บททบทวนเอกสาร

1. ลักษณะและการจัดกลุ่มของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง นอกจากจะสังเคราะห์แสงได้แล้ว ยังสามารถตรึงไนโตรเจนและผลิตกาซไฮโดรเจนได้อีกด้วย แบคทีเรียนี้จะพบอยู่ทั่วไปตามพื้นดินที่ชื้นแฉะและน้ำสกปรก (polluted water) มี bacteriochlorophyll สามารถสังเคราะห์แสงได้ แต่ไม่ให้กาซออกซิเจนออกมา จัดอยู่ใน Order Rhodospirillales ซึ่งแบ่งย่อยเป็น 2 Suborder

1. Suborder Rhodospirillianeae แบคทีเรียสังเคราะห์แสงใน Suborder นี้มี bacteriochlorophyll a หรือ b ส่วนใหญ่เคลื่อนที่โดยอาศัย flagella แบ่งเป็น 2 Family คือ Rhodospirillaceae และ Chromatiaceae

2. Suborder Chlorobiinae ประกอบด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มี bacteriochloyophyll c, d หรือ e และ bacteriochlorophyll a อีกเล็กน้อย แบ่งเป็น 2 Family คือ Chlorobiaceae และ Chloroflexaceae

Clayton และ Sistorm (1978) ได้สรุปลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงใน Family Rhodospirillaceae ไว้ในตารางที่ 1 และ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1. แสดงคุณสมบัติของ Rhodospirillaceae

(Clayton and Sistrom, 1978)

Table 1. Properties of the Rhodospirillaceae[a]

Species	Cell shape, width/length (μm)	Intracytoplasmic membrane system	DNA base ratio (mol G + C/dl)	Predominant carotenoids[b]	Color anaerobic culture	Quinones[c]	Aerobic or microaerophilic growth in the dark[d]	Required growth factors[e]
Rhodocyclus purpureus	Half-circle/circle, 0.6–0.7/2.7–5	Tubes	65.3	rl, rh	Purple-violet	Q_{10}	m	Vitamin B_{12} + paba + biotin
Rhodomicrobium vannielii	Ovoid and stalk, 1.0–1.2/2–2.8	Lamellae	61.8–63.8	sp, β-c	Orange-brown	ND	m	None
Rhodopseudomonas								
acidophila	Rod, 1.0–1.3/2–5	Lamellae	62.2–66.8	rh, rg, rlg	Purple-red or orange-brown	ND	m, ae	None
capsulata	Rod/sphere, 0.5–1.2/2–2.5	Vesicles	65.5–66.8	sn, se	Yellow to brown	Q_{10}	ae	Thiamine ± biotin ± niacin
gelatinosa	Rod, 0.4–0.5/1–2	Tubes	70.5–72.4	sn, se	Yellow-brown to pinkish	$Q_8 + MK_8$	ae	Biotin + thiamine
globiformis	Sphere, 1.6–1.8	Vesicles	66.3	kts	Purple-red	ND	m	Biotin + paba
palustris	Rod, 0.6–0.9/1.2–2	Lamellae	64.8–66.3	sp, ly, rh	Red-brown	Q_{10}	ae	Paba ± biotin
sphaeroides	Sphere/ovoid, 0.7/2–2.5	Vesicles	68.4–69.9	sn, se	Green-brown to brown	Q_{10}	ae	Biotin + thiamine + niacin
sulfidophila	Rod/sphere, 0.6–0.9/0.9–2.0	Vesicles	67.0–71.0	sn, se	Yellow-brown to red	ND	ae	Biotin + thiamine + niacin + paba
sulfoviridis	Rod, 0.5–0.9/1.2–2	Lamellae	67.8–68.4	neu, sp	Olive-green	ND	m	Biotin + pyridoxine + paba
viridis	Rod, 0.6–0.9/1.2–2	Lamellae	66.3–71.4	2H-neu, 2H-ly	Green	$Q_9 + MK_9$	m	Paba + Biotin
Rhodospirillum								
fulvum	Spiral, 0.5–0.7/3.5	Stacks	64.3–65.3	ly, rh	Brown	$Q_9 + MK_9$	m	Paba
molischianum	Spiral, 0.7–1.0/5–8	Stacks	61.7–64.8	ly, rh	Brown	$Q_9 + MK_9$	m	Amino acids
photometricum	Spiral, 1.2–1.5/7–10	Stacks	65.8	ly, rh	Brown	ND	m	Yeast extract
rubrum	Spiral, 0.8–1.0/7–10	Vesicles	63.8–65.8	sp	Red	$Q_{10} + RK$	ae	Biotin
tenue	Spiral, 0.3–0.5/3–6	Tubes	64.8	ly, rh, rl	Purple-violet or brown-orange	$Q_8 + MK_8$	ae	None

[a] The data were collected from Hansen and Veldkamp (1963), Keppen and Gorlenko (1975), Mandel *et al.* (1971), Maroc *et al.* (1968), Pfennig (1974), Pfennig and Trüper (1971*d*, 1974), and van Niel (1944).

[b] (β-c) β-Carotene (61); (2H-ly) 1,2-dihydrolycopene (69); (2H-neu) 1,2-dihydroneurosporene (71); (kts) diketo-tetrahydrospirilloxanthin (20); (ly) lycopene (67); (neu) neurosporene (70); (rg) rhodopin glucoside (51); (rh) rhodopin (50); (rl) rhodopinal (2); (rlg) rhodopinal-D-glucoside (3); (se) spheroidene (28); (sn) spheroidenone (23); (sp) spirilloxanthin (37). The numbers in parentheses are the serial numbers of the carotenoids in Chapter 12, Table 1.

[c] (MK) Menaquinone; (Q) ubiquinone; (RK) rhodoquinone. The subscript numbers indicate isoprenoid chain lengths. (ND) Not determined.

[d] (ae) Aerobic; (m) microaerophilic.

[e] Required by some strains.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2. แสดงคุณสมบัติทางชีวเคมีของ Rhodospirillaceae

(Clayton and Sistrom, 1978)

Table 2. Electron Donors and Carbon Sources Used by the Rhodospirillaceae[a]

Donor/source	Species[b]															
	Rc. purpureus	*Rm. vannielii*	*Rp. acidophila*	*Rp. capsulata*	*Rp. gelatinosa*	*Rp. globiformis*	*Rp. palustris*	*Rp. sphaeroides*	*Rp. sulfidophila*	*Rp. sulfoviridis*	*Rp. viridis*	*Rs. fulvum*	*Rs. molischianum*	*Rs. photometricum*	*Rs. rubrum*	*Rs. tenue*
Acetate	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	−	−	−	0	0	−	−	0	−	−	0	−	−	−	+	+
Aspartate	−	−	−	+	0	−	−	0	±	0	0	±	±	±	+	−
Benzoate	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−
Butyrate	−	+	+	+	±	−	+	±	+	+	−	+	+	+	+	+
Caproate	+	+	±	+	−	−	+	±	+	0	−	+	+	−	+	+
Caprylate	−	+	−	+	0	−	+	±	+	0	0	+	+	−	0	+
Citrate	−	−	+	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
Ethanol	−	+	+	−	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	±
Formate	−	−	±	0	±	−	+	0	+	−	−	0	0	−	−	−
Fructose	−	−	−	+	0	+	−	+	±	+	0	−	−	+	±	−
Fumarate	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+
Gluconate	0	0	0	−	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	−	0
Glucose	−	−	±	+	+	+	−	+	+	+	+	±	−	+	−	−
Glutamate	−	−	−	+	0	−	+	0	+	0	+	0	0	−	+	0
Glycerol	−	−	±	−	−	−	+	+	0	+	−	−	−	+	−	−
Glycolate	−	−	±	0	0	−	+	0	0	0	0	0	−	+	0	−
Lactate	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	±	+	+	+
Malate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonate	−	+	±	0	0	−	+	0	0	−	0	0	−	0	0	−
Mannitol	−	−	−	−	±	+	−	+	−	−	0	−	−	+	−	−
Methanol	−	±	±	0	±	−	−	0	−	0	0	0	−	−	±	±
Pelargonate	−	−	−	+	0	−	−	±	+	0	0	+	+	±	0	+
Propionate	−	+	+	+	±	−	+	±	+	−	−	+	+	±	+	+
Pyruvate	+	+	+	+	+	±	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+
Succinate	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tartrate	−	−	±	−	±	+	−	+	−	−	0	0	−	−	−	−
Valerate	−	+	+	+	0	−	+	±	+	−	−	+	+	+	+	+
Yeast extract	−	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+
Casamino acids	−	+	+	+	0	−	+	0	+	+	+	−	−	+	+	+
Hydrogen (H_2)	+	+	+	+	±	0	+	+	+	0	−	+	0	0	+	±
Sulfide	0	(+)	0	(+)	0	0	(+)	0	+	+	0	0	0	0	(+)	0
Thiosulfate	−	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−	−	−	−	−	−

[a] The data were collected from Hansen and Veldkamp (1973), Keppen and Gorienko (1975), Pfennig (1974), and Pfennig and Trüper (1974).

[b] Genera: (*Rc.*) *Rhodocyclus;* (*Rm.*) *Rhodomicrobium;* (*Rp.*) *Rhodopseudomonas;* (*Rs.*) *Rhodospirillum.* Symbols: + = utilized; ± = utilized by some strains; (+) = utilized at low concentrations, preferably in continuous cultures; − = not utilized; 0 = not tested.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Watanabe et al. (1980) ได้รายงานการวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้จากประเทศไทย โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีว่า เชื้อที่แยกได้ทุกเชื้อเจริญได้ดีใน malate-glutamate medium ภายใต้สภาพไร้ออกซิเจนและมีแสงสว่าง แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารแบบเดียวกันขณะไม่มีแสง เชื้อที่แยกได้ทุกเชื้อไม่สามารถใช้ sulfide หรือ thiosulfate จากคุณสมบัติทั้งหมดดังกล่าว วินิจฉัยว่าเชื้อที่แยกได้ทุกเชื้อเป็น Purple nonsulfur photosynthetic bacteria จากสีของโคโลนีในอาหาร G_5 สามารถแยกเชื้อที่แยกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่ม A (A1-A4) มีโคโลนีสีแดง กลุ่ม B (B1-B6) มีโคโลนีสีน้ำตาล เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้มาทำการย้อมสีและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอนพบว่า เชื้อของกลุ่ม A มีลักษณะเซลล์เป็นท่อนยาว มีแฟลกเจลลัม 1 เส้น เชื้อของกลุ่ม B มีลักษณะเซลล์กลมรีหรือท่อนยาว มีแฟลกเจลลัม 1 เส้น และทุกเชื้อของ A และ B ย้อมสีติดสีกรัมลบ จากรูปร่างลักษณะดังกล่าว วินิจฉัยได้ว่า เชื้อทั้งสองกลุ่มเป็น Rhodopseudomonas sp. เมื่อนำเชื้อในกลุ่ม B ซึ่งมีสีน้ำตาลมาเลี้ยงใน malate-glutamate medium สภาพมีออกซิเจน สีของโคโลนีจะเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีแดง จากคุณสมบัติข้อนี้ วินิจฉัยว่าเชื้อในกลุ่ม B เป็น Rp. sphaeroides หรือ Rp. capsulata จากการทดสอบการใช้สารอินทรีย์และสารช่วยการเจริญเชื้อในกลุ่ม B ใช้ tartarate, mannose manitol และ sorbitol เป็นแหล่งคาร์บอนได้ จึงสรุปได้ว่าเชื้อในกลุ่ม B เป็น Rp. sphaeroides เชื้อในกลุ่ม A สามารถย่อยเจลาตินได้ จากคุณสมบัติข้อนี้แสดงว่าเชื้อในกลุ่ม A เป็น Rp. gelatinosa

2. การผลิตกาซไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

2.1 ขบวนการทางเคมีของการผลิตกาซไฮโดรเจน

Gest และ Kamen. (1949) เป็นบุคคลกลุ่มแรก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่สังเกตพบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะผลิตกาซไฮโดรเจนขณะทำการสังเคราะห์แสง โดยเขาคิดว่าการผลิตกาซของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเกิดขึ้นจากการทำงานของ hydrogenase แต่ Lindstrom et al. (1952) ได้รายงานว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงหลายสปีชีส์ สามารถตรึงไนโตรเจนโดยใช้เอนไซม์ nitrogenase ได้ Ormerod et al. (1961)ได้ทดลองเลี้ยง Rhodospirillum rubrum ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแอมโมเนียม พบว่า การตรึงไนโตรเจนและการผลิตกาซไฮโดรเจนจะหยุดชงักลง ซึ่ง Ormerod และ Gest (1962) ได้อธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตกาซไฮโดรเจนกับการตรึงไนโตรเจนว่า การที่เกลือแอมโมเนียมไปยับยั้งขบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกาซไฮโดรเจนนั้น เป็นผลจาก Feed back repression ซึ่ง NH_4 จะเป็นผลลัพธ์สุดท้ายจากการตรึงไนโตรเจน เมื่อมีปริมาณมากพอแล้ว บางส่วนจะไปยับยั้งการตรึงไนโตรเจน ดังนั้น การผลิตกาซไฮโดรเจนและการตรึงไนโตรเจนจะต้องถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันหรือเอนไซม์หลายชนิดที่สัมพันธ์กัน การผลิตกาซไฮโดรเจนโดยอาศัยเอนไซม์ hydrogenase และ nitrogenase สามารถเขียนเป็นสมการเคมีได้ดังนี้

$$2H^+ + \text{Reduced Ferredoxin} \xrightarrow{\text{Hydrogenase}} H_2$$

$$2H^+ + \text{Reduced Ferredoxin} \xrightarrow{\text{Nitrogenase}} H_2 \quad (\text{xATP} \rightarrow \text{xADP})$$

เมื่อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมีเอนไซม์ทั้งสองชนิดก็มีการศึกษากันมาก เพื่อที่จะทราบว่า เอนไซม์ชนิดใดแน่ที่กระตุ้นให้มีการผลิตกาซไฮโดรเจน มีหลักฐานสนับสนุนว่า การผลิตกาซไฮโดรเจนจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงถูกกระตุ้นด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

nitrogenase จากงานทดลองของ Hillmer และ Gest (1977) และ Kim et al. (1980) ซึ่งทดลองกับ Rhodopseudomonas palustris ได้ยืนยันว่า ทั้งการตรึงไนโตรเจนและการผลิตกาซไฮโดรเจนถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ nitrogenase เหมือนกัน โดยขบวนการสังเคราะห์แสงในปฏิกริยาที่ใช้แสง จะให้ ATP และ reductant แก่ nitrogenase ใช้ในการตรึงไนโตรเจน ซึ่งจะได้ NH_4^+ เมื่อ NH_4^+ ในเซลล์มีปริมาณมากพอแล้วจะยับยั้ง nitrogenase ไม่ให้เปลี่ยน N_2 เป็น NH_4^+ อีก เมื่อ nitrogenaseถูกยับยั้งการผลิตกาซไฮโดรเจนก็หยุดชงัก แต่ Hiura et al. (1981) ได้รายงานว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงพวก Rhodospirillum rubrum จะขับ ferredoxin ออกมาขณะทำการสังเคราะห์แสงแล้ว hydrogenase ก็จะถูกขับออกมาในปริมาณเท่า ๆ กัน hydrogenase จะทำหน้าที่ในการผลิตกาซไฮโดรเจนนอกเซลล์ จากการตรวจสอบประสิทธิภาพของ hydrogenase ที่ถูกขับออกมานอกเซลล์เขาได้พบว่า มีประสิทธิภาพมากกว่า hydrogenase ในเซลล์ถึง 11 เท่า

2.2 เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกาซไฮโดรเจน

เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกาซไฮโดรเจนได้แก่ แบคทีเรียสังเคราะห์แสง และ Cyanobacteria Gaffron และ Rubin (1942) ได้รายงานว่า Scenedesmus สามารถผลิตกาซไฮโดรเจนขณะทำการสังเคราะห์แสงได้ ซึ่งเขาคิดว่าเป็นผลจากขบวนการ Photolysis; Benemann และ Weare (1974) ได้ตรวจสอบความสามารถในการผลิตกาซไฮโดรเจนของ Anabaena cylindrica พบว่า A. cylindrica ผลิต O_2 ได้มากกว่า H_2 หลายเท่า ซึ่งกาซทั้งสองได้จากขบวนการ Photolysis เช่นกัน Weissman และ Benemann (1977) ทดลองผลิตกาซไฮโดรเจนของ A. cylindrica ในแบบการเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการ รายงานว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

A. cylindrica ที่เลี้ยงแบบต่อเนื่อง และอยู่ในสภาพขาดไนโตรเจนสามารถผลิตกาซไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องกันถึง 1 เดือน ต่อมาในปี 1979 Benemann et al. ได้ทดลองกับ Mastigocladus laminosus พบว่าเชื้อ cyanobacteria ดังกล่าวสามารถผลิตกาซไฮโดรเจนได้ประมาณ 10-16.3 มล. ต่อวัน แต่กาซที่เก็บได้มีปริมาณกาซไฮโดรเจนประมาณ 0.16% เท่านั้น

สำหรับการผลิตกาซไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้มีผู้รายงานไว้ดังนี้ Gest และ Kamen (1949) ได้ทดลองเลี้ยง Rhodospirillum rubrum ในอาหารสังเคราะห์ ได้พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตกาซไฮโดรเจนได้ Lindstrom et al. (1951) ได้รายงานว่า Purple nonsulfur bacteria ชนิดอื่น ๆ เช่น Rhodopseudomonas sphaeroides Rp. capsulata และ Rp. gelatinosa ก็สามารถผลิตกาซไฮโดรเจนและตรึงไนโตรเจนได้ Okuda et al. (1960) ได้รายงานว่า Rp. palustris ก็มีคุณสมบัติดังกล่าว นอกจากนี้ Lindstorm et al. (1951) ได้รายงานว่า Purple sulfur bacteria และ Green sulfur bacteria ก็สามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศได้ Hillmer และ Gest (1977) ได้ทดลองเลี้ยง Rp. capsulata ในอาหารสังเคราะห์ที่เติมสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น lactate, pyruvate, glycerol, malate, fumarate, succinate อย่างละสองชนิดลงไป เขาได้รายงานว่า ถ้าเติม fumarate และ pyruvate จะใช้ปริมาณกาซไฮโดรเจนมากที่สุด โดยผลิตได้ 120 มล./ชม./กรัม (น้ำหนักแห้งของเซลล์) และเมื่อทำการวัดการผลิตกาซไฮโดรเจนของเชื้อ Rp. capsulata นี้ โดยใช้ Syringe technique เขาได้รายงานว่าการใช้ lactate เป็นแหล่งคาร์บอนและ glutamate เป็นแหล่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไนโตรเจน แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะสามารถผลิตกาซไฮโดรเจนได้สูงสุด ซึ่งวัดได้ในอัตรา 130 มล./ชม./กรัม. (น้ำหนักแห้งของเซลล์) แต่ Zurrer และ Bachofen (1979) ได้ทำการผลิตกาซไฮโดรเจนจากเชื้อ Rs. rubrum ที่เจริญในอาหารที่มี lactate ล้วน ๆ และของเหลือทิ้ง (waste) จากโรงงานอุตสาหกรรมที่มี lactate ปนอยู่ มี glutamate เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้พบว่าอัตราการผลิตกาซไฮโดรเจนเป็น 20 มล./ชม./กรัม. (น้ำหนักแห้งของเซลล์) ซึ่งนอกจากจะสามารถผลิตกาซไฮโดรเจนบริสุทธิ์ได้แล้ว แบคทีเรียสังเคราะห์แสงยังช่วยกำจัดของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมได้อีกด้วย เซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถใช้เป็นอาหารโปรตีน ซึ่งมีคุณค่าทางอาหารสูง โดยเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงประกอบด้วย โปรตีน 65% มี essential amino acids และ วิตามินอีกจำนวนมาก จากการคำนวณเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เลี้ยงในอาหาร 40 ลิตร สามารถผลิตกาซไฮโดรเจนได้ 25 ลิตร และได้เซลล์แบคทีเรีย คิดเป็นน้ำหนักแห้งได้ 4.5 กรัม Kim et al. (1980) พบว่าการใช้กรดอินทรีย์หลายชนิดเป็น substrate นั้น lactate เป็น substrate ในการผลิตกาซไฮโดรเจนที่ดีที่สุด ซึ่งจะมีอัตราการผลิตกาซไฮโดรเจนได้ 40-50 มล./ชม./กรัม. (น้ำหนักแห้งของเซลล์) แต่ถ้าต้องการผลิตกาซไฮโดรเจนแบบต่อเนื่อง ซึ่งใช้เวลานาน glutamate จะเป็น substrate ที่ดีที่สุด

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกาซไฮโดรเจน

2.3.1 อุณหภูมิและสภาพที่เลี้ยงเชื้อ

Benemann et al. (1979) ได้รายงานว่า อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญและการผลิตกาซไฮโดรเจนของ M. laminosus นอกจากนี้ การผลิตกาซไฮโดรเจนจาก cyanobacteria ในปริมาณมาก ๆ จะกระทำได้เฉพาะเลี้ยงเชื้อในสภาพไร้ออกซิเจนเท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งตรงกับรายงาน Zürrer และ Bachofen (1979) ที่ทำการทดลองในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง Rs. rubrum

2.3.2 ความเข้มของแสง

Hillmer และ Gest (1977) ได้ทดสอบความเข้มของแสงที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกาซไฮโดรเจนของ Rp. capsulata ความเข้มของแสงที่พอเหมาะกับอัตราการเจริญเป็น 6,500 ลักซ์ และความเข้มของแสงที่เปลี่ยนแปลงจะมีผลต่อปริมาณการผลิตกาซไฮโดรเจน ถ้าความเข้มของแสงมากขึ้นอัตราการผลิตกาซไฮโดรเจนก็เพิ่มขึ้น ถ้าความเข้มของแสงลดลงอัตราการผลิตกาซไฮโดรเจนจะลดลงด้วย Benemann et al. (1979 b) ได้รายงานผลของความเข้มของแสงต่อการผลิตกาซไฮโดรเจนของ M. laminosus ไว้ว่า ถ้าความเข้มของแสงลดลงเป็น 1 ใน 3 ของความเข้มเดิม อัตราการผลิตกาซไฮโดรเจนก็จะลดลงไปจากอัตราเริ่มแรก นอกจากนี้ Zürrer และ Bachofen (1979) ได้ทำการวัดการผลิตกาซไฮโดรเจนของ Rs. rubrum ได้พบว่า อัตราการผลิตกาซไฮโดรเจนจะเพิ่มขึ้น ถ้าความเข้มของแสงเพิ่มขึ้น ส่วน Kim et al. (1980) พบว่า การผลิตกาซไฮโดรเจนของ Rp. palustris ขึ้นอยู่กับแสงสว่าง ถ้าปิดแสงการผลิตกาซไฮโดรเจนจะหยุดชงักและจะเพิ่มอัตราการผลิตกาซไฮโดรเจนอีกหลังจากให้แสงสว่างต่อไป 4 ชม.

2.3.3 อาหารที่เลี้ยงเชื้อ

Gest และ Kamen (1949) ได้พบว่า เมื่อเลี้ยง Rs. rubrum ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น malate, fumarate, pyruvate, glutamate, และ aspartate Rs. rubrum จะผลิตกาซไฮโดรเจนออกมาในปริมาณมาก ในปีเดียวกันนี้ Gest และ Kamen ได้รายงานว่า การผลิตกาซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งโดย NH_4^+

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ผงสกัดจากยีสต์และ peptone ที่มีปริมาณความเข้มข้นมาก Bregoff และ Kamen (1952) ได้รายงานเพิ่มเติมอีกว่า การผลิตกาซไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะถูกยับยั้ง ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีกรดอมิโน เช่น alanine และ serine ซึ่งเมื่อใช้ในขบวนการเมตาโบลิซึม แล้วจะให้ NH_4^+ ออกมา Schick (1971) พบว่า NH_4^+ จะยับยั้งการทำงานของ nitrogenase Hillmer และ Gest (1977) การที่ NH_4^+ ยับยั้งการตรึงไนโตรเจนและการผลิตกาซไฮโดรเจนนั้นเป็นการที่เซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะนำ ATP และ reducing power ที่ได้จากการสังเคราะห์แสงไปใช้ในการสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อการเจริญเพื่อให้การเจริญเป็นไปอย่างรวดเร็ว ซึ่ง Kim et al. (1980) รายงานว่า NH_4^+ จะยับยั้งการผลิตกาซไฮโดรเจนของ Rp. palustris ได้เช่นเดียวกัน

2.3.4 Gas phase

Ormerod et al. (1962) รายรายงานว่า การพ่นอากาศลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทำในการผลิตกาซไฮโดรเจนจะทำให้ปริมาณการผลิตกาซไฮโดรเจนลดลง เขาให้ความเห็นว่า เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกาซไฮโดรเจนนั้นไวต่อกาซออกซิเจน แต่ Bonemann et al. (1979) ได้รายงานว่ากาซออกซิเจนมีผลต่อ nitrogenase ใน M. laminosus จะไม่มีผลต่อการผลิตกาซไฮโดรเจนของเชื้อดังกล่าว นอกจากนี้ N_2 ก็มีผลต่อการผลิตกาซไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง โดย N_2 จะทำให้การผลิตกาซไฮโดรเจนหยุดชงัก (Gest และ Kamen, 1949; Benemann et al. 1974; Weissman et al. 1977)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. วิธีการศึกษาการผลิตกาซไฮโดรเจนในห้องปฏิบัติการ

Ormerod et al. (1961) ได้ทดสอบการผลิตกาซไฮโดรเจนของเชื้อ Rs. rubrum โดยใช้ mineral salt medium แล้วเติมกรดอินทรีย์ลงไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตกาซไฮโดรเจน การทดสอบกระทำในสภาพไร้ออกซิเจนและมีแสงสว่าง เขาได้รายงานว่า Rs. rubrum สามารถใช้กรดอินทรีย์หลายชนิดเป็นวัตถุดิบในการผลิตกาซไฮโดรเจน Hillmer และ Gest (1977) ได้ทดสอบการผลิตกาซไฮโดรเจนของ Rp. capsulata โดยใช้ Basal medium ซึ่งเติม 30 มิลลิโมลา Dl-lactate และ 7 มิลลิโมลา L-glutamate เลี้ยงเชื้อตั้งต้นในหลอดทดสอบที่มีความจุ 17 มล. ทำสภาพไร้ออกซิเจนโดยปิดจุกยางที่ปลายหลอดทดสอบและนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ ให้แสงสว่างประมาณ 6,500 ลักซ์ ทำการถ่ายเชื้อใส่อาหารใหม่ทุกวัน เป็นเวลาอย่างน้อย 10 รุ่น จากนั้น จึงนำเชื้อที่ได้มาทำการทดสอบการผลิตกาซไฮโดรเจนโดยใช้วิธี Syringe technique ซึ่งเขาได้ตัดปลายก้านสูบด้านที่มีมือจับทิ้ง แล้วนำด้านตัดกลับเข้าใส่ในกระบอกสูบ จากนั้น สวมเข็มฉีดยาเข้ากับหลอดฉีดยาผ่านกาซอาร์กอนลงในเชื้อเริ่มต้น ใช้หลอดฉีดยาดูดเชื้อที่เลี้ยงไว้จนเต็มประมาณ 60 มล. ไล่อากาศออกจนหมด ใช้จุกยางกดเข้ากับปลายเข็มฉีดยาจนแน่น แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 °ซ แสงสว่าง 10,000 ลักซ์ เมื่อมีการเกิดขึ้นจะดันก้านสูบขึ้น ทำให้ทราบปริมาณของกาซที่เกิดขึ้น Benemann et al. (1979) ได้ทดสอบการผลิตกาซไฮโดรเจนของ M. laminosus โดยใช้อาหาร Allen and Arnon medium เลี้ยงเชื้อในภาชนะเลี้ยงเชื้อ ภายใต้สภาพมีออกซิเจน ให้แสงสว่างประมาณ 3.0 10^4 เออร์ก/ตร.ซม./วินาที. จนกระทั่งเชื้อมีความหนาแน่น 0.2 มก./มล. จากนั้น เริ่มลดปริมาณกาซไนโตรเจน โดยดูดอากาศออกแล้วและพ่นกาซซึ่งมีส่วนผสมไนโตรเจน 0.2% คาร์บอนไดออกไซด์ 0.6% ที่เหลือเป็นอาร์กอนพ่นลงไปในอัตราส่วนประมาณ 3 ลิตรต่อชั่วโมง การวัดปริมาณไนโตรเจน, ไฮโดรเจน และ ออกซิเจน ใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Aerograph gas chromatograph model A-90-P3 Zürrer และ Bachofen (1979) ได้ทดสอบการผลิตกาซไฮโดรเจนของ Rs. rubrum โดยเลี้ยงด้วยเชื้อตั้งต้นด้วย mineral salt medium ซึ่งเติม L-glutamate 25 มิลลิโมลา และ calcium lactate 50 มิลลิโมลา pH 6.8 นอกจากนี้เขาได้ทดสอบของเหลือทิ้ง ซึ่งได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติคพวก Streptococcus faecalis, ของเหลือทิ้งจากการทำ Yogurt และ Whey ของเหลือทิ้งแต่ละชนิดใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกาซไฮโดรเจน โดยเติมของเหลือทิ้งเหล่านี้ลงไปในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Ormerod บรรจุอาหารที่จะทดสอบลงในถังหมักในสภาพไร้ออกซิเจน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ ภายใต้แสงสว่างจากหลอดทังสเตน 100 วัตต์ ความเข้มของแสง 20 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร เสียบเข็มฉีดยาซึ่งมีท่อนำกาซต่ออยู่ให้ทะลุจุกยางด้านบนถังหมักเก็บกาซไฮโดเรจนที่เกิดขึ้น จากการทดลองนี้เขาได้รายงานว่า ปริมาณกาซไฮโดรเจนที่ผลิตจาก Rs. rubrum เมื่อเปรียบเทียบกับ Anabaena จะพบว่า กาซไฮโดรเจนที่ผลิตจาก Rs. rubrum มีปริมาณมากกว่าหลายเท่า และนอกจากนี้การผลิตกาซไฮโดรเจนจาก Cyanobacteria ยังมีปัญหาด้านเทคนิคคือ ต้องฉีดกาซเฉื่อยเช่น กาซอาร์กอนลงในเชื้อที่เลี้ยงไว้ ดังนั้น การผลิตกาซไฮโดรเจนในปริมาณมาก ๆ ควรผลิตจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เพราะเทคนิคในการผลิตง่ายกว่า Kim et al. (1980) ได้ทดสอบการผลิตกาซไฮโดรเจนจาก Rp. palustris โดยใช้ Basal medium ซึ่งเติม DL-malate 30 มิลลิโมลา และ L-glutamate 5 มิลลิโมลา เริ่มเลี้ยงเซลล์ Rp. palustris ใน minimal malate medium ภายใต้สภาพไร้ออกซิเจนและมีแสงสว่างเมื่อครบ 17 ชม. แล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอน นำมาล้างด้วย basal medium 2 ครั้ง จากนั้น เตรียมเครื่องมือวัดการผลิตกาซไฮโดรเจน โดยใช้ขวดขนาด 150 มล. เป็นภาชนะเลี้ยงเชื้อ เติม minimal-malate medium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลงไป 140 มล. เติม glutamate 5 มิลลิโมลา ปิดผิวหน้าอาหารด้วย พาราฟินเหลว ปิดปากขวดด้วยจุกยาง ซึ่งมีเข็มฉีดยาแทงทะลุลงไป เพื่อเป็นทางออกของกาซที่เกิดขึ้น นำขวดไปใส่ใน water bath อุณหภูมิ 30°ซ ซึ่งมีด้านข้างเป็นแก้ว ให้แสงสว่างด้วยหลอด incandescent ความเข้มของแสงประมาณ 10,000 ลักซ์ นำเซลล์ที่ทำให้ตกตะกอนแล้ว ทำให้เป็น suspension ใหม่ด้วย minimal-malate medium วัด O.D.ให้ได้ 0.7 ดูดเซลล์ที่ละลายแล้ว 5 มล. ฉีดลงไปในขวดที่เตรียมไว้ นำมาอัดกาซอาร์กอนเข้าไปให้เต็มฉีดลงไปในขวด แล้วดูดอากาศในขวดออก พ่นอาร์กอนและดูดออก 5 ครั้ง เชื้อที่เลี้ยงไว้จะอยู่ภายใต้สภาพบรรยากาศของกาซอาร์กอน วัดปริมาณกาซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องกาซโครมาโตกราฟ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved