บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีถึงวิกฤตการณ์น้ำมันที่มีราคาแพง สืบเนื่องมาจากการใช้น้ำมันเป็นแหล่งพลังงานเป็นจำนวนมาก นอกจากน้ำมันแล้ว ยังมีการใช้ทรัพยากรธรรมชาติด้านพลังงานอื่นๆ อาทิเช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน และน้ำมันดิบ เป็นต้น ซึ่งพลังงานเหล่านี้ล้วนแต่เป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัดและกำลังจะหมดไปในอนาคต หากมนุษย์ยังคงใช้พลังงานอย่างฟุ่มเฟือยและไม่ผลิตพลังงานใหม่ๆ ขึ้นมาทดแทน นอกจากนี้ การใช้พลังงานเหล่านี้ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม อันได้แก่ ปัญหามลพิษอากาศ ความร้อน ภาวะเรือนกระจก และฝนกรด ฯลฯ จากความเป็นมาดังกล่าวข้างต้น จึงได้มีหน่วยงานต่างๆ ทั่วโลกหันมาให้ความสนใจในการค้นคว้าวิจัย พัฒนา และผลิตพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่ๆ ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ในหลายประเทศมีการรณรงค์ให้ลดการใช้และลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ สำหรับประเทศไทยได้มีการคิดค้นพลังงานทางเลือกใหม่ขึ้นมาใช้แทนน้ำมัน เช่น พลังงานโซลาร์เซลล์จากแสงอาทิตย์ ไบโอดีเซลหรือแอลกอฮอล์จากพืช เพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานสำหรับลดการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศ

พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน โดยไฮโดรเจนมีพลังงานสะสมสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม เป็นก๊าซที่ไม่มีสีและไม่มีกลิ่น เมื่อทำการเผาผลาญไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ในอากาศจะเกิดเป็นออกไซด์ของไนโตรเจนซึ่งเป็นพิษน้อยกว่าพลังงานอื่นๆ ในปัจจุบันมีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนในโรงงานอุตสาหกรรมในต่างประเทศ ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนจรวดและขับดันยานอวกาศ มีการประดิษฐ์รถยนต์ที่ใช้พลังงานไฮโดรเจนในการขับเคลื่อนแต่ยังไม่มีการผลิตในเชิงการค้า ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการสร้างโรงงานผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี ซึ่งในการผลิตต้องเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงและเสี่ยงต่อการระเบิดของก๊าซไฮโดรเจน

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา นักวิจัยทั่วโลกหันมาให้ความสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่าไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) โดยสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ ได้แก่ แบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว สำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรียนั้นมีข้อดีคือเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่จำเป็นต้องได้รับแหล่งคาร์บอน

จากอาหารที่เติมลงไป สำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงนั้น มีข้อดีคือได้ผลผลิตสูง แต่จำเป็นต้องได้รับแหล่งคาร์บอนจากอาหารที่เติมลงไปเช่นกันและการเพาะเลี้ยงทำได้ยากกว่า สำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย มีข้อดีคือสามารถใช้พลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศมาผลิตเป็นชีวมวล และได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการ นอกจากนี้ ยังลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอยู่ในบรรยากาศอีกด้วย โดยไซยาโนแบคทีเรียนั้นมีข้อได้เปรียบกว่าสาหร่ายสีเขียว คือ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียมีความไวต่อออกซิเจนน้อยกว่าของสาหร่ายสีเขียว

การผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียจะใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ในการเร่งปฏิกิริยา โดยสามารถแบ่งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้เป็น 2 ชนิด ตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์ไฮโดรจีเนสชนิดที่ 1 คือ "unidirectional" หรือ "uptake" hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน และเอนไซม์ไฮโดรจีเนสชนิดที่ 2 คือ "bidirectional" หรือ "reversible" hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นไฮโดรเจน เอนไซม์ uptake hydrogenase สามารถพบได้เฉพาะในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายตรึงไนโตรเจนหรือที่มีเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) และในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ไม่ตรึงไนโตรเจน *Anacystis nidulans* เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็กในบริเวณเร่ง เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจนซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้มาจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ปัจจุบันมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ uptake hydrogenase หน่วยย่อยใหญ่หรือ *hupL* และหน่วยย่อยเล็กหรือ *hupS* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 (www.kazusa.or.jp), *Nostoc* sp. PCC 73102 และ *Anabaena variabilis* เอนไซม์ชนิดที่ 2 reversible hydrogenase พบในไซยาโนแบคทีเรียทั่วไป จัดเป็นชนิดที่มีนิกเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบเช่นกัน แอคติวิตีของเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นกับสภาวะในการเจริญเติบโต โดยสามารถวัดแอคติวิตีได้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียว *Aphonocapsa* sp., *Synechococcus* sp. และ *Synechocystis* sp.ในไซยาโนแบคทีเรียชนิดเป็นเส้นสาย ได้แก่ *Spirulina* sp. และ *Oscillatoria* sp. และในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Mastigocladus* sp. ปัจจุบันมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างเอนไซม์นี้ทั้งหน่วยย่อยใหญ่และหน่วยย่อยเล็ก (*hoxH* และ *hoxY*) ใน *Anabaena cylindrica, Anabaena variabilis*, *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC7942, *Prochlorothrix hollandica* และ *Arthrospira* sp.

Aphanothece halophytica เป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มเซลล์เดียว มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก แบ่งตัวตามขวาง มักพบเป็นกลุ่ม มีเยื่อหุ้มเซลล์หนา ลักษณะที่สำคัญของ *A. halophytica* คือ เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนเค็มสูง โดยสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ตั้งแต่ 0.25 โมลาร์ถึง 4.0 โมลาร์ จากการปรับตัวเพื่อรักษาสมดุลระหว่างความเข้มข้นของเกลือที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์ เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำภายในเซลล์ซึ่งทำให้เซลล์เหี่ยวและทำให้ขบวนการเมแทบอลิซึมหยุดชะงัก ปัจจุบันคณะผู้วิจัยได้ศึกษาทดลองและรายงานการผลิตไฮโดรเจนจาก *A. halophytica* เป็นครั้งแรก โดยพบว่าเซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution โดยผลิตได้สูงกว่าไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamenis* ถึง 16 เท่า ในโครงงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจึงได้มีความมุ่งหวังในการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากเดิมเป็นอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุและเกลือในปริมาณสูงมาเป็นน้ำทะเลที่มีแร่ธาตุและเกลือในปริมาณสูงเช่นกันมาใช้ทดแทน เนื่องจาก *A. halophytica* เป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มและสามารถเจริญในอาหารที่มีความเค็มสูง อย่างไรก็ดี ในการศึกษานี้จำเป็นต้องมีการปรับสูตรอาหารน้ำทะเลเพื่อให้ *A. halophytica* เจริญเติบโตและผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาสูตรอาหารน้ำทะเลที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica* ในระดับเขย่า

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาสูตรอาหารน้ำทะเลที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica* ในระดับเขย่า โดยนำน้ำทะเลมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ความเค็ม และแร่ธาตุชนิดต่างๆ เช่น เหล็ก นิกเกิล กำมะถัน ฯลฯ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำเอาน้ำทะเลที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดในธรรมชาติมาใช้ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เพื่อผลิตไฮโดรเจนได้

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1). ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica* ในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island salt solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้น นำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์และล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการกรองและฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มากระจายในฟลาสก์ที่มีน้ำทะเลปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 และนำฟลาสก์ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที โดยให้แสงความเข้ม 30 ไมโครโมลไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน

2). ศึกษาการเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph (GC) ในวันที่ 7 โดยบ่มเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีแสงและไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3). ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่แปรผันไนเตรท แมกนีเซียมซัลเฟต แหล่งคาร์บอน โซเดียมคลอไรด์ เหล็ก และนิกเกิล

4). ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* แบบยั่งยืนภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ two-stage