ผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124

ยุวดี คำแหง*, ปรียานุช ศรีไพบูลย์, วรัญญา บินอานัด, จันทร์เทวา ราชเจริญ และ สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

***อีเมลผู้ประพันธ์บรรณกิจ:** Yuwadee.kh@kmitl.ac.th

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจน (H_2) เป็นพลังงานทางเลือกที่สะอาด ซึ่งสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว งานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. CirG, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะขาดธาตุอาหาร เช่น ไนโตรเจน โพแทสเซียมและซัลเฟอร์ จากการทดลองพบว่า ในบรรดาสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ให้การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด จากนั้น จึงนำสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* sp. CirG ที่ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด มาศึกษาสภาวะที่มีเหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและความเข้มแสง พบว่า *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากไนโตรเจน (TAP-N) ซึ่งมีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 8,000 ลักซ์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 110.73 ± 1.57 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และให้ผลการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ 3,617.65 ± 23.19 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์

คำสำคัญ: การผลิตไฮโดรเจน; สาหร่ายสีเขียว; พลังงานทางเลือก; การขาดแหล่งอาหาร; แหล่งคาร์บอน; ความเข้มแสง

Effects of Carbon Source and Light Intensity on Hydrogen Production by Unicellular Green Algae *Chlorella* sp. CirG, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 and *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124

Yuwadee Khamheang*, Priyanuch Sripaiboon, Waranya Binarnat, Chantewa Rachjaroen and Saranya Phunpruch

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Lat Krabang, Bangkok 10520, Thailand

***Corresponding author's e-mail: Yuwadee.kh@kmitl.ac.th**

Abstract

Hydrogen (H_2) is a clean alternative energy source that can be produced by several kinds of microorganisms such as bacteria, cyanobacteria and green algae. This study investigates the optimal conditions for hydrogen production from three green algae species: *Chlorella* sp. CirG, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 and *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124. The study focused on hydrogen production under nutrient-deprived conditions, including nitrogen (TAP-N), potassium (TAP-K), and sulfur deprivation (TAP-S). Among the three species, *Chlorella* sp. CirG, incubated under nitrogen-deficient conditions (TAP-N), produced the highest hydrogen, This species was further examined to determine the optimal conditions for hydrogen production, focusing on carbon sources and light intensity. The results found that *Chlorella* sp. CirG, cultured in TAP-N medium with 87 mM acetic acid and exposed to 8,000 lux light intensity, achieved the maximum H_2 production rate and H_2 accumulation with amount 110.73 ± 1.57 micromoles of H_2 per milligram of chlorophyll per hour and 3,617.65 ± 23.19 micromoles of H_2 per milligram of chlorophyll, respectively.

Keywords: Hydrogen production; Green algae; Alternative energy; Nutrient deprivation; Carbon sources; Light intensity

บทนำ

ในปัจจุบัน การเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร การขยายตัวทั้งทางด้านเศรษฐกิจ และอุตสาหกรรม ส่งผลให้เกือบทุกประเทศทั่วโลกประสบปัญหาวิกฤตการณ์ขาดแคลนพลังงาน ซึ่งแหล่งพลังงานที่มนุษย์นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ พลังงานที่ได้จากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น ถ่านหิน น้ำมันปิโตรเลียม และก๊าซธรรมชาติ แต่การเผาไหม้ของแหล่งพลังงานเหล่านี้ ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก ซึ่งเป็นสาเหตุนำไปสู่การเกิดภาวะโลกร้อน (Global warming) ส่งผลให้นักวิจัยให้ความสนใจในการแสวงหาพลังงานทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานไฮโดรเจน (H_2) จัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากเป็นแหล่งพลังงานสะอาด เมื่อเกิดการเผาไหม้ด้วยออกซิเจนจะได้เพียงน้ำและออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและ อนุรักษ์พลังงานกระทรวงพลังงาน, 2552) พลังงานไฮโดรเจนให้ค่าพลังงานความร้อนจากการเผาไหม้สูงถึง 141.65 เมกะจูลต่อกิโลกรัม (Perry, 1963) ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพ โดยทางชีวภาพจะผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิดอาจเรียกว่า “ไบโอไฮโดรเจน” ปัจจุบันการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียสามารถใช้แสงและน้ำเป็นวัตถุดิบผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในการผลิตไฮโดรเจน

ผลการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Chlorella vulgaris และ Scenedesmus obliquus* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียสามารถผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ปราศจากซัลเฟอร์ ที่ความเข้มแสง 140 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่า การเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีม่วงให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ 128 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร (Ruiz-Marin *et al*., 2020) และงานวิจัยของ Kim *et al*. (2006) ได้ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* โดยการแปรผันความเข้มแสงตั้งแต่ 60-200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ พบว่า มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด คือ 225 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร ใน 24 ชั่วโมงแรกที่ความเข้มแสง 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และเมื่อความเข้มแสงที่ 300 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที การผลิตไฮโดรเจนหยุดลง เนื่องจากระบบแสงสองถูกยับยั้งโดยแสง (Photodamage)

วิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. CirG, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. CirG, *S. obliquus* TISTR 8546 และ *C. reinhardtii* CC-124 ในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (Young *et al.*, 2022)

2. วิธีการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว

ปิเปตเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ จากนั้น เติมเมทานอลที่มีความบริสุทธิ์ 90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้น นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 และ 665 นาโนเมตร (Lee & Shen, 2004) (สมการที่ 1.1) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ การทดลองทั้งหมดดำเนินการในรูปแบบ 3 ชุดทดลอง (Triplicate)

ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี = Chlorophyll A + B = $(4.0 \times A_{665}) + (25.5 \times A_{650})$ (สมการที่ 1.1)

3. วิธีการศึกษาการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหาร TAP โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 เพาะเลี้ยงในสภาวะตามหัวข้อที่ 1 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์มาเก็บเกี่ยวและล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP จากนั้นกระจายเซลล์ในอาหาร TAP (สูตรปกติ) อาหารที่ขาดแหล่งอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ ไนโตรเจน (TAP-N), โพแทสเซียม (TAP-K) และซัลเฟอร์ (TAP-S) เพื่อเป็นการเหนี่ยวนำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจน จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดขนาดเล็ก (Vial) ทำการพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที เพื่อไล่อากาศออก จากนั้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนตามหัวข้อที่ 5 การทดลองทั้งหมดดำเนินการในรูปแบบ 3 ชุดทดลอง (Triplicate) เมื่อทราบสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน จากนั้น นำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป (Melis, 2002)

4. วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก

4.1 วิธีการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส กลีเซอรอล กรดซิตริก โซเดียมอะซีเตท ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์ทุก ๆ แหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนเดิม คือ กรดอะซีติก

บ่มเซลล์ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 800 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด ปิเปตเซลล์ลงในขวด Vial จากนั้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนตามหัวข้อที่ 5 การทดลองทั้งหมดดำเนินการในรูปแบบ 3 ชุดทดลอง (Triplicate) เมื่อทราบชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย สีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก จากนั้น นำแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมมาศึกษาความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อไป (Rashid *et al*., 2012)

4.2 วิธีการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก

เมื่อทราบชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก นำเซลล์มาทำการเก็บเกี่ยวและบ่มในอาหาร TAP-N ที่แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสุดท้ายให้เท่ากับ 0, 8.7, 34.8, 87 และ 174 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับความเข้มข้นเดิม 17.4 มิลลิโมลาร์ จากนั้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนตามหัวข้อที่ 5 การทดลองทั้งหมดดำเนินการในรูปแบบ 3 ชุดทดลอง (Triplicate) เมื่อทราบความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสายพันธุ์ที่คัดเลือก จากนั้น นำไปศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป (Ruiz-Marin *et al*., 2020)

4.3 วิธีการศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก

นำเซลล์มาทำการเก็บเกี่ยวและบ่มในอาหาร TAP-N ที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ลงในขวด Vial นำไปบ่มภายใต้แสงที่แปรผันความเข้มแสงที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0 (ที่มืด), 800, 1,600, 4,000 และ 8,000 ลักซ์ จากนั้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนตามหัวข้อที่ 5 การทดลองทั้งหมดดำเนินการในรูปแบบ 3 ชุดทดลอง (Triplicate)

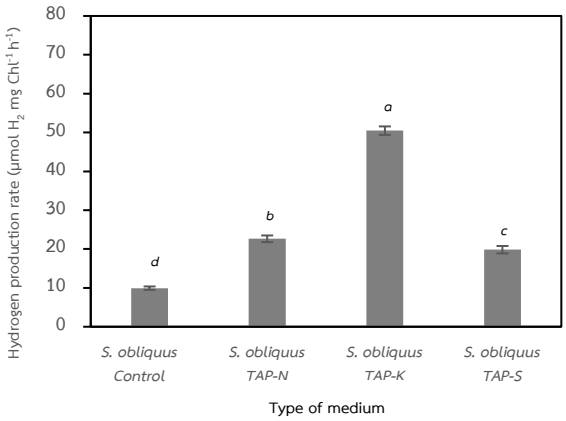
5. การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงตามหัวข้อที่ 1 จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายในหลอดเซนตริฟิวจ์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์สาหร่าย 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ลงในอาหารทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดขนาดเล็ก (Vial) ทำการพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที เพื่อไล่อากาศออก และซักนำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ เมื่อครบเวลาแล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน โดยการใช้เข็มฉีดยาดูดก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือเซลล์สาหร่ายภายในขวด Vial ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ (Gas Chromatograph : GC) (Therien *et al*., 2014) การทดลองทั้งหมดดำเนินการในรูปแบบ 3 ชุดทดลอง (Triplicate)

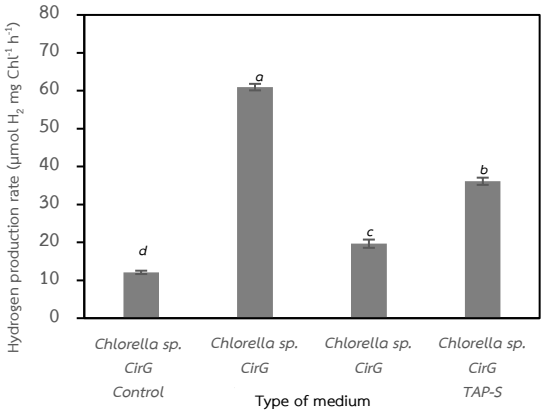
ผลการวิจัย

1. ผลการคัดเลือกชนิดของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน

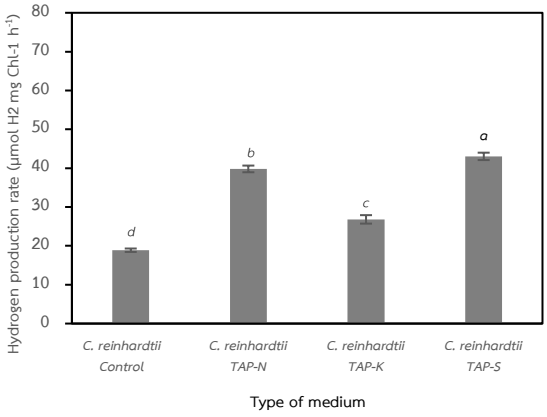
จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนทุกๆ 24 ชั่วโมง ของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า *Chlorella* sp. CirG มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 60.96 ± 0.86 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มในอาหาร TAP-N โดยเพิ่มขึ้น 2-3 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ (ภาพที่ 1A) และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1,682.20 ± 2.98 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 1), สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 50.48 ± 0.24 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มในอาหาร TAP-K ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ (ภาพที่ 1B) และมีผลผลิตไฮโดรเจนสงสุดเท่ากับ 1,537.03 ± 21.00 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 1) และสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 43.04 ± 0.75 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มในอาหาร TAP-S ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ (ภาพที่ 1C) และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1,298.69 ± 11.71 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 1) จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจน พบว่า สาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่นำมาบ่มในอาหารที่ขาดธาตุอาหารบางชนิด สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนได้เมื่อเทียบกับอาหารสูตรปกติ จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหาร TAP-N มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายสีเขียวอีกสองสายพันธุ์ ดังนั้น จึงเลือก *Chlorella* sp. CirG มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป



(A)



(B)



(C)

ภาพที่ 1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG (A), *S. obliquus* TISTR 8546 (B) และ *C. reinhardtii* CC-124 (C) ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติและอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งอาหารชนิดต่างๆ ในสภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

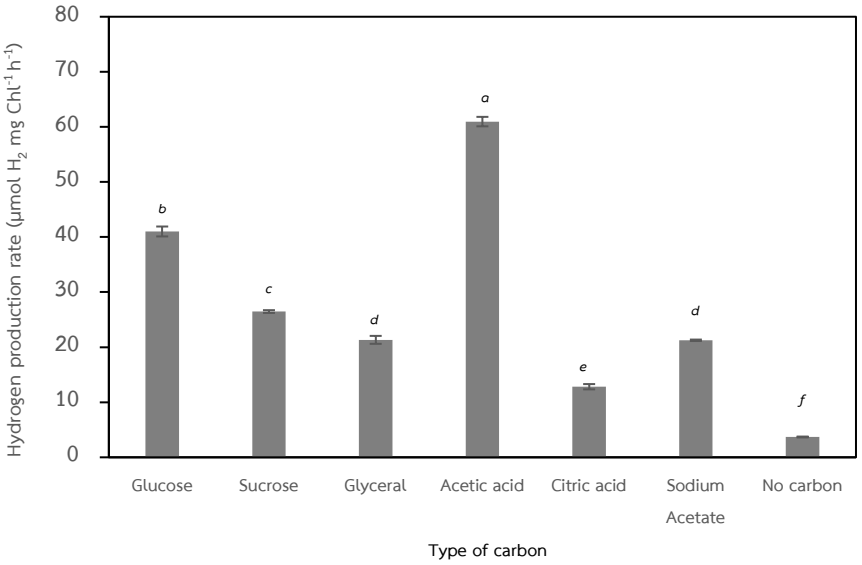
ตารางที่ 1 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติและ อาหาร TAP ที่ขาดแหล่งอาหารชนิดต่างๆ

อาหาร	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (μmol H_2 mg Chl^{-1})		
	Chlorella sp.	*S. obliquus*	*C. reinhardtii*
TAP	470.47 ± 16.20^{d}	696.98 ± 2.76^{d}	540.75 ± 4.35^{d}
TAP-N	1,682.20 ± 2.98^{a}	857.71 ± 19.30^{c}	1,107.16 ± 11.73^{b}
TAP-K	699.93 ± 5.55^{c}	1,537.03 ± 21.00^{a}	624.45 ± 1.19^{c}
TAP-S	1,211.28 ± 33.77^{b}	1,155.66 ± 18.88^{b}	1,298.69 ± 11.71^{a}

2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก

2.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก

จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG พบว่า เมื่อบ่มในอาหาร TAP-N ซึ่งมีกรดอะซีติกความเข้มข้นสุดท้าย 17.4 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 60.96 ± 0.86 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ภาพที่ 2) และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เท่ากับ 1,682.20 ± 2.98 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 2) ในทางตรงกันข้าม อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. CirG จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-N ที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 2) ดังนั้น จึงนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอนมาศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป



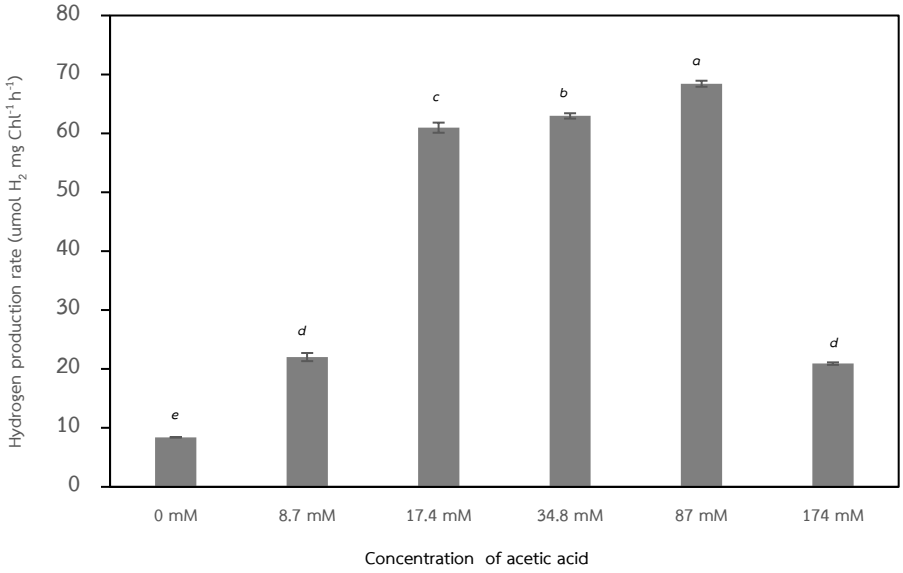
ภาพที่ 2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

ตารางที่ 2 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหาร TAP-N ซึ่งมีการแปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

แหล่งคาร์บอน	**ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ($\mu mol\ H_2\ mg\ Chl^{-1}$)**
Glucose	$1{,}175.45 \pm 11.91^{b}$
Sucrose	787.68 ± 22.90^{c}
Glycerol	717.39 ± 24.40^{d}
Acetic acid	$1{,}682.20 \pm 2.98^{a}$
Citric acid	362.63 ± 22.20^{f}
Sodium acetate	647.31 ± 27.47^{e}
No carbon	136.68 ± 2.75^{g}

2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก

จากการทดลองสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหาร TAP-N ซึ่งมีกรดอะซีติกความเข้มข้นสุดท้าย 87 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 64.42 ± 0.61 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 1.2 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร TAP-N สูตรปกติ (ดังภาพที่ 3) และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1,777.85 ± 15.26 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ดังตารางที่ 3) ดังนั้น จึงนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ มาศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป



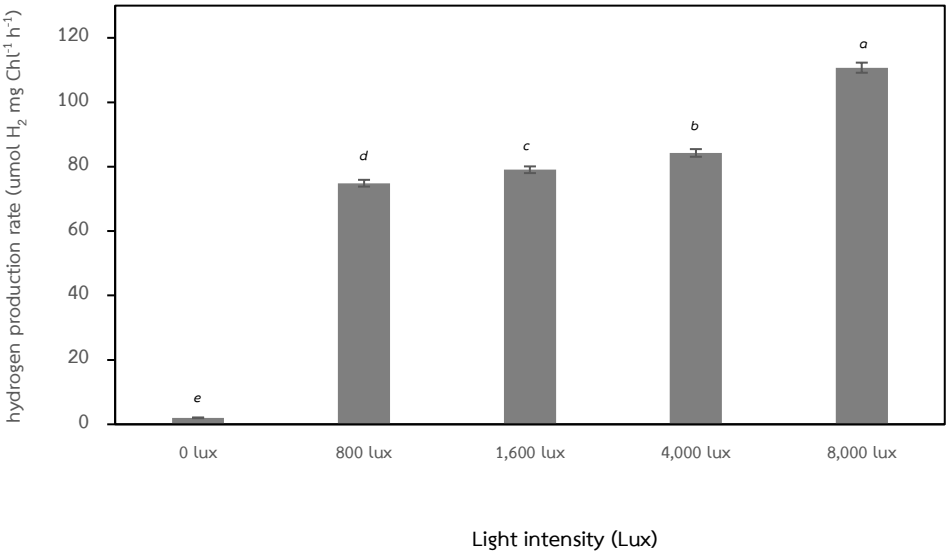
ภาพที่ 3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหาร TAP-N โดยมีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่ 0, 8.7, 17.4, 34.8, 87 และ 174 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 3 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหาร TAP-N โดยมีความเข้มข้นของกรดอะซีติกต่างกัน

ความเข้มข้นของกรดอะซีติก (mM)	**ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (umol H_2 mg Chl^{-1})**
0	314.35 ± 6.54^{f}
8.7	773.79 ± 11.37^{d}
17.4	$1{,}682.20 \pm 2.98^{c}$
34.8	$1{,}705.59 \pm 14.64^{b}$
87	$1{,}777.85 \pm 15.26^{a}$
174	725.85 ± 5.94^{e}

2.3 ผลการศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก

จากการศึกษาความเข้มแสงที่แตกต่างกัน พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มภายใต้ความเข้มแสง 8,000 ลักซ์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ 110.73 ± 1.57 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 1.4 เท่า เมื่อเทียบกับการบ่มในอาหาร TAP-N ภายใต้ความเข้มแสงปกติ (800 ลักซ์) (ดังภาพที่ 4) และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 3,617.65 ± 23.19 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ดังตารางที่ 4)



ภาพที่ 4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหาร TAP-N ภายใต้ความเข้มแสง 0, 800, 1,600, 4,000 และ 8,000 ลักซ์

ตารางที่ 4 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหาร TAP-N (กรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์) ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ

ความเข้มแสง (lux)	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (umol H_2 mg Chl^{-1})
0	105.77 ± 1.77^{e}
800	1,682.20 ± 2.98^{d}
1,600	2,936.66 ± 29.56^{c}
4,000	3,036.25 ± 23.43^{b}
8,000	3,617.65 ± 23.19^{a}

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในบรรดาสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อบ่มในอาหาร TAP-N ที่มีกรดอะซีติกความเข้มข้นสุดท้าย 87 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้ความเข้มแสง 8,000 ลักซ์ พบว่า มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ 110.73 ± 1.57 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ 3,617.65 ± 23.19 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เพิ่มขึ้น 1.4 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ สภาวะนี้จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวชนิดนี้ในอนาคตต่อไป

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากรายงานวิจัย พบว่า ธาตุอาหารไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญของคลอโรฟิลล์และยังเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีน กรดนิวคลีอิก และไนโตรจีนัสเบส ดังนั้น การขาดแหล่งไนโตรเจนทำให้การสังเคราะห์แสงลดลงและส่งผลต่อการทำงานของระบบแสงสอง (PSII) ส่งผลให้ออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองลดลง เมื่อไม่มีออกซิเจนไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส [Fe]-hydrogenase กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจึงมีประสิทธิภาพมากขึ้น (He *et al*., 2012) นอกจากนี้มีงานวิจัย พบว่า *Chlorella vulgaris* Pa-023 ที่เลี้ยงในสภาวะขาดไนโตรเจน (TAP-N) สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ 31.28 ± 1.73 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และให้ผลผลิตไฮโดรเจน 925.32 ± 19.95 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์หลังจากการบ่มแบบปราศจากออกซิเจนภายใต้แสงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง (Thaninthorn & Saranya, 2025) การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *C. vulgaris* Pa-023 ในอาหารที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ช่วยกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้น 2.5 เท่า และในอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) เพิ่มขึ้น 2.7 เท่า เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ผ่านกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนระหว่างการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยมีเอนไซม์ [Fe]-hydrogenase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อย่างไรก็ตาม เอนไซม์นี้ไวต่อออกซิเจนและถูกยับยั้งโดยกระบวนการสลายน้ำด้วยแสง (Water photolysis) ดังนั้น การทำให้สาหร่ายขาดไนโตรเจนและซัลเฟอร์ สามารถกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *C. vulgaris* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Manoyan, 2022) นอกจากนี้กรดอะซีติกเมื่อละลายน้ำ จะเกิดการแตกตัวได้เป็นอะซีเตทและโปรตอน ซึ่งเซลล์จะสามารถนำโปรตอนส่งต่อให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน (He *et al*., 2012) สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนจากการแยกสลายโมเลกุลของน้ำโดยใช้พลังงานแสงแบบทางตรงเป็นวิถีหลัก เมื่อเพิ่มความเข้มแสง สาหร่ายสีเขียวผลิตไฮโดรเจนได้สูง เนื่องจากความเข้มแสงที่สูงขึ้นจะทำให้คลอโรฟิลล์

เกิดการกระตุ้นการปลดปล่อยอิเล็กตรอนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงได้มากขึ้น (Kim *et al*., 2006) ดังนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG มาทดลองในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อเป็นการขยายขนาดการผลิตและผลผลิตไฮโดรเจนให้มากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้นั้นด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้ผู้ให้คำแนะนำ ความรู้ ตลอดจนข้อเสนอแนะในทุกขั้นตอนของการดำเนินงานวิจัย คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วยความซาบซึ้งเป็นอย่างสูง นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังได้รับความเอื้อเฟื้อสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์จากห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงานกระทรวงพลังงาน. (2552). *ไฮโดรเจน*. กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน.

He, M., Li, L., Zhang, L., & Liu, J. (2012). The enhancement of hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides* exposed to nitrogen limitation and sulfur deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy, 37*(24), 16903–16915.

Kim, J., Kang, C., Park, T., Kim, M., & Sim, S. (2006). Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, *31*(11), 1585–1590.

Lee, Y. K., & Shen, H. (2004). Basic culturing techniques (p. 40). In A. Richmond (Ed.), *Handbook of microalgal culture*: *Biotechnology and applied phycology*. Ames, IA, USA: Iowa State Press, a Blackwell Publishing Company.

Manoyan, J. G. (2022). Growth and hydrogen production by *Chlorella vulgaris* Pa-023 under sulfur and nitrogen deprivation. *Biological Journal of Armenia, 74*(4), 6-11.

Melis, A. (2002). Green alga hydrogen production: Progress, challenges and prospects. *International Journal of Hydrogen Energy, 27*(12), 1217–1228.

Perry, J. H. (1963). *Chemical engineers' handbook*. New York, NY, USA: McGraw-Hill.

Rashid, N., Lee, K., Han, J.-I., & Gross, M. (2012). Hydrogen production by immobilized *Chlorella vulgaris*: Optimizing pH, carbon source, and light. *Bioprocess and Biosystems Engineering, 36*(7), 867–872.

Ruiz-Marin, A., Canedo-López, Y., & Chávez-Fuentes, P. (2020). Biohydrogen production by *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* immobilized cultivated in artificial wastewater under different light quality. *AMB Express, 10*, 191.

Thaninthorn, S., & Saranya, P. (2025). Screening and optimization of high-efficiency H_2-producing *Chlorella* strains. *Journal of Applied Biology & Biotechnology, 13*(3), 71–81.

Therien, J. B., Zadvorny, O. A., Posewitz, M. C., Bryant, D. A., & Peters, J. W. (2014). Growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in acetate-free medium when co-cultured with alginate-encapsulated acetate-producing strains of *Synechococcus sp.* PCC 7002. *Biotechnology for Biofuels, 7*, 154.

Young, E. B., Reed, L., & Berges, J. A. (2022). Growth parameters and responses of green algae across a gradient of phototrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions. *Plant Biology, 10*, 13776.