รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของรูปทรงวัสดุตรึงต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

The effect of immobilization matrix shape on hydrogen production of green alga *Tetraspora* sp. CU2551

นายเชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2561
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ผลของรูปทรงวัสดุตรึงต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 แหล่งเงิน ทุนอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ 2561 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2560 ถึง 30 กันยายน 2561
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ สังกัด สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ได้ถูกศึกษามาก่อนว่ามีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่สูง อย่างไรก็ตาม การผลิตก๊าซยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้โดยอาศัยเทคนิคการตรึงเซลล์ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเลือกวัสดุตรึงเซลล์สาหร่าย เพื่อการผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้น วัสดุตรึงที่เลือกมี 4 ชนิด ได้แก่ อัลจิเนต อะการ์ ไคโตซาน และเจลาติน โดยนำวัสดุตรึงมาขึ้นรูปทรงกลม รูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์ม จากการทำการทดลองพบว่า วัสดุตรึงอัลจิเนตสามารถขึ้นรูปได้ทั้งสามแบบ ในขณะที่วัสดุตรึงอะการ์สามารถขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์มได้ ส่วนวัสดุตรึงไคโตซานสามารถขึ้นรูปได้เฉพาะทรงกลม อย่างไรก็ตาม วัสดุตรึงเจลาตินไม่สามารถขึ้นรูปได้เลย ผลการผลิตไฮโดรเจนพบว่า วัสดุตรึงอัลจิเนตขึ้นรูปทรงกลม รูปทรงสี่เหลี่ยม และแผ่นฟิล์ม จะผลิตไฮโดรเจนได้ 1.96, 0.86 และ 1.02 μmol H_2/mg DW/hr ตามลำดับ ส่วนวัสดุตรึงอะการ์ขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์ม จะผลิตไฮโดรเจนได้ 1.21 และ 1.27 μmol H_2/mg DW/hr ตามลำดับ สำหรับวัสดุตรึง ไคโตซานนั้นไม่พบการผลิตไฮโดรเจน จากนั้นได้ทดสอบการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 4, 8, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เซลล์จะผลิตไฮโดรเจนได้อย่างต่อเนื่องภายใน 36 ชั่วโมง และยังพบว่าการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตรูปทรงกลมจะเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าระบบเซลล์อิสระเป็น 2 เท่า การศึกษาครั้งนี้ได้เปิดโอกาสที่จะเพิ่มผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับสเกลที่ใหญ่ขึ้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: The effect of immobilization matrix shape on hydrogen production of green alga *Tetraspora* sp. CU2551

Researcher: Asst.Prof.Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj **Faculty:** Science **Department:** Biology

ABSTRACT

The green alga *Tetraspora* sp. CU2551 was previously identified as the hydrogen-producing organism. However, the immobilization technique could be applied to enhance the capability in gas production. This study aims to select the immobilization materials that suitable for *Tetraspora* sp. immobilization. The four materials chosen were alginate, agar, chitosan and gelatin modeling in 3 shapes: sphere, block and thin film. The results showed that alginate could be molded into those types whereas agar could be molded into block and thin film. While chitosan could be molded into only sphere, gelatin could not be successfully molded. The production results revealed that alginate in sphere, block and thin film showed the production rate of 1.96, 0.86 and 1.02 μmol H_2/mg DW/hr, respectively. For the agar matrix, the block and thin film showed the rate of 1.21 and 1.27 μmol H_2/mg DW/hr, respectively, whereas chitosan showed no production. The time-course analysis over the period of 4, 8, 12, 24, 36 and 48 hr showed the continuous production over 36 hr. Moreover, the alginate bead showed above 2 times increased in hydrogen production rate when compared to that in free-cell system. This study enables the opportunities for the up-scale production.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภท เงินอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

นายเชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... ง

สารบัญ ..... จ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ฌ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขต 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 การผลิตไฮโดรเจน 4

2.1.1 การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ 4

2.1.2 การสังเคราะห์ด้วยแสง 4

2.2 สาหร่าย 5

2.2.1 สาหร่ายสีเขียว 6

2.3 เทคโนโลยีและกระบวนการตรึง 7

2.3.1 ประวัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง 7

2.3.2 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ 8

2.3.3 วิธีการตรึงเซลล์ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 11

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 15

3.1 สาหร่ายสีเขียว 15

3.2 สารเคมี 15

3.3 อุปกรณ์ 15

3.4 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 และวิธีการวัดปริมาณเซลล์ 16

3.5 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน (ระบบเซลล์อิสระ) 16

3.5.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ 16

3.5.2 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ 17

3.6 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอัลจิเนต เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน 17

3.6.1 ขั้นตอนการตรึงเซลล์ 17

3.7 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอะการ์ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน 20

3.7.1 ขั้นตอนการตรึงเซลล์ 20

3.8 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในไคโตซาน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน 21

3.8.1 ขั้นตอนการตรึงเซลล์ 21

3.9 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในเจลาติน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน 23

3.9.1 ขั้นตอนการตรึงเซลล์ 23

3.10 วิธีการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 26

4.1 ผลการสรุปความสามารถของการขึ้นรูปทรงในวัสดุตรึง 26

4.2 ผลของการผลิตไฮโดรเจนของวัสดุตรึงอัลจิเนต 27

4.3 ผลของการผลิตไฮโดรเจนของวัสดุตรึงอะการ์ 28

4.4 ผลของการผลิตไฮโดรเจนของวัสดุตรึงไคโตซาน 29

4.5 ผลของการผลิตไฮโดรเจนของวัสดุตรึงเจลาติน 29

4.6 ผลของการเปรียบเทียบปริมาณไฮโดรเจนในวัสดุตรึง 29

4.7 ผลการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับระบบเซลล์อิสระ 30

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 32

5.1 สรุปผลการวิจัย 32

5.1.1 ผลของการเปรียบเทียบปริมาณไฮโดรเจนในวัสดุตรึง 32

5.1.2 ผลการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับระบบเซลล์อิสระ 32

5.2 ข้อเสนอแนะ 33

เอกสารอ้างอิง 34

ภาคผนวก 36

ภาคผนวก ก 37

ภาคผนวก ข 38

ภาคผนวก ค 41

ภาคผนวก ง 42

ประวัตินักวิจัย 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ 25

ตารางที่ 4.1 ความสามารถของการขึ้นรูปทรงในแต่ละวัสดุตรึง..... 26

ตารางที่ ก.1 อัตราส่วนในเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (อาหาร TAP)..... 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 2.1 แหล่งพลังงานไฮโดรเจน 3

รูปที่ 2.2 การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ 4

รูปที่ 2.3 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงและทางอ้อม 5

รูปที่ 2.4 สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* 6

รูปที่ 2.5 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* 7

รูปที่ 2.6 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) 9

รูปที่ 2.7 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ 11

รูปที่ 3.1 การขึ้นรูปทรงกลมของอัลจิเนต 18

รูปที่ 3.2 การขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมของอัลจิเนต 19

รูปที่ 3.3 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มของอัลจิเนต 19

รูปที่ 3.4 การขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมของอะการ์ 20

รูปที่ 3.5 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มของอะการ์ 21

รูปที่ 3.6 การขึ้นรูปทรงกลมของไคโตซาน 22

รูปที่ 3.7 การขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมของเจลาติน 24

รูปที่ 3.8 การขึ้นแผ่นฟิล์มของเจลาติน 24

รูปที่ 4.1 ผลผลิตไฮโดรเจนของอัลจิเนตในแต่ละรูปทรง 27

รูปที่ 4.2 ผลผลิตไฮโดรเจนของอะการ์ในแต่ละรูปทรง 28

รูปที่ 4.3 การเปรียบเทียบผลผลิตไฮโดรเจนระหว่างอัลจิเนตและอะการ์ 30

รูปที่ 4.4 ผลการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับระบบเซลล์อิสระ 31

รูปที่ ค.1 โครมาโทรแกรมของ peak standard และ peak hydrogen 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ค.2 แสดงค่า peak area ของ peak standard และ peak hydrogen..... 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พลังงานเป็นปัจจัยพื้นฐานที่ใช้ในการดำรงชีวิตของมนุษย์ ในปัจจุบันมีจำนวนประชากรเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้พลังงานลดน้อยลง พลังงานสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ พลังงานสิ้นเปลือง และพลังงานทดแทน ซึ่งในอนาคตพลังงานสิ้นเปลืองอาจจะมีไม่เพียงพอต่อความต้องการของมนุษย์ เนื่องจากพลังงานเหล่านี้มีอยู่อย่างจำกัด จึงมีการหันมาใช้พลังงานทดแทน ได้แก่ พลังงานธรรมชาติ (แสงอาทิตย์ ลม) พลังงานชีวมวล และพลังงานไฮโดรเจน

ไฮโดรเจน (Hydrogen, H_2) ถือได้ว่าเป็นพลังงานสะอาดสามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ เมื่อใช้กับเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) จะไม่ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ออกมาสู่บรรยากาศ จึงไม่ก่อให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก (Greenhouse effect) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของสภาวะโลกร้อน

ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้สิ่งมีชีวิต ได้แก่ แบคทีเรีย (Bacteria) และสาหร่ายสีเขียว (Green algae) ซึ่งสาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและมีความว่องไวต่อการสังเคราะห์แสง เมื่อแสงไปกระตุ้นโมเลกุลของน้ำทำให้แตกตัวออกเป็นไฮโดรเจนไอออน (H^+) ก๊าซออกซิเจน (O_2) และอิเล็กตรอน (Electron, e^-) จากนั้นเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) จะรวมไฮโดรเจนไอออนและอิเล็กตรอนได้เป็นก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ซึ่งถือว่าเป็นการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงต่างจากแบคทีเรีย จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า สาหร่ายสีเขียวที่พบในประเทศไทยที่ชื่อว่า *Tetraspora* sp. CU2551 เป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจต่อการนำมาศึกษาการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากมีลำดับดีเอ็นเอของยีนส์ที่มีความใกล้เคียงกับสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* (Maneeruttanarungroj, 2010) อย่างไรก็ตาม การผลิตไฮโดรเจนด้วยระบบเซลล์อิสระนั้นอาจจะมีก๊าซออกซิเจนออกมาจากการแตกตัวของน้ำเป็นจำนวนมาก ซึ่งจะทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจน จึงทำการศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมโดยวิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว ซึ่งเป็นการทำให้เซลล์อยู่กับที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้จะช่วยให้แสงสามารถส่องผ่านเซลล์ได้อย่างทั่วถึงและเป็นการป้องกันไม่ให้ก๊าซออกซิเจน (O_2) เข้าถึงภายในเซลล์ ซึ่งก๊าซออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้กระบวนการผลิตไฮโดรเจนทำงานได้ช้าลง (Kosourov and Seibert, 2008) ดังนั้นการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวจึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการศึกษาการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนจากวัสดุตรึง 4 ชนิด ได้แก่ อัลจิเนต อะการ์ ไคโตซาน และเจลาติน โดยทำการขึ้นรูปทรงของวัสดุตรึงแต่ละชนิด ดังนี้ รูปทรงกลม รูปทรงสี่เหลี่ยม และแผ่นฟิล์ม อีกทั้งยังมีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องโดยวิธีการตรึงเซลล์เทียบกับระบบเซลล์อิสระ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบชนิดของวัสดุตรึงที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551
2. เพื่อเปรียบเทียบรูปทรงของการตรึงที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551
3. เพื่อเปรียบเทียบผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากระบบเซลล์ตรึงและจากระบบเซลล์อิสระ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เพื่อทำการวัดก๊าซไฮโดรเจน
2. ขึ้นรูปทรงของวัสดุตรึงแต่ละชนิด ดังนี้ รูปทรงกลม รูปทรงสี่เหลี่ยม และแผ่นฟิล์ม
3. ทำการตรึงสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในวัสดุตรึงทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ อัลจิเนต อะการ์ ไคโตซาน และเจลาติน
4. วัดไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ในรูปแบบต่างๆ
5. ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องโดยวิธีการตรึงเซลล์เทียบกับระบบเซลล์อิสระ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551
2. องค์ความรู้พื้นฐานเพื่อการต่อยอดในการเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจน

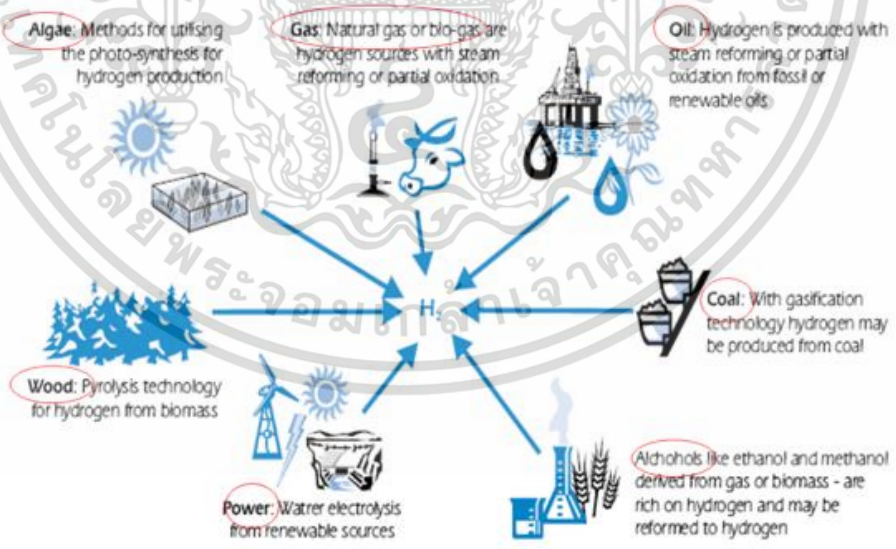
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พลังงานไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นองค์ประกอบของน้ำ (H_2O) ที่มีมากที่สุดบนโลก นอกจากนี้ยังเป็นธาตุที่รวมอยู่ในโมเลกุลของสารประกอบอื่นๆ เช่น สารประกอบจำพวกไฮโดรคาร์บอน (HC) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปิโตรเลียมที่มีความสำคัญสำหรับการพัฒนาทางเศรษฐกิจของประเทศ คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน คือไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย มีความสะอาดสูง ไม่เป็นพิษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ประโยชน์ของการนำก๊าซไฮโดรเจนมาใช้งานคือใช้เป็นเชื้อเพลิงในการเผาไหม้และให้ความร้อนออกมา หรือใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงโดยปฏิกิริยาทางเคมีแล้วเกิดกระแสไฟฟ้าซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ทั้งในการขับเคลื่อนรถ ผลิตกระแสไฟฟ้า อุปกรณ์อิเล็คทรอนิคส์ขนาดเล็กและอื่นๆ

ปัจจุบันการผลิตไฮโดรเจนเมื่อพิจารณาจากวัตถุดิบเป็นหลักแบ่งออกเป็น 3 แหล่งหลัก คือ จากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น แก๊สธรรมชาติ ถ่านหิน น้ำมันปิโตรเลียม จากแหล่งพลังงานหมุนเวียน เช่น ชีวมวล และน้ำ ฯลฯ และจากพลังงานนิวเคลียร์ (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 แหล่งพลังงานไฮโดรเจน

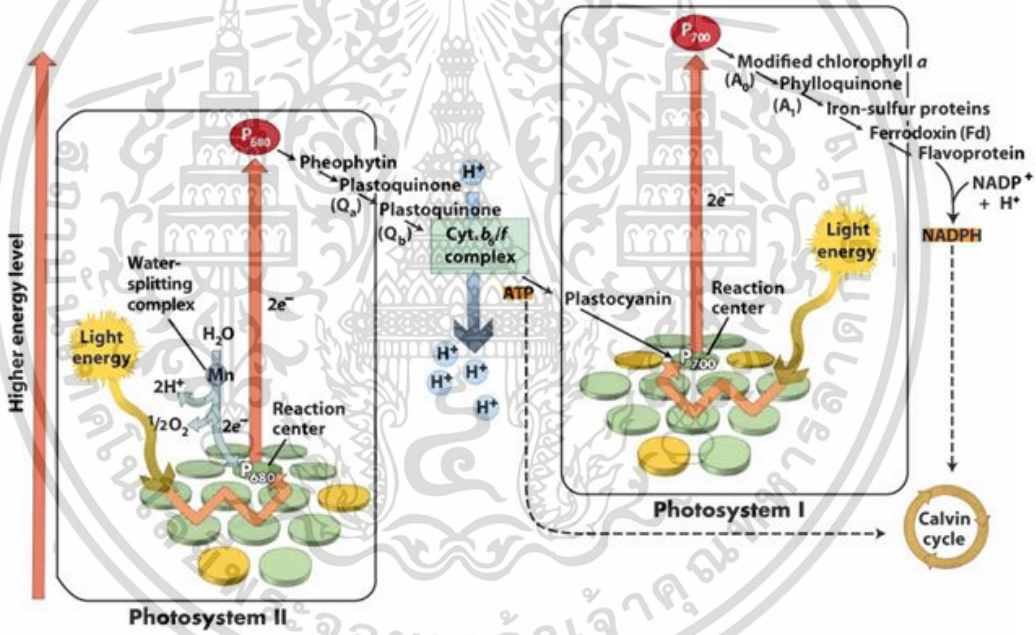
(ที่มา : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 การผลิตไฮโดรเจน

2.1.1 การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ (Biohydrogen Production)

การผลิตแก๊สไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูงด้วยกระบวนการทางชีวภาพผ่านสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลินทรีย์ (microorganism) สารตั้งต้นหลักของกระบวนการ ได้แก่ น้ำ ของเสียอินทรีย์ (Organic Waste) หรือชีวมวล จุลินทรีย์ที่มีการใช้งานในกระบวนการ ได้แก่ สาหร่าย (Algae) แบคทีเรีย (Bacteria) หรืออาร์เคีย (Archaea) โดยอาจต้องใช้เอนไซม์ (Enzyme) หรือสารประกอบจำพวกโปรตีนช่วยเร่งปฏิกิริยา จำแนกการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ 2 แบบ ได้แก่ การจำแนกตามการใช้แสงภายในกระบวนการ คือ กลุ่มที่ใช้และไม่ใช้แสงภายในกระบวนการและการจำแนกตามลักษณะของกระบวนการ การผลิตไฮโดรเจนทางตรงและทางอ้อม ปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีหลักที่ใช้ผลิตไฮโดรเจนชีวภาพเชิงพาณิชย์ เนื่องจากข้อจำกัดด้านความรู้ความเข้าใจ และประสิทธิภาพของกระบวนการต่ำ (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

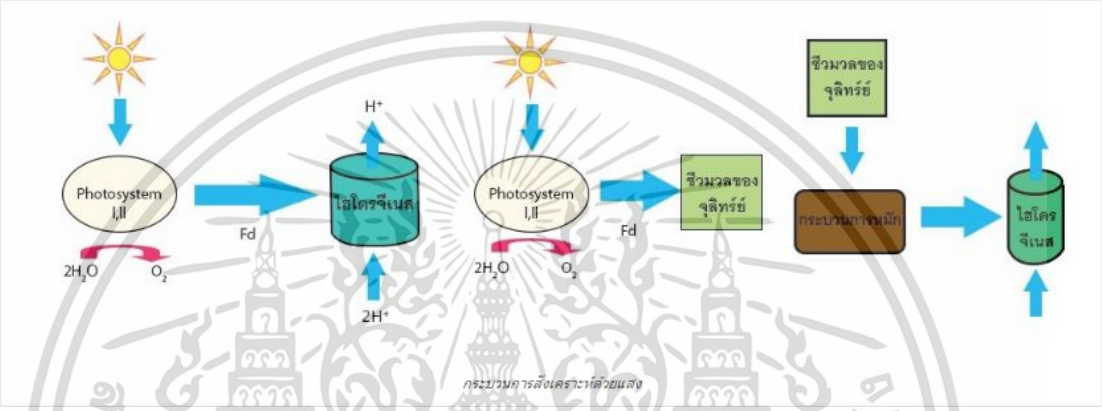
(ที่มา : http://incolors.club/collectionpdwn-photosystem-1.htm)

2.1.2 การสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthesis)

กระบวนการทางชีวเคมีที่สิ่งมีชีวิตสีเขียวเปลี่ยนรูปพลังงานแสงไปเป็นพลังงานเคมี โดยแสงถูกดูดจับไว้และทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาระหว่างน้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ ได้คาร์โบไฮเดรต การสังเคราะห์ ด้วยแสงเพื่อผลิตไฮโดรเจนจำแนกได้เป็น 2 วิธีการ ได้แก่ การแยกสลายด้วยแสงทางตรง และการแยกสลายด้วยแสงทางอ้อม (รูปที่ 2.3) การแยกสลายด้วยแสงทางตรงพบมากในสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สีเขียว (Green Algae) ที่แสงกระตุ้นโมเลกุลของน้ำให้แยกออกเป็นไฮโดรเจนไอออน (H^+) แก๊สออกซิเจน (O_2) และอิเล็กตรอน (Electron, e^-) จากนั้น เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) จะรวมไฮโดรเจนไอออนและอิเล็กตรอนได้แก๊สไฮโดรเจน ส่วนการแยกสลายด้วยแสงทางอ้อมพบมากในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue Green Algae) หรือไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) ที่ใช้ปฏิกิริยาสังเคราะห์ด้วยแสงร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อผลิตคาร์โบไฮเดรตซึ่งจะถูกนำไปผลิตแก๊สไฮโดรเจนต่อไป ข้อจำกัดหลักของการผลิตไฮโดรเจนผ่านการสังเคราะห์ด้วยแสงในการใช้งานเชิงอุตสาหกรรมคือค่าใช้จ่ายในการผลิตสูง



รูปที่ 2.3 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงและทางอ้อม (ที่มา: Hallenbeck and Benemann, 2002)

2.2 สาหร่าย (Algae)

สาหร่ายเป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีคลอโรฟิลล์เอ (Chlorophyll A) ไว้สำหรับใช้ในการสังเคราะห์แสง มีหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยา (Morphology) สูง ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ มีขนาดตั้งแต่เล็กมากจนมองไม่เห็นด้วยตาเปล่าไปจนถึงมีขนาดใหญ่ ไม่มีราก และใบที่แท้จริง ส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายพืช (อาภารัตน์, 2553)

สาหร่ายเป็นพืชชั้นต่ำที่มีคลอโรฟิลล์แต่ไม่มีส่วนที่เป็นราก ลำต้น และใบที่แท้จริง มีตั้งแต่ขนาดเล็กมากประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียวซึ่งมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า ต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ไปจนถึงขนาดใหญ่ประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก อาจเป็นเส้นสาย (filament) หรือมีลักษณะคล้ายพืชชั้นสูงโดยมีส่วนที่คล้ายราก ลำต้น และใบ รวมเรียกว่า ทัลลัส (thallus) อย่างไรก็ตาม สาหร่ายก็สามารถเจริญเติบโตได้ในลักษณะเดียวกับพืช เนื่องจากมีเม็ดคลอโรฟิลล์ซึ่งทำให้สามารถสังเคราะห์แสงได้ และจะเจริญเติบโตได้ดีในสถานที่ที่มีแสงแดดจัด ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำสูง แร่ธาตุอาหารพอเพียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

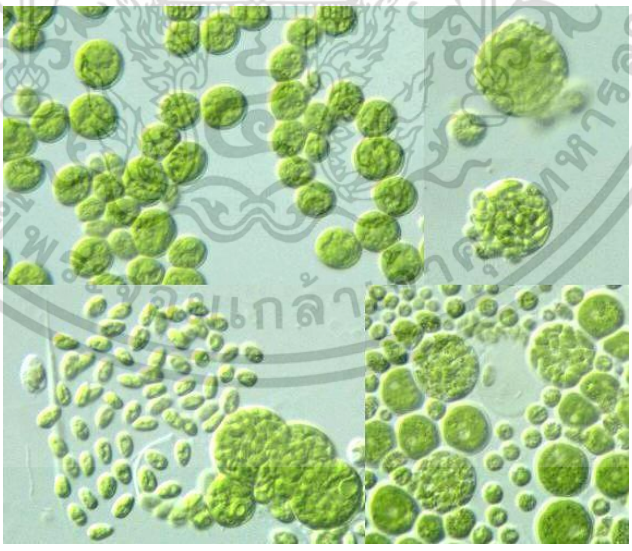
ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสูงมากเมื่อเทียบกับพืชทั่วไป ด้วยเหตุนี้จึงทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว
(ที่มา: ส่วนวิจัยเกษตรกรรม ฝ่ายวิชาการ กสิกรไทย**)**

2.2.1 สาหร่ายสีเขียว (green algae) ปริมาณสาหร่ายสีเขียวมีมากพอๆ กับสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว เจริญเติบโตได้ดีทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม แต่จะไม่มีความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ผิดปกติได้เช่นสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว รูปร่างและขนาดของสีเขียวต่างกันตามชนิด บางชนิดที่ขึ้นในน้ำทะเลและมีสารพวกหินปูนมาเกาะ ทำให้มีลักษณะเป็นแผ่นแข็งสีขาว บางชนิดมีลักษณะเป็นเส้นเกาะลอยเป็นแพตามบ่อหรือตามชายฝั่งที่มีน้ำใส ซึ่งชนิดนี้ชาวบ้านแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่าเทา สามารถนำมาประกอบอาหารบริโภคได้ สาหร่ายสีเขียวน้ำจืดที่รู้จักกันดีอีกอย่างหนึ่ง คือ สาหร่ายไฟ พบมากตามท้องนาที่มีน้ำขัง อย่างไรก็ตามในต่างประเทศสาหร่ายสีเขียวที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางมีอยู่ 2 สายพันธุ์ คือ

1. *Chlorella* ได้แก่ C. *pyrenoidosa*, C. *ellipsoidea* และ C. *sorok-niana* ซึ่งประเทศที่กำลังทำการค้นคว้าวิจัยถึงประโยชน์ คือ สหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น (รูปที่ 2.4)

2. *Scenedesmus* ได้แก่ S. *acutus* กำลังอยู่ในระหว่างการค้นคว้าทดลองในประเทศเยอรมันตะวันตก อินเดีย เปรู และไทย และ S. *obliqus* ก็กำลังอยู่ในระหว่างความสนใจค้นคว้าทดลองของนักวิทยาศาสตร์ในประเทศเชโกสโลวะเกีย

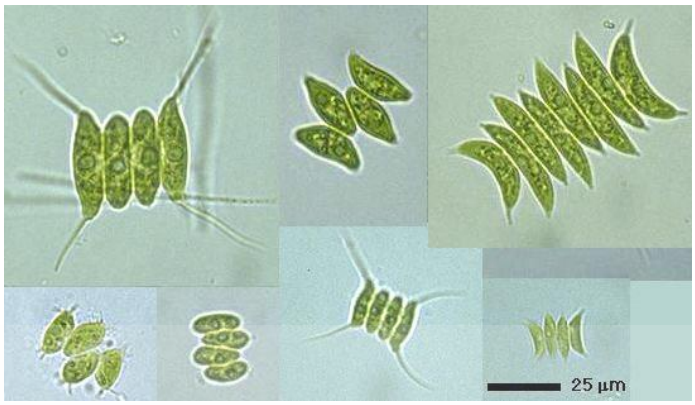
(ที่มา: ส่วนวิจัยเกษตรกรรม ฝ่ายวิชาการ กสิกรไทย**)**



รูปที่ 2.4 สาหร่ายสีเขียว *Chlorella*

(ที่มา: http://www.thaigoodview.com/node/85974**)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*
(ที่มา : http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Protista/ChlorophytaE.html)

2.3 เทคโนโลยีและกระบวนการตรึง

2.3.1 ประวัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

การใช้จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงเริ่มมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1823 Schuetzenbach ได้ทำการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็วโดยใช้ฟิล์มจุลินทรีย์ที่ติดบนเศษไม้ หลังจากนั้นมาไม่มีผู้สนใจจนกระทั่งเริ่มมีการพัฒนาเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์เพื่อเป็นตัวเร่งในอุตสาหกรรม และมีการศึกษาเกี่ยวกับการตรึงเอ็นไซม์เพื่อใช้ได้นานและสะดวกยิ่งขึ้นและทำให้เหมาะสมกับการนำไปใช้เป็นตัวเร่งในอุตสาหกรรมมากขึ้น

ในปี ค.ศ.1953 Nelson และ Griffin ได้ใช้ active carbon และ alumina ดูดซับเอนไซม์ไว้แล้วนำมาใช้ปรากฏว่าเอนไซม์ยังคงทำงานได้บ้างต่อมาในปี ค.ศ.1921 Hitchcock ได้รับรายงานผลการทดลองในทำนองเดียวกัน หลังจากนั้นในปี ค.ศ.1951 Campbell และคณะได้นำแอนติเจนไปตรึงไว้บนเซลลูโลสโดยวิธี covalent binding แล้วใช้แยกแอนติบอดี้ออกมาได้สำเร็จทำให้มีผู้สนใจจำนวนมากต่อมาไม่นานก็มีการนำเทคนิคอิมมูโนโลยีมาใช้กับเอนไซม์

ในปี ค.ศ.1953 Grubhofer และ Schlerth นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันตะวันตกได้ตรึงเอนไซม์อะไมเลส, เปปซิน, ไรโบนิวคลิเอส และคาร์บอซีเปปไทเดสไว้บนตัวนำ (carrier) ด้วยวิธี diazo coupling ปรากฏว่าเอนไซม์เหล่านี้ยังคงทำงานได้บ้าง หลังจากนั้นจงมีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ถูกตรึงอย่างขว้างขวาง และมีการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆมากขึ้น

ในปี ค.ศ.1960 Hattori และ Furusaka ได้ตรึงเซลล์ที่มีชีวิตของ *Escherichia coli* และ *Azotobacter agile* โดยยึดไว้บนโดเว็กซ์-1 พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงสามารถออกซิไดส์กลูโคสและ กรดซัคซินิกได้ ต่อมาในปี ค.ศ.1966 Mosbach ได้ตรึงเซลล์ *Umbilicarriapustulata* ด้วยโพลีอะคริราไมด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(polyacrylamide) พบว่าความสามารถของเอนไซม์ orsellenic aciddecarboxylase ยังคงมีอยู่ในระหว่างการทดลองเป็นเวลานาน 3 เดือน หลังจากนั้นก็มีรายงานเกี่ยวกับเซลล์ที่ถูกตรึงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งในปีค.ศ.1973 Chibata ได้ประสบความสำเร็จในการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแอล-แอสพาร์ติก ซึ่งนับว่าเป็นอุตสาหกรรมแห่งแรกของโลกที่ใช้ระบบเซลล์ถูกตรึง

ในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงในการผลิตสารชนิดต่างๆกันอย่างขว้างขวางและที่ประสบความสำเร็จในระดับอุตสาหกรรมแล้ว เช่น การผลิตกรดแอล-แอสพาร์ติก กรดแอล-มาลิกและฟรุกโตสเป็นต้น

2.3.2 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ (Immobilization)

เป็นการนำเซลล์มายึดติดกับวัสดุใดๆ เพื่อเพิ่มความทนทานของเซลล์ในการใช้งาน อีกทั้งสามารถนำกลับมาใช้งานใหม่ได้เหมือนกับเซลล์ที่กระบวนการผลิตยุ่งยากและมีราคาแพง ช่วยให้สามารถลดต้นทุนการผลิตของกระบวนการใดๆก็ตามที่ต้องอาศัยการทำงานของเซลล์ที่มีราคาแพงได้ นอกจากนี้แล้วผลผลิตที่ได้ยังมีการปนเปื้อนน้อยลงเนื่องจากไม่มีโปรตีนของเซลล์ละลายอยู่ในสารละลายนั้นด้วย ทำให้กระบวนการผลิตแยกผลผลิตหรือ product recovery ทำได้ง่ายขึ้น การใช้ immobilization system ยังสามารถควบคุมกระบวนการได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถเพิ่มหรือลดอัตราเร็วของการผลิต หรือการดำเนินกระบวนการได้ง่าย หรือแม้การหยุดกระบวนการก็ทำได้ง่าย โดยแยกเอาเซลล์ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกได้ทันที ยิ่งไปกว่านั้นการใช้ immobilization system ยังช่วยทำให้การทำปฏิกิริยาต่อเนื่องหลายๆขั้นตอน (multiple reactions) ทำได้ง่ายๆ โดยการปล่อยให้สารละลายผ่านเข้าสู่ระบบของ immobilization cells ต่างๆ ไปทีละขั้นตอนได้ (ศศิธร และเบญจมาภรณ์, 2550)

2.3.3 วิธีการตรึงเซลล์

วิธีการตรึงเซลล์แบ่งได้เป็น 3 วิธีใหญ่ๆ คือ การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking method) และการห่อหุ้ม (entrapping method)

1. การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) หมายถึง การเชื่อมจุลินทรีย์โดยตรงกับตัวนำที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble carrier) ซึ่งอาจแบ่งย่อยได้เป็น 2 วิธี คือ Adsorption และ covalent binding method

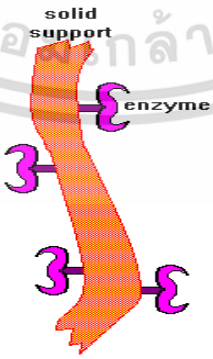
1.1 Adsorption method เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยใช้เซลล์ดูดซับอยู่กับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไอออนิค พันธะไฮโดรโฟบิค หรือพันธะไฮโดรเจน โดยอาศัยหลักธรรมชาติทางเคมีเนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียหรือยีสต์ประกอบด้วย diaminopimelic acid และ hexosamines ซึ่งสามารถเกิด ionic interaction กับตัวนำที่ใช้ได้โดยแรงดูดซับนี้จะขึ้นอยู่กับขนาดละอายุของเซลล์รวมทั้งปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องด้วยการตรึงเซลล์ วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายแต่ดูดซับค่อนข้างอ่อนและมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่ายเมื่อมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปลี่ยนแปลง pH, ionic strength, การไหลของน้ำ, การเกิดฟองอากาศ และเมื่อมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะกับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการผลผลิตที่ปราศจากการปนเปื้อนของเซลล์แต่ก็อาจปรับปรุงแรงดูดซับให้สูงขึ้นโดยทำ cross-linking หลักการดูดซับและในทางปฏิบัติอาจนำข้อเสียนี้มาใช้ประโยชน์โดย desorption เซลล์ที่หมดความสามารถออกไป แล้วดูดซับเซลล์ใหม่เข้ามาแทนที่ นอกจากนี้การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ยังมีข้อเสียอีกประการหนึ่งคืออัตราการดูดซับเซลล์ต่อหน่วยของตัวนำค่อนข้างต่ำแต่ก็อาจแก้ไขโดยการใช้สารที่มีรูพรุนเป็นตัวดูดซับ ตัวอย่างสารที่ใช้เป็นตัวดูดซับด้วยวิธีนี้ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ (อนุพันธ์ของเซลลูโลส, เด็กซ์เตรนและอะกาโรส) โปรตีน (เจลาตินและอัลบูมิน) โพลิเมอร์สังเคราะห์ (โพลีไวนิลคลอไรด์ และ ion-exchange resin) เช่น DEAE-sephadex, DEAE cellulose และสารอนินทรีย์ (อิฐ ทราย และ porous glass) เป็นต้น

1.2 Covalent Binding Method เป็นวิธีที่นิยมในการตรึงเอนไซม์เนื่องจากได้ผลดีแต่ไม่นิยมในการตรึงเซลล์ เนื่องจากจำเป็นต้องใช้สารเคมีซึ่งมักเป็นพิษต่อเซลล์จึงอาจทำให้เซลล์ตายและเอนไซม์ถูกทำลายได้การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นการเชื่อมเซลล์โดยตรงกับ activated support โดยสารที่ใช้เป็นตัวยึดจับนั้นสามารถเชื่อมกับหมู่อะตอมซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ผิวเซลล์ เช่น หมู่อะมิโน

หมู่คาร์บอกซิล หมู่ซัลฟาไฮดริล หมู่อิมมิดาโซล หรือหมู่ฟีนอลของโปรตีน วิธีนี้มีข้อดีคือเซลล์เชื่อมอยู่กับผิวหน้าของตัวนำอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดี และมีการรั่วไหลของเซลล์ได้น้อยแต่มีข้อเสียคือการตรึงด้วยวิธีนี้ค่อนข้างรุนแรงเนื่องจากสร้างพันธะโควาเลนท์ตามปกติจำเป็นต้องใช้สารตัวนำที่มีการดัดแปลงโดยใช้สารเคมี ซึ่งมักจะมีความเป็นพิษ และอาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการเอนไซม์เพียงชนิดเดียวและเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ซึ่งไม่ต้องสัมผัสกับสารเคมีที่ใช้ในระหว่างการเตรียมสารที่ใช้เป็นตัวยึดเซลล์ด้วยวิธีนี้ เช่น activated porous silica bead, borosilicate glass, zirconia ceramic, agarose bead และสารเคมีที่ต้องใช้ในการทำพันธะโควาเลนท์ เช่น carbodiimide, aminopropyltriethoxysilane และglutaraldehyde



รูปที่ 2.6 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method)

(ที่มา: http://leavingbio.net/enzymes.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเชื่อมแบบไขว้ (Cross - linking method) หมายถึงการเชื่อมจุลินทรีย์เข้าด้วยกันโดยใช้สารพวก Bi หรือ multifunctional reagent เช่น glutaradehyde และtoluene diisocyanate เป็นต้น การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ต่างจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีอื่นๆ คือ เซลล์ไม่ได้ถูกตรึงอยู่กับสารที่เป็นตัวดูดซับหรือห่อหุ้มอยู่ในเจลหรือใน Semi-permeable membrane แต่เป็นการเชื่อมเข้าด้วยกันโดยใช้สารเคมีภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างรุนแรงทำให้เซลล์ตายได้ ดังนั้นการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับกรณีที่ต้องการใช้ปฏิกิริยาเชิงเดี่ยว (single reaction) เท่านั้น

3. การห่อหุ้ม (Entrapping method) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีด้วยวิธีนี้แบ่งได้เป็น 2 แบบ

3.1 Semi-permeable membrane เช่น คอลโดเดียน (collodian) หรือซิลิโคน (silicone) ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้ แต่ยอมให้สับสเตรทหรือผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่ไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ในอุตสาหกรรม และอาจมีปัญหาของการตกตะกอนของเซลล์ที่เกิดขึ้นด้วย ดังนั้นการนำไปใช้ประโยชน์จึงมีจำกัด นิยมใช้ในด้านยาและการวิเคราะห์เท่านั้น

3.2 Lattices Type หมายถึง การตรึงเซลล์ด้วยการห่อหุ้มเซลล์ไว้ภายในช่องสามมิติในเจลสารพวกโพลิเมอร์ การตรึงด้วยวิธีการห่อหุ้มโดยทั่วไปจะหมายถึงแบบ lattices Type ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและประสบความสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากใช้ได้กับเซลล์ทุกชนิดในขณะที่วิธีอื่นมีข้อเสียมากกว่า สารที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการห่อหุ้มได้แก่ สารพวก Biochemical inert hydrogel โดยใช้หลักการเกิดเจล ซึ่งทำให้เกิดโครงร่างสามมิติที่มีลักษณะเป็นรูพรุนและกลไกในการเกิดเจลมีหลายแบบ คือ

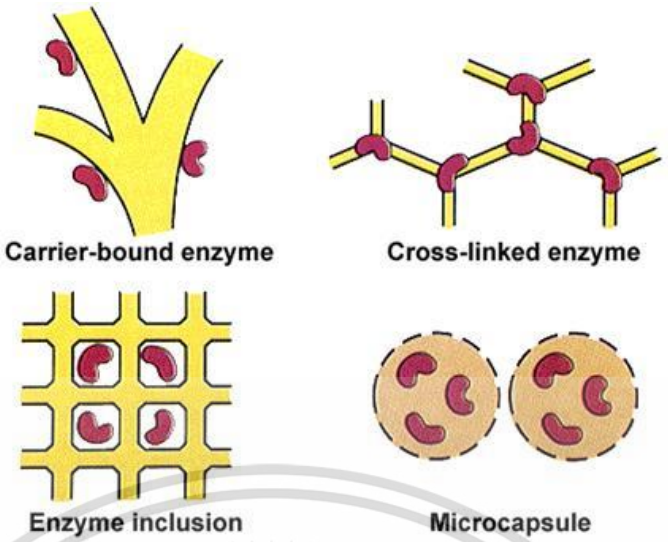
Covalent Binding เช่น การโพลิเมอรไรซ์ของโพลีอะคริราไมด์

Ionic Forces เช่น แคลเซียมอัลจิเนต (Calcium alginate)

Precipitation โดย pH อุณหภูมิ หรือโดยการเปลี่ยนแปลงตัวทำละลาย (solvent change) เช่น คอลลาเจน (collagen) คาร์ราจีแนน (carragenan) และโพลีสไตรีน (polystyrene)

(ที่มา: http://www.sc.chula.ac.th/clubs/FoodClub/Page_16.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ

(ที่มา : http://enzymetechnology.blogspot.com/2009/10/enzyme-technology.html)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.4.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

Maneeruttanarungroj (2010) ค้นพบบ่อน้ำจืดในจังหวัดปทุมธานีของประเทศไทยพบสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ใหม่จัดอยู่ในตระกูล *Tetraspora* และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้ความเข้มของแสง 48-92 μE/m^2/s และ อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.75-9.30 แต่เมื่อค่า pH อยู่ที่ 5.25 พบว่าเริ่มไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น นอกจากนี้ถ้าเพิ่ม β-mercaptoethanol 0.5 mM ในอาหาร TAP จะมีกระตุ้นให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มเป็นสองเท่า ถ้าใช้อาหาร TAP ที่ปราศจากไนโตรเจนและซัลเฟอร์ มีผลทำให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 50% ในทางตรงกันข้ามกันการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในอาหาร TAP+β-mercaptoethanol 0.5 mM แต่ปราศจากไนโตรเจนและซัลเฟอร์เซลล์เติบโตที่ความเข้มแสงต่ำกว่า 5 uE/m^2/s ซึ่งจะไม่มีผลเมื่อความเข้มแสงสูงขึ้น จากการคำนวณการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 17.3-61.7 μmol/mg Chl a/h เป็นอัตราการผลิตสูงมากเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ ดังนั้น *Tetraspora* sp. CU2551 จึงเป็นสาหร่ายที่น่าสนใจในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนแบบใช้แสง

Antal และคณะ (2014) ค้นพบว่าสาหร่ายสี*เขียว Chlamydomonas reinhardtii* จะสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในอัตราที่สูงในสภาวะการบ่มที่ไร้ออกซิเจนและถูกตรึงโดยใช้อัลจิเนตแบบฟิล์ม จากนั้นเลี้ยงสาหร่ายที่ผ่านการตรึงนี้โดยใช้อาหาร TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส โดยศึกษากลไกพื้นฐานของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการตรึงแบบใช้ระบบแสง (PSII) งานวิจัยนี้สรุปได้ว่า การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับระบบแสง แต่ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ถูกตรึงและสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์

2.4.2 การตรึงสาหร่ายสีเขียวและ cyanobacteria เพื่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

Laurinavichene และคณะ (2006) เป็นการตรึงสาหร่ายเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากซัลเฟอร์ โดยจะทำการเลี้ยงเชื้อจากอาหารเหลวและความเข้มแสงที่มีความเหมาะสม โดยสรุปคือ (1) อาหารเลี้ยงเชื้อมีความจำเป็นต่อการตรึงเซลล์สาหร่ายโดยที่ต้องผสมอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นเนื้อเดียวกันกับสาหร่ายและวัสดุตรึง เพื่อที่สาหร่ายจะได้สามารถนำอาหารนั้นไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตและกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (2) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์มีความสำคัญต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการตรึงเซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* (3) ความเข้มแสงที่สูงเกินไปจะทำให้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนลดลง ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนโดยรวมที่ผลิตได้อยู่ที่ 380 mL ใน 23 วัน และอัตราการผลิตสูงสุดใน 1 วัน คือ 45 mL และการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยการตรึงเซลล์นั้นสามารถอยู่ได้ไม่เกิน 4 สัปดาห์ ซึ่งแสงมีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนถ้าในสภาวะไร้แสง 50 นาที จะทำให้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชะลอตัวลงและความเข้มข้นที่ผลิตออกมานั้นก็จะลดลงตามไปด้วย แต่แสงก็จะไปกระตุ้นอิเล็กตรอน (Electrons) ด้วยโฟตอน (Photons) ทำให้โมเลกุลของน้ำแตกตัวได้เป็นก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซออกซิเจน ดังนั้นเมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้นก็จะทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซออกซิเจนมากขึ้นด้วย เมื่อก๊าซออกซิเจนมากขึ้นก็ทำให้กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลง ดังนั้นจึงทำการพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไปลดความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนและเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจน

Anjana (2014) ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจาก cyanobacteria ในเซลล์อิสระและในเซลล์ที่ถูกตรึงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนโดยบ่มในที่มีแสงสว่าง 21 ชั่วโมง และที่มืด 3 ชั่วโมง ทำการตรึงโดยใช้อะการ์และอัลจิเนต โดยอะการ์ขึ้นรูปเป็นทรงสี่เหลี่ยมลูกเต๋าและอัลจิเนตขึ้นรูปเป็นเม็ดบีดส์ ซึ่งจะเปรียบเทียบก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ในเซลล์ที่ตรึงด้วยอะการ์ (สี่เหลี่ยมลูกเต๋า), อัลจิเนต (เม็ดบีดส์) และเซลล์อิสระความหนาแน่นของเซลล์และขนาดของเซลล์เป็นตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ในงานวิจัยนี้ได้เลือกการตรึงที่มีขนาดของเม็ดบีดส์และสี่เหลี่ยมลูกเต๋าเท่ากับ 0.5, 1.0 และ 2.0 mm ผลสรุปได้ว่ามีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุดที่ขนาด 1.0 mm ทั้งอะการ์และอัลจิเนตและอัลจิเนตมีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าอะการ์

Kosourov และ Seibert (2008) ได้มีการพัฒนาโดยใช้เทคนิคใหม่ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สาหร่ายสีเขียวนำมาขึ้นรูปอัลจิเนตแบบฟิล์ม โดยใช้สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ cc 124 ผลของการตรึงเซลล์แสดงให้เห็นดังนี้ (1) เซลล์มีความหนาแน่นสูงถึง 2,000 μg Chl $mL^{-1}$of matrix (2) การเกิดไฮโดรเจนจะอยู่ในสภาวะขาดซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส (3) อัตราการเกิดไฮโดรเจนเพิ่มสูงถึง 12.5 μmol mg^{-1}Chl h^{-1} (4) การเปลี่ยนแปลงของแสงมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน และ (5) ออกซิเจนในบรรยากาศเป็นตัวยับยั้งทำให้การทำงานของกระบวนการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนทำงานได้ช้าลงโดยที่เซลล์สาหร่ายถูกตรึงด้วยอัลจิเนต จากนั้นนำใส่ในขวดไวแอลจะพบว่ามีออกซิเจนประมาณ21% อยู่ภายในพื้นที่ส่วนบนของขวดไวแอลและจะค่อยๆกลายเป็นไฮโดรเจนสูงถึง 67% ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เมื่อมีการพ่นอาร์กอนเข้าไปในขวดไวแอลที่บรรจุเซลล์อยู่ สรุปได้ว่ากระบวนการผลิตไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นช้าลงเมื่อมีออกซิเจนมาเจือปน และยังขึ้นอยู่กับ 2 ปัจจัยดังนี้ (1) อาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และ (2) อัลจิเนตสามารถแยกเซลล์ออกจากออกซิเจนในของเหลวและอากาศส่วนบนภายในขวดไวแอล อีกทั้งยังป้องกันไม่ให้ออกซิเจนแพร่เข้าไปภายในเซลล์ด้วยจะเห็นว่ากลยุทธ์ในการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตจะทำให้กระบวนการผลิตไฮโดรเจนมีศักยภาพเพิ่มมากขึ้นและยังใช้เป็นการประยุกต์ในอนาคตต่อไป

2.4.3 การตรึงด้วยไคโตซาน

วราภรณ์ และคณะ (2550) ไคโตซานเจลในรูปเม็ดบีดส์ถูกเตรียมจากไคโตซานชนิดเกล็ดและชนิดผงที่มีขนาด 60 mesh ด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางและวิธีการเชื่อมขวาง การเตรียมเม็ดบีดส์ด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางจากไคโตซานชนิดเกล็ดจะได้เม็ดบีดส์ที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมและมีความยืดหยุ่น ส่วนเม็ดบีดส์ที่เตรียมด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางจากไคโตซานชนิดผงจะมีลักษณะแบนและเปราะบาง สำหรับการเตรียมด้วยวิธีการเชื่อมขวาง พบว่าอัตราส่วนของสารเชื่อมขวาง glyoxal hydrate ต่อ tetrasodium pyrophosphate ที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อลักษณะของเม็ดบีดส์ที่เตรียมจากไคโตซานชนิดเกล็ด แต่จะไม่มีผลต่อเม็ดบีดส์ที่เตรียมจากไคโตซานชนิดผง อย่างไรก็ตาม เม็ดบีดส์ที่เตรียมโดยวิธีการเชื่อมขวางจากไคโตซานทั้ง 2 ชนิดจะเปราะบางและไม่มีความยืดหยุ่น ดังนั้น ไคโตซานเจลในรูปของเม็ดบีดส์ที่เตรียมด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางจากไคโตซานชนิดเกล็ดจึงเหมาะสำหรับใช้เป็นตัวพยุงในการตรึงรูปเอนไซม์อัลคาเลส โดยเอนไซม์อัลคาเลสที่ตรึงรูปด้วยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์จะมีกิจกรรมสูงกว่าเอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพโดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงรูปด้วยพันธะโคเวเลนต์คือ 3 ชั่วโมง

สุนทรี และพัฒน (2556) การศึกษาการตรึงเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* แห้ง โดยใช้เทคนิค Hybrid Immobilization ทดสอบหาสัดส่วนที่เหมาะสมของสารที่ใช้ในการตรึงเซลล์สาหร่ายความเข้มข้นร้อยละ 1 ซึ่งได้แก่ โซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 1.5 และ 2.0 สารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1.0 และ 2.0 โดยใช้สารละลาย $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 โมลาร์ ในการขึ้นรูปเม็ดบีดส์ทำการคัดเลือกเม็ดบีดส์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสม คือ มีลักษณะเป็นเม็ดกลมและสามารถคงสภาพอยู่ในน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนสีรีแอคทีฟบลู 171 ที่ระดับความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/ ลิตร ภายใน 24 ชั่วโมง โดยไม่แสดงถึงการบวมน้ำและนำเม็ดบีดส์ที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการดูดซับสีย้อม โดยใช้เม็ดบีดส์ปริมาณ 5 กรัม ต่อน้ำเสียสังเคราะห์ปนเปื้อนสีรีแอคทีฟบลู 171 30 มิลลิลิตร สามารถดูดซับสีในช่วงระยะสัมผัส 8 ชั่วโมง จากการแปรค่าอัตราส่วนวัสดุตรึงเซลล์สามารถผลิตเม็ดบีดส์ที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมได้ทั้งหมดจำนวน 27 แบบ โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 3.5 - 4.8 มิลลิเมตร โดยเม็ดบีดส์ที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมได้จากวัสดุตรึงเซลล์สารละลายโซเดียมอัลจิเนต: สารละลายไคโตแซน: $CaCl_2$ ที่อัตราส่วนร้อยละ 1.5: 1.0: 0.3 โมลาร์ และเม็ดบีดส์แบบที่คัดเลือกมีความสามารถในการดูดซับสีรีแอคทีฟบลู 171 ได้ร้อยละ 78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่ายสีเขียว

Tetraspora sp. CU2551

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

1. อาหาร TAP (Tris Acetate Phosphate medium) เหลว (ภาคผนวก ข)

3.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจน

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

3.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับกระบวนการตรึงเซลล์

1. อัลจิเนต ชนิด Analytical reagent grade
2. อะการ์ (Agar agar Bacto for Becteriology) จาก s d fine-chem limited ชนิด Industrial grade
3. เจลาติน (Gelatine power Bacto bloom 240) จาก s d fine-chem limited ชนิด Industrial grade
4. ไคโตซาน (Chitosan low molecular weight) จาก ALDRICH Chemistry ชนิด Analytical reagent grade
5. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) จาก CARLO ERBA REAGENTS ชนิด Analytical reagent grade
6. แอมพิซิลิน (AMPICILLIN SODIUM SALT) จาก VWR ชนิด Analytical reagent grade
7. โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 (Potassium phosphate buffer pH 7.2) (ภาคผนวก ค)
8. กรดอะซิติก (acetic acid) ชนิด Analytical reagent grade
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ชนิด Analytical reagent grade

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)

3.3.2 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Balance)

3.3.4 เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง (Balance)

3.3.5 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)

3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.3.7 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.3.8 เครื่องวิเคราะห์องค์ประกอบของสาร (Gas Chromatrograph)

3.3.9 ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet)

3.3.10 หลอดฉีดยา (Syringe)

3.3.11 เข็มฉีดยา ยี่ห้อ Needle nippro No.18 ขนาด 1.2 x 25 มิลลิเมตร

3.3.12 ถาดสี่เหลี่ยม

3.3.13 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.14 ตาข่าย

3.3.15 สติกเกอร์ใส

3.3.16 กรรไกร

3.3.17 มีด

3.3.18 เขียง

3.4 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 และวิธีการวัดปริมาณเซลล์

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เพื่อทำเป็น starter เริ่มจากการเตรียมอาหาร TAP แล้วนำอาหาร TAP ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นใส่สาหร่ายประมาณ 1 loop และปิดจุก นำฟลาสก์ที่มีสาหร่ายและอาหารไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 5 วัน ต่อมานำสารละลายใส่หลอดเซ็นติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำหลอดที่ปั่นเหวี่ยงแล้วเทส่วนที่ใสทิ้ง 45 มิลลิลิตร และเก็บส่วนที่เหลือไว้ นำเซลล์จากส่วนที่เหลือไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยมีปริมาณน้ำ 990 ไมโครลิตร และเซลล์ 10 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโต-มิเตอร์ เพื่อบันทึกค่าความขุ่นสำหรับการใช้งานต่อไป

3.5 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน (ระบบเซลล์อิสระ)

3.5.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ (starter) มาใส่อาหาร TAP ปริมาตร 600 มิลลิลิตร โดยคำนวณให้มีปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.01 ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันแบ่งใส่ฟลาสก์ 12 ฟลาสก์ ฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมานำสารละลายใส่หลอดเซ็นติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำหลอดที่ปั่นเหวี่ยงแล้วเทส่วนที่ใสทิ้ง 45 มิลลิลิตร และเก็บส่วนที่เหลือไว้นำเซลล์จากส่วนที่เหลือไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยมีปริมาณน้ำ 990 ไมโครลิตร และเซลล์ 10 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.5.2 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์

นำเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากข้อ 3.5.1 มาใส่ลงในอาหาร TAP ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยแต่ละขวดไวแอลจะมีเซลล์แห้งเท่ากับ 1 มิลลิกรัม การหาปริมาณเซลล์แห้งจะใช้สมการ $y = 1.791521x$ (เชิดศักดิ์, 2554) โดยที่ y คือ ค่าการดูดกลืนแสง และ x คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

3.6 วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอัลจิเนตเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน

3.6.1 ขั้นตอนการตรึงเซลล์

3.6.1.1 ขั้นตอนการเตรียมแคลเซียมคลอไรด์

เตรียมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.6.1.2 ขั้นตอนการเตรียมวัสดุตรึง

ในการตรึงเซลล์ใช้อัลจิเนตที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยเริ่มต้นจากการเตรียม อัลจิเนตความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งอัลจิเนต 12 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 240 มิลลิลิตร จากนั้นทำการอุ่นเพื่อให้อัลจิเนตละลายจนหมดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป (การเติมน้ำสาหร่ายจะทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของอัลจิเนตเป็น 4 เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.1.3 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์

นำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้มาใส่อาหาร TAP จนปริมาตรถึง 60 มิลลิลิตร ผสมกับอัลจิเนตที่เตรียมไว้จนเป็นเนื้อเดียวกันให้มีสัดส่วน 1:4 ตามลำดับ โดยคำนวณให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 16.749 มิลลิกรัม หลังจากนั้นแบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนละ 100 มิลลิลิตร

3.6.1.4 ขั้นตอนการหยดเจล (รูปทรงกลม)

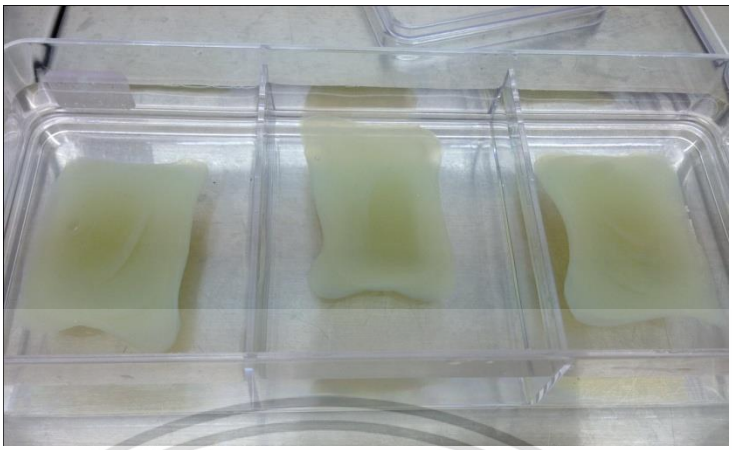
ดูดเจลที่ผสมไว้ในส่วนที่ 1 ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 25 มิลลิลิตร หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 18 ซึ่งหนึ่งหยดเจลเท่ากับ 1 เม็ดเจลของเซลล์ที่ถูกตรึง แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปล้างด้วยอาหาร TAP อีกครั้ง หลังจากนั้นทำการคัดแยกขนาดโดยใช้ตะแกรงคัดขนาดในช่วง 2.80-3.35 มิลลิเมตร และชั่งเม็ดเจลหนัก 14.30 กรัม (เพื่อให้มีปริมาณเซลล์แห้ง 1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดไวแอลที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.1)

รูปที่ 3.1 การขึ้นรูปทรงกลมของอัลจิเนต

3.6.1.5 ขั้นตอนการเทเจล (รูปทรงสี่เหลี่ยม)

ในการเทเจลต้องการให้มีขนาดของทรงสี่เหลี่ยมเท่ากับ 3.1x3.1x3.1 มิลลิเมตร ดูดเจลที่ผสมไว้ในส่วนที่ 2 ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 25 มิลลิลิตร ลงไปในถาดสี่เหลี่ยม (โดยคำนวณปริมาตรได้จากพื้นที่ของถาดสี่เหลี่ยมเพื่อที่จะให้ได้ความสูงที่ต้องการ) แล้วเทสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ตามลงไป ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการตัดด้วยมีดและนำไปล้างด้วยอาหาร TAP อีกครั้ง แล้วชั่งเซลล์หนัก 13.68 กรัม (เพื่อให้มีปริมาณเซลล์แห้ง 1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดไวแอลที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 การขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมของอัลจิเนต

3.6.1.6 ขั้นตอนการเตรียมแผ่นฟิล์ม

นำตาข่ายมาติดกับสติกเกอร์ใสแล้วตัดให้เป็นขนาดสี่เหลี่ยมตามที่ต้องการ เพื่อนำไปใช้ในการเทเจลขั้นตอนต่อไป

3.6.1.7 ขั้นตอนการเทเจล (แผ่นฟิล์ม)

ดูดเจลที่ผสมไว้ในส่วนที่ 3 ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 25 มิลลิลิตร ลงในแผ่นฟิล์มที่เตรียมไว้ แล้วใช้มีดเกลี่ยให้พอดีกับแผ่นฟิล์ม จากนั้นสเปรย์สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ลงบนแผ่นฟิล์ม ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตัดด้วยกรรไกรและนำไปล้างด้วยอาหาร TAP อีกครั้ง แล้วชั่งเซลล์หนัก 9.89 กรัม (เพื่อให้มีปริมาณเซลล์แห้ง 1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดไวแอลที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 35 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.3)

รูปที่ 3.3 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มของอัลจิเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอะการ์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน

3.7.1 ขั้นตอนการตรึงเซลล์

3.7.1.1 ขั้นตอนขั้นตอนการเตรียมวัสดุตรึง

ในการตรึงเซลล์ใช้อะการ์ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเริ่มต้นจากการเตรียม อะการ์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งอะการ์ 3.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 160 มิลลิลิตร จากนั้นทำการอุ่นเพื่อให้อะการ์ละลายจนหมดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การเติมน้ำสาหร่ายจะทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของอะการ์เป็น 1 เปอร์เซ็นต์)

3.7.1.2 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์

นำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้มาใส่อาหาร TAP จนปริมาตรถึง 40 มิลลิลิตร ผสมกับอะการ์ที่เตรียมไว้จนเป็นเนื้อเดียวกันให้มีสัดส่วน 1:4 ตามลำดับ โดยคำนวณให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 11.166 มิลลิกรัม หลังจากนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 100 มิลลิลิตร

3.7.1.3 ขั้นตอนการเทเจล (รูปทรงสี่เหลี่ยม)

ในการเทเจลต้องการให้มีขนาดของทรงสี่เหลี่ยมเท่ากับ 3.1x3.1x3.1 มิลลิเมตร ดูดเจลที่ผสมไว้ในส่วนที่ 1 ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 25 มิลลิลิตร ลงไปในถาดสี่เหลี่ยม (โดยคำนวณปริมาตรได้จากพื้นที่ของถาดสี่เหลี่ยมเพื่อที่จะให้ได้ความสูงที่ต้องการ) ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการตัดด้วยมีดและนำไปล้างด้วยอาหาร TAP อีกครั้ง แล้วชั่งน้ำหนัก 10.55 กรัม (เพื่อให้มีปริมาณเซลล์แห้ง 1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดไวแอลที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.4)

รูปที่ 3.4 การขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมของอะการ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.1.4 ขั้นตอนการเทเจล (แผ่นฟิล์ม)

ในการเทเจลต้องการให้มีขนาดของแผ่นฟิล์มเท่ากับ 1.5x1.5x1.5 มิลลิเมตร ดูดเจลที่ผสมไว้ในส่วนที่ 2 ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 25 มิลลิลิตร ลงไปในถาดสี่เหลี่ยม (โดยคำนวณปริมาตรได้จากพื้นที่ของถาดสี่เหลี่ยมเพื่อที่จะให้ได้ความสูงที่ต้องการ) ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการตัดด้วยมีดและนำไปล้างด้วยอาหาร TAP อีกครั้ง แล้วชั่งวุ้นหนัก 14.58 กรัม (เพื่อให้มีปริมาณเซลล์แห้ง 1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดไวแอลที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.5)

รูปที่ 3.5 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มของอะการ์

3.8 วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในไคโตซานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน

3.8.1 ขั้นตอนการตรึงเซลล์

3.8.1.1 ขั้นตอนการเตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์

เตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.8.1.2 ขั้นตอนการเตรียมวัสดุตรึง

ในการตรึงเซลล์ใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยเริ่มต้นจากการเตรียมไคโตซานความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งไคโตซาน 7.2 กรัม ละลายในกรดอะซิติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 240 มิลลิลิตร จากนั้นทำการอุ่นเพื่อให้ไคโตซานละลายจนหมดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

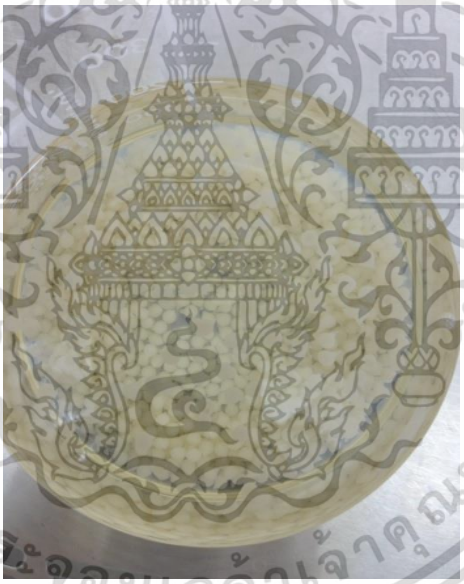
121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การเติมน้ำสาหร่ายจะทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของไคโตซานเป็น 2 เปอร์เซ็นต์)

3.8.1.3 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์

นำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้มาใส่อาหาร TAP จนปริมาตรถึง 60 มิลลิลิตร ผสมกับไคโตซานที่เตรียมไว้จนเป็นเนื้อเดียวกันให้มีสัดส่วน 1:4 ตามลำดับ โดยคำนวณให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 16.749 มิลลิกรัม หลังจากนั้นแบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนละ 100 มิลลิลิตร

3.8.1.4 ขั้นตอนการหยดเจล (รูปทรงกลม)

ดูดเจลที่ผสมไว้ในส่วนที่ 1 ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 25 มิลลิลิตร หยดลงในสาร ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 18 ซึ่งหนึ่งหยดเจลเท่ากับ 1 เม็ด เจลของเซลล์ที่ถูกตรึง แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ pH 7.2 และน้ำกลั่น ตามลำดับ แล้วชั่งเม็ดเจลหนัก 11.88 กรัม (เพื่อให้มีปริมาณเซลล์แห้ง 1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดไวแอลที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.6)



รูปที่ 3.6 การขึ้นรูปทรงกลมของไคโตซาน

3.8.1.5 ขั้นตอนการเทเจล (รูปทรงสี่เหลี่ยม)

ในการเทเจลต้องการให้มีขนาดของทรงสี่เหลี่ยมเท่ากับ 3.1x3.1x3.1 มิลลิเมตร ดูดเจลที่ผสมไว้ในส่วนที่ 2 ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 25 มิลลิลิตร ลงไปในถาดสี่เหลี่ยม (โดยคำนวณปริมาตรได้จากพื้นที่ของถาดสี่เหลี่ยมเพื่อที่จะให้ได้ความสูงที่ต้องการ) แล้วเทสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ตามลงไป ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.8.1.6 ขั้นตอนการเทเจล (แผ่นฟิล์ม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเทเจลต้องการให้มีขนาดของแผ่นฟิล์มเท่ากับ 1.5x1.5x1.5 มิลลิเมตร ดูดเจลที่ผสมไว้ในส่วนที่ 3 ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 25 มิลลิลิตร ลงไปในถาดสี่เหลี่ยม (โดยคำนวณปริมาตรได้จากพื้นที่ของถาดสี่เหลี่ยมเพื่อที่จะให้ได้ความสูงที่ต้องการ) แล้วเทสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ตามลงไป ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.9 วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในเจลาตินเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน

3.9.1 ขั้นตอนการตรึงเซลล์

3.9.1.1 ขั้นตอนการเตรียมวัสดุตรึง

ในการตรึงเซลล์ใช้เจลาตินที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยเริ่มต้นจากการเตรียม เจลาตินความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งเจลาติน 9.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 240 มิลลิลิตร จากนั้นทำการอุ่นเพื่อให้เจลาตินละลายจนหมดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การเติมน้ำสาหร่ายจะทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเจลาตินเป็น 3 เปอร์เซ็นต์)

3.9.1.2 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์

นำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้มาใส่อาหาร TAP จนปริมาตรถึง 60 มิลลิลิตร ผสมกับเจลาตินที่เตรียมไว้จนเป็นเนื้อเดียวกันให้มีสัดส่วน 1:4 ตามลำดับ โดยคำนวณให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 16.749 มิลลิกรัม หลังจากนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 150 มิลลิลิตร

3.9.1.3 ขั้นตอนการเทเจล (รูปทรงสี่เหลี่ยม)

ในการเทเจลต้องการให้มีขนาดของทรงสี่เหลี่ยมเท่ากับ 3.1x3.1x3.1 มิลลิเมตร ดูดเจลที่ผสมไว้ในส่วนที่ 1 ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 25 มิลลิลิตรลงไปในถาดสี่เหลี่ยม (โดยคำนวณปริมาตรได้จากพื้นที่ของถาดสี่เหลี่ยมเพื่อที่จะให้ได้ความสูงที่ต้องการ) จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในกะละมังที่ใส่น้ำแข็งเพื่อช่วยในการแข็งตัว (รูปที่ 3.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.7 การขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมของเจลาติน

3.9.1.4 ขั้นตอนการเทเจล (แผ่นฟิล์ม)

ในการเทเจลต้องการให้มีขนาดของแผ่นฟิล์มเท่ากับ 1.5x1.5x1.5 มิลลิเมตร ดูดเจลที่ผสมไว้ในส่วนที่ 2 ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 25 มิลลิลิตร ลงไปในถาดสี่เหลี่ยม

(โดยคำนวณปริมาตรได้จากพื้นที่ของถาดสี่เหลี่ยมเพื่อที่จะให้ได้ความสูงที่ต้องการ) จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมงในกะละมังที่ใส่น้ำแข็งเพื่อช่วยในการแข็งตัว (รูปที่ 3.8)

รูปที่ 3.8 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มของเจลาติน

3.10 วิธีการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551

นำสาหร่ายจากข้อ 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 ที่ผ่านการพ่นก๊าซอาร์กอน จากนั้นเพาะเลี้ยงไว้ในอาหาร TAP และบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณส่วนบนของขวดไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ (GC) การทดลองนี้จะใช้ก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ในก๊าซอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐาน ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซแสดงในตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Column	Pack column 2 m; Molecular sieve 13x
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Temperature Program	• Injector temperature 100 °C • Column temperature 50 °C • Detector temperatur 120°C
Carrier gas	Argon 99.999% purity (flow rate 70-80 ml/min)
Standard gas	4% H_2 in Argon

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้ต้องการต่อยอดในการผลิตไฮโดรเจน จากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 โดยที่ผลการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *Tetraspora* sp. CU2551 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ (Maneeruttanarungroj, 2010) การศึกษาในครั้งนี้จึงต้องการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นโดยอาศัยเทคนิคการตรึงเซลล์ โดยจะดูชนิดและรูปทรงของวัสดุที่จะสามารถเพิ่มปริมาณไฮโดรเจนได้เป็นหลัก

4.1 ผลการสรุปความสามารถของการขึ้นรูปทรงในวัสดุตรึง

จากการทำการทดลองตรึงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในวัสดุตรึงทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ อัลจิเนต อะการ์ ไคโตซาน และเจลาติน ซึ่งนำมาขึ้นรูปทรงต่างๆ ดังนี้ รูปทรงกลม รูปทรงสี่เหลี่ยม และแผ่นฟิล์ม จากการศึกษาพบว่า อัลจิเนตสามารถขึ้นรูปทรงได้ทั้งหมด 3 รูปแบบ คือ รูปทรงกลม รูปทรงสี่เหลี่ยม และแผ่นฟิล์ม อะการ์สามารถขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์มได้ ไคโตซานสามารถขึ้นรูปได้เฉพาะทรงกลม และเจลาตินไม่สามารถขึ้นรูปทรงลักษณะใดได้เลย ดังสรุปในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ความสามารถของการขึ้นรูปทรงในแต่ละวัสดุตรึง

รูปทรง / วัสดุตรึง	รูปทรงกลม	รูปทรงสี่เหลี่ยม	แผ่นฟิล์ม
อัลจิเนต	√	√	√
อะการ์	×	√	√
ไคโตซาน	√	×	×
เจลาติน	×	×	×

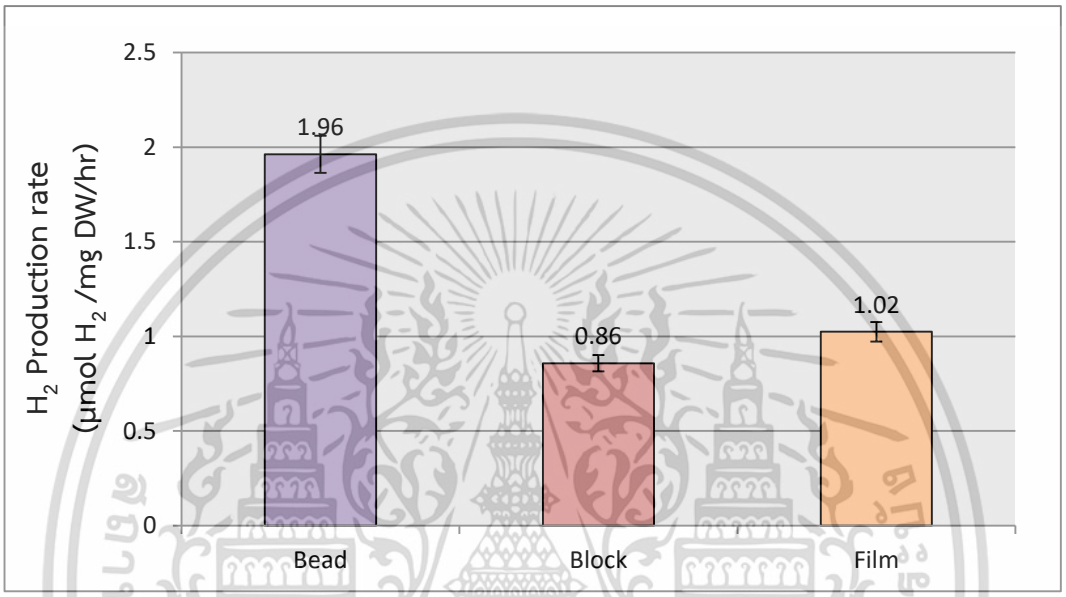
หมายเหตุ √ สามารถขึ้นรูปได้

× ขึ้นรูปไม่สำเร็จ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของการผลิตไฮโดรเจนของวัสดุตรึงอัลจิเนต

จากการทำการทดลองนำสาหร่ายมาผสมในวัสดุตรึงอัลจิเนตและนำไปขึ้นรูปทรงกลม รูปทรงสี่เหลี่ยม และแผ่นฟิล์ม จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะให้ผลผลิตไฮโดรเจนดังรูปที่ 4.1



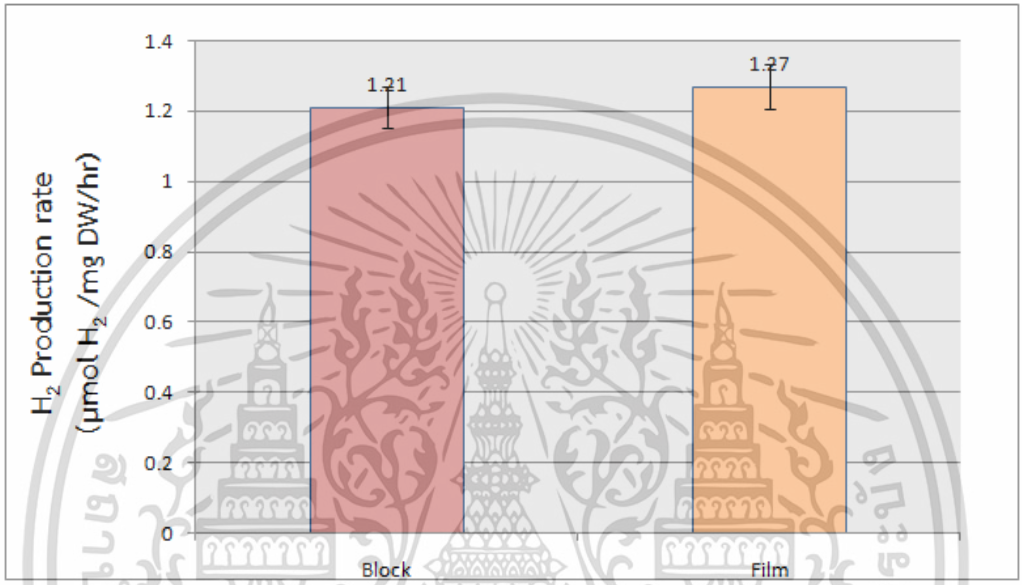
รูปที่ 4.1 ผลผลิตไฮโดรเจนของอัลจิเนตในแต่ละรูปทรง

จากรูปที่ 4.1 ผลผลิตไฮโดรเจนในวัสดุตรึงอัลจิเนตของการขึ้นรูปทรงกลมให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด รองลงมาเป็นแผ่นฟิล์มและรูปทรงสี่เหลี่ยม ตามลำดับ เนื่องจากอัลจิเนตขึ้นรูปทรงกลมมีความคงตัวและขึ้นรูปทรงได้ดีกว่ารูปแบบอื่น และในระหว่างทำการทดลอง การขึ้นรูปทรงกลมมีขั้นตอนไม่ซับซ้อนเท่าการขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์ม จึงทำให้การขึ้นรูปทรงกลมมีผลผลิตที่ดีกว่า ซึ่งจากการวัดค่าไฮโดรเจนนั้นสามารถทำได้จากการใช้เครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ จากนั้นนำค่า peak area มาคำนวณเพื่อหาปริมาณไฮโดรเจนตามสูตรการคำนวณ (ภาคผนวก ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของการผลิตไฮโดรเจนของวัสดุตรึงอะการ์

จากการทำการทดลองนำสาหร่ายมาผสมในวัสดุตรึงอะการ์และนำไปขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยม และแผ่นฟิล์ม จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24ชั่วโมง จะให้ผลผลิตไฮโดรเจนดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ผลผลิตไฮโดรเจนของอะการ์ในแต่ละรูปทรง

จากรูปที่ 4.2 ผลผลิตไฮโดรเจนในวัสดุตรึงอะการ์ของการขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์ม ให้ผลผลิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากอะการ์มีการเกิดเจลแบบ Physical gels (แข็งตัวได้ด้วยตัวเอง) ไม่ต้องใช้สารเคมีช่วยในการคงตัว ซึ่งทำให้ขึ้นรูปได้ง่ายและเกิดการผิดพลาดได้น้อย อีกทั้งยังมีการขึ้นรูปในลักษณะคล้ายคลึงกันอีกด้วย จึงทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากการวัดค่าไฮโดรเจนนั้นสามารถทำได้จากการใช้เครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ จากนั้นนำค่า peak area มาคำนวณเพื่อหาปริมาณไฮโดรเจนตามสูตรการคำนวณ (ภาคผนวก ง) ส่วนการนำมาขึ้นรูปทรงกลมนั้นพบว่าไม่สามารถทำได้ เนื่องจากอะการ์สามารถแข็งตัวเป็นวุ้นได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นการนำหลอดฉีดยาขนาด 25 มิลลิลิตรมาดูดเจลและใช้เข็มเบอร์ 18 มาหยดเจลใช้ระยะเวลานาน ทำให้อะการ์แข็งตัวภายในหลอดฉีดยาและเมื่อหยดเจลลงมาอะการ์จึงกลายเป็นวุ้นไม่สามารถแข็งตัวเป็นเม็ดได้ ดังนั้นอะการ์จึงไม่เหมาะสมจะนำมาตรึงเซลล์สาหร่ายเพื่อขึ้นรูปทรงกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของการผลิตไฮโดรเจนของวัสดุตรึงไคโตซาน

จากการทำการทดลองนำสาหร่ายมาผสมในวัสดุตรึงไคโตซาน สามารถขึ้นรูปทรงกลมได้แต่ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ เนื่องจากในการทำการทดลองได้นำไคโตซานไปละลายในกรดอะซิติก (acetic acid) ก่อนแล้วจึงนำมาผสมกับเซลล์สาหร่ายในอัตราส่วน 4:1 แล้วจึงหยดเจลเป็นรูปทรงกลมลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ในขั้นตอนการทำการทดลองเซลล์สาหร่ายได้ถูกผสมและอยู่ในหลายสภาวะทั้งสภาวะกรดและเบส จึงอาจทำให้เซลล์สาหร่ายเสื่อมสภาพไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้

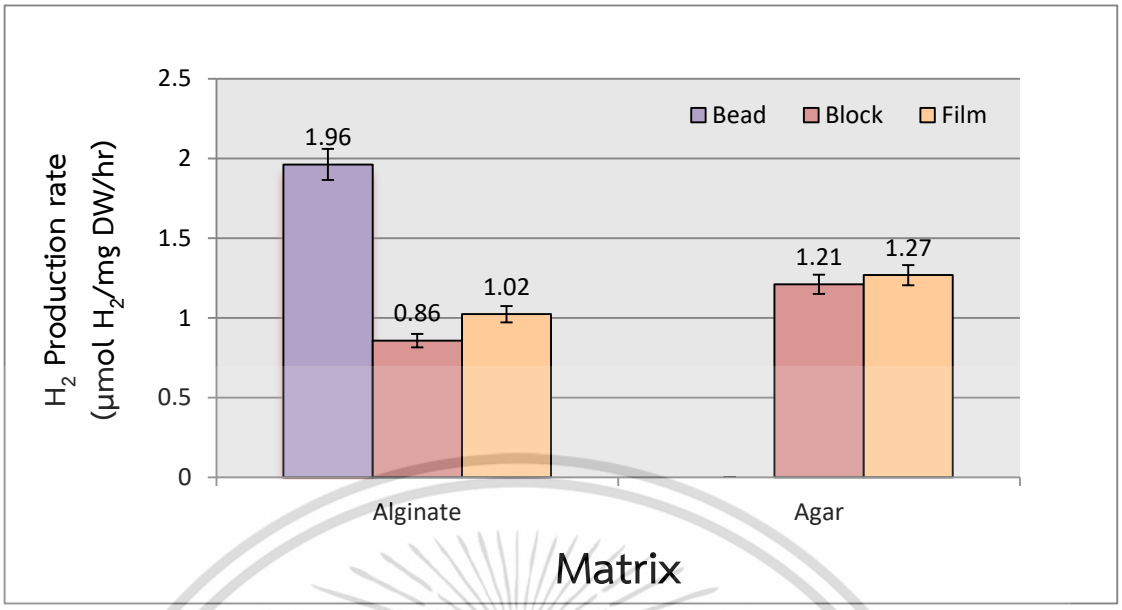
4.5 ผลของการผลิตไฮโดรเจนของวัสดุตรึงเจลาติน

จากการทำการทดลองนำสาหร่ายมาผสมในวัสดุตรึงเจลาตินไม่สามารถขึ้นรูปทรงใดๆได้สำเร็จ เนื่องจากเจลาตินจะสามารถแข็งตัวที่ 15 องศาเซลเซียส และแข็งตัวได้ดีที่ 1 องศาเซลเซียส อีกทั้งยังสามารถหลอมละลายได้ที่ 25-40 องศาเซลเซียส และจะละลายเป็นน้ำเมื่อได้รับความร้อน (ที่มา: http://www.molecularrecipes.com/hydrocolloid-guide/gelatin/) เมื่อทำการทดลองผสมกับเซลล์สาหร่ายและได้เทเจลลงถาดสี่เหลี่ยมและนำไปแช่ในกระบะที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่ทำให้ เจลแข็งตัวแต่เมื่อนำถาดออกมาจากกระบะพบว่า เจลที่บรรจุอยู่ในถาดสี่เหลี่ยมค่อยๆละลายจนกลายเป็นน้ำ ทำให้ไม่สามารถนำออกมาตัดได้ วัสดุตรึงเจลาตินนี้จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรึงเซลล์เพื่อขึ้นรูปทรงต่างๆ วิธีแก้ไขปัญหานี้คือ ต้องมีสารที่ช่วยให้การทำให้โมเลกุลของเจลาตินใหญ่ขึ้นเรียกว่า ตัวเชื่อมข้าม (crosslinked) คือการใส่สารที่มีพันธะโควาเลนต์ 2 พันธะลงไป เพื่อเป็นการเชื่อมกันของโมเลกุลให้โมเลกุลของเจลาตินใหญ่ขึ้นโดยที่จับกันเป็นก้อนหรือเป็นแผ่นที่มีขนาดใหญ่กว่าเป็นสายเดี่ยวๆ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ได้ขยายเรื่องไปถึงการใช้ตัวเชื่อมข้ามจึงทำให้วัสดุตรึงเจลาตินไม่สามารถขึ้นรูปมาเพื่อใช้ผลิตไฮโดรเจนได้

4.6 การเปรียบเทียบผลของปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตจากวัสดุตรึงในรูปทรงต่างๆ

เพื่อเป็นการเปรียบเทียบอัตราการผลิตไฮโดรเจนในแต่ละวัสดุหลากหลายรูปทรง ได้แก่ อัลจิเนต ทรงกลม ทรงสี่เหลี่ยม แผ่นฟิล์มบาง และอะการ์ ทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์มบาง จึงได้ทำการวาดกราฟบนแกนเดียวกันอีกครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



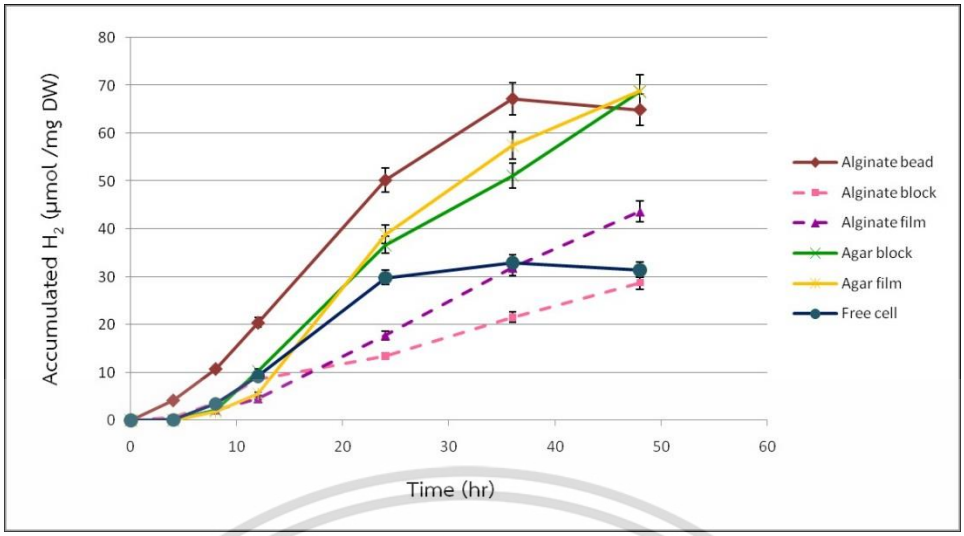
รูปที่ 4.3 การเปรียบเทียบผลผลิตไฮโดรเจนระหว่างอัลจิเนตและอะการ์

จากรูปที่ 4.3 จะเห็นว่าในวัสดุตรึงอัลจิเนตที่ขึ้นรูปทรงกลมให้ผลผลิตได้ดีกว่าทุกรูปแบบ แต่ในวัสดุตรึงอะการ์ในการขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์มจะได้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าการตรึงเซลล์สาหร่ายในวัสดุตรึงอัลจิเนตแบบรูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์ม และในการเลือกวัสดุตรึงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคตจะกล่าวได้ว่า การตรึงเซลล์ในวัสดุตรึงอัลจิเนตที่ขึ้นรูปทรงกลมให้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดที่ 24 ชั่วโมง

4.7 ผลการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับระบบเซลล์อิสระ

จากการทำการทดลองตรึงเซลล์สาหร่ายในวัสดุตรึงทั้ง 4 ชนิดที่สามารถตรึงและขึ้นรูปได้ โดยทำการเลี้ยงเซลล์สาหร่ายก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้มีการนำมาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องโดยจะทำการวัดปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ และวัดทุก 4, 8, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และนำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้มาเปรียบเทียบกับระบบเซลล์อิสระจะได้ผลดังรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ผลการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับระบบเซลล์อิสระ

จากรูปที่ 4.4 จะแสดงให้เห็นว่า อัลจิเนตที่ขึ้นรูปทรงกลม ( ) เริ่มให้ผลการผลิตไฮโดรเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 ผลิตสูงสุดชั่วโมงที่ 36 และเริ่มผลิตคงที่ชั่วโมงที่ 48 อัลจิเนตที่ขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยม (- - - - -) เริ่มให้ผลการผลิตไฮโดรเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และค่อยๆเพิ่มขึ้นสูงสุดชั่วโมงที่ 48 และมีแนวโน้มว่าจะสามารถผลิตเพิ่มขึ้นได้อีก อัลจิเนตที่ขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม (- - - - -) เริ่มให้ผลการผลิตไฮโดรเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 และค่อยๆ เพิ่มขึ้นสูงสุดชั่วโมงที่ 48 และมีแนวโน้มว่าจะสามารถผลิตเพิ่มขึ้นได้อีก อะการ์ที่ขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยม (x) และแผ่นฟิล์ม (x) เริ่มให้ผลการผลิตไฮโดรเจนชั่วโมงที่ 8 แล้วค่อยๆ เพิ่มขึ้นสูงสุดชั่วโมงที่ 48 และมีแนวโน้มว่าจะสามารถผลิตเพิ่มขึ้นได้อีกเช่นกัน ส่วนระบบเซลล์อิสระ ( ) เริ่มให้ผลการผลิตไฮโดรเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 ผลิตสูงสุดชั่วโมงที่ 36 และเริ่มผลิตคงที่ชั่วโมงที่ 48

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า อัลจิเนตที่ขึ้นรูปทรงกลมให้ผลการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดในทุกวัสดุและทุกรูปทรง และมีการให้ผลการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าเท่าตัวเมื่อเทียบกับระบบเซลล์อิสระ เหตุเพราะว่า การตรึงเซลล์เป็นการกีดกันไม่ให้ออกซิเจนเข้าไปภายในเซลล์ ซึ่งออกซิเจนเป็นตัวที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งส่งผลทำให้การทำงานของกระบวนการผลิตไฮโดรเจนทำงานได้ช้าลง (Kosourov and Seibert, 2008) และอะการ์ที่ขึ้นรูปแผ่นฟิล์มและรูปทรงสี่เหลี่ยมให้ผลการผลิตไฮโดรเจนรองลงมา ตามลำดับ เนื่องจากเจลที่เกิดจากอะการ์มีคุณสมบัติเป็น thermoreversible gels คือ เจลที่เปลี่ยนกลับเป็นของเหลวได้ เมื่อมีความร้อน ถึงแม้ว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยอะการ์จะไม่ได้เปลี่ยนเป็นของเหลวก็ตาม แต่ก็อาจจะเสื่อมสภาพได้ เพราะอะการ์เกิดเจลแบบ Physical gels (แข็งตัวได้ด้วยตัวเอง) แต่ถึงอย่างไรก็ถือได้ว่าอะการ์เป็นวัสดุที่น่าสนใจเพราะมีแนวโน้มในการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ส่วนอัลจิเนตที่ขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์ม จะให้ผลผลิตมากกว่าระบบเซลล์อิสระหลังจากชั่วโมงที่ 48 จึงสรุปได้ว่าในการตรึงเซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 จะให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากกว่าระบบเซลล์อิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 ผลของการเปรียบเทียบปริมาณไฮโดรเจนในวัสดุตรึง

จากการทำการทดลองเรื่องการเลือกวัสดุตรึงสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 เพื่อการผลิตไฮโดรเจน จากการนำเซลล์สาหร่ายมาเพาะเลี้ยงและทำการบ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ แล้วนำไปทำเป็น starter และวัดค่า OD_{730} จะได้ค่าความขุ่นเท่ากับ 0.16 จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายมาทำการตรึงในวัสดุตรึงทั้งหมด 4 ชนิดที่นำมาศึกษา ได้แก่ อัลจิเนต อะการ์ ไคโตซาน และเจลาติน นำมาขึ้นรูปทรงต่างๆ ดังนี้ รูปทรงกลม รูปทรงสี่เหลี่ยม และแผ่นฟิล์ม สรุปได้ว่าวัสดุตรึงอัลจิเนตสามารถขึ้นรูปทรงได้ทั้ง 3 แบบ คือ รูปทรงกลม รูปทรงสี่เหลี่ยม และแผ่นฟิล์ม วัสดุตรึงอะการ์สามารถขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์มได้ วัสดุตรึง ไคโตซานสามารถขึ้นรูปได้เฉพาะทรงกลม และวัสดุตรึงเจลาตินไม่สามารถขึ้นรูปทรงใดๆได้เลย

ต่อมาได้ทำการวัดปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ โดยเริ่มจากการพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่ก๊าซออกซิเจนที่อยู่ภายในขวดไวแอลก่อน จากนั้นทำการบ่มสาหร่ายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปวัดปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ จะได้ปริมาณไฮโดรเจนของเซลล์อิสระเท่ากับ 1.24 μmol H_2/mg DW/hr วัสดุตรึงอัลจิเนตเท่ากับ 1.96, 0.86 และ 1.02 μmol H_2/mg DW/hr ของการขึ้นรูปทรงกลม รูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์ม ตามลำดับ ปริมาณไฮโดรเจนของวัสดุตรึงอะการ์เท่ากับ 1.21 และ 1.27 μmol H_2/mg DW/hr ของการขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์ม ตามลำดับ และวัสดุตรึงไคโตซานสามารถขึ้นรูปทรงกลมได้ แต่ไม่ให้ผลผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากขั้นตอนในการทำการทดลองเซลล์สาหร่ายอยู่ในหลายสภาวะ (สภาวะกรดและเบส) ทำให้เซลล์สาหร่ายอาจจะตายจึงไม่สามารถให้ผลผลิตไฮโดรเจนได้ จากการทำวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่า วัสดุตรึงอัลจิเนตที่ขึ้นรูปทรงกลมสามารถให้ผลผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด โดยให้ผลผลิตดีขึ้นกว่า 2 เท่า จึงเหมาะแก่การนำไปศึกษาและใช้ประโยชน์เป็นลำดับต่อไป ส่วนวัสดุตรึงอัลจิเนตที่ขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมให้ผลผลิตไฮโดรเจนน้อยที่สุดจึงเหมาะแก่การนำไปพัฒนาและปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นเป็นลำดับต่อไป

5.1.2 ผลการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับระบบเซลล์อิสระ

จากการทำการทดลองและได้ผลสรุปข้างต้น งานวิจัยนี้ยังได้มีการศึกษาผลของการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับระบบเซลล์อิสระ โดยเริ่มต้นเลี้ยงสาหร่ายที่ค่า OD_{730} เท่ากับ 0.01 บ่มเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรึงเซลล์สาหร่ายและเตรียมเซลล์ของระแบบอิสระดังวิธีการที่ได้กล่าวไปในบทที่ 3 จากนั้นทำการวัดปริมาณไฮโดรเจนทุก 4, 8, 12, 24 ,36 และ 48 ชั่วโมง นำ peak area มาคำนวณปริมาณไฮโดรเจนในหน่วย (μmol/mg DW) พบว่า วัสดุตรึงอัลจิเนตขึ้นรูปทรงกลมสามารถเริ่มให้ผลการผลิตไฮโดรเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 ผลิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 และเริ่มผลิตคงที่ชั่วโมงที่ 48 ส่วนวัสดุตรึงอัลจิเนตขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์ม เริ่มให้ผลการผลิตไฮโดรเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และชั่วโมงที่ 8 และผลิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ตามลำดับ และมีแนวโน้มว่าจะสามารถผลิตได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ วัสดุตรึงอะการ์ขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมและแผ่นฟิล์ม เริ่มให้ผลการผลิตไฮโดรเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 และมีแนวโน้มว่าจะสามารถผลิตได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ หลังจากชั่วโมงที่ 48 เช่นกัน ส่วนระบบเซลล์อิสระเริ่มให้ผลการผลิตไฮโดรเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 ผลิตสูงสุดชั่วโมงที่ 36 และเริ่มผลิตคงที่ชั่วโมงที่ 48 อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบกับระบบเซลล์อิสระพบว่า อัลจิเนตที่ขึ้นรูปทรงกลมผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่าทุกวัสดุตรึงและทุกรูปแบบ และอะการ์ที่ขึ้นรูปแผ่นฟิล์มและรูปทรงสี่เหลี่ยมให้ผลการผลิตไฮโดรเจนรองลงมา ตามลำดับ ส่วนอัลจิเนตที่ขึ้นรูปแผ่นฟิล์มและรูปทรงสี่เหลี่ยมจะให้ผลการผลิตไฮโดรเจนที่ต่ำกว่าทุกวัสดุตรึงและทุกรูปแบบ แต่เมื่อพิจารณาจากการทดลองวัสดุตรึงอัลจิเนตที่ขึ้นรูปแผ่นฟิล์มและขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมหลังจากชั่วโมงที่ 24 จะมีแนวโน้มของการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มมากขึ้น ในทางกลับกันระบบเซลล์อิสระเริ่มมีแนวโน้มคงที่ จึงสรุปได้ว่าการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการตรึงเซลล์ดีกว่าระบบเซลล์อิสระและการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตรูปทรงกลมจะเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าระบบเซลล์อิสระถึง 2 เท่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยเป็นการศึกษาการเลือกวัสดุตรึงเซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 เพื่อการผลิตไฮโดรเจน สามารถสรุปข้อเสนอแนะเพื่อเป็นแนวทางการศึกษาวิจัยต่อไป ดังนี้

1. ควรปรับความเข้มข้นของวัสดุตรึงอัลจิเนตและสัดส่วนในการผสมระหว่างวัสดุตรึงกับเซลล์สาหร่ายให้มีความหลากหลาย
2. ควรเพิ่มการทดลองในการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะที่ขาดซัลเฟอร์ จากงานวิจัยของ (Laurinavichene และคณะ, 2006) พบว่าการขาดซัลเฟอร์จะสามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้
3. ควรเพิ่มเวลาในการบ่มวัสดุตรึงอัลจิเนตที่ขึ้นรูปทรงกลมให้มากกว่า 48 ชั่วโมง

ในการพัฒนาวัสดุตรึงอัลจิเนตที่ขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยม ควรลดความเข้มข้นสุดท้ายในการเตรียมอัลจิเนตให้ลดลง เพื่อที่จะสามารถขึ้นรูปทรงสี่เหลี่ยมได้ง่ายและมีขนาดตามต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2557. **คู่มือพลังงานไฮโดรเจน**. กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2557. **ไฮโดรเจน**.

ขนิษฐา หมู่โสภิญ. 2553. **ไบโอไฮโดรเจนพลังงานทางเลือกใหม่**.

เคมีภัณฑ์คอร์ปอเรชั่น. 2010-2016. **เจล (Gel)**.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2559. **การผลิตเอนไซม์ตรึงรูป.**

ธนพล กลิ่นเมือง และศุภนุช ยิบแสงทอง. 2553. **อาณาจักรของสิ่งมีชีวิต**.

วราภรณ์ สุทธิวิชัยพร,สายพิณ ทานัชณาสัย และวรรณวิบูลย์ กาญจนดุญชร. 2550. “การตรึงรูปเอนไซม์อัลคาเลสบนตัวพยุงในรูปบีดส์จากไคโตซาน.” ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิธร คงเรือง และเบญจมาภรณ์ วงศ์อนุ. 2550. รายงานการวิจัยการตรึงเซลล์ยีสต์โดยการห่อหุ้มเพื่อผลิตไวน์ลำไยอบแห้ง. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์.

ศิริรจนา กันภัย. 2559. **สมบัติทางเคมีของคาร์โบไฮเดรท-ไฮโดรคอลลอยด์ และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม.**

สุนทรี แสงศรี และพัฒน ทวีโภค. 2556. “การตรึงสาหร่ายแห้ง Chlorella vulgaris ด้วยวิธี hybrid immobilization และความสามารถในการใช้เป็นตัวดูดซับสีย้อมรีแอคทีฟบนเปื้อน.” คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ส่วนวิจัยเกษตรกรรม ฝ่ายวิชาการ ธนาคารกสิกรไทย. 2557. **ประเภทของสาหร่าย**.

Anjana, K. and A. Kaushik. 2014. Enhanced hydrogen production by immobilized cyanobacterium Lyngbya perelegans under varying anaerobic conditions. Biomass Bioenerg 63:54-57.

Antal, T. K., D. N. Matorin, G. P. Kukarskikh, M. D. Lambreva, E. Tyystjarvi, T. E. Krendeleva, A. A. Tsygankov, and A. B. Rubin. 2014. Pathways of hydrogen photoproduction by immobilized Chlamydomonas reinhardtii cells deprived of sulfur. Int J Hydrogen Energ 39(32):18194-18203.

Hallenbeck, P. C. and J. R. Benemann. 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. Int J Hydrogen Energ 27(11-12):1185-1193.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Laurinavichene, T. V., A. S. Fedorov, M. L. Ghirardi, M. Seibert, and A. A. Tsygankov. 2006. Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived Chlamydomonas reinhardtii cells. Int J Hydrogen Energ 31(5):659-667.

Laurinavichene, T. V., S. N. Kosourov, M. L. Ghirardi, M. Seibert, and A. A. Tsygankov. 2008. Prolongation of H(2) photoproduction by immobilized, sulfur-limited Chlamydomonas reinhardtii cultures. J Biotechnol 134(3-4):275-277.

Maneeruttanarungroj, C., P. Lindblad, and A. Incharoensakdi. 2010. A newly isolated green alga, Tetraspora sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. Int J Hydrogen Energ 35(24):13193-13199.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สรุปการใช้จ่ายเงิน

	งบบุคลากร	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ
ครั้งที่ 1	-	-	23,851.16
ครั้งที่ 2	-	-	26,629.75
รวม	-	-	50,480.91

รวมรายจ่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่ายอาหาร TAP (Tris Acetate Phosphape medium) เหลว

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง (balance analytical) ละเอียด 4 ตำแหน่ง

2. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)

3. ปิเปต (pipette) ขนาด 1, 10 และ 25 มิลลิลิตร

4. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)

2. สารเคมี

1. กรดบอริก (H_3BO_3) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie

2. เกลเซียลอะซิติกแอซิด (Glacial Acetic Acid) GR Grade บริษัท Duksan Pure Chemical

3. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie

4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie

5. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie

6. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie

7. โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4.2H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS

8. ทริส-ไฮดรอกซีเมทิล-อะมิโนมีเทน (Tris(hydroxymethyl-aminomethane)) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS

9. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie

10. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie

12. แมงกานีสคลอไรด์ไดไฮเดรต ($MnCl_2.2H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie

13. วุ้น (Agar-Agar Bacto) เกรดวิเคราะห์ บริษัท S.D. Fine-Chem Limited

14. เอทิลีนไดเอมีนเททระอะซิติกแอซิด (EDTA) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie

15. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie

16. ไอร์ออนซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie

3. ขั้นตอนการเตรียมอาหาร TAP (Tris Acetate Phosphape medium) เหลว

ตารางที่ ก.1 อัตราส่วนในเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (อาหาร TAP) ดังนี้

No.	Chemical	Amount (g)	Volume to (mL)	V/1L TAP	Final Conc (uM)
1	Tris	24.20	100	10	20,000
2	NH_4Cl	3.75	250	25	7,000
	$MgSO_4.7H_2O$	1.00			830
	$CaCl_2.2H_2O$	0.50			450
3	K_2HPO_4	2.88	10	1	1,650
	KH_2PO_4	1.44			1,050
4*	$Na_2EDTA.2H_2O$	0.5000	10	1	134
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.2200			136
	H_3BO_3	0.1140			184
	$MnCl_2.4H_2O$	0.0500			40
	$FeSO_4.7H_2O$	0.0500			33
	$CoCl_2.6H_2O$	0.0160			12
	$CuSO_4.5H_2O$	0.0160			10
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.0077			4
5	CH_3COOH (conc.)	-	-	1 mL	0.1% (V/V)

2. ปิเปตสารละลายข้อที่1-5 เป็นปริมาตร10, 25, 1, 1 และ 1 มิลลิลิตรตามลำดับ จากนั้น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึง 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียม potassium phosphate buffer 0.1 M pH 7.2

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง (balance analytical) ละเอียด 4 ตำแหน่ง

2. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)

3. ปิเปต (pipette) ขนาด 1, 10 และ 25 มิลลิลิตร

4. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)

2. สารเคมี

1. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1M

2. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1M

3. ขั้นตอนการเตรียม 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.2

ละลายไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1M 87.09 กรัม ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร และละลายสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1M มา 68.045 กรัม ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมา 71.7 และ 28.3 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมใส่ขวดโหลเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

วิธีการคำนวณปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

1.การหาว่าในบริเวณส่วนบนของขวดมีก๊าซไฮโดรเจนกี่โมล

$$\frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างที่วัดได้จากเครื่อง } GC \text{ x 4\% ของก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟมาตรฐานที่ได้จากเครื่อง } GC} = \text{A \%}$$

$$\frac{(Vheadspace + V_{\text{กระบอกฉีดยา}})x\ A\%}{100\ \text{mL}} = \text{B mL}$$

$$\left(\frac{\text{B mL x 1mol}}{22.4\ \text{L}}\right) x\ 1{,}000 = \quad \text{C umol}$$

* 22.4 L คือ ปริมาตรของแก๊สไฮโดรเจน 1 mol

1,000 คือ การเปลี่ยนหน่วยจาก mmol เป็น µmol

2. การหาว่าเซลล์มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่าไหร่

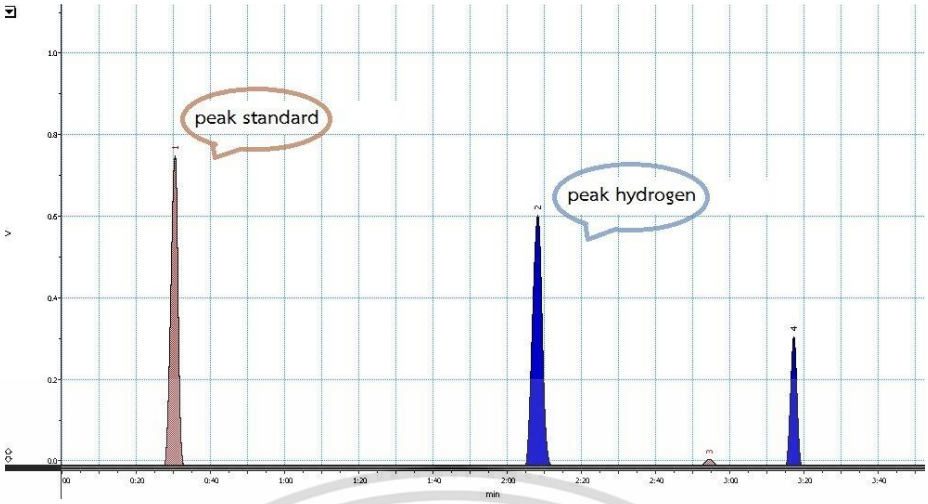
*แต่เนื่องจากได้คำนวณให้มีเซลล์แห้งเท่ากับ 1 มิลลิกรัม (mg)

3. เวลาในการบ่มเพื่อฉีด GC (hr)

4. การคำนวณอัตราการผลิตในหน่วย µmol H_2/mg DW/hr

จะได้ว่าค่าจาก C/1 mg/hr

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.1 โครมาโทรแกรมของ peak standard และ peak hydrogen

Peak	Fill	Peak Name	t_R (min)	t_S (min)	t_E (min)	H (V)	H_{Norm}	Peak Area (V.s)
1			0:31	0:28	0:36	0.76	17.92	1.6817525
2			2:08	2:04	2:16	0.61	14.43	1.8287128
3			2:55	2:52	2:59	0.01	0.32	0.0299374

peak standard
peak hydrogen

รูปที่ ค.2 แสดงค่า peak area ของ peak standard และ peak hydrogen

จากโครมาโทรแกรม (รูปที่ ค.1) จะแสดงค่า peak area (รูปที่ ค.2) จากนั้น นำค่า peak area ไปคำนวณหาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนตามสมการที่กล่าวมาข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ไทย) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์
   (อังกฤษ) Asst.Prof.Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 3606 00476 64 4
3. การทำงาน
   ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
   สถานที่ทำงาน สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
   สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง
   จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรณีย์ 10520
   โทรศัพท์ 02-329-8400-11 โทรสาร 02-329-8412
   โทรศัพท์มือถือ 084-662-6149 email: cherdsak.ma@kmitl.ac.th
4. ประวัติการศึกษา
   ปริญญาตรี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   ปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   ปริญญาเอก ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. ประสบการณ์งานวิจัย
   1. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยเครื่องหมายพันธุกรรมเชิงโมเลกุล
   2. ศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน
   3. ศึกษากระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในจุลชีพสีเขียว

<u>ผลงานวิจัย</u>

1. Maswanna, T., Phunpruch, S., Lindblad, P. and **Maneeruttanarungroj, C**. (2018) Enhanced hydrogen production by optimization of immobilized cells of the green alga *Tetraspora* sp. CU2551 grown under anaerobic condition. Biomass and Bioenergy 111:88-95.
2. Sirawattanamongkol, T. and **Maneeruttanarungroj, C**. 2018. The optimization of biohydrogen production from green alga KS03. Proceeding of the Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2018), Hat Yai, Songkhla, Thailand, 7-9 February 2018, EE301-306.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. **Maneeruttanarungroj, C.** 2018. Effect of immobilization materials and shapes on biohydrogen production from green alga Tetraspora sp. CU2551. Proceeding of the Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2018), Hat Yai, Songkhla, Thailand, 7-9 February 2018, EE291-295.

4. Maswanna, T. and **Maneeruttanarungroj, C**. (2017) Hydrogen production by immobilized green alga *Tetraspora* sp. CU2551 in calcium alginate using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis. Proceeding of the 13th Conference Network of Thailand conference (ENETT), Chiangmai, Thailand, May31 – 2June, 2017, 1090 – 1098.

5. Maswanna, T., Phunpruch, S. and **Maneeruttanarungroj, C**. (2017) Hydrogen production in *Tetraspora* sp. CU2551 under full-factorial N-, P-, and S-nutrients deprivation. Proceeding of the Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2017), Bangkok, Thailand, February 2 – 3, 2017, 1584 – 1590.

6. **Maneeruttanarungroj, M.** and Incharoensakdi, A. (2016) RNA isolation from a tough cell wall green alga *Tetraspora* sp. CU2551. Proceeding of the Science and Technology of Emerging Materials conference (STEMa2016), 19-22

7. **Maneeruttanarungroj, C**. and Phunpruch, S. (2017) Effect of pH on Biohydrogen Production in Green Alga *Tetraspora* sp. CU2551. Energy procedia 138:1085-1092.

8. **Maneeruttanarungroj, C**. and Incharoensakdi, A. (2016) Rapid method for DNA isolation from a tough cell wall green alga *Tetraspora* sp. CU2551. World journal of microbiology and biotechnology 32(6):99.

9. **Maneeruttanarungroj, C.**, Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. (2012) Sulfate permease (SulP) and hydrogenase (HydA) in the green alga *Tetraspora* sp. CU2551: Dependence of gene expression on sulfur status in the medium. Int J Hydrogen Energ 37:15105-15116**.**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. **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 Energ 35:13193-13199.

11. Nzila, A., Rottmann, M., Chitnumsub, P., Kiara, S. M., Kamchonwongpaisan, S., **Maneeruttanarungroj, C**., Taweechai, S., Yeung, B. K., Goh, A., Lakshminarayana, S. B., Zou, B., Wong, J., Ma, N. L., Weaver, M., Keller, T. H., Dartois, V., Wittlin, S., Brun, R., Yuthavong, Y. and Diagana, T. T. (2010) Preclinical evaluation of the antifolate QN254, 5-chloro- N060-(2,5-dimethoxy-benzyl)-quinazoline-2,4,6-triamine, as an antimalarial drug candidate. Antimicrob Agents Chemother 54, 2603–2610.

12. Dasgupta, T., Chitnumsub, P., Kamchonwongpaisan, S., **Maneeruttanarungroj, C**., Nichols, SE., Lyons, TM., Tirado-Rives, J., Jorgensen, WL., Yuthavong, Y. and Anderson, K.S. (2009) Exploiting structural analysis, *in silico* screening, and serendipity to identify novel inhibitors of drug-resistant *Falciparum* malaria. ACS Chem Biol 4:29–40.

13. Supungul, P., Tang, S., **Maneeruttanarungroj, C**., Rimphanitchayakit, V., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon A. (2008) Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol 32, 61–70.

14. **Maneeruttanarungroj, C.**, Pongsomboon, S., Wuthisuthimethavee, S., Klinbunga, S., Wilson, K.J., Swan, J., Li, Y., Whan, V., Chu, K.H., Li, C.P., Tong, J., Glenn, K., Rothschild, M., Jerry, D. and Tassanakajon, A. (2006) Development of polymorphic expressed sequence tag-derived microsatellites for the extension of the genetic linkage map of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Anim Genet 37, 363–368.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้