที่เจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

3.5 จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันปริมาณของโซเดียมไนเตรท พบว่าการลดความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทส่งผลให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น โดยความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายคือ 0.075 มิลลิโมลาร์

3.6 จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต พบว่าการขาดแมกนีเซียมซัลเฟตส่งผลให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตพบว่า การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเหล็กไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย จึงเลือกความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตเท่ากับ 18 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตที่มีอยู่ในอาหาร BBM สูตรปกติ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม

3.8 จากการนำผลการทดลองที่ได้มาพัฒนาเป็นสูตรอาหารที่เหมาสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM ที่เหมาะสม (ปราศจากแหล่งคาร์บอน มีโซเดียมไนเตรท 0.075 มิลลิโมลาร์ ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟต และเติมเหล็กซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 18 ไมโครโมลาร์) ผลิตไฮโดรเจนได้ 0.895 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM สูตรปกติที่ผลิตได้ 0.394 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ถึง 2.27 เท่า

4. จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป สรุปได้ดังนี้

4.1 อายุของเชื้อมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว โดยพบว่าสาหร่ายที่มีอายุเซลล์ 18 ชั่วโมง ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด

4.2 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด ภายหลังการปรับตัวให้อยู่ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.3 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่มีแสงสว่าง ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมืด โดยความเข้มแสงที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตไฮโดรเจน คือ 2,000 ลักซ์

4.4 อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนคือ 35 องศาเซลเซียส

4.5 จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการให้สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว พบว่าสาหร่ายสีเขียวผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด เมื่อเติมเบต้า-เมอเคปโตเอทานอล ซึ่งทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าอาหาร TAP สูตรปกติถึง 1.8 เท่า

4.6 จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยแปรผันแหล่งและปริมาณของคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมอะซีเตทความเข้มข้น 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ซึ่งเป็นแหล่งและปริมาณคาร์บอนของอาหาร TAP สูตรปกติ ให้ค่าการผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่าการลดความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ ส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น โดยความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เหมาะสมคือ 0.49 มิลลิโมลาร์

4.8 จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการแปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต พบว่าการลดความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น โดยความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมคือ 0.1 มิลลิโมลาร์

4.9 จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตพบว่า ความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนคือ 4.5 ไมโครโมลาร์

4.10 จากนำผลการทดลองที่ได้มาพัฒนาเป็นสูตรอาหารที่เหมาสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่เหมาะสม (ความเข้มข้นสุดท้ายของโซเดียมอะซีเตท 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตรลาร์ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.49 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 มิลลิโมลาร์ และเหล็กซัลเฟต 4.5 ไมโครโมลาร์) ผลิตไฮโดรเจนได้ 5.067 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าไฮโดรเจนที่ผลิตจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติ ที่ผลิตได้ 1.749 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ประมาณ 3 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ชัชวาลย์ ชัยชนะ. 2547. การพัฒนาพลังงานทดแทนและความเป็นไปได้ในประเทศไทย. **โลกพลังงาน.** มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ปีที่ 10. ฉบับที่ 34. หน้า 29-34.

ชัยชาญ ฤทธิเกริกไกร. 2547. รายงานพิเศษ: เรื่องสถานการณ์พลังงาน. **โลกพลังงาน.** มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ปีที่ 7. ฉบับที่ 22. หน้า 22-29.

ภาณุทัศน์ อินใจมา. 2550. ก๊าซไฮโดรเจนแหล่งพลังงานทดแทนที่ไม่มีวันสูญสิ้น. **โลกพลังงาน.** มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ปีที่ 10. ฉบับที่ 34. หน้า 44-45.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546. **สาหร่ายวิทยา.** พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 122 – 155.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542. **แพลงก์ตอนพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 774-785.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2543. **คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน.** พิมพ์ครั้งที่ 3. (ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 1) กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 774-785.

สิริชนก จันทร์ใบ "รายงานการใช้พลังงานทดแทน Hydrogen Technology ตอนที่ 1." [online]. Available : http://www.thailandindustry.com/home/FeatureStory_preview.php?id=9641&section=9. 2008.

ศิริจันทร์ ทองประเสริฐ และ มานิจ ทองประเสริฐ. "ไฮโดรเจน: เชื้อเพลิงสำหรับอนาคต." [online]. Available : http://www.navy22.com/th/index.php?option=com_smf&Itemid=0&topic=14691.0. 13 ก.ค. 2008.

Abeliovich, A. and Weisman, D. 1978. "Role of heterotrophic nutrition in growth of the alga *Scenedesmus obliquus* in high-rate oxidation ponds." **Appl. Environ. Microbiol.** 35 : 32-37.

Allen, M. M. and Stanier, R. Y. 1968. "Selective isolation of blue-green algae from water and soil." **J. General Microb.** 51 : 203-209.

Bak, T., Nowotny, J., Rekas, M. and Sorrell, C. C. 2002. "Photo-electrochemical hydrogen generation from water using solar energy. Materials-related aspects." **Int. J. Hydrogen Energy.** 27 : 991-1022.

Ball, S. G., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J. C. and Matagne, R. F. 1990. "Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*." **Plant Sci.** 66 : 1-9.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P. and Buchanan, B. B. 2003. "Proteomics gives insight into the regulatory function of chlorophast thioredoxins." **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA. 100 : 370-375.

Benemann, J. 1996. "Hydrogen biotechnology : progress and prospects." **Nat. Biotechnol.** 14 : 1101-1103.

Bold, H. C. and Wynne, M. J. 1971. "Cultivation of algae in the laboratory." In : Mc Elroy W. D., Swan C. P. [Eds], Prentice Hall, Engwood cliffs. pp. 571.

Chen, F. and Johns, M. R. 1996. "Heterotrophic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* on acetate in chemostat culture." **Process Biochem.** 31 : 601-604.

Chen, P. C., Fan, S. H., Chiang, C. L. and Lee, C. M. 2008. "Effect of growth conditions on the hydrogen production with cyanobacterium *Anabaena* sp.strain CH3." **Int. J. Hydrogen Energy.** 33 : 1460-1464.

Cepak, V., Pribyl, P. and Vitova, M. 2006. "The effect of light color on the nucleocytoplasmic and chloroplast cycle of the green chlorococcal alga *Scenedesmus obliquus*. **Folia. Microbiol.** 51(4) : 342-348.

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." **Int. J. Hydrogen Energy.** 34 : 4941-4946.

Desikachary, T. V. 1959. Cyanophyta. Botany Department University of Madras, Indian Council of Agariculture Research. NewDelhi. pp. 686.

Dubinsky, Z., Matsukawa, R. and Karube, I. 1995 "Photobiological aspects of algal mass culture." **J. Mar. Biotechnol.** 2 : 61-65.

Friedman, O., Dubinsky, Z. and Arad (Malis), S. 1991. "Effect of light intensity on growth and polysaccharide production in red and blue-green Rhodophyta unicells." **Bioresource Technol.** 38 : 105-110.

Florin, L., Tsokoglou, A. and Happe, T. 2001. "A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain." **J. Biol. Chem.** 276 : 6125-6132.

Fouchard, S., Hemschemeier, A., Caruana, A., Pruvost, J., Legrand, J., Happe, T., Pltier, G. and Cournac, L. 2005. "Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas* cell." **Appl. Environ. Microbiol.** 10 : 6199-6205.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gaffron, H. 1939. "Reduction of carbon dioxide with hydrogen in green plant." **Nature.** 143 : 204–205.

Gaffron, H. and Rubin, J. 1942. "Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae." **J. Gen. Physiol.** 26 : 219–240.

Graham, L. E., Graham, J. M. and Wilcok, L. W. 1946. **Algae: 2nd ed.** Wisconsin America.

Gibbs, M., Gfeller, R. P. and Chen, C. 1986. "Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii.*III: photoassimilation of acetate." **Plant Physiol.** 82 : 160-166.

Gladue, R. M. and Maxey, J. E. 1994. "Microalgal feeds for aquaculture." **J. Appl. Phycol.** 6 : 131-141.

Greenbaum, E. and Lee, J. 1998. "Photosynthetic hydrogen and oxygen production by green algae." In : Zaborsky et. al. [Eds], Biohydrogen. Plenum press. New York. pp. 235-241.

Grobbelaar, J. U. 1995 "Influence of areal density on ß-carotene production by *Dunaliella salina.*" **J. Appl. Phycol.** 7: 69-73.

Phycol. 7: 69-73.Guan, Y., Deng, M., Yu, X. and Zhang, W. 2004. "Two-stage photobiological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis.*" **J. Biochem. Bioeng.** 19 : 69-73.

Hanahan, D. 1983. "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid." **J. Mol. Biol.** 4 : 557-580.

Harris, E. H. 1989. The *Chlamydomonas* source book : a comprehensive guide to biology and laboratory use. San Diego : Academic.

Hartman, H. and Krasna, A. 1963. "Studies on the adaptation of hydrogenase in *Scenedesmus.*" **J. Biol. Chem.** 238 : 749-757.

Healey, F.P. 1970. "The mechanism of hydrogen evolution in *Chlamydomonas moewusii.*" Plant Physol. 45 : 153 -lant Physol. 45 : 153 – 159.

Kessler, E. 1974. "Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genera *Ankistrodesmus* and *Scenedesmus.*" **Arch. Microbiol.** 113 : 143-144.

Khetkorn, W., Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. 2010. "Enhanced biohydrogen production by the N_2-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012." **Int. J. Hydrogen Energy.** 35 : 12767-12776.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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." **Int. J. Hydrogen Energy.** 31 : 1585-1590.

Kojima, E. and Lin B. 2004. "Effect of partial shading on photoproduction of hydrogen by *Chlorella*." **J. Biosci. Bioeng.** 5 : 317-321.

Kosaric, N. and Lyng, R.P. 1988. "Microbial production of hydrogen." In : Rehm, H. J. [Eds], Biotechnology Vol. 6b (special microbial procrsses). VCH. pp. 101-134.

Kosourov, S., Makarova, V., Fedorov, A.S., Tsygankov, A., Seibert, M. and Ghirardi, M. L. 2005. "The effect of sulfur re-addition on H(2) photoproduction by sulfur-deprived green algae." **Photosynth res.** 85(3) : 295-305.

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." **J. Biotechnol.** 128 : 776-787.

Lee, Y. K. and Shen, H. 2004. "Basic culturing techniques." In : Richmond, A. [Eds], Handbook of microalgal culture. IS Press. pp. 40-50

Lewis, L. A. and Flechtner, V. R. 2004. "Cryptic species of *Scenedesmus* (Chlorophyta) from desert soil communities of wertern North America." **J. Phycology.** 40(6) : 1127-1137.

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

Mahro, B. and Grimme, L. H. 1982. "H_2-production by green algae : the significance of anaerobic pre-incubation periods and of high light intensities for H_2-photoproductivity of *Chlorella fusca*." **Arch. Microbiol.** 132 : 82-86.

Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. 2010. "A newly isolated green alga *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production." **Int. J. Hydrogen Energy.** 35 : 13193-13199.

Maness, P. C., Yu, J., Eckert, C. and Ghirardi, M. L. 2009. "Photobiological hydrogen production prospects and challenges : Efforts to scale up the capacity of green algae and cyanobacteria to use sunlight to convert water into hydrogen gas for energy use." **Microbe.** 6(4) : 275-280.

Melis, A. 2002. "Green alga hydrogen production : progress, challenges and prospects." **Int. J. Hydrogen Energy.** 27 : 1217-1228.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Melis, A. and Happe, T. 2001. "Hydrogen production : green algae as a source of energy." **Plant Physiol.** 3 : 740-748.

Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M. L. and Seibert, M. 2000. "Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." **Plant. Physiol.** 122 : 127-136.

Miura, Y., Ohta, S. and Mano, M. 1986. "Isolation and characterization of a unicellular marine and green alga exhibiting high activity in dark hydrogen production." **Agric. Biol. Chem.** 50(11) : 2837-2844.

Ogawa, T. and Aiba, S. 1981. "Bioenergatic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*." **Biotechnol.** 23 : 1121-1132.

Rasoul-Amini, S., Ghasemi, Y., Morowvat, 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.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. 1979. "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria." **J. Gen. Microbiol.** 11 : 1–61.

Sambrook, J. Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning 2nd ed. Vol. 1-3. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schnackenberg, J., Schulz, R. and Senger, H. 1993. "Characterization and purification of hydrogenase from the eukaryotic green glga *Scenedesmus obliquus*." **FEBS.** 327 : 21-24.

Schulz, R., Schnackenberg, J., Stangier, K., Wünschiers, R., Zinn, T. and Senger, H. 1998. "Light- dependent hydrogen production of the green algae." In : Zaborsky et al. [Eds], BioHydrogen. Plenum Press, New York.

Schürmann, P. and Jacquot, J. P. 2000. "Plant thioredoxin systems revisited." **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 51 : 371-400.

Skjånes, K., Knutsena, G., Källqvist, T. and Lindblad, P. 2008. "H_2 production from marine and freshwater species of green algae during sulfur deprivation and considerations for bioreactor design." **Int. J. Hydrogen Energy.** 33 : 511-521.

Thompson, Jr. G. A. 1996. "Lipids and membrane function in green algae." **Biochem. Biophys. Acta.** 1302 : 17-45.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thompson, P. A. 1992. "Effect of temperature on the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton." **J. Phycol.** 28 : 481-488.

Tsygankov, A. A., Kosourov, S. N., Tolstygina, I. V., Ghirardi, M. L. and Seibert, M. 2006. "Hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions." **Int. J. Hydrogen Energy.** 31 : 1574–1584.

Ust'ak, S., Havrland, B., Munoz, J. O. J., Fernandez, E. C. and Lachman, J. 2007. "Experimental verification of various methods for biological hydrogenase production." **Int. J. Hydrogen Energy.** 32 : 1736-1741.

Vignais, P., Billound, B. and Meyer, J. 2001. "Classification and phylogeny of hydrogenase." **FEMS Microbiology.** 25 : 455-501.

Vonshak, A. 1986. "Laboratory techniques for the cultivation of microalgae." In : Richmond A. [Eds], Handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 117-145

Winkler, M., Heil, B., Heil, B. and Happe, T. 2002a. "Isolation and molecular characterization of the [Fe] hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca*." **Biochim. Biophys. Acta.** 1576 : 330-334.

Winkler, M., Hemschemerier, A., Gotor, C., Melis, A. and Happe, T. 2002b. "[Fe]-hydrogenase in green algae : photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation." **Int. J. Hydrogen Energy.** 27 : 1431-1439.

Wünschiers, R. and Lindblad, P. 2002. "Hydrogen in education – a biological approach." **Int. J. Hydrogen Energy.** 27 : 1131-1140.

[online]. Available : http://www.people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent.html

[online]. Available : http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ Bold's Basal medium (BBM)

สารเคมี	ส่วนประกอบสารละลาย	มิลลิลิตร/ลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	8.75 กรัม/500 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	1.25 กรัม/500 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	3.75 กรัม/500 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	12.5 กรัม/500 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
ไดโพแทสซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	3.75 กรัม/500 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.25 กรัม/500 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิด ไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)	10 กรัม/ลิตร	1 มิลลิลิตร
โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	6.2กรัม/ลิตร	1 มิลลิลิตร
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	4.98 กรัมลิตร	1 มิลลิลิตร
กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4 (conc.))	1 มิลลิลิตร/ลิตร	
กรดบอลิก (H_3BO_3)	5.75 กรัม/500 มิลลิลิตร	0.7 มิลลิลิตร
Trace Metal Solution	See below	1 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบของ Trace Metal Solution:

ส่วนประกอบ		
กรดบอลิก (H_3BO_3)	2.86	กรัม/ลิตร
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	1.81	กรัม/ลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.222	กรัม/ลิตร
โซเดียมโมลิเบตเพนตะไฮเดรต ($NaMoO_4.5H_2O$)	0.390	กรัม/ลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.079	กรัม/ลิตร
โคบอลไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2.6H_2O$)	0.0494	กรัม/ลิตร

ละลายสารละลายแต่ละส่วนแล้ว นำมาผสมกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	2.86	กรัม/ลิตร
แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	1.81	กรัม/ลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.22	กรัม/ลิตร
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4.2H_2O$)	0.39	กรัม/ลิตร
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.079	กรัม/ลิตร
โคบอลต์ (II) ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2.6H_2O$)	0.049	กรัม/ลิตร

ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	149.6	กรัม/ลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกตะไฮเดรต ($MgSO_4.6H_2O$)	6.94	กรัม/ลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	3.6	กรัม/ลิตร
กรดซิตริก (Citric Acid)	0.6	กรัม/ลิตร
ไดโซเดียมอีทีดีเอ (Na_2EDTA)	0.1	กรัม/ลิตร
Trace metal mix 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบอาหาร BG11

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
เฟอร์ริคแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4$.Citrate) (0.60 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ N8 medium

ส่วนประกอบ

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_20$)	260	มิลลิกรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	740	มิลลิกรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	10	มิลลิกรัม
ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไอรอนซอลท์ (Fe.EDTA)	10	มิลลิกรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	50	มิลลิกรัม
โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)	1000	มิลลิกรัม
Trace element mixture	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.8

ส่วนประกอบของ Trace element mixture

อะลูมิเนียมซัลเฟตออกตะเดคะไฮเดรต ($Al_2(SO_4)_3.18H_2O$)	3.58	กรัม/ลิตร
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	12.98	กรัม/ลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	1.83	กรัม/ลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	3.20	กรัม/ลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

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

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

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

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

ประกอบด้วยสารละลาย Disodium EDTA 5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคน ปรับ pH 6.5 ด้วย 5N โซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารตามด้านล่างเพิ่มตามลำดับ

เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	2.2	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	0.51	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.016	กรัม
โซเดียมโมลิเบตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.073	กรัม
โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$)	0.016	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารละลายจะมีสีเหลืองเขียว เปลี่ยนเป็นสีม่วง หลังจากนั้น เติมสารตามด้านล่างตามลำดับ

20 ml 1M stock โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (1M stock: 6.8 กรัม /50มิลลิลิตร)

30 ml 1M stock ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (1M stock: 8.7 กรัม /50 มิลลิลิตร)

(ปรับพีเอช 7.2) สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น 1.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria Bertani (LB) Broth

ส่วนประกอบของอาหาร

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Super Optimal Broth (SOB)

ส่วนประกอบของอาหาร

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	20	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

สารละลาย RF1

ส่วนประกอบ

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	10	มิลลิโมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	50	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมอะซิเตรต (CH_3COOK)	30	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	10	มิลลิโมลาร์
กลีเซอรอล (Glycerol)	15	เปอร์เซ็นต์

ปรับพีเอชเป็น 5.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วกรองผ่าน filter ขนาด 0.22 ไมครอน

สารละลาย RF2

ส่วนประกอบ

3-(N-มอร์โฟลิโน)โพรเพนซัลโฟนิก แอซิด (MOPs)	10	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	10	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	10	มิลลิโมลาร์
กลีเซอรอล (Glycerol)	15	เปอร์เซ็นต์

ปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วยกรดอะซีติก แล้วกรองผ่าน filter ขนาด 0.22 ไมครอน

บัฟเฟอร์ TE

ส่วนประกอบ

ทริสไฮโดรคลอริก (Tris-HCl)	1	โมลาร์
ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA)	0.5	โมลาร์

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายและปรับพีเอชเป็น 8 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tracking dye

ส่วนประกอบ

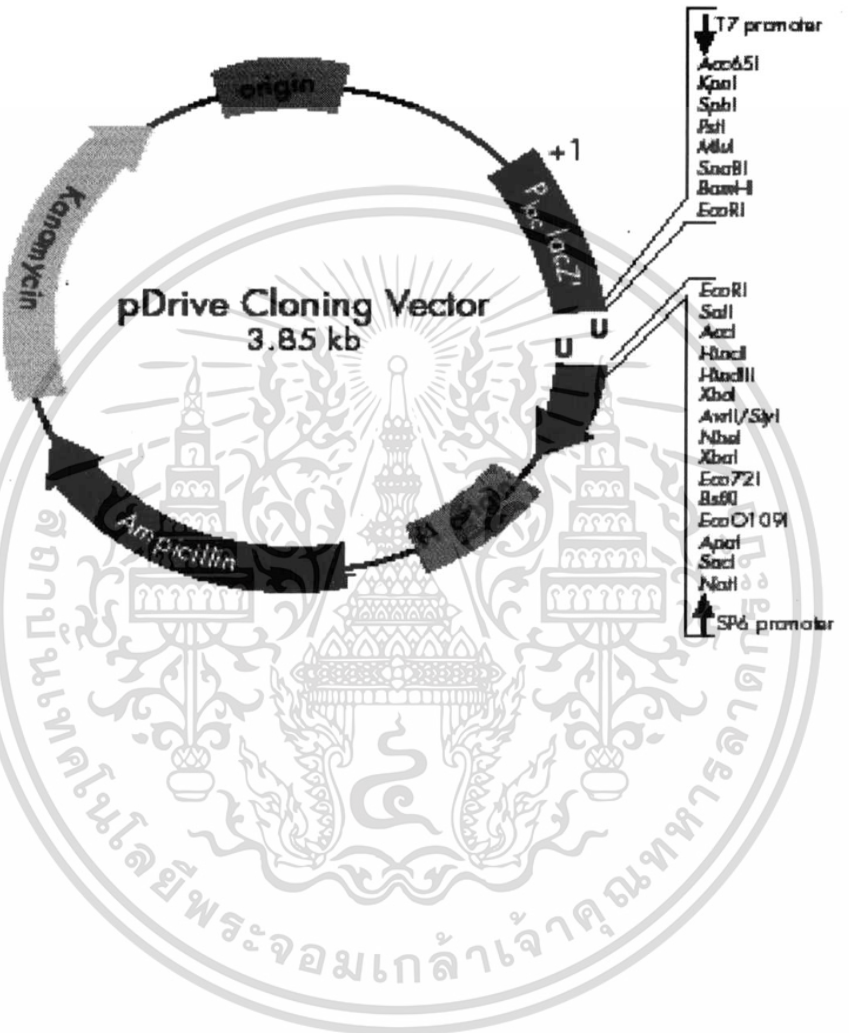
ซูโครส (sucrose) หรือกลีเซอรอล (glycerol) (น้ำหนักต่อปริมาตร)	40	เปอร์เซ็นต์
โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) (น้ำหนักต่อปริมาตร)	0.25	เปอร์เซ็นต์

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

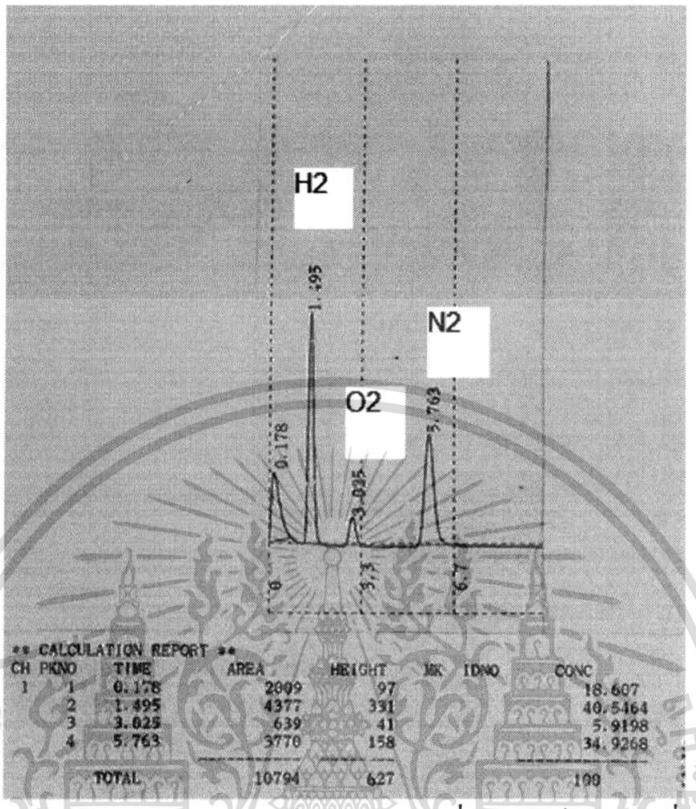
ภาคผนวก ง

แผนที่ยีนของพลาสมิด pDrive (Qiagen, Germany)

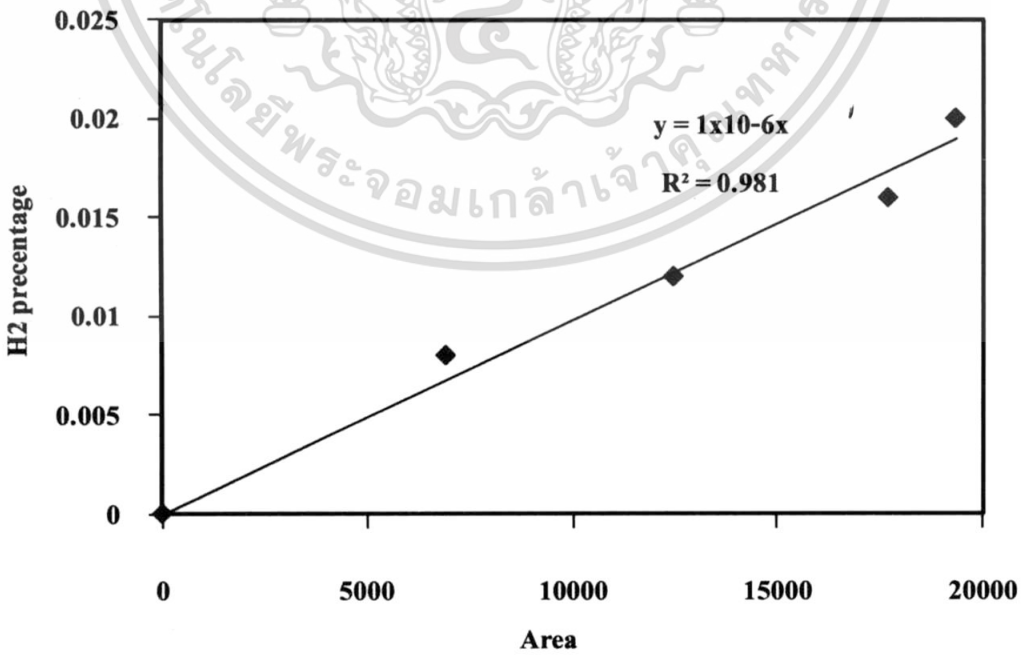


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ



รูปที่ จ 1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของก๊าซไฮโดรเจนที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง GC-TCD



รูปที่ จ 2 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

1. นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ (%) จากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ จ 2)
2. นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละมาเปรียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร
3. นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาเปรียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิโมล โดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาณไฮโดรเจน 1 มิลลิโมล
4. นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมงจะได้ ปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมง
5. นำปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมงที่ได้มาหารปริมาณคลอโรฟิลล์จะได้หน่วยเป็น ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

ตารางที่ ฉ 1 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way anova ของการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป

a, b,c,d,e มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ab ไม่มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	1	2	3	4	5	*P*
Medium						0.05
N8	0.1375[a]					
BG11		0.2981[b]				
BBM			0.4283[c]			
Cell ages (weeks)						0.05
3	0.1541[a]					
2		0.3117[b]				
2			0.4283[c]			
Adaptation time (hours)						0.05
24	0.0330[a]					
8		0.1013[b]				
6		0.1116[b]				
4			0.1459[c]			
2				0.3116[d]		
Carbon Source						0.05
Na_3CO_3	0.1226[a]					
Sucrose		0.1978[b]				
$NaHCO_3$		0.1995[b]				
Fructose		0.2200[b]				
CH_3COONa			0.2630[c]			
Control				0.3116[d]		
Glucose					0.3293[e]	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ 1 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way anova ของการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป (ต่อ)

	1	2	3	4	5	*P*
$NaNO_3$ (mM)						0.05
1.5	0.1792[a]					
0	0.2012[ab]	0.2012[ab]				
6		0.2377[bc]	0.2377[bc]			
0.75			0.2506[cd]	0.2506[cd]		
0.075			0.2734[cde]	0.2734[cde]	0.2734[cde]	
3				0.2922[de]	0.2922[de]	
0.15					0.3133[e]	
$MgSO_4$ (mM)						0.05
1.55	0.0482[a]					
0.155		0.1114[b]				
0.31		0.1215[b]				
0.62		0.1282[b]				
0.0775			0.1757[c]			
0.0388				0.2268[d]		
0					0.4005[e]	
$FeSO_4$ (μM)						0.05
0	0.2411[a]					
90	0.2593[ab]	0.2593[ab]				
9	0.2619[ab]	0.2619[ab]				
4.5		0.3011[b]				
2.25			0.3703[c]			
18			0.3792[c]			
36			0.4032[c]			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ 2 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way anova ของการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป

a, b,c,d,e มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ab ไม่มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	1	2	3	4	*P*
Cell ages (hours)					0.05
36	0.3336[a]				
24		0.5335[b]			
12			0.8318[c]		
18				1.355[d]	
Adaptation time (hours)					0.05
6	0.0366[a]				
8	0.0374[a]				
24	0.0408[a]				
4		0.0616[b]			
2			0.1213[c]		
Dark and Light					
dark	0.7709[a]				
light		1.355[a]			
Temperature (°C)					
25	0.2138[a]				
40	0.2490[ab]	0.2490[ab]			
30		0.2893[b]			
35			0.4394[c]		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ 2 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way anova ของการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป (ต่อ)

	1	2	3	4	*P*
Light density (lux)					
500	0.1799[a]				
3,000		0.2565[b]			
1,000		0.2582[b]			
4,000		0.3097[b]			
2,000			0.4507[c]		
Reducing agent (5 mM)					
Methylviologen	0.2572[a]				
Dithionite	0.5525[ab]	0.5525[ab]			
Fructose		0.6666[b]			
Control		0.7149[b]			
Glucose		0.7583[b]			
NADH		0.7979[b]			
Sucrose		0.8665[b]			
DTT		0.9261[b]			
β-mercaptoethanol			1.2856[c]		
Carbon Source					0.05
Na_2CO_3	0.1908[a]				
Sucrose		0.6075[b]			
$NaHCO_3$		0.6886[b]			
Fructose		0.7192[b]			
Glucose			0.9241[c]		
Control			0.9319[c]		
CH_3COONa				1.3760[d]	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ 2 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way anova ของการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป (ต่อ)

	1	2	3	4	*P*
CH_3COONa (mM)					0.05
8.7	0.2455[a]				
4.35	0.2936[a]				
17.4	0.3238[a]				
174	0.3792[a]				
0	0.4191[a]				
34.8		0.8556[b]			
69.6		0.8982[b]			
NH_4Cl (mM)					0.05
0	0.0943[a]				
0.245	0.1271[a]				
9.8	0.1354[ab]	0.1354[ab]			
3.92	0.1393[ab]	0.1393[ab]			
1.96	0.1406[ab]	0.1406[ab]			
0.98		0.1974[b]			
0.49			0.2657[c]		
$MgSO_4$ (mM)					0.05
2	0.4713[a]				
0.05	0.4901[a]				
0.8	0.5158[ab]	0.5158[ab]			
0	0.5262[ab]	0.5262[ab]			
0.4	0.5571[ab]	0.5571[ab]			
0.2		0.6671[b]			
0.1			1.3989[c]		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ 2 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way anova ของการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป (ต่อ)

	1	2	3	4	*P*
$FeSO_4$ (μM)					0.05
36	0.3573[a]				
2.25	0.3882[a]				
90	0.4417[a]				
0	0.4437[a]				
18		0.5631[b]			
9		0.5916[b]			
4.5			1.1607[c]		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุรัตน์ติพร รัตนะ เกิดเมื่อวันที่ 2 เมษายน พ.ศ. 2527 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 133 หมู่ 34 ตำบลเมืองเดช อำเภอเดชอุดม จังหวัดอุบลราชธานี ในปี พ.ศ. 2549 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสำเร็จการศึกษาในปีพ.ศ. 2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้