

การผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 และ

Chlorella sp. KLSc59 ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

H₂ PRODUCTION FROM GREEN ALGA *Tetraspora* sp. CU2551 AND *Chlorella*
sp. KLSc59 UNDER AEROBIC CONDITIONS



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

H₂ PRODUCTION FROM GREEN ALGA *Tetraspora* sp. CU2551 AND *Chlorella*
sp. KLSc59 UNDER AEROBIC CONDITIONS.



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

(IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT APPLIED OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 และ *Chlorella* sp. KLSc59 ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ
H₂ production from green alga *Tetraspora* sp. CU2551 and *Chlorella* sp. KLSc59 under aerobic conditions.

ชื่อนักศึกษา นางสาว เบญจรัตน์ แดงทอง รหัสนักศึกษา 58050914
นางสาว เบญจวรรณ ชุ่มชวย รหัสนักศึกษา 58050916
นางสาว ปณัฐชา กองแก้ว รหัสนักศึกษา 58050918

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ. วีน่า ชูโชติ ประธานกรรมการ	
ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการ	
ผศ. ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551
และ *Chlorella* sp. KLS59 ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

ชื่อนักศึกษา นางสาว เบญจรัตน์ แต่งทอง รหัสนักศึกษา 58050914

นางสาว เบญจวรรณ ชุ่มชวย รหัสนักศึกษา 58050916

นางสาว ปณัฐชา กองแก้ว รหัสนักศึกษา 58050918

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

การศึกษาพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตแก๊สไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว ทั้งสองสายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ พารามิเตอร์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ แสง ธาตุอาหาร และปริมาณของเซลล์สาหร่าย โดยกำหนดการทดลองดังนี้ ปัจจัยทางด้านแสงทำการบ่มเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์ในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) มีอากาศ บ่มสาหร่ายในตู้บ่มเขย่าที่ 140 รอบ/นาที อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส แต่มีการควบคุมปัจจัยทางแสงโดยจะบ่มเลี้ยงในสภาวะแสงที่แตกต่างกัน สภาวะแสง ได้แก่ 0 ลักซ์, 1,000 ลักซ์, 2,000 ลักซ์ และ 3,000 ลักซ์ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า แสงยังคงทำให้มีออกซิเจนสูงโดยเมื่อถึงความเข้มแสงลดลงความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายก็มากขึ้น ปัจจัยทางด้านธาตุอาหารทำการทดลองโดยทำการบ่มเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์ในอาหาร TAP-K, TAP-S, TAP-N, TAP-P, TAP-Mg, TAP-Fe, TAP-Cu, TAP-Ca, TAP-Zn และ TAP-Mn ภายใต้สภาวะปกติแต่ปราศจากแสง พบว่า *Tetraspora* sp. CU2551 ที่เลี้ยงในอาหาร TAP-K มีการผลิตแก๊สไฮโดรเจนเยอะที่สุดคือ 0.39725 $\mu\text{mol}/\text{mgDW}$ เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ปัจจัยทางด้านปริมาณเซลล์เลือกทำการทดลองในเฉพาะสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 โดยกำหนดความเข้มข้นของเซลล์คือ 0.1 – 0.5 ที่ OD_{750} แล้วบ่มเลี้ยงในสภาวะปกติแต่ปราศจากแสงภายในอาหาร TAP-K พบว่าที่ความเข้มข้นเซลล์ 0.1 ของ *Tetraspora* sp. CU2551 ได้ผลผลิตคือแก๊สไฮโดรเจนมากที่สุดคือ 0.01451 $\mu\text{mol}/\text{mgDW}$

คำสำคัญ : สภาวะที่มีอากาศ พารามิเตอร์ แสง ธาตุอาหาร ปริมาณเซลล์ แก๊สไฮโดรเจน
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	H ₂ production form green alga <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 and <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 under aerobic conditions.
Student	Miss Benjarat Tangthong ID 58050914 Miss Benjawan ChumChuay ID 58050916 Miss Panatcha Kongkaew ID 58050918
Degree	Bachelor of Science
Major	Industrial Microbiology
Academic Year	2018
Advisor	Asst. Prof. Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj

ABSTRACT

The aim of this special project is to study the parameters which are an important factor affecting the hydrogen production of both green algae under aerobic conditions. The parameters used in the experiment were light, nutrient and culture density of algae cells. The cell was cultured using both species of green algae in Tris-Acetate-Phosphate medium (TAP) under normal conditions, there is an air inside the cured shaking at 140 rpm/minute, temperature 36 degrees Celsius with the control of the light factor incubating in different lighting conditions of 0 lux, 1,000 lux, 2,000 lux and 3,000 lux. The result showed that light is an important factor in increasing the amount of oxygen. Nutrient factors were tested in both species of green algae with TAP-K medium, TAP-S medium, TAP-N medium, TAP-P medium, TAP-Mg medium, TAP-Fe medium, TAP-Cu medium, TAP-Ca medium, TAP-Zn medium and TAP-Mn medium. Under normal conditions without light, the experiment revealed that *Tetraspora* sp. CU2551 in TAP-K yielded the most production of hydrogen gas, 0.39725 μmol / mgDW, over a period of 7 days. The cell density was selected to experiment and only *Tetraspora* sp. CU2551. The cell density was 0.1 - 0.5 at OD₇₅₀ in TAP-K medium. The experiment found that 0.1 cell density of *Tetraspora* sp. CU2551 resulted in the highest yields of hydrogen gas yielding.

Keywords : aerobic conditions, parameters, light, nutrient, volume of algae cells, hydrogen

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา สาขาจุลชีววิทยา อุตสาหกรรม ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากการสนับสนุน และช่วยเหลือจากท่านผู้มีอุปการะคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาและกรรมการโครงการพิเศษ ที่กรุณาเป็นอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษาระหว่างการดำเนินการค้นคว้าวิจัย ให้อำนวยความสะดวกอุปการะรวมถึงสารเคมีที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด และอำนวยความสะดวกให้คำปรึกษาตลอดจนตรวจทานแก้ไขทำให้โครงการพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีอย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์กรรมการโครงการพิเศษทุกท่าน ที่กรุณาเป็นอย่างยิ่งในการให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์โครงการพิเศษนี้ ทำให้โครงการพิเศษมีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้การอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ ทำให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ บิดา มารดาและบุคคลภายในครอบครัว รวมทั้งเพื่อนๆ และผู้มีส่วนร่วมในโครงการพิเศษนี้ทุกท่านที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก และกำลังใจตลอดการทำโครงการพิเศษนี้

นางสาว เบญจรัตน์ แดงทอง

นางสาว เบญจวรรณ ชุ่มชวย

นางสาว ปณัฐชา กองแก้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
คำย่อและคำสัญลักษณ์	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 สาหร่ายสีเขียว	4
2.2 สาหร่ายสีเขียวคลอเรลลา (<i>Chlorella sp.</i>)	6
2.3 สาหร่ายสีเขียวเตตราสปอรา (<i>Tetraspora sp.</i>)	7
2.4 พลังงานไฮโดรเจน	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว	9
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	13
3.1 สาหร่าย	13
3.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย	13
3.3 สารเคมี	13
3.3.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	13
3.4 อุปกรณ์	14
3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิด	13
3.5.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารวัน	13
3.5.2 วิธีเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว	16
3.6 วิธีศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว	17
3.7 วิธีศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะต่าง ๆ	18
3.7.1 อิทธิพลของแสง	18
3.7.2 การทดสอบการขาดธาตุอาหาร	18
3.7.3 ความเข้มข้นเซลล์ที่ระดับต่างกันที่มีผลต่อการเกิดแก๊สไฮโดรเจน	19
3.8 การตอบสนองระดับเซลล์	19
3.8.1 การผลิตออกซิเจนของเซลล์	19
3.8.2 กิจกรรมของเอนไซม์	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	21
4.1 อิทธิพลของแสง	21
4.2 การทดสอบการขาดธาตุอาหาร	24
4.3 ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น	27
4.4 การตอบสนองระดับเซลล์	30
4.4.1 การผลิตออกซิเจนของเซลล์	30
4.4.2 กิจกรรมของเอนไซม์	31
4.5 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย	32
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	34
5.1 สรุปผลการวิจัย	34
5.2 ข้อเสนอแนะ	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก ก	37
ภาคผนวก ข	38
ภาคผนวก ค	40
ภาคผนวก ง	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเทอร์มอลคอนดักติวิตี ดีเทคเตอร์	18
4.1 ตารางแสดงข้อมูลจากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย	32



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 เส้นทางการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง และปฏิกิริยาไกลโคไลซิสของสาหร่าย สีเขียว	2
2.1 ภาพแผนภูมิการจัดจำแนกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว	5
2.2 ภาพสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดเซลล์ 10 μm	6
2.3 ภาพสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 600X	7
2.4 เส้นทางการเกิดปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายสีเขียว	10
3.1 แสดงการแยกเชื้อด้วยวิธี Streak-plate	16
3.2 แสดงการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว TAP ในตู้บ่ม	17
4.1 ปริมาณไฮโดรเจน และออกซิเจนจากสาหร่ายสีเขียว	21
4.1 ปริมาณไฮโดรเจน และออกซิเจนจากสาหร่ายสีเขียว (ต่อ)	22
4.2 ปริมาณไฮโดรเจน และออกซิเจนในอาหารต่าง ๆ จากสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc59	24
4.3 ปริมาณไฮโดรเจน และออกซิเจนในอาหารต่าง ๆ ของสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	26
4.4 ปริมาณไฮโดรเจน และออกซิเจนที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 0.1 – 0.5 ในอาหาร TAP-K ของ สาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	28
4.4 ปริมาณไฮโดรเจน และออกซิเจนที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 0.05 – 0.5 ในอาหาร TAP-K ของ สาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	29
4.6 ปริมาณไฮโดรเจน และออกซิเจนในการทดสอบประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสง 2 (PSII) ของสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	30
4.7 ปริมาณแก๊สไฮโดรเจนจากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและคำสัญลักษณ์

TAP = อาหาร Tris-Acetate-Phosphate

TAP-K = อาหาร Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากโพแทสเซียม

TAP-S = อาหาร Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากซัลเฟอร์

TAP-N = อาหาร Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากไนโตรเจน

TAP-P = อาหาร Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากฟอสฟอรัส

TAP-Mg = อาหาร Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากแมกนีเซียม

TAP-Fe = อาหาร Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากเหล็ก

TAP-Cu = อาหาร Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากทองแดง

TAP-Ca = อาหาร Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากแคลเซียม

TAP-Mn = อาหาร Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากแมงกานีส

TAP-Zn = อาหาร Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากสังกะสี

OD₇₅₀ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

$\mu\text{mol/mgDW}$ = หน่วยปริมาณไมโครโมลแก๊สต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

GC = เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

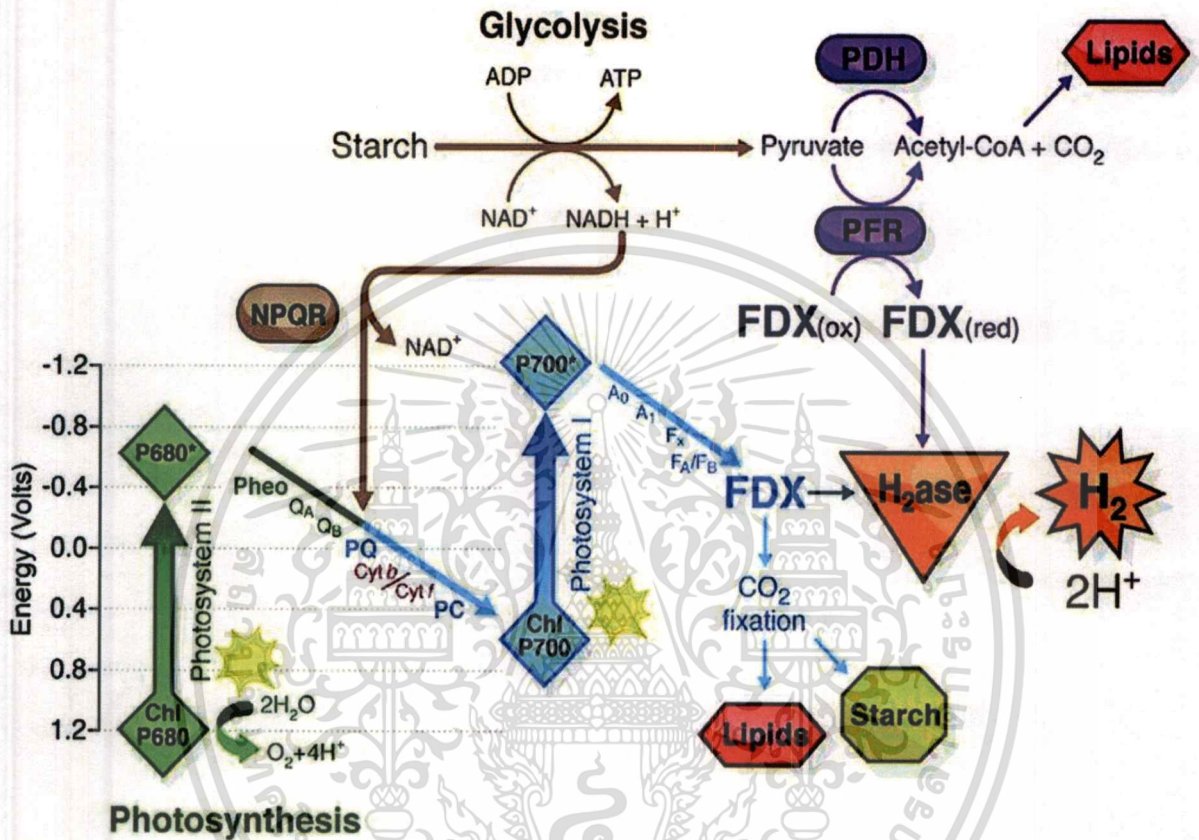
ในปัจจุบันโลกให้ความสนใจเกี่ยวกับการดูแลรักษาสิ่งแวดล้อมมากขึ้นในขณะเดียวกันความต้องการในการใช้พลังงานกลับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และคาดว่าจะขยายตัวเพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ 37 ในปี ค.ศ.2040 อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการลดใช้พลังงานที่ก่อให้เกิดมลพิษและหันมาให้ความสนใจกับพลังงานทางเลือกที่เป็นพลังงานชีวภาพมากขึ้น เนื่องจากเป็นพลังงานสะอาดและไม่ปลดปล่อยมลพิษออกมาภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการเผาไหม้ นอกจากนี้ภาวะโลกร้อน และปริมาณเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ลดน้อยลงยิ่งเป็นแรงกระตุ้นให้เกิดการศึกษาค้นคว้าพลังงานทางเลือกอื่น ๆ รวมถึงพลังงานสะอาดจากจุลินทรีย์ในกลุ่มของสาหร่ายขนาดเล็กโดยการศึกษาที่ผ่านมาถือว่าสาหร่ายขนาดเล็กอาจเป็นแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงชนิดใหม่ในอนาคตเนื่องจากสามารถใช้ในการผลิตพลังงานทางเลือกได้มากมาย อาทิเช่น ไบโอดีเซล, ไบโอมีเทน และ ไฮโดรเจน (Kruse et al., 2005; Chisti, 2007; Schenk et al., 2008)

เชื้อเพลิงไฮโดรเจน ถูกนำไปใช้ในเซลล์ไฟฟ้าเคมีหรือจุลระเบิดในเครื่องสันดาปภายในเพื่อให้พลังงานกับอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์หรือรถไฟฟ้า นอกจากนี้เชื้อเพลิงไฮโดรเจนยังถูกใช้ในการขับเคลื่อนยานอวกาศ และมีศักยภาพที่จะถูกผลิตในเชิงพาณิชย์เพื่อใช้กับกรชนส่งทั้งภาคพื้นดินและทางอากาศ นอกจากนี้เชื้อเพลิงไฮโดรเจนไม่ปล่อยมลภาวะในสิ่งแวดล้อมเนื่องจากภายหลังการเกิดการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์จะได้เพียงความร้อนและโมเลกุลของน้ำ

การผลิตแก๊สไฮโดรเจนมีหลากหลายวิธีโดยกระบวนการที่แตกต่างกัน การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีทางชีววิทยานั้นก็ยังสามารถทำได้ในหลากหลายรูปแบบ โดยใช้จุลินทรีย์เนื่องจากมีจุลินทรีย์ทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอตมากมายที่สามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้ การผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยสาหร่ายจึงเป็นวิธีหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายเป็นที่ยอมรับมากกว่า 55 ปีแล้ว

ในปัจจุบันมีการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากสาหร่ายมากมายหลายหลายวิธีโดยส่วนใหญ่มักจะผลิตแก๊สไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเนื่องจากอากาศจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งส่งผลโดยตรงต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่าย ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายเป็นกระบวนการหลักที่ทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย เนื่องจากการผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยสาหร่ายต้องทำในสภาวะที่ปราศจากอากาศจึงจำเป็นต้องใช้ต้นทุนสูงในการทำให้เกิดสภาวะที่ไม่มีอากาศในการบ่มเลี้ยงสาหร่ายให้เกิดการผลิตไฮโดรเจน และยังห่างไกลกับจุดคุ้มทุนอยู่มาก ในปัจจุบันจึงมีวิธีทางชีววิทยาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากมายเพื่อเพิ่มจุดคุ้มทุนในการผลิตไฮโดรเจน เส้นทางการเกิดปฏิกิริยาที่สาหร่ายสีเขียวใช้ในการผลิตไฮโดรเจนแสดงดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 เส้นทางการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง และปฏิกิริยาไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว

จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงเป็นที่มาของงานวิจัยที่มุ่งศึกษาการผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยวิธีทางชีววิทยาโดยใช้สาหร่ายสีเขียวในสภาวะที่มีอากาศ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนในสภาวะที่มีอากาศ และศึกษาปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อการผลิตแก๊สไฮโดรเจน ได้แก่ อิทธิพลของความเข้มแสงในหน่วยลักซ์, การขาดธาตุอาหารต่าง ๆ ในสภาวะบ่มเลี้ยง และปริมาณเซลล์เริ่มต้นของสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 และ *Chlorella* sp. KLS59 ในสภาวะที่มีอากาศ
- 1.2.2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อการผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้แก่ ความเข้มแสง, การขาดธาตุอาหาร และปริมาณเซลล์ที่ให้ในการผลิตไฮโดรเจน

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาการผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยสาหร่ายสีเขียวในสภาวะที่มีอากาศ โดยทำการศึกษาจากพารามิเตอร์ที่คาดว่าจะส่งผลต่อปริมาณแก๊สไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น และทำการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสองสายพันธุ์ โดยพารามิเตอร์ที่จะศึกษาที่คาดว่าจะมีผลต่อความสามารถในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์มีดังนี้คือ ความเข้มแสง, การขาดธาตุอาหาร และปริมาณเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวขณะที่มีการผลิตแก๊สไฮโดรเจน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1. ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับการผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยสาหร่ายสีเขียวในสภาวะที่มีอากาศ
- 1.4.2. ทราบถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์
- 1.4.3. ต่อยอดองค์ความรู้ที่ได้จากการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

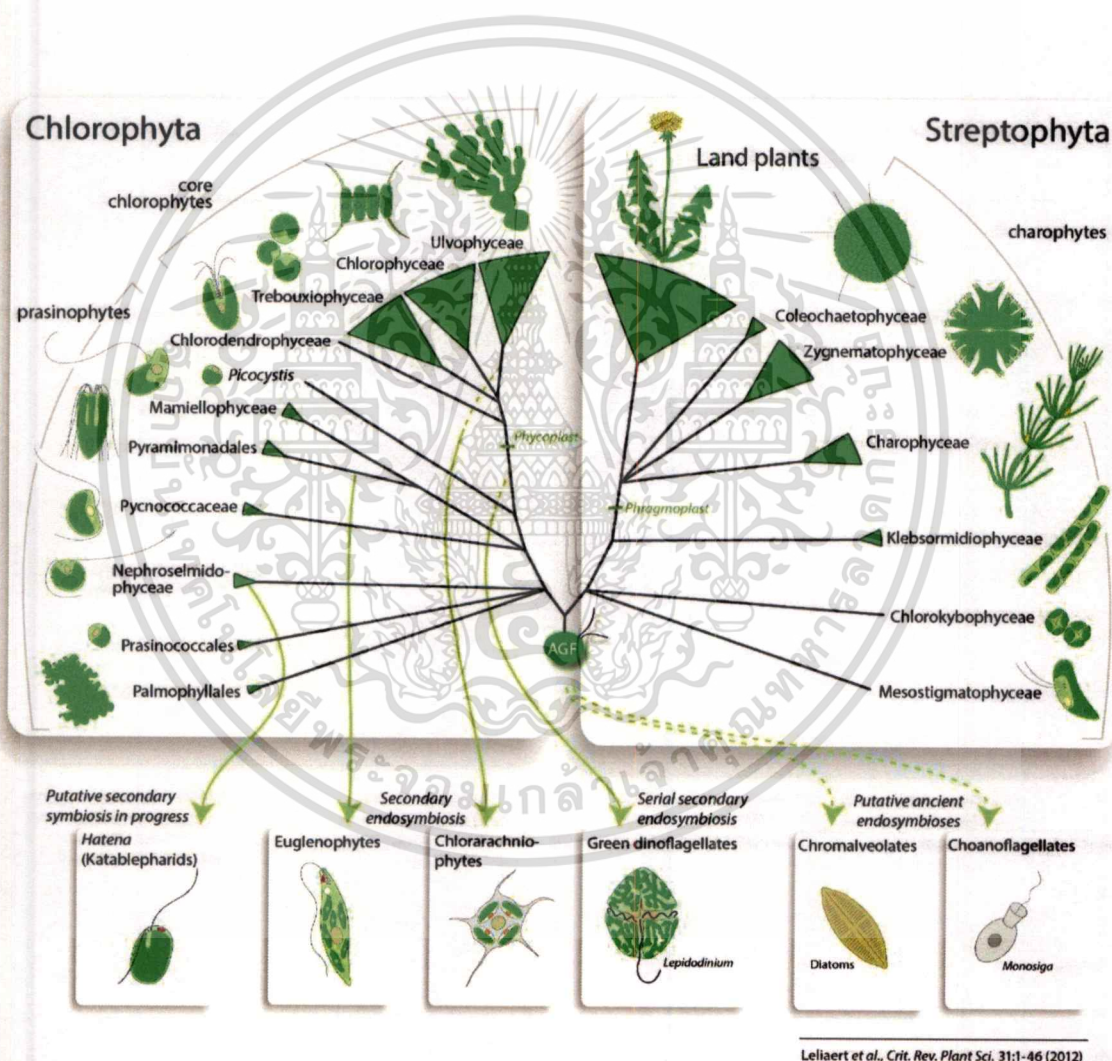
2.1 สาหร่ายสีเขียว

ดิวิชันคลอโรไฟตา (Chlorophyta) สาหร่ายใน division นี้ มีประมาณ 6,000 species มีลักษณะหลายอย่างที่พอเชื่อได้ว่า พืชชั้นสูงมีวิวัฒนาการมาจาก green algae ส่วนใหญ่เป็นพวกน้ำจืด มีบาง species ที่อยู่ในน้ำเค็มบางชนิดก็อยู่บนบก (terrestrial) ตามดินหรือหินที่ชุ่มชื้น และตามเปลือกต้นไม้ใหญ่ สาหร่ายสีเขียวเป็นพวกเซลล์เดี่ยว (unicellular) แต่อาจอยู่รวมเป็นกลุ่ม (colonies) เป็นรูปร่างคล้ายใบไม้หรือเป็นเส้น (filament) แต่ละเซลล์มี nucleus อยู่ 1 อัน ผนังเซลล์ประกอบด้วยเซลลูโลส อาหารจะถูกเก็บไว้ในเซลล์ในรูปของแป้ง การสืบพันธุ์ มีทั้งแบบ asexual และ sexual ทั้งนี้แล้วแต่ species แบบ asexual โดยการแบ่งเซลล์ และ fragmentation หรือสร้าง spore ในเซลล์ แบบ sexual โดยการรวมตัวของ gametes green algae ที่ถือว่า primitive ที่สุด เป็นพวกเซลล์เดี่ยวโดด ๆ เซลล์เคลื่อนที่ได้โดยอาศัย flagella ตัวอย่างได้แก่ chlamydomonas ซึ่งเป็นพวกที่เก่าแก่และเชื่อว่าเป็นพวกที่วิวัฒนาการไปเป็นพืชชั้นสูง รูปร่างทั่วไปเป็นเซลล์เดี่ยว กลมๆ มี cell wall เป็น cellulose ในเซลล์มี chloroplast ใหญ่รูปกล้วยซึ่งภายในมี pyrenoid เป็นแหล่งเก็บสะสมแป้ง (starch) นอกจากนี้ยังมี eye spot สีแดง nucleus ที่กลางเซลล์ 1 อัน และ contractile vacuole 2 อัน การสืบพันธุ์เป็นแบบ asexual โดยสร้าง spores 2 – 3 อันในเซลล์ spore นี้ว่ายน้ำได้โดยอาศัย flagella จึงมีชื่อเรียกว่า zoospore การสืบพันธุ์แบบ sexual เซลล์สร้าง gametes โดยแบ่งตัวแบบ mitosis หลายครั้ง แล้วจึงปล่อย gametes ออกมาผสมกันภายนอก zygote ที่ได้แบ่งตัวแบบ meiosis อีก 1 ครั้งได้ zoospore 4 แต่ละเซลล์จะเติบโตไปเป็น mature cell ต่อไป green algae หลายชนิด อยู่รวมกันเป็นสาย สาหร่ายสีเขียวมีหน้าที่เป็นผู้ผลิตอาหารและก๊าซออกซิเจนแก่ระบบนิเวศ สามารถสังเคราะห์แสงได้เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์จึงช่วยเพิ่มออกซิเจนให้กับแหล่งน้ำ สาหร่ายส่วนใหญ่แบ่งเซลล์ได้อย่างรวดเร็วจึงทำให้มีสารไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนสูง ผนังเซลล์เป็นสารประกอบพวกเซลลูโลส ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวคือ มีคลอโรฟิลล์ทั้งชนิด เอ บี แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ , อาหารสะสมเป็นพวกแป้ง , ผนังเซลล์เป็นสารเซลลูโลส อาจมีแคลเซียมและซิลิกาปน , มีแฟลกเจลลาอยู่ด้านหน้าของเซลล์ , อยู่รวมกันหลายเซลล์เป็น Colony Volvox ลักษณะที่สำคัญของสาหร่ายสีเขียว คือ สารสีสังเคราะห์แสง (Photosynthesis pigments) ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์เอ, บี และสารสีประกอบได้แก่ แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ เป็นสารชนิดเดียวกับที่พบในพืชชั้นสูง , ผนังเซลล์ ส่วนใหญ่มีผนังเซลล์ 2 ชั้น (แต่บาง Class ก็ไม่มีผนังเซลล์ มีเยื่อหุ้มแทน) ผนังชั้นนอกเป็นพวกเพคติน ผนังชั้นในพวกเซลลูโลส หนวด (Flagella) พบเฉพาะพวก

เอ็กสาร์ราเป็นอีกกลุ่มที่สังเคราะห์ไนโตรเจนเพื่อใช้ในการดำรงชีพและใช้ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เคลื่อนไหวได้ หนวดเป็นชนิดเรียวคล้ายแส้ (acronematic type) จำนวนมี 1,2,4,8 หรือเป็นวง ความยาวหนวดถ้ามากกว่า 1 เส้น จะเท่ากันทุกเส้น , ผลผลิตจากการสังเคราะห์แสง อาหารสะสม เป็นแป้ง สะสมในส่วนของเซลล์ที่เรียกว่า ไพรีนอยด์ แป้งประกอบด้วย อะไมโลส และอะไมโล เพคติน, ตำแหน่งของ Photosynthesis pigments สารสีอยู่ในออร์แกเนลที่มีรูปร่างที่แน่นอนเรียกว่า คลอโรพลาสต์ มีรูปร่างลักษณะต่าง ๆ เช่นรูปถ้วย เป็นวงรอบเซลล์ รูปเกือบวง ติ่งยื่น เป็นขดเกลียว แฉกรูปดาว หรือเป็นแถบข้างเซลล์ , รูปร่างของเซลล์ มีทั้งเป็นเซลล์เดี่ยว กลุ่มเซลล์ หรือต่อเป็นเส้นสาย การจัดจำแนกสาหร่ายสีเขียวแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ภาพแผนภูมิการจัดจำแนกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 สาหร่ายสีเขียวคลอเรลลา (*Chlorella* sp.)

ในปี ค.ศ. 1890 เอ็ม ดับพลิว ไบเจอร์นิค (M.W.Beijerinck) นักจุลชีววิทยาชาวดัตช์ ได้ ค้นพบ *Chlorella* sp. เป็นคนแรก ชนิดที่ค้นพบได้ คือ *Chlorella vulgaris*. โดยชื่อ *Chlorella* นั้นมาจากภาษากรีก คำว่า คอลโรส (Chloros) ที่แปลว่า สีเขียว รวมกับภาษาละติน คำว่า เอลล่า (Ella) ที่แปลว่า เล็ก นอกจากนี้ ยังเชื่อกันว่า *Chlorella* sp. อาจเป็นลูกโซ่ของจรรยาอาหาร

อย่างแรกที่เกิดในสภาพของพืชเซลล์เดี่ยวที่มีนิวเคลียสและผนังเซลล์ที่สมบูรณ์ คลอเรลลาเป็น สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 4-10 ไมโครเมตร ไม่มีแฟลกเจลลา คลอโรพลาสต์มีลักษณะเป็นรูปถ้วย หรือเป็นแผ่นอยู่ริมเซลล์ ประกอบไปด้วยคลอโรฟิลล์เอ และบี คลอเรลลา ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์, น้ำ, แสงแดดและสารอาหารเพียง เล็กน้อยเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ในธรรมชาติมักสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการ สร้างอโตสปอร์จำนวน 2, 4, 6, 8 และ 16 โดยที่ จำนวนของอโตสปอร์ (autospore) จะมาจาก mother cell ซึ่งถูกควบคุมโดยสภาวะภายในและภายนอก ลักษณะเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวคลอเรลลาแสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ภาพสาหร่าย *Chlorella* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดเซลล์ 10 μm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 สาหร่ายสีเขียวเตตราสปอรา (*Tetraspora* sp.)

เตตราสปอราเป็นสาหร่ายสีเขียวที่พบภายในกลุ่มโมโนไฟเลติก (monophyletic) ไฟลัมคลอโรไฟตา (Chlophyta) สาหร่ายชนิดนี้สามารถพบได้ในน้ำจืด บางกรณีอาจพบสภาพแวดล้อมอื่น ๆ เช่น ในทะเลหรือแม้แต่แหล่งน้ำที่ปนเปื้อน สาหร่ายชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วโลกยกเว้นที่แอนตาร์กติกา การสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นบริเวณคอโรพลาสต์รูปถ้วย และมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศโดยจะใช้การสืบพันธุ์แบบไมโทซิส (mitosis) เป็นหลัก สาหร่ายชนิดนี้ถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1818 โดย Link ex Desvaux อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ระดับโมเลกุลพบว่าเตตราสปอราที่มีฐานวิทยาพื้นฐานคล้ายกับคลาไมโดโมนาส (*Chlamydomonas* sp.) ลักษณะเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวเตตราสปอราแสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ภาพสาหร่าย *Tetraspora* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 600X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 พลังงานไฮโดรเจน

ในปัจจุบันความต้องการใช้พลังงานของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น รวมถึงประเทศไทยเองก็มีการเติบโตในภาคอุตสาหกรรมอย่างต่อเนื่อง ผลกระทบที่ตามมาคือ ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลต่าง ๆ เช่น ปิโตรเลียม แก๊สธรรมชาติ และถ่านหินที่ปล่อยออกมาจากภาคอุตสาหกรรม และระบบขนส่งก็เพิ่มสูงขึ้นด้วย จากข้อมูลของ Carbon Dioxide Information Analysis Center แสดงให้เห็นว่าปริมาณการปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่อประชากรทั่วโลกเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งหากเชื้อเพลิงฟอสซิลเกิดการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ ก็จะก่อให้เกิดแก๊สเรือนกระจกตามมา ได้แก่ คาร์บอนมอนอกไซด์ และสารประกอบออกไซด์ไนโตรเจน (NO_2) หรือซัลเฟอร์ (SO_2) ในรูปแบบต่างๆ ดังนั้นการหาพลังงานทางเลือกในรูปแบบอื่น ๆ โดยเลือกพลังงานสะอาดมาทดแทนการใช้พลังงานจากแหล่งฟอสซิลก็ถือเป็นหนทางหนึ่งที่น่านำมาใช้แก้ปัญหา

พลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen, H_2) ถือได้ว่าเป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับการเผาไหม้ที่มีประสิทธิภาพสูง สะอาด และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และยังได้รับการยอมรับว่าจะเป็นแหล่งของพลังงานเชื้อเพลิงที่สำคัญอย่างมากในอนาคต ทั้งนี้เนื่องจากพลังงานไฮโดรเจนไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเกิดการเผาไหม้ร่วมกับแก๊สออกซิเจน โดยภายหลังการเผาไหม้จะมีเพียงความร้อน และเกิดไอน้ำเป็นผลพลอยได้ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อเพลิงชนิดอื่น ๆ ที่ภายหลังการเผาไหม้จะได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลพลอยได้ ซึ่งเป็นแก๊สเรือนกระจก และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยตรงก่อการเกิดภาวะโลกร้อน

ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและยังเป็นองค์ประกอบของน้ำ (H_2O) ที่มีมากที่สุดบนโลก นอกจากนี้ไฮโดรเจนยังเป็นธาตุที่รวมอยู่ในโมเลกุลของสารประกอบอื่น ๆ เช่น สารประกอบจำพวกไฮโดรคาร์บอน (HC) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปิโตรเลียมที่มีความสำคัญสำหรับการพัฒนาทางเศรษฐกิจของประเทศ คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน คือไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย มีความสะอาดสูง ไม่เป็นพิษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ประโยชน์ของการนำแก๊สไฮโดรเจนมาใช้งานคือใช้เป็นเชื้อเพลิงในการเผาไหม้และให้ความร้อนออกมา หรือใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงโดยมีปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อทำให้เกิดเกิดกระแสไฟฟ้าซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ทั้งในการขับเคลื่อนในระบบยานยนต์ ผลิตกระแสไฟฟ้า อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ขนาดเล็กและอื่น ๆ แก๊สไฮโดรเจนสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติเมื่อมีปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างกรดกับโลหะ อาจเกิดจากกระบวนการผลิตของแบคทีเรียหรือสาหร่ายบางชนิด อย่างไรก็ตาม แก๊สไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมักจะหายไปในเวลาอันรวดเร็วเนื่องจากน้ำหนักที่เบาจึงทำให้ลอยขึ้นไปในอากาศได้ง่ายเป็นปกติ ดังนั้น เราจึงมักจะพบไฮโดรเจนอยู่ในรูปของน้ำ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ในปี ค.ศ. 1671 รอเบิร์ต บอยล์ (Robert Boyle) ค้นพบว่าการทำปฏิกิริยาระหว่างเหล็กและกรดอ่อนๆ สามารถทำให้เกิดแก๊สไฮโดรเจนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งได้เป็น 3 เทคโนโลยีหลัก คือ 1. กระบวนการความร้อนเคมี Thermo Chemical Process จะใช้วิธีการทางเคมีควบคู่กับการใช้ความร้อน มีวัตถุดิบหลักเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น แก๊สธรรมชาติ ถ่านหิน ผลลัพธ์ที่ได้ คือ แก๊สสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย ไฮโดรเจน H_2 คาร์บอนไดออกไซด์ CO_2 คาร์บอนมอนอกไซด์ CO น้ำ H_2O และมีเทน CH_4 จากนั้นต้องผ่านกระบวนการเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ไฮโดรเจนบริสุทธิ์ โดยผ่านกระบวนการทางความร้อนเคมี ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (Steam Reforming) กระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน Gasification 2. กระบวนการไฟฟ้าเคมี Electro Chemical Process เป็นการใช้ไฟฟ้าในการแยกน้ำเพื่อให้ได้ ไฮโดรเจนและออกซิเจน โดยไฟฟ้าที่มาจากแหล่งกำเนิดไฟฟ้าทุกชนิดจะสามารถใช้ได้กับกระบวนการนี้ ไม่ว่าจะเป็นไฟฟ้าจากแหล่งพลังงานหมุนเวียนหรือจากแหล่งพลังงานนิวเคลียร์ 3. กระบวนการชีวเคมี Biochemical Process เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจน โดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหรือจุลินทรีย์ รวมถึงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเหล่านี้จะเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นไฮโดรเจน แต่มีข้อเสียคือ มีประสิทธิภาพต่ำเนื่องจากความสามารถในการผลิตถูกจำกัดด้วยความเข้มของแสงที่ได้รับ

2.5 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว เป็นการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ยูคาริโอตที่สังเคราะห์ด้วยแสง เช่นเดียวกับสาหร่ายสีแดง และสาหร่ายสีน้ำตาล แตกต่างกับการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์โพรคาริโอตที่มีกลไกการสังเคราะห์แสงแบบเดียวกับพืช ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

2.5.1 กลไกการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

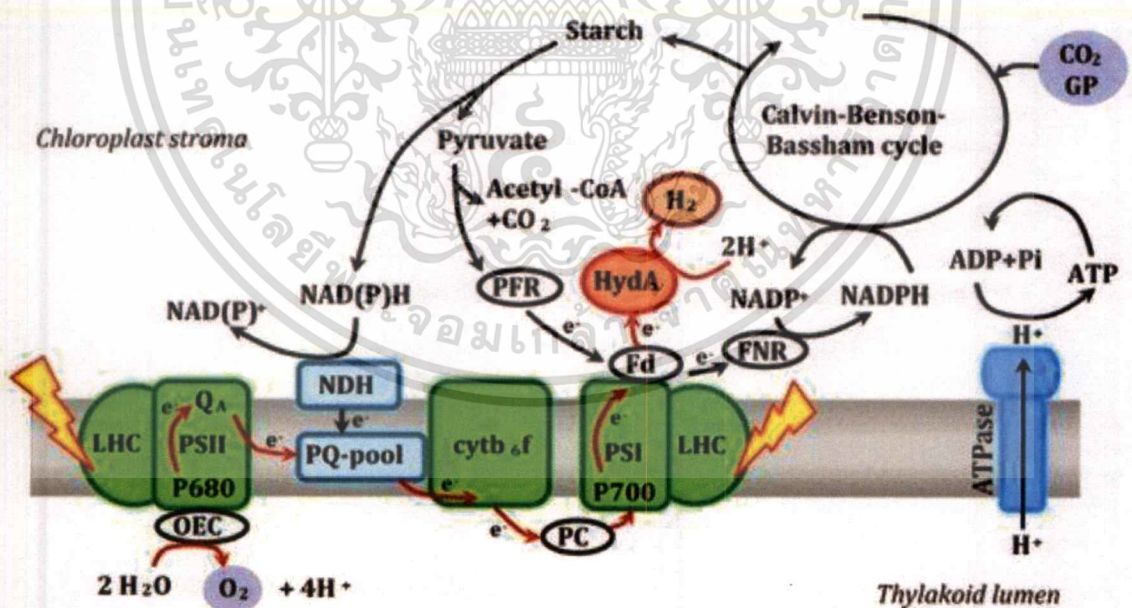
สาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ในสภาวะที่มีมืดและมีแสง โดยที่ความเข้มแสงต่ำจะเกิดการกระตุ้นให้มีการผลิตแก๊สไฮโดรเจนมากกว่าที่ความเข้มแสงสูง เพราะกระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งโดยออกซิเจน โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งส่งผลโดยตรงต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

แก๊สไฮโดรเจนที่เกิดจากสาหร่ายได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่าย โดยสาหร่ายสีเขียวถูกจัดอยู่ในจำพวกโฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic) คือ สามารถสร้างอาหารเองได้โดยการสังเคราะห์ด้วยแสง และใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ก็เป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการสร้างอาหาร

2.5.2 การสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายสีเขียว

การสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายเริ่มจากการสังเคราะห์ที่ระบบแสง 2 (PS II) (รูปที่ 2. 4) โดยจะ
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สมทบไว้สำหรับงานใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ได้รับพลังงานแสงเพื่อกระตุ้นให้อิเล็กตรอนในศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของระบบแสง 2 หลุดออกไป และ
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

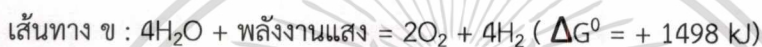
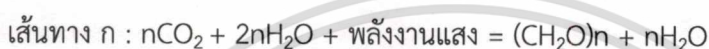
ยังทำให้น้ำเกิดการแตกตัวได้เป็นออกซิเจนอิเล็กตรอนและโปรตอน อิเล็กตรอนที่ได้จากน้ำจะเข้าไปแทนที่อิเล็กตรอนที่หลุดออกมาจากระบบแสง 2 และจะทำการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่หลุดออกมาไปยัง พลาสโตควิโนน (Plastoquinone : PQH₂) ส่งต่อไปยังไซโตโครม b6f (Cyt b6f) และไหลวนกลับมาที่พลาสโตควิโนน (Plastoquinone : PQ) ในขณะที่เดียวกันโปรตอนจะวิ่งลงมาผ่านพลาสโตควิโนน Plastoquinone : PQH₂ พร้อมกับอิเล็กตรอน โปรตอนจะวิ่งจากสโตรมาซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตอนต่ำ (Low H⁺) ไปยังลูเมนที่มีปริมาณโปรตอนสูงกว่า (High H⁺) ส่วนอิเล็กตรอนจะกลับมาในไซโตโครม b6f และเคลื่อนตัวต่อไปโดยมี พลาสโตไซยานิน plastocyanin : PC มารับไปยังระบบแสง 1 (PS I) ในการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนนี้จะสูญเสียพลังงานเป็นอย่างมาก เพื่อใช้ในการปั๊มโปรตอนจากสโตรมาเข้าสู่ลูเมน จึงต้องมีการกระตุ้นพลังงานด้วยแสงใหม่อีกครั้งในระบบแสง 1 การทำงานของระบบแสง 1 จะคล้ายกับระบบแสง 2 คือเมื่อได้รับพลังงานจากแสงแล้วก็จะทำให้อิเล็กตรอนในศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของระบบแสง 1 หลุดออกมาไปยังสโตรมาและอิเล็กตรอนที่วิ่งมาจากระบบแสง 2 ก็จะมาแทนที่อิเล็กตรอนที่หลุดไป หลังจากนั้นอิเล็กตรอนที่หลุดออกมาจะเคลื่อนที่ไปยังเฟอริดอกซิน (ferredoxin : Fd) แล้วรีดิวซ์ NADP⁺ ให้กลายเป็น NADPH โดยเอนไซม์เฟอริดอกซินเอ็นเอตีพีรีดักเตส (ferredoxin-NADP reductase : Fp) โปรตอนที่อยู่ในลูเมนจะค่อย ๆ เคลื่อนขึ้นไปใน ATPsynthase และได้ ATP ออกมา แสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ภาพแสดงเส้นทางการเกิดปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นทาง ก ของการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นในสภาวะปกติ โดยจะได้ ออกซิเจนจากการสังเคราะห์ด้วยแสง เฟอร์เรดอกซิน (ferredoxin : Fd) จะทำการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังส่วนประกอบเคมี NADP+ จะได้ NADPH ออกมา NADPH ที่ได้จะทำปฏิกิริยากับ ATP และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ได้เป็นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะนำไปใช้เป็นอาหารและเก็บสะสมต่อไป ส่วนเส้นทาง ข จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะพิเศษ เช่น สภาวะที่ไม่มีแก๊สออกซิเจนและความดันของแก๊สไฮโดรเจนต่ำมาก ๆ เป็นต้น อิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ผ่านเฟอร์เรดอกซิน (Fd) และเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตอน โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยที่ไม่ต้องใช้ ATP ในการทำปฏิกิริยา จะทำให้ได้แก๊สไฮโดรเจนออกมา กลไกนี้ต้องคำนึงถึงเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งมีความไวต่อแก๊สออกซิเจน จากที่กล่าวมาจะได้สมการดังนี้



2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาถึงความสามารถของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวในการผลิตแก๊ส H_2 ในสภาวะที่มีการให้แสงสว่างที่เพียงพอทำให้เกิดเป็นองค์ความรู้ใหม่ทางชีวภาพ ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ในอดีตพบว่าการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวนั้นเกิดในสภาวะแบบไม่ใช้ออกซิเจนและบ่มในที่มืด พบว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ถูกแสดงออกภายใต้สภาวะที่มีการบ่มที่มีแสงและมีการเร่งปฏิกิริยาโดยเฉพาะ ซึ่งจะให้ปริมาณของ H_2 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ที่เป็นรูปแบบโมโนเมอร์ ที่เป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสอีกด้วย (Voordouw *et al.*, 1989; Adams, 1990; Meyer and Gagnon, 1991; Happe *et al.*, 1994)

การแปลรหัสในนิวเคลียสของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว พบว่าโปรตีนที่มีการแสดงออกและแปลรหัส จะทำหน้าที่ในคลอโรพลาสต์ (Happe *et al.*, 1994) การดูดกลืนแสงโดยระบบสังเคราะห์แสงจำเป็นสำหรับการผลิตแก๊สไฮโดรเจน เนื่องจากแสงจะช่วยให้เกิดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลของน้ำ และทำการปล่อยอิเล็กตรอนและโปรตอนและการขนส่งแบบ endergonic ของอิเล็กตรอนเหล่านี้สู่เฟอร์เรดอกซิน การสังเคราะห์แสง ferredoxin (PetF) จะทำหน้าที่เป็นผู้ให้อิเล็กตรอนกับเอนไซม์ Fe-hydrogenase ดังนั้นจึงเป็นการเชื่อมโยงเฟอร์เรดอกซินกับโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียว (Florin *et al.*, 2001) ภายใต้เงื่อนไขการทำงานของเอนไซม์ hydrogenase นั้นเกิดเพียงชั่วคราว (ใช้เวลาไม่กี่วินาทีถึงไม่กี่นาาที) เพราะอิเล็กตรอนและโปรตอนจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยขึ้นกับแสงของน้ำทำให้เกิดการปล่อยโมเลกุลของออกซิเจน และออกซิเจนเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Fe-Hydrogenase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Ghirardi *et al.*, 2000) การศึกษาและพัฒนาปัจจุบันยังไม่สามารถเอาชนะลักษณะพิเศษร่วมกันของปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสงของ O_2 และ H_2 เนื่องจากปัญหาด้านสรีรวิทยาของสาหร่ายและบทบาทของเอนไซม์ Fe hydrogenase ซึ่งโดยปกติแล้วจะเจริญภายใต้สภาวะการสังเคราะห์ด้วยแสงแบบมีอากาศจึงเป็นเรื่องที่ถกเถียงกันมานาน เมื่อพิจารณาถึงความไวของเอนไซม์ O_2 hydrogenase ของเฟอร์เรสไฮโดรเจนและสภาพแวดล้อมของปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นจึงเกิดคำถามว่าเอนไซม์ Hydrogenase นั้นมีส่วนในการวิวัฒนาการของคลอโรพลาสต์ในสาหร่ายสีเขียวด้วยเอนไซม์นี้ และการสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถนำมาใช้ในการผลิตก๊าซ H_2 เพื่อการค้าได้หรือไม่ (Zhang *et al.*, 2001)

อย่างไรก็ตามความสามารถของสาหร่ายสีเขียวในการผลิตก๊าซ H_2 ที่สังเคราะห์ด้วยแสงนั้นทำให้เป็นที่สนใจของวงการวิทยาศาสตร์เนื่องจากความสำคัญพื้นฐานและการปฏิบัติของกระบวนการ ที่อยู่ด้านล่างนี้เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของการสังเคราะห์ด้วยแสงในการผลิตก๊าซ H_2 ของสาหร่ายสีเขียว และปัญหาที่พบเกี่ยวกับเทคโนโลยีปัจจุบัน

1. การสังเคราะห์ด้วยแสงในสาหร่ายสีเขียวสามารถทำงานได้ด้วยประสิทธิภาพการแปลงโฟตอนที่ $\geq 80\%$ (Ley and Mauzerall, 1982)
2. Micro-algae สามารถผลิต H_2 สังเคราะห์ด้วยการแปลงโฟตอนที่ $\geq 80\%$
3. โมเลกุลของ O_2 ทำหน้าที่เป็นสวิตช์ควบคุมที่ทรงพลังและมีประสิทธิภาพซึ่งกิจกรรมการผลิต H_2 จะถูกปิด (Greenbaum, 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่าย

1. สาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* KLS59 ที่ทำการคัดแยกโดย วัชรภรณ์ เสมาชัยและคณะ (2559)
2. สาหร่ายสีเขียว *tetraspora sp.* CU2551 ที่ทำการคัดแยกโดย เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์และคณะ (2554)

3.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย

1. อาหาร TAP (Tris-acetate phosphate medium) pH 7.2
2. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารแคลเซียม หรือ TAP -Ca
3. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมหรือ TAP-K
4. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารไนโตรเจน หรือ TAP-N
5. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารแมกนีเซียมหรือ TAP-Mg
6. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ หรือ TAP-S
7. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารฟอสฟอรัส หรือ TAP-P
8. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารเหล็ก หรือ TAP-Fe
9. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารแมงกานีส หรือ TAP-Mn
10. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารสังกะสี หรือ TAP-Zn
11. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารคอปเปอร์ หรือ TAP-Cu

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base) (CARLO ERBA, India)
2. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (LOBALO Chemie, India)
3. แมกนีเซียมซัลเฟตเพปเตอไซด์ (MgSO₄·7H₂O) (LOBALO Chemie, India)
4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Ajax Finechem Pty, Australia)
5. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (LOBALO Chemie, India)
6. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (LOBALO Chemie, India)
7. เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติคแอซิดไดโซเดียมซอลท์ ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (LOBALO Chemie, India)
9. กรดบอริก (H_3BO_3) (LOBALO Chemie, India)
10. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) (LOBALO Chemie, India)
11. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (LOBALO Chemie, India)
12. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) (CARLO ERBA, India)
13. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (LOBALO Chemie, India)
14. แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) (LOBALO Chemie, India)
15. กรดอะซิติก (CH_3COOH) (CARLO ERBA, India)
16. โซเดียมคลอไรด์ ($NaCl$) (LOBALO Chemie, India)
17. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (LOBALO Chemie, India)
18. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)
19. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)
20. แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) (LOBALO Chemie, India)
21. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (CARLO ERBA, India)
22. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) (LOBALO Chemie, India)
23. อะการ์ อะการ์ (Agar Agar Bacto) (S D fine-chem limited: SDFCL, India)
24. กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$)
25. ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$)
26. กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)
27. ไตรโซเดียมซิเตท ($Na_3C_6H_5O_7$) (Fisher Scientific, USA)
28. โซเดียมไฮโดรเจนไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) (CARLO ERBA, India)
29. โซเดียมเซียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
30. MV (Methyl viologen)
31. 100mM Na-dithionite

3.4 อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glassware)
2. Flask ขนาด 125 ml และจุกสำลี
3. ไมโครปิเปตต์ (Pipet-lite xls, Rainin Mettler Toledo, Switzerland)
4. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
5. เข็มเขี่ยเชื้อแบบกลม (loop)
6. กระบอบอก centrifuge

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 7. ถุงพลาสติก และหนังยาง
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. ขวดสีชา
9. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
10. ขวดแก้ว (Gas-tight vial) ขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร จุกยาง และที่ครอบฝาแบบอะลูมิเนียม
11. เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph)
12. ตู้บ่มแบบเขย่า และ ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
13. ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar Air Flow)
14. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) (JS Research INC, Korea)
15. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
16. เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Thailand)
17. เครื่องวัดแสง (Lux meter)
18. คิวเวต (Semi-micro cuvette, path length 10 mm)
19. กระบอกฉีดยา (Syringe) และเข็มฉีดยา (Hypodermic needle) (Nipro, Thailand)
20. ตัวล็อกเข็มฉีดยา (Syringe valve push button, luer lock) (Sigma-Aldrich, USA)
21. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Berner)
22. เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer)

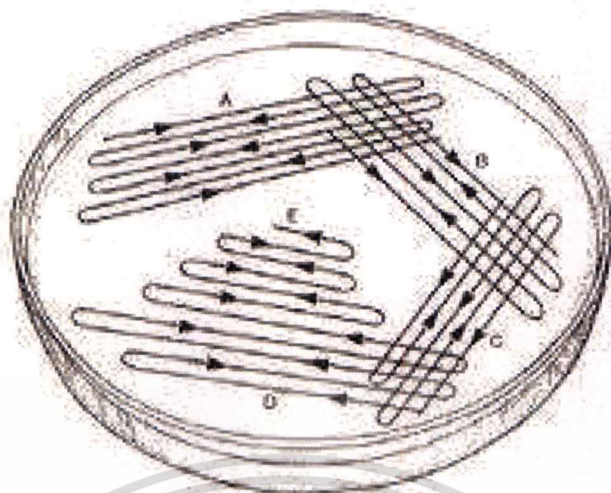
3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว

3.5.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารวุ้น

ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารวุ้นนั้นต้องทำโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ภายในตู้ปลอดเชื้อเพื่อช่วยในการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ และลดข้อผิดพลาดในการเลี้ยงเชื้อได้ ขั้นตอนแรกทำการเตรียมอาหารวุ้น TAP โดยเติม อะการ์ร้อยละ 15 ลงในอาหาร TAP นำไปใส่ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค จากนั้นนำอาหารวุ้นที่ได้เทลงในจานเลี้ยงเชื้อรองจานกระทั่งอาหารวุ้นแข็งตัว แล้วใช้ห้วงเขี่ยเชื้อทำการถ่ายเชื้อโดยใช้เทคนิค Streak-plate ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

นำห้วงเขี่ยเชื้อมาลนไฟจนกระทั่งปลายลวดร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดอยู่ในห้วงเขี่ยเชื้อ รอให้เย็น จากนั้นแตะตัวอย่างสาหร่ายและขีด (Streak) ลงบนจานเพาะเชื้อ โดยขีดให้อยู่ในแนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น ซึ่งในระนาบแรกนั้นจะมีเชื้อของสาหร่ายสีเขียวอยู่หนาแน่นที่สุด หลังจากนั้นนำ ห้วงเขี่ยเชื้อมาลนไฟอีกครั้ง เพื่อฆ่าเชื้อที่ยังติดอยู่ให้หมด แล้วขีดเชื้อต่อจากรอยลากในระนาบแรกเพียงครั้งเดียว และขีดให้อยู่ในแนวระนาบที่สองให้ติดต่อกัน 4-5 เส้นอีกครั้ง โดยรอยขีดของเชื้อในระนาบที่สองต้องไม่ทับกับรอยขีดของเชื้อในระนาบแรกอีก หลังจากนั้นทำเช่นเดียวกับในระนาบที่สองจนกระทั่งครบทั้งจานเลี้ยงเชื้อ นำจานเพาะเลี้ยงที่ขีดเชื้อแล้วไปบ่มที่ตู้บ่มที่มีอุณหภูมิคงที่ที่ 36 องศาเซลเซียส ความเข้ม แสง 3,800 ลักซ์ โดยทำการบ่มจนกระทั่งได้สาหร่ายเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ขึ้นบนหน้าอาหารวุ้น TAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 แสดงการแยกเชื้อด้วยวิธี Streak-plate
ที่มา : <http://pirun.ku.ac.th/~b521020210/หน้า10.html>

3.5.2 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว

ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว (broth) นั้นควรทำโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ภายในตู้ปลอดเชื้อเช่นเดียวกัน เริ่มจากใช้ ไมโครปิเปตต์ขนาด 5000 ไมโครลิตร นำมาใช้ดูดอาหาร TAP ปริมาตร 50 ml จากนั้นนำไปใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำหัวงูเขี่ยเชื้อมาลนไฟให้ลวดที่ปลายร้อนจนเป็นสีแดง ทิ้งให้เย็นประมาณ 20 วินาที นำหัวงูเขี่ยเชื้อเขี่ยสาหร่ายสีเขียวที่อยู่บนผิวหน้าของจานอาหารเลี้ยงเชื้อจุ่มลงไปขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีการลนไฟตรงบริเวณปากขวดก่อน จากนั้นนำจุกสำลีมาปิดปากขวดไว้ แล้วนำขวดรูปชมพู่ที่ลงเชื้อเสร็จเรียบร้อยแล้วไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ บ่มในสภาวะที่มีแสงในความเข้มแสง 3000 ลักซ์ อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อครบ 24 ชั่วโมงนำเอาสาหร่ายในขวดรูปชมพู่ไปปั่นเก็บเซลล์ โดยการใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ภายในตู้ปลอดเชื้อเช่นเดียวกัน โดยนำเซลล์สาหร่ายจากขวดรูปชมพู่ใส่กระบอก centrifuge ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) นำไปปั่นเก็บเซลล์โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง ใช้ความเร็วรอบ 4500 rpm เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำน้ำกลั่นใส่ลงในกระบอก centrifuge แล้วนำไป vortex เพื่อล้างเอาอาหาร TAP เก่าออกจากเซลล์สาหร่าย ให้ล้างเซลล์ทั้งหมด 3 รอบ จากนั้นรอบสุดท้ายจะเทน้ำกลั่นออกให้เหลือน้ำกลั่น 5 หรือ 10 ml บนผิวหน้าเซลล์สาหร่าย แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นเพื่อใช้เป็นสาหร่ายตั้งต้นในการเลี้ยงจุลชีพสาหร่ายให้เจริญเติบโตและผลิตไฮโดรเจนในสภาวะต่างๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 แสดงการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว TAP ในตู้บ่ม

3.6 วิธีศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่เก็บไว้ในกระบอก centrifuge ไปเลี้ยงใหม่เพื่อเป็นการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ในขวดรูปชมพู่ ที่มีอาหาร TAP 50 ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อที่จะนำไปทำการทดลองต่อ ขั้นตอนนี้ควรทำโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ภายในตู้ปลอดเชื้อเช่นเดียวกัน จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายที่ถูกกระตุ้นการเจริญแล้ว นำไปปั่นเพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ด้วยเครื่อง centrifuge เหนส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น เมื่อล้างเซลล์เสร็จแล้วให้นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อหาความเข้มข้นของเซลล์ว่ามีค่าเท่าไรโดยจะใช้เวลาความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร หลังจากวัดเสร็จแล้วนำมาคำนวณเพื่อหาปริมาณของเซลล์สาหร่ายเพื่อที่จะให้เซลล์เริ่มต้นของการทดลองอยู่ในช่วง 0.1 ใส่อาหารที่เราเตรียมไว้ปริมาตร 2 ml ลงใน gas-tight vial ขนาด 100 มิลลิลิตร ปิดขวดด้วยจุกยางและฝาปิดอะลูมิเนียม โดยขั้นตอนทั้งหมดต้องทำภายในตู้ปลอดเชื้อเช่นเดียวกัน (ยกเว้นการทดลองสุดท้ายที่เป็นการไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองความเข้มข้นของเซลล์) จากนั้นทำการบ่มเพื่อให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนในตู้บ่มสำหรับการบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) จะบ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ภายหลังจากที่สารละลายแขวนลอยเซลล์ของสาหร่ายถูกนำไปเลี้ยงใน vial ในสภาวะต่างๆที่ต้องการศึกษา vial ของทุกชุดการทดลองจะถูกนำไปตรวจสอบปริมาณแก๊สไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นซึ่งเกิดจากกิจกรรมของสาหร่ายโดยใช้ Gas Chromatograph - Thermal conductivity detector (GC-TCD) แสดงดังตารางที่ 3.1 หลังจากนั้นนำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้จากโครมาโตแกรมมาคำนวณการผลิต ไฮโดรเจนในสาหร่าย โดยเทียบกับก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน แสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก

ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี เทอร์มอลคอนดักติวิตี ดีเทคเตอร์ (Gas Chromatography- Thermal conductivity detector; GC-TCD)

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Carrier Gas	Argon flow rate 30 ml/min (99.999% purity)
Column	- Pack column 1.5 m X 1.0 mm - Molecular sieve 5A mesh 80/100
Detector	Thermal conductivity detector (TCD)
Temperature Program	- Injector temperature: 100 °C - Oven temperature: 40 °C - Detector temperature: 200 °C

3.7 วิธีศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะต่างๆ

3.7.1 อิทธิพลของแสง

ในการศึกษาปัจจัยทางแสงผู้ทำการทดลองจะศึกษาปัจจัยทางด้านความเข้มแสงในหน่วยลักซ์ กำหนดค่าความเข้มแสงที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0 1,000 2,000 3,000 ลักซ์ โดยสารละลายแขวนลอยเซลล์ของสาหร่ายที่เตรียมไว้ (ตามวิธี 3.6) จนเซลล์มีอายุ 24 ชั่วโมง นำเครื่องวัดแสง Lux Meter วัดที่บริเวณต่างๆภายในตู้บ่ม จากนั้นนำกระดาษสีดำมาพันรอบขวดที่มีความเข้มแสง 0 ลักซ์ แล้วใช้ถุงพลาสติกพันที่ขวดแต่ละความเข้มแสง จากนั้นวัดปริมาณแก๊สไฮโดรเจนที่เวลาต่างๆจนกระทั่งพบว่าแก๊สไฮโดรเจนมีปริมาณเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.2 การทดสอบการขาดธาตุอาหาร

นำสาหร่ายสีเขียวมาทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ตามวิธีที่ 3.6) จนเซลล์สาหร่ายมีอายุ 24 ชั่วโมง ทำการปั่นเก็บเซลล์โดยล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง บ่มเซลล์สาหร่ายในอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ คือ อาหาร TAP ที่ขาดธาตุแคลเซียม (TAP-Ca) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุแมกนีเซียม (TAP-Mg) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ (TAP-S) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุเหล็ก (TAP-Fe) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุแมงกานีส (TAP-Mn) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุสังกะสี (TAP-Zn) และ อาหาร TAP ที่ขาดธาตุคอปเปอร์ (TAP-Cu) (ภาคผนวก ก) บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าแล้วทำการวัดปริมาณแก๊สไฮโดรเจนที่เวลาต่างๆ จนกระทั่งไม่พบว่ามีแก๊สไฮโดรเจนมีปริมาณเพิ่มขึ้น

3.7.3 ความเข้มข้นเซลล์ที่ระดับต่างกันที่มีผลต่อการเกิดก๊าซไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียวมาทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ตามวิธี 3.6) ซึ่งวิธีนี้ในการเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมงจะใช้อาหารTAPปกติ จากนั้นปั่นเซลล์นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เพื่อหาความเข้มข้นเซลล์เพื่อที่จะเอามาคำนวณ ซึ่งอาหารที่จะใช้คือ TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) เพราะจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าอาหาร TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) จะทำให้สาหร่ายผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุด จากนั้นใส่เซลล์ที่ความเข้มข้นที่ต่างกันลงในอาหาร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า วัดปริมาณแก๊สไฮโดรเจนที่เวลาต่างๆจนกระทั่งไม่พบว่ามีแก๊สไฮโดรเจนมีปริมาณเพิ่มขึ้น

เตรียมเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP ปกติและอาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหาร -K มาใส่ในขวดไวแอลอย่างละ สามซ้า แล้วนำไปวัดปริมาณแก๊ส

3.8 การตอบสนองของระดับเซลล์

3.8.1 การผลิตออกซิเจนของเซลล์

นำเซลล์สาหร่ายใส่ลงในอาหาร TAP และ อาหาร TAP-K ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในขวดไวแอลปริมาตร 13 มิลลิลิตร ทำทั้งหมดสามซ้า จากนั้นนำอาหารทั้ง 6 ขวดไปวางไว้กลางแดด วัดความเข้มแสงและวัดอุณหภูมิ ด้วยเครื่องวัดแสง Lux meter ทิ้งไว้ครึ่งกลางแดด พอครบทุกครั้งชั่วโมงให้นำแต่ละขวดไปวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ทำให้ครบ 6 ขวด ทำซ้า 5 ครั้ง.

3.8.2 กิจกรรมของเอนไซม์

การทดลองนี้เราจะเตรียมสารทั้งหมด 4 ขวด แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน เริ่มจาก

ขั้นตอนที่ 1 เตรียม 0.2% Triton x-100 ใน 50 mM K-PO₄ buffer pH 6.9 เตรียม 100 มิลลิลิตร จากนั้นชั่ง K₂HPO₄ 0.871 กรัม ละลายน้ำ 80 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 6.9 ด้วย 0.5-1 M HCL จึงปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL จากนั้นเติม Triton X-100 0.2 มิลลิลิตร ลงในบัฟเฟอร์ จากนั้นบรรจุ 7 มิลลิลิตร ลงในขวด 13 มิลลิลิตร จากนั้นให้ปิดฝาแล้วรอเป่าก๊าซอาร์กอน ทำ 2 ขวด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 2 เตรียมสาร 40 มิลลิโมล MV ปริมาตร 5 mL ชั่ง MV มา 0.05 กรัม จากนั้นให้เติมน้ำลงไป 5 มิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 3 เตรียมสาร 100 mM Na-dithionite ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยทำการชั่งสาร 0.087 กรัม แล้วนำไปละลายน้ำ 5 มิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 4 เตรียมเซลล์ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร TAP และในอาหาร TAP -K อย่างละ 1 ขวด จากนั้นเราจะมาทำ assay โดยการนำขวดไวแอลเปล่ามา 4 ขวด เป่าก๊าซอาร์กอนใส่ลงไปในช่วงเพื่อเป็นการไล่แก๊สที่ตกค้างในขวดไวแอลให้ออกจากขวดจากนั้นใส่ 250 มิลลิลิตรของ MV, 750 มิลลิลิตรของ buffer, 1 มิลลิลิตรของเซลล์สำหรับ tetra ตามลำดับ โดยต้องล้างเข็มด้วยก๊าซอาร์กอนทุกครั้ง จากนั้นให้ใส่ 100 มิลลิลิตรของ Na-dithionite ลงในแต่ละขวดเพราะสารตัวนี้จะไปทำปฏิกิริยาเกิดการเปลี่ยนสีจากสีเขียวของเซลล์สำหรับไปเป็นสีม่วงเข้ม ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงนำไปตรวจสอบปริมาณแก๊สไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นโดยใช้ Gas Chromatograph -Thermal conductivity detector; (GC-TCD)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

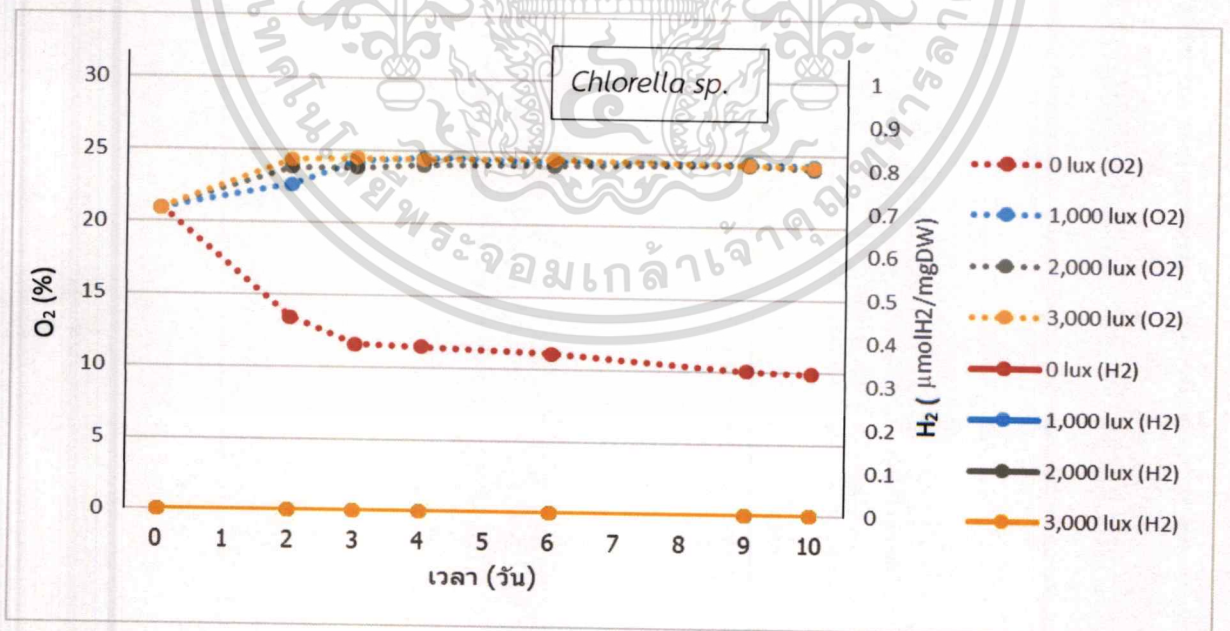
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

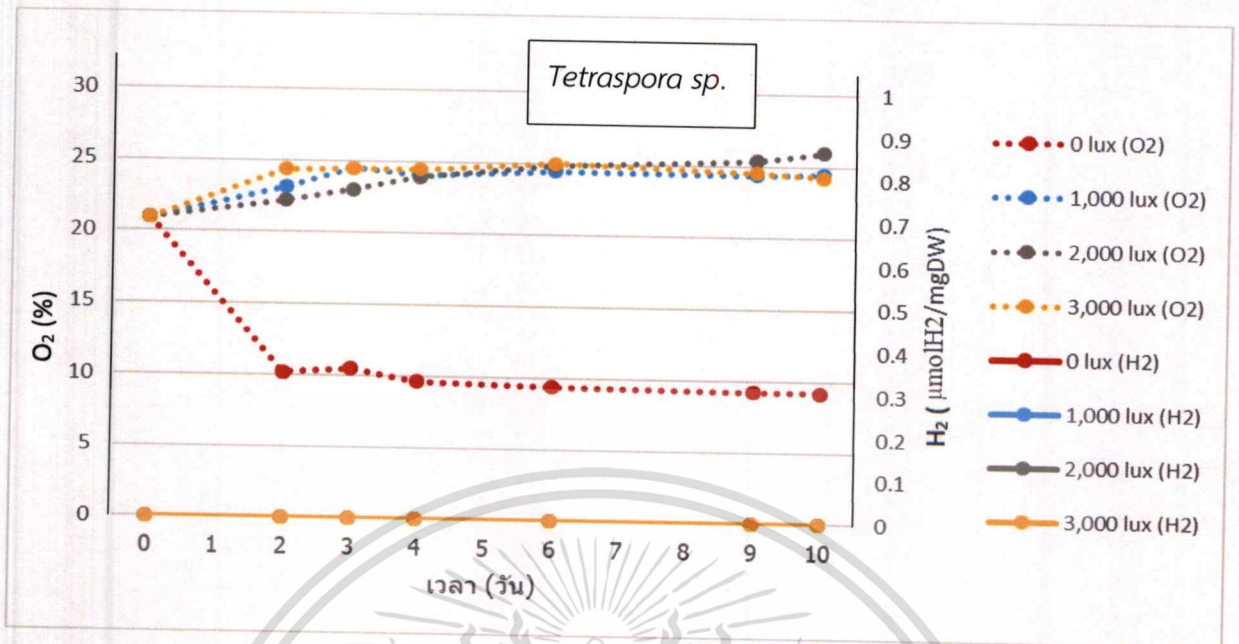
การทดลองการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีอากาศนั้นทำขึ้นเพื่อเพิ่มโอกาสในการหาพลังงานทางเลือกเพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนในรูปแบบของแก๊สชีวภาพ โดยทำการทดสอบภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ถึงแม้ว่าออกซิเจนจะเป็นตัวยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวก็ตาม ในการศึกษาใช้สาหร่ายสีเขียวสองชนิด ได้แก่ *Tetraspora* sp. CU2551 และ *Chlorella* sp. KLS59 โดยกำหนดปัจจัยที่คาดว่าจะส่งผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์ ได้แก่ อิทธิพลของแสง การขาดธาตุอาหาร และปริมาณเซลล์ ผลการศึกษาเป็นไปดังนี้

4.1 อิทธิพลของแสง

จากการศึกษาอิทธิพลของแสงโดยกำหนดเงื่อนไขความเข้มแสงที่ 0 - 3,000 ลักซ์ ในสาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์เป็นเวลา 10 วันพบว่า อิทธิพลของแสงส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์ โดยที่ความเข้มแสง 1,000 - 3,000 ลักซ์จะพบการเพิ่มขึ้นของออกซิเจนตามลำดับแสดงดังรูปที่ 4.1 นอกจากนี้ที่ความเข้มแสง 0 ลักซ์หรือในสภาวะที่ปราศจากแสงไม่พบการเพิ่มขึ้นของออกซิเจน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)

รูปที่ 4.1 ปริมาณไฮโดรเจน และออกซิเจนจากสาหร่ายสีเขียว

(ก) : *Chlorella sp.* KLSc59(ข) : *Tetraspora sp.* CU2551

จากรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าไม่พบก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้น และปริมาณออกซิเจนในสาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลา 10 วันของการบ่มเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1,000 – 3,000 ลักซ์ ไม่พบว่ามีแก๊สไฮโดรเจนเกิดขึ้นนอกจากนี้ยังมีปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โดยวันที่ 0 มีปริมาณออกซิเจนเริ่มต้นที่เท่ากันคือ 20.95 % และยังพบว่าปริมาณออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นอยู่ในช่วง 20 – 30 % ภายในระยะเวลา 10 วัน แสดงให้เห็นว่า แสงส่งผลโดยตรงต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่สาหร่ายสีเขียวใช้ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนเนื่องจากแสงทำให้ปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้น แสงจึงเป็นหนึ่งในตัวแปรที่สำคัญทั้งในระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 1 และระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 2 เมื่อเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวได้รับพลังงานแสง จะเกิดการกระตุ้นให้อิเล็กตรอนในศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 2 หลุดออกไปทำให้น้ำเกิดการแตกตัวได้เป็นออกซิเจนอิเล็กตรอน และโปรตอน จากที่กล่าวมาข้างต้นที่ความเข้มแสง 1,000 – 3,000 ลักซ์จึงไม่พบไฮโดรเจนเกิดขึ้นเนื่องจากออกซิเจนจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเกิดแก๊สไฮโดรเจน

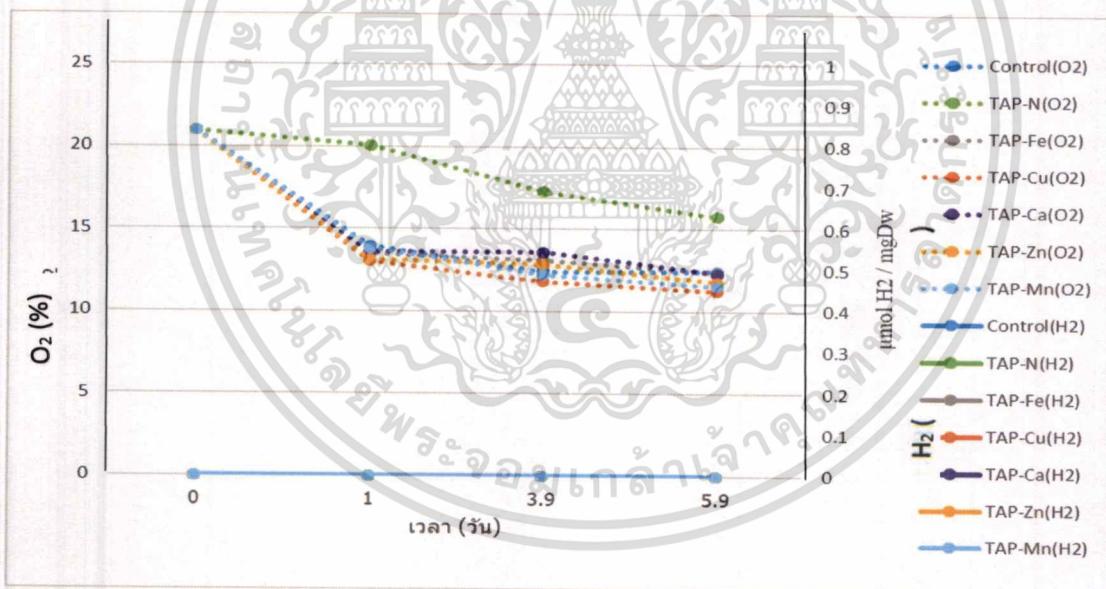
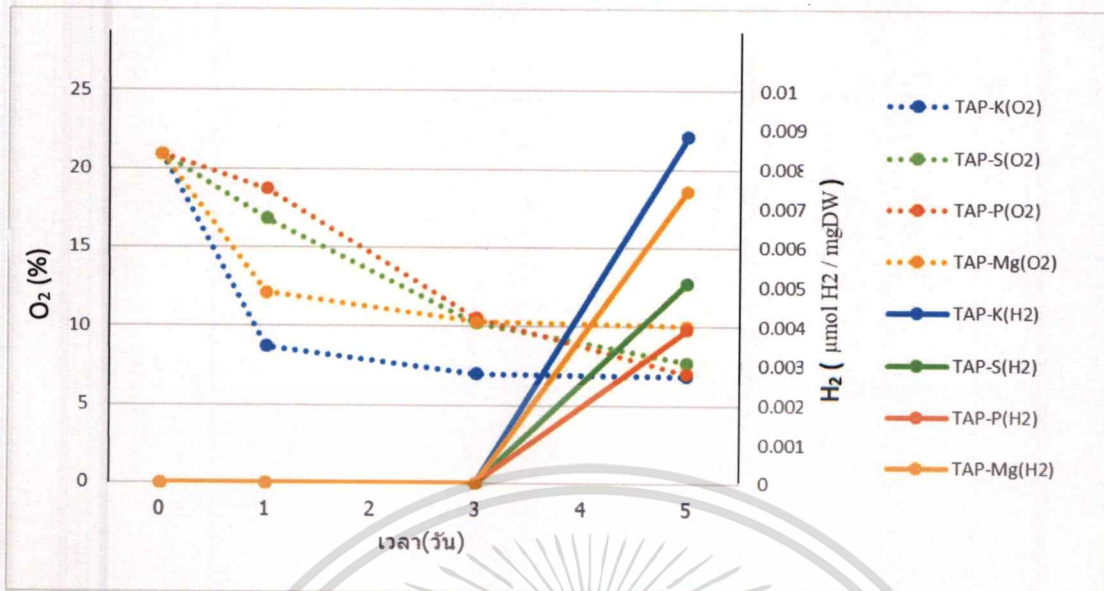
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ความเข้มแสง 0 ลักซ์พบว่าปริมาณออกซิเจนลดต่ำลงจาก 20.95 % ในวันที่ 0 อย่างเห็นได้ชัดเมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน จากนั้นปริมาณออกซิเจนจะค่อยๆ ลดลงอย่างช้า ๆ เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน ที่ความเข้มแสง 0 ลักซ์ หรือสภาวะปราศจากแสงแม้จะยังไม่พบว่ามีแก๊สไฮโดรเจนเกิดขึ้นแต่ปริมาณออกซิเจนลดลง อันเนื่องมาจากเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวไม่ได้รับพลังงานแสง เพราะแสงจะช่วยในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำ และทำการปลดปล่อยอิเล็กตรอนและโปรตอนรวมเพื่อทำการขนส่งซึ่งถือเป็นปฏิกิริยา endergonic (ปฏิกิริยาดูดพลังงาน) ของอิเล็กตรอนเพื่อเข้าสู่ Ferredoxin (Fdx) ที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ซึ่ง Ferredoxin (PetF) จะทำหน้าที่เป็นผู้ให้อิเล็กตรอนกับเอนไซม์ Fe-hydrogenase ที่เชื่อมโยงโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียว อัตราการผลิตไฮโดรเจนจะขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโต (Florin *et al.*, 2001) การบ่มโดยอยู่ในสภาวะไร้อากาศหรือมีปริมาณออกซิเจนต่ำ จะทำให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย เนื่องจากสภาวะไร้อากาศนี้จะทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับของระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 2 ซึ่งจะไปเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้การสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณที่มากขึ้น (T.K. Antal *et al.*, 2003) แต่เนื่องด้วยงานวิจัยนี้ทำการทดลองในสภาวะที่มีอากาศ อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยรายงานว่า การขาดธาตุอาหารจะส่งเสริมให้เกิดผลิตภัณฑ์ไฮโดรเจน จึงได้ทำการทดลองโดยทำการทดสอบการขาดธาตุอาหารต่อไป

4.2 การทดสอบการขาดธาตุอาหาร

จากการศึกษาอิทธิพลของธาตุอาหารโดยจะให้เซลล์อยู่ในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากโพแทสเซียม (TAP-K), Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากซิลเฟอร์ (TAP-S), Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากไนโตรเจน (TAP-N), Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากฟอสฟอรัส (TAP-P), Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากแมกนีเซียม (TAP-Mg), Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากเหล็ก (TAP-Fe), Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากทองแดง (TAP-Cu), Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากแคลเซียม (TAP-Ca), Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากสังกะสี (TAP-Zn) และ Tris-Acetate-Phosphate ที่ปราศจากแมงกานีส (TAP-Mn) โดยมี TAP เป็นชุดควบคุม ทำการบ่มเลี้ยงในสภาวะที่ปราศจากแสงและทำการทดลองในสาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าอิทธิพลของธาตุอาหารส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่สาหร่ายสีเขียวใช้ในการผลิตไฮโดรเจน แสดงดังรูปที่ 4.2 และรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)

รูปที่ 4.2 ปริมาณไฮโดรเจน และออกซิเจนในอาหารต่าง ๆ จากสาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ KLSc59

(ก) : อาหารกลุ่มที่พบการผลิตไฮโดรเจน

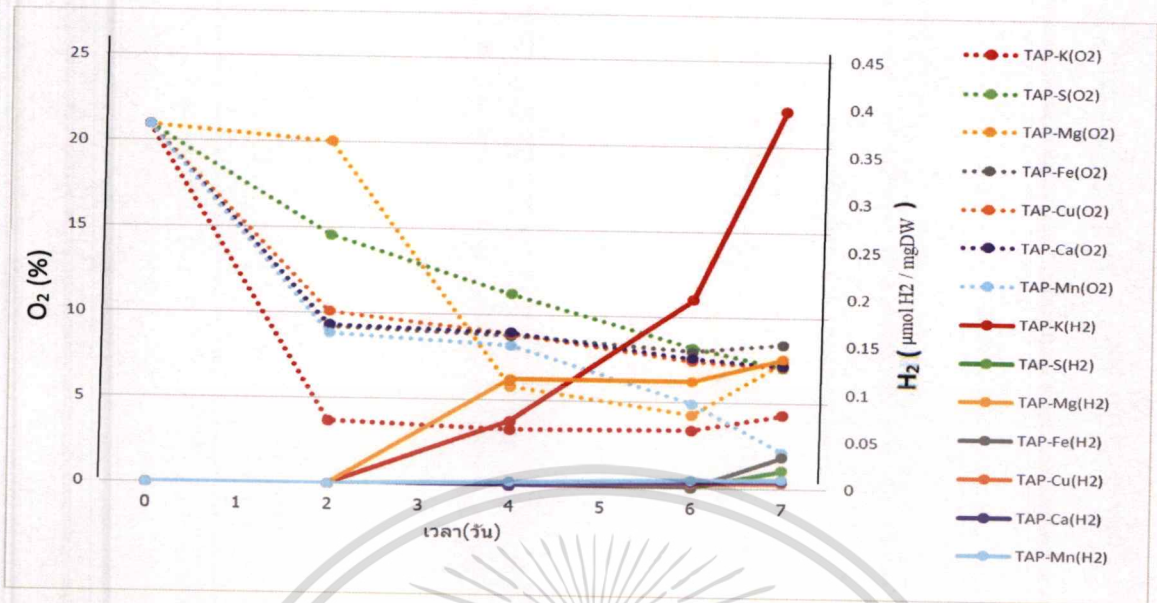
(ข) : อาหารกลุ่มที่ไม่พบการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

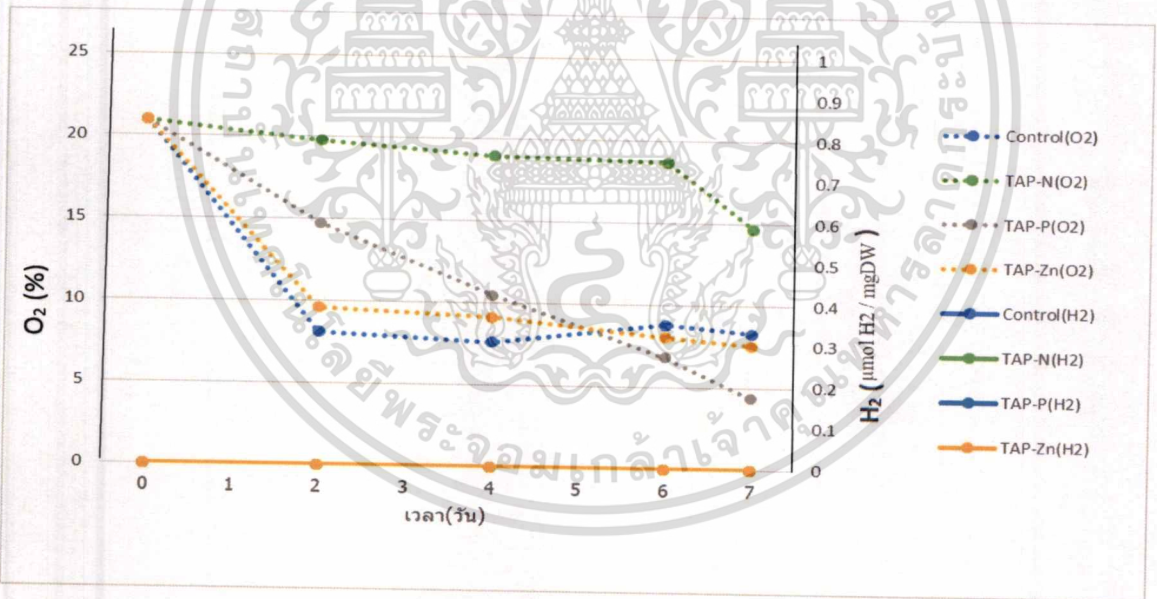
จากรูปที่ 4.2 จะเห็นได้ว่า *Chlorella* sp. KLSc59 ที่บ่มเลี้ยงในอาหารที่ขาดโพแทสเซียม, ซัลเฟอร์, ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียมพบว่ามีแก๊สไฮโดรเจนเกิดขึ้นแสดงดังรูป (ก) แสดงให้เห็นว่าธาตุอาหารที่กล่าวมาข้างต้นส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่สาหร่ายใช้เป็นกระบวนการหลักในการผลิตไฮโดรเจน โดยเฉพาะ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ถูกบ่มเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากโพแทสเซียมพบว่ามีปริมาณไฮโดรเจนสูงสุดคือ $0.008826 \mu\text{mol}/\text{mgDW}$ มีการศึกษาทางพลังงานชีวภาพเกี่ยวกับการใช้อาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ขาดโพแทสเซียม เพื่อให้สาหร่ายสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงจากระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง เพราะโพแทสเซียมสามารถถูกแทนที่ด้วยโซเดียมในกระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ และยังทำให้ระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงยังคงทำงานได้อย่างเป็นปกติอยู่ อย่างไรก็ตามโซเดียมไม่สามารถแทนที่โพแทสเซียมในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นแป้ง ดังนั้นการเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนผ่านระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 2 (Photosystem II) จะเกิดขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากอิเล็กตรอนที่เกิดจากการเผาผลาญกลูโคสถูกนำมาใช้ในการแทนที่อย่างต่อเนื่อง การสังเคราะห์ขั้นต่อไปจะทำให้เกิดการเปิดใช้งานของระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 1 และ plastic hydrogenase ส่งผลให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ผ่านระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 2 และนอกจากนี้ยังพบว่าการยับยั้งการผลิตออกซิเจนเกิดขึ้นในการทดลองใช้อาหารที่ขาดโพแทสเซียม (Aikaterini papazi *et al.*, 2014) และซัลเฟอร์ยังเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญที่สามารถควบคุมระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 2 ได้ (Wykoff *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายจะเริ่มกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเมื่อออกซิเจนลดลงต่ำกว่าหรือเท่ากับ 10 % สาหร่ายสีเขียวถูกพบว่าการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณที่ค่อนข้างสูง แต่กลับให้ผลิตภัณฑ์ชั่วคราวมาก สังเกตได้หลังจากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้นในทันทีหลังบ่มเมื่อมีการให้แสงและไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญโดยจะถูกบ่มในที่มืด พบว่าการแสดงออกของยีนไฮโดรจีเนสสังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของไฮโดรเจนที่ใช้เวลาไม่นาน นอกจากนั้นยังพบว่าในระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงนี้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะรับอิเล็กตรอนที่ผลิตโดยระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 2 จนกระทั่งวัฏจักร Calvin Benson (เป็นปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์ระหว่างการสังเคราะห์ด้วยแสง) เริ่มมีการทำงานทำให้ ไฮโดรจีเนสถูกยับยั้งการทำงานโดยเกิดจากความเข้มข้นของออกซิเจนที่สูงขึ้น (Mus *et al.*, 2005)

สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ถูกบ่มเลี้ยงในอาหารที่ขาดไนโตรเจน, เหล็กทองแดง, แคลเซียม, สังกะสี, แมงกานีส และซุดควบคุมไม่พบแก๊สไฮโดรเจนเกิดขึ้น แสดงดังรูป (ข) นอกจากนี้ยังพบว่า *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ถูกบ่มเลี้ยงในอาหารกลุ่มที่ไม่พบไฮโดรเจนและมีปริมาณออกซิเจนสูงกว่า 10 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.3 ปริมาณไนโตรเจน และออกซิเจนในอาหารต่าง ๆ ของสาหร่าย *Tetraspora sp.* CU2551

(ก) : อาหารกลุ่มที่พบการผลิตแก๊สไนโตรเจน

(ข) : อาหารกลุ่มที่ไม่พบการผลิตแก๊สไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

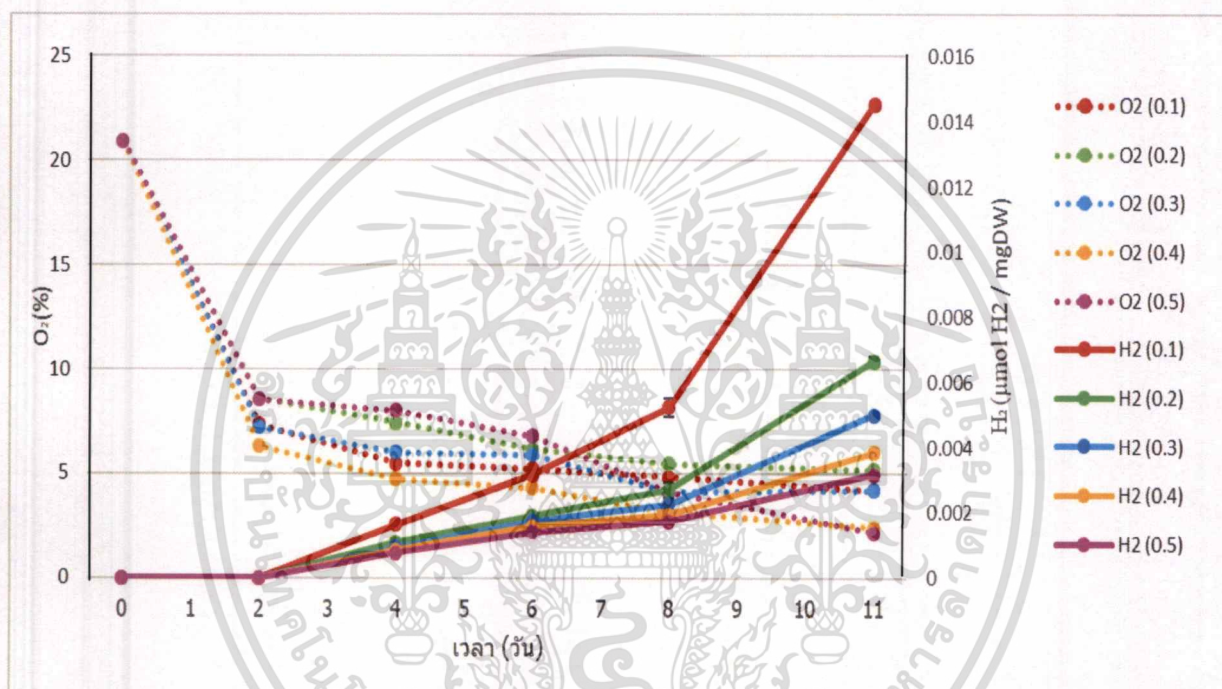
จากรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่า *Tetraspora* sp. CU2551 ที่บ่มเลี้ยงในอาหารที่ขาดโพแทสเซียม, ซัลเฟอร์, แมกนีเซียม, เหล็ก, ทองแดง, แคลเซียม และแมงกานีสพบว่ามีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้นแสดงดังรูป (ก) ซึ่ง *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ถูกบ่มเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากโพแทสเซียมมีปริมาณไฮโดรเจนสูงสุดคือ $0.39725 \mu\text{mol}/\text{mgDW}$ โดยสาหร่ายจะเริ่มกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเมื่อออกซิเจนลดลงต่ำกว่าหรือเท่ากับ 10 % เช่นเดียวกันกับในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS5

อย่างไรก็ตามผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าความสามารถในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์มีไม่เท่ากัน เมื่อนำค่าผลได้ของสาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์ต่อปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เท่ากันจะเห็นได้ว่าในสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLS59 ค่าผลได้ที่มากที่สุดคือ $0.017526 \mu\text{mol}/\text{mgDW}$ เกิดขึ้นในสาหร่ายที่ถูกบ่มเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากโพแทสเซียม เช่นเดียวกับกับ *Tetraspora* sp. CU2551 ค่าผลได้ที่มากที่สุดเกิดขึ้นในสาหร่ายที่ถูกบ่มเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากโพแทสเซียมโดยมีค่าผลได้ที่มากที่สุดคือ $0.39725 \mu\text{mol}/\text{mgDW}$ จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงได้ทำการศึกษาปัจจัยทางด้านปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ต่อเพียงสายพันธุ์เดียวโดยคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มค่าผลได้ของแก๊สไฮโดรเจนที่จะเกิดขึ้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น

จากการศึกษาอิทธิพลของปริมาณเซลล์เริ่มต้น หรือความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการทดลอง การผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีอากาศและปราศจากแสงบ่มเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากโพแทสเซียม (TAP-K) โดยกำหนดเงื่อนไขที่ OD_{750} เท่ากับ 0.1 – 0.5 ในสายร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 พบว่า อิทธิพลของความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่สายร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน แสดงดังรูปที่ 4.4

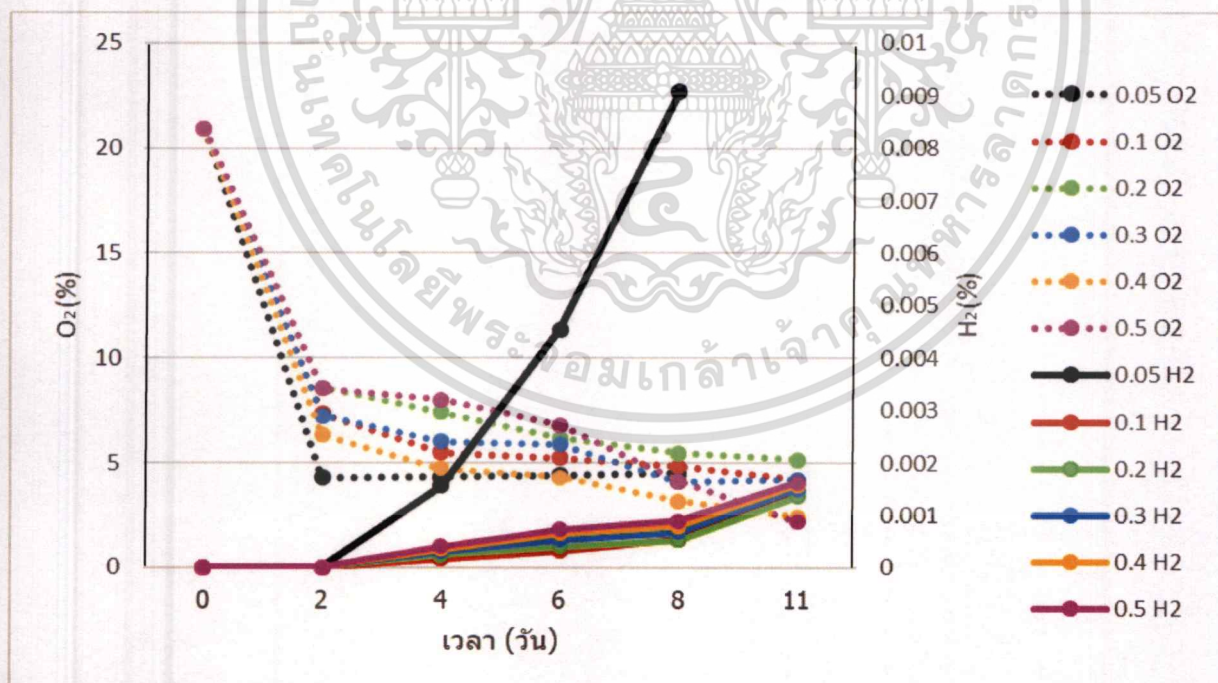


รูปที่ 4.4 ปริมาณไฮโดรเจน และออกซิเจนที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 0.1 – 0.5 ในอาหาร TAP-K ของสายร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

จากรูปที่ 4.4 จะเห็นได้ว่า เมื่อเลี้ยงสายร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP ที่ปราศจากโพแทสเซียมในสภาวะที่มีอากาศและปราศจากแสงพบว่ามีแก๊สไฮโดรเจนเกิดขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 วันและมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ทั้งในความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ในขณะเดียวกันปริมาณออกซิเจนลดลงต่ำกว่า 10 % เมื่อเวลาผ่านไป 2 วันและมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ สวนทางกันกับปริมาณไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น เนื่องจากสายร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ใช้ ออกซิเจนในการเจริญจากปริมาณเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิเจนที่ลดลงและปริมาณไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นออกซิเจนมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ไฮโดรเจนของสาหร่าย โดยจะไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้ไฮโดรเจนที่สาหร่ายผลิตได้มีปริมาณต่ำ

มีรายงานว่าในระบบการเลี้ยงสาหร่ายแบบปกติที่มีออกซิเจนอยู่ในระบบจะมีปริมาณไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นต่ำกว่า 1.5% แต่ปริมาณไฮโดรเจนจะสามารถเพิ่มขึ้นได้สูงถึง 3-10% ถ้าหากว่ามีการกำจัดออกซิเจนออกจากระบบ ทันที (Ida Akkarman *et al.*, 2002) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่ายิ่งความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ $OD_{750} = 0.1$ มีค่าผลได้ของไฮโดรเจนมากที่สุดคือ $0.01451 \mu\text{mol/mgDW}$ และที่ $OD_{750} = 0.5$ มีค่าผลได้ของไฮโดรเจนน้อยที่สุดคือ $0.00316 \mu\text{mol/mgDW}$ ในขณะที่การทดลองอิทธิพลของธาตุอาหารของ *Tetraspora sp.* CU2551 ในอาหาร TAP-K มีมากถึง $0.39725 \mu\text{mol/mgDW}$ อันเนื่องมาจากการทดลองก่อนหน้านี้ใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ $OD_{750} = 0.05$ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ใช้มีผลต่อค่าผลได้ของไฮโดรเจนเนื่องจากยิ่งปริมาณเซลล์มีมากค่าผลได้ของไฮโดรเจนก็จะน้อยลงเมื่อคิดในหน่วย $\mu\text{mol/mgDW}$ จะต้องนำค่าไฮโดรเจนที่ได้มาหารต่อปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ และเนื่องจากยิ่งปริมาณเซลล์เริ่มต้นมากอาจจะเกิดภาวะขาดอาหาร หรือแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่มีในสภาวะทดลองจึงทำให้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่น้อยกว่ามีค่าผลได้มากกว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่มากกว่าซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายแสดงดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ปริมาณไฮโดรเจน และออกซิเจนที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 0.05 – 0.5 ในอาหาร TAP-K ของ

สาหร่าย *Tetraspora sp.* CU251

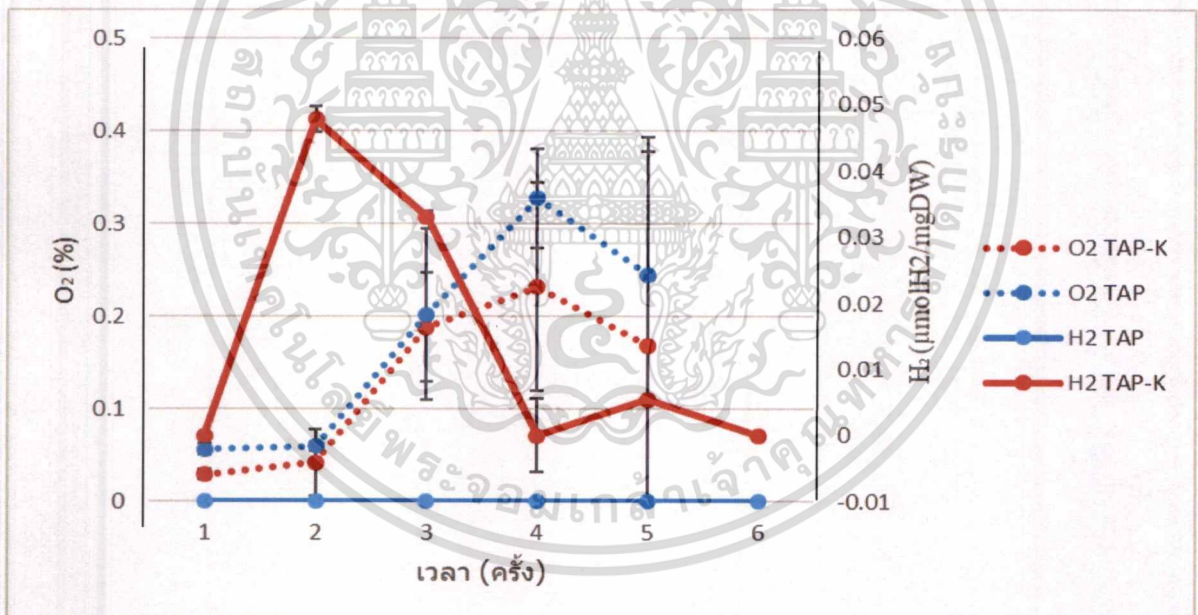
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามผลการทดลองจากการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ที่คาดว่าจะส่งผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีอากาศของสาหร่ายสีเขียวนั้นยังไม่เพียงพอที่จะอธิบายผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่สาหร่ายสีเขียวใช้ในการผลิตไฮโดรเจนในระดับเซลล์ได้ จึงได้ทำการศึกษาค้นคว้าการตอบสนองระดับเซลล์เพื่อดูการทำงานของระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 2 และการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์ต่อไป

4.4 การตอบสนองระดับเซลล์

4.4.1 การผลิตออกซิเจนของเซลล์

จากการศึกษาการตอบสนองระดับเซลล์โดยทำการศึกษาค้นคว้าการทำงานของระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 2 พบว่าอิทธิพลของแสงและธาตุอาหารส่งผลต่อกิจกรรมของเซลล์ในระบบสังเคราะห์ด้วยแสง 2 ของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora sp.* CU2551 แสดงดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ปริมาณไฮโดรเจน และออกซิเจนในการทดสอบระบบสังเคราะห์ด้วยแสง 2 (PSII) ของสาหร่าย

Tetraspora sp. CU2551

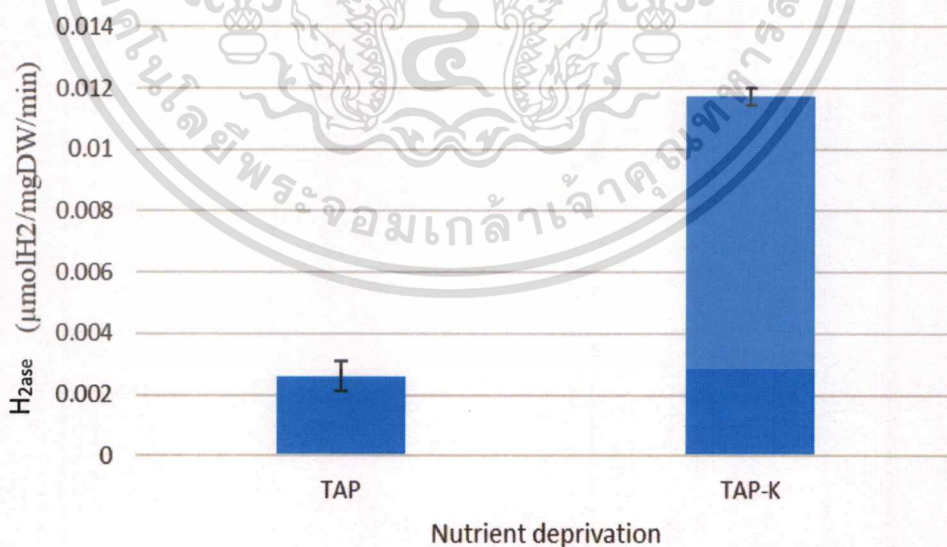
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.5 จะเห็นได้ว่า ในอาหาร TAP-K พบว่ามีแก๊สไฮโดรเจนเกิดขึ้นและมีปริมาณออกซิเจนต่ำกว่าชุดควบคุม (TAP) นอกจากนี้ยังเห็นได้ว่าในชุดควบคุมไม่พบแก๊สไฮโดรเจนเกิดขึ้นเป็นไปตามผลการทดลองในหัวข้อ 4.2 เนื่องจากโพแทสเซียมส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่สาหร่ายใช้ในการผลิตไฮโดรเจนโดยส่งผลโดยตรงต่อระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 2 ทำให้ในชุดทดลองที่เลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP-K พบว่ามีแก๊สไฮโดรเจนเกิดขึ้น ในขณะที่ชุดควบคุมพบวาระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 2 ของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ทำงานปกติ คือไม่พบกิจกรรมการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจากระบบสังเคราะห์แสง 2 ใช้พลังงานแสงเพื่อสลายโมเลกุลของน้ำเพื่อให้อิเล็กตรอนและโปรตรอนสำหรับใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจน แต่ในขณะเดียวกันระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง 2 ก็ให้ผลผลิตเป็นออกซิเจนด้วย ซึ่งออกซิเจนเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งเป็นตัวเร่งสำคัญในปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจน (Ghirardi *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีออกซิเจนในอากาศจากสภาวะทดลองที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีบทบาทสำคัญในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

4.4.2 กิจกรรมของเอนไซม์

จากการศึกษาจากการศึกษาการตอบสนองระดับเซลล์โดยทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 แสดงดังรูปที่

4.7



รูปที่ 4.7 ปริมาณแก๊สไฮโดรเจนจากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสพบว่าในอาหารปกติ (TAP) พบว่าการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะถูกยับยั้งในสภาวะที่มีอากาศ (Posewitz *et al.*, 2005) ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์แก๊สไฮโดรเจนน้อยกว่าในอาหาร TAP ที่ปราศจากโพแทสเซียม (TAP-K) นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหาร TAP-K เอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่ถูกขัดขวางการทำงาน เนื่องจากจากโพแทสเซียมสามารถถูกแทนที่ด้วยโซเดียมในกระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ทำให้ระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงยังคงทำงานได้อย่างเป็นปกติ อยู่ส่งผลให้พบผลิตภัณฑ์แก๊สไฮโดรเจนในอาหาร TAP-K มากกว่าในอาหาร TAP เป็นไปตามผลการทดลองที่ 4.2

4.5 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่าย

4.5 การเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่าย

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 และ *Chlorella* sp. KLS59 ในสภาวะที่มีอากาศโดยกำหนดที่คาดว่าจะส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่สาหร่ายสีเขียวใช้ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจนได้สภาวะที่เหมาะสมที่มีค่าผลได้มากที่สุดคือ $0.39725 \mu\text{mol/mgDW}$ โดยใช้สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 บ่มเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศและปราศจากแสงในอาหาร TAP-K โดยมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ $\text{OD}_{750} = 0.05$ แต่เนื่องด้วยยังมีงานวิจัยมากมายที่ทำการศึกษการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้สาหร่ายเช่นเดียวกันในสภาวะที่คล้ายคลึงกัน จึงได้ทำการเปรียบเทียบค่าผลได้ของไฮโดรเจนงานวิจัยอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงข้อมูลจากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย

สายพันธุ์สาหร่าย	ปริมาณแก๊สไฮโดรเจน	หน่วย	หมายเหตุ	แหล่งข้อมูล
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551 <i>Chlorella</i> sp. KLSc59	0.39725 0.008826	$\mu\text{mol}/\text{mgDW}$	เลี้ยงในอาหารTAP-K ในสภาวะที่มีอากาศ และปราศจากแสง	การศึกษาคั้งนี้
<i>Scenedesmus</i> Sp.	210	mL / L / d	ควบคุมพีเอช และ BESA	Kumar G, <i>et al.</i> 2016
<i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i> <i>C.reinhardtii</i>	450	μl	ตัดต่อยีน OEE2	Li H, <i>et al.</i> 2015
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	35.1	$\mu\text{mol}/\text{mgDW}$	ควบคุมระดับของสาร ตั้งต้น	Maneeruttanarungroj C, Phunpruch S, 2017
<i>Laminaria digitata</i> <i>Arthrospira platensis</i>	55.3	ML/g	การหมัก	Ding L, <i>et al.</i> 2018
<i>Scenedesmus obliquus</i>	28.1 – 35.0	mL H ₂ /g VS	พีเอช 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หมักแบบกะ	Wang J, Yin Y, 2018
<i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i>	20	$\mu\text{l H}_2/\text{ml}$	บ่มมืดในสภาวะที่ ปราศจากอากาศ	Nagy v, <i>et al.</i> 2018

จากข้อมูลข้างต้นพบว่าในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวนั้นสามารถทำได้หลากหลายวิธี ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษา จะเห็นได้ว่าการศึกษานั้นมีการใช้สาหร่ายสีเขียวหลากหลายสายพันธุ์ และหลายวิธี ถึงแม้ว่าจากการศึกษาการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 และ *Chlorella* sp. KLSc59 ถึงแม้ว่าในการศึกษาคั้งนี้จะได้ค่าผลได้ต่ำกว่าการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียววิธีอื่น เนื่องจากทำในสภาวะที่มีอากาศแต่การศึกษานี้ก็ทำให้ได้ทราบถึงองค์ความรู้ใหม่ๆที่จำเป็นต่อการพัฒนาวิธีการผลิตไฮโดรเจนเพื่อให้ได้ค่าผลได้มากขึ้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาปัจจัยที่คาดว่าจะส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีอากาศจากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora sp.* CU2551 และ *Chlorella sp.* KLSc59 พบว่า อิทธิพลของแสงส่งผลโดยตรงต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์ โดยจะเห็นได้ว่าไม่พบไฮโดรเจนเกิดขึ้นพบเพียงที่ความเข้มแสง 0 ลักซ์ปริมาณออกซิเจนลดลง

การศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารพบว่าในธาตุอาหาร TAP-K มีค่าผลได้ของแก๊สไฮโดรเจนมากที่สุดคือ 0.39725 $\mu\text{mol}/\text{mgDW}$ จากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora sp.* CU2551

การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นพบว่าในความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นที่ $\text{OD}_{750} = 0.1$ ของสาหร่าย *Tetraspora sp.* CU2551 มีค่าผลได้ของแก๊สไฮโดรเจนมากที่สุดคือ 0.01451 $\mu\text{mol}/\text{mgDW}$ และในการศึกษาการตอบสนองของระดับเซลล์ พบว่าอิทธิพลของแสงและธาตุอาหารส่งผลต่อกิจกรรมของเซลล์ในระบบสังเคราะห์ด้วยแสงที่สาหร่ายสีเขียวใช้เป็นกระบวนการหลักในการผลิตไฮโดรเจน

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ทำการศึกษาในประเด็นการกลายพันธุ์ในระดับยีนเพื่อหาสาหร่ายสายพันธุ์ที่เหมาะสม และมีความทนทานต่อออกซิเจน เนื่องจากออกซิเจนเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส
2. เนื่องจากผลการศึกษาพบว่าอาหาร TAP-K ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวได้ จากที่กล่าวมาข้างต้นสามารถทำการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารว่าส่งผลต่อประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายหรือไม่
3. ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่หลากหลายเพื่อหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนในสาหร่าย
4. ศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายในสภาวะที่ปราศจากอากาศ เนื่องจากออกซิเจนเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Adams MWW, The structure and mechanism of ironhydrogenases. *Biochim Biophys Acta*. 1990: 1020: 115–145.

Akkerman I, Janssen M, Rocha J, René H. Wijffels, Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy* 2002: 27: 1195-1208.

Antal K, Krendeleva E, Laurinavichene V, Makarova VV, Ghirardi M L, Rubin , Tsygankov AA, Seibert M, The dependence of algal H₂ production on Photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003: 1607: 153 – 160.

Chisti Y, Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 2007: 25: 294–306.

Debabrata D, Veziroglu N, Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy* 2001: 26: 13-28.

Ding L, Gutierrez CE, Cheng J, Xia A, Shea R, Guneratnam A, Murphy J, Assessment of continuous fermentative hydrogen and methane co-production using macro- and micro-algae with increasing organic loading rate. *Energy* 2018: 151: 760-770.

Florin L, Tsokoglou A, Happe T, A novel type of Fe-hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. *Journal of Biochemistry*. 2001: 276: 6125–6132

Ghirardi ML, Togasaki RK, Seibert M, Oxygen sensitivity of algal H₂ production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1997: 63: 141–151.

Ghirardi ML, Zhang L, Lee JW, Flynn T, Seibert M, Greenbaum E, Melis A, Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends Biotechnology*. 2000: 18: 506–511.

Greenbaum E, Energetic efficiency of hydrogen photoevolution by algal water-splitting. *Biophysical journal*. 1988: 54: 365–368

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Happe T, Mosler B, Naber JD, Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biochemistry*. 1994: 222: 769–774.
- Kruse O, Rupprecht J, Bader KP, Thomas-Hall S, Schenk PM, Finazzi G, Han-kamer B, Improved photobiological H₂ production in engineered greenalgal cells. *Journal of Biological Chemistry* 2005: 280: 34170–34177.
- Kumar G, Zhen G, Sivaguranathan P, Bakonyi P, Nemestóthy N, Bélafi-Bakó K, Kobayashi T, Kai-Qin Xu, Biogenic H₂ production from mixed microalgae biomass : impact of pH control and methanogenic inhibitor (BESA) addition. *Biofuel Research Journal* 2016: 11: 470 – 474.
- Ley AC, Mauzerall DC, Absolute absorption cross sections for photosystem II and the minimum quantum requirement for photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. *Biochemistry and Biophysics Acta*. 1982: 680: 95–106.
- Leliaert F, Smith D, Moreau H, Herron M, Verbruggen H, Charles F, Clerck D&O , Phylogeny and Molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2014: 31: 1-46.
- Li H, Zhang L, Shu L, Zhuang LX, Liu Y, Jun C, Hu Z, Sustainable photosynthetic H₂-production mediated by artificial miRNA silencing of OEE2 gene in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *International journal of Hydrogen energy* 2015: 40: 5609 – 5616.
- Maneeruttanarungroj C, Phunpruch S, Effect of pH on Biohydrogen Product in Green Alga *Tetraspora* sp. CU2551. *Energy Procedia* 2017: 138: 1085-1092.
- Melis A, Zhang L, Forestier M, Ghirardi M, Seibert M, Sustained Photobiological Hydrogen Gas Production upon Reversible Inactivation of Oxygen Evolution in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 2000: 122: 127–136.
- Meyer J, Gagnon J, Primary structure of hydrogenase I from *Clostridium pasterianum*. *Biochemistry*. 1991: 30: 9697–9704.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Nagy v, Podmaniczki A, Vidal-Meireles A, Tengölics R, Kovács L, Rákhely G, Alberto Scoma and Szilvia Z, Water-splitting-based, sustainable and efficient H₂ production in green algae as achieved by substrate limitation of the Calvin–Benson–Bascham cycle. *Biotechnology Biofuels* 2018: 11: 69.
- Papazi I, Potassium deficiency, a smart cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus*. *International journal of Hydrogen energy* 2014: 39: 19452-19464.
- Posewitz MC, King PW, Smolinski SL, Smith RD, Ginley AR, Ghirardi ML, Seibert M. Identification of genes required for hydrogenase activity in *C. reinhardtii*. *Biochemical Society Transactions*. 2005: 33: 102–104.
- Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, Marx UC, Mussgnug JH, Posten C, Kruse O, Hankamer B, Second generation biofuels: high–efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research journal*. 2008: 1: 20–43.
- Voordouw G, Strang JD, Wilson FR, Organization of the genes encoding [Fe] hydrogenase in *Desulfovibrio vulgaris*. *Journal of Bacteriol.* 1989: 171: 3881–3889
- Wang J, Yin Y, Fermentative hydrogen production using pretreated microalgal biomass as feedstock. *Microbial Cell Factories*. 2018: 17: 22.
- Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossman AR, The regulation of photosynthetic electron-transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 1998: 117: 129–139.
- Yafei S, Carbon dioxide bio-fixation and wastewater treatment via algae photochemical synthesis for biofuels production. *RSC Advances*. 2014: 4: 49672-49722.
- Zhang L, Happe T, Melis A, Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. 2002: 214(4): 552-561.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสายพันธุ์สาหร่ายเพื่อนำมาศึกษา

1. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย

คัดเลือกจากสาหร่ายสีเขียวที่ได้มีการศึกษาเบื้องต้นมาก่อน โดยเป็นสาหร่ายที่มีการคัดแยกมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยเลือกใช้สาหร่าย *Chlorella sp.* KLSc59 และ *Tetraspora sp.* CU2551

2. การเตรียมสาหร่ายก่อนการนำมาศึกษา

- 2.1 สาหร่ายสายพันธุ์ต้นแบบของการศึกษาจะถูกเก็บรักษาเซลล์โดยวิธีการ ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ และถูกแช่เย็นไว้
- 2.2 การจะนำสาหร่ายที่ถูกเก็บไว้มาใช้จำเป็นต้องนำออกมาเลี้ยงบนอาหารวันใหม่ เพื่อเป็นการกระตุ้นการเจริญ และ เพื่อเป็นการยืนยันว่าไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย
- 2.3 ใช้วิธีการ streak plate จากน้ำสาหร่ายที่อยู่ในกระบอก centrifuge โดยต้องทำในตู้ปลอดเชื้อและใช้เทคนิคปลอดเชื้อ Aseptic technique
- 2.4 จากนั้นทำการบ่มงานอาหารที่มีสาหร่ายในที่มืดแสง เป็นเวลา 3 – 5 วันจนเริ่มมีการเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวสีเขียว และไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียเลย
- 2.5 เมื่อได้สาหร่ายที่แน่ใจว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียแล้ว ให้ชุดเอาโคโลนีเดี่ยวของสาหร่ายบนผิวหน้าอาหาร เพื่อนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ และบ่มในตู้เขย่าที่มีการควบคุมแสง
- 2.6 เมื่อเลี้ยงจนเซลล์สาหร่ายในอาหารเหลวเริ่มเป็นสีเขียว ให้นำเอาเซลล์ในอาหารเหลวนั้นไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง และเก็บเอาตะกอนเซลล์เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3. การกำจัดเซลล์สาหร่ายหลังการศึกษา

เซลล์สาหร่ายที่นำมาทำการศึกษา จะมีการเลี้ยงให้เจริญในอาหาร TAP ที่ไม่มีการส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ การกำจัดเซลล์สาหร่ายหลังการนำมาศึกษาจะใช้วิธีทำให้เซลล์ผ่านความร้อนสูงเพื่อให้เซลล์ตายหรืออ่อนแรงลง ก่อนปล่อยลงสู่แหล่งธรรมชาติ ไม่จำเป็นต้องนำไปใส่หม้อทิ้งมาเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับทำอาหารเลี้ยงสาหร่าย Tris – Acetate – Phosphate (TAP)

1.1 Stock สารเคมีที่ 1

ชั่ง Tris มา 24.20 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

1.2 Stock สารเคมีที่ 2

1.2.1 ชั่ง NH_4Cl มา 3.75 กรัม

1.2.2 ชั่ง $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ มา 1.00 กรัม

1.2.3 ชั่ง $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ มา 0.50 กรัม

แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 250 มิลลิลิตร

1.3 Stock สารเคมีที่ 3

1.3.1 ชั่ง K_2HPO_4 มา 2.88 กรัม

1.3.2 ชั่ง KH_2PO_4 มา 1.44 กรัม

แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร

1.4 Stock สารเคมีที่ 4

1.4.1 ชั่ง $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ มา 0.5000 กรัม

1.4.2 ชั่ง $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ มา 0.2200 กรัม

1.4.3 ชั่ง H_3BO_3 มา 0.1140 กรัม

1.4.4 ชั่ง $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ มา 0.0500 กรัม

1.4.5 ชั่ง $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ มา 0.0500

1.4.6 ชั่ง $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ มา 0.0160 กรัม

1.4.7 ชั่ง $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ มา 0.0077 กรัม

แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร

1.5 Stock สารเคมีที่ 5

ใช้ CH_3COOH conc. เข้มข้นโดยไม่ต้องทำการเจือจาง

2. การทำอาหารเลี้ยงสาหร่าย Tris – Acetate – Phosphate (TAP) ปริมาตร 1 ลิตร

2.1 นำ Stock สารเคมีที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหาร

2.2 ใส่ Stock สารเคมีที่ 2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหาร

2.3 ใส่ Stock สารเคมีที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหาร

2.4 ใส่ Stock สารเคมีที่ 4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานานาชาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2.5 ใส่ Stock สารเคมีที่ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหาร (ทำภายในตู้ดูดควัน)
- 2.6 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 800 มิลลิลิตร แล้วทำการวัด pH ให้ได้เท่ากับ 7 จากนั้นค่อยปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร
- 2.7 หากต้องการทำเป็นอาหารแข็งให้เติม 1.5 % ของวุ้นลงไปขวดอาหาร แล้วผสมให้เข้ากัน
- 2.8 นำขวดอาหารใส่ลงในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ตั้งค่าอุณหภูมิให้อยู่ที่ 121 องศา เวลา 15 นาที

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงสำหรับ Tris – Acetate – Phosphate (TAP) แบบขาดธาตุอาหาร

การเตรียมอาหาร TAP โดยเตรียมแบบขาดธาตุอาหารนั้น จะทำเช่นเดียวกันกับการเตรียมอาหาร TAP ธรรมดา แต่อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงสารเคมีบางตัวในบาง Stock เพื่อเป็นการกำจัดสารเคมีตัวนั้นๆที่ไม่ต้องการให้สาหร่ายใช้ในการเจริญได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวัดปริมาณแก๊สไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatography

1. หลักการทำงานและการใช้งานเครื่อง Gas Chromatography

การทำงานของเครื่อง GC อาศัยเทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารผสม โดยอาศัยความแตกต่าง ของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารผสมบนเฟสคงที่ (Stationary phase) ภายใต้การ พาของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้าสู่เครื่อง GC สารดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนสถานะจากของเหลว (Liquid) เป็นแก๊ส (Gas) และส่วนแก๊สของสารผสมจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดย แก๊สฮีเลียม ซึ่งภายในคอลัมน์จะเกิดการแยกสารผสม (Separation) โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารที่อยู่ภายในคอลัมน์ (Stationary phase) และสารผสม โดยในการศึกษานี้จะใช้ Thermal conductivity detector (TCD) ใช้ Column คือ Pack column 1.5 m X 1.0 mm และ Molecular sieve 5A mesh 80/100 โดยการเริ่มต้นใช้งานจะเริ่ม จาก

- 1.1 เริ่มจากการเปิดเครื่อง และเปิดวาล์วแก๊ส ไฮโดรเจน ที่ต่อกับเครื่อง
- 1.2 เปิดโปรแกรม รอสักพักจะได้ยินเสียงของ Detector ทำงาน ซึ่งจะแสดงให้เห็นในกราฟหน้าจอ
- 1.3 รอสักพักจนกราฟเริ่มนิ่งเป็นเส้นตรง และทำการฉีดแก๊ส standard ซึ่งในที่นี้ใช้เป็นแก๊สไฮโดรเจน ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร หรือ 40 ไมโครลิตร
- 1.4 ฉีดแก๊ส standard เข้าสู่เครื่อง และอ่านค่าของแก๊สไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น โดยให้มีค่าใกล้เคียงกัน มาก 3 ครั้งติดกัน จะถือว่าใช้ได้
- 1.5 ทำการฉีดตัวอย่างที่ต้องการ (ผ่านการเตรียมตัวอย่างแล้ว) และบันทึกผลเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างก่อนการนำมาฉีด Gas Chromatography

ตัวอย่างของการศึกษานี้เป็นอาหารเหลวที่มีเซลล์ของสาหร่ายเจริญอยู่มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยตัวอย่างจะอยู่ในขวดแก้ว (Gas-tight vial) ขนาด 100 มิลลิลิตร มีจุกยางปิดอยู่ และครอบด้วย อลูมิเนียม โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

- 2.1 นำขวดแก้วตัวอย่างมาทำการเป่าแก๊สอาร์กอนโดยฉีดแก๊สอาร์กอนเพื่อกำจัดเอาแก๊สส่วนเกินออกจากขวดแก้ว ใช้เข็มดูดเอาแก๊สมาประมาณ 0.4 มิลลิลิตร ก่อนจะนำไปฉีดใส่ขวดตัวอย่าง
- 2.2 ให้ทำการดูดอากาศภายในขวดขึ้นและลงประมาณ 2 – 3 รอบ เพื่อทำการผสมแก๊สในขวด
- 2.3 ดูดแก๊สจากขวดแก้วออกมาประมาณ 0.4 มิลลิลิตร ก่อนนำไปฉีดใส่เครื่อง GC เพื่อวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในการศึกษา โดยดูผลจากกราฟที่แสดง
- 2.4 โปรแกรมจะผลเป็นกราฟ และค่าพื้นที่ใต้กราฟแสดงกราฟ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้นำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไฮโดรเจนและออกซิเจนในระบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การคำนวณปริมาณแก๊ส

การคำนวณปริมาณแก๊สไฮโดรเจนจะคำนวณจากค่าพื้นที่ใต้กราฟที่แสดงผลทางโปรแกรมจากเครื่อง Gc ในหน่วย ไมโครโมล/มิลลิกรัมดรายเวท ($\mu\text{mol}/\text{mgDW}$) โดยมีวิธีคำนวณดังนี้

1. การคำนวณหาปริมาณแก๊สไฮโดรเจนภายในขวด (Head space)

X = ค่าพื้นที่ใต้กราฟของแก๊สไฮโดรเจน (mV.S)

Y = ค่าพื้นที่ใต้กราฟของ 4% ของแก๊สไฮโดรเจนมาตรฐาน (mV.S)

ถ้าพื้นที่ใต้กราฟ เท่ากับ Y จะมีความเข้มข้นของแก๊สไฮโดรเจน 4%

ถ้าพื้นที่ใต้กราฟ เท่ากับ X จะมีความเข้มข้นของแก๊สไฮโดรเจน $\frac{X \times 4\%}{Y} = Z\%$

พื้นที่ของอากาศภายในขวด เท่ากับ 75 (ml) จากปริมาตรขวด 100 (ml)

พื้นที่ของอากาศทั้งหมด $75 + 0.4$ (ml) จากปริมาตรของแก๊สในกระบอกฉีดยา เท่ากับ 75.4 (ml)

ดังนั้น

$$\text{พื้นที่ของอากาศทั้งหมดจะมีความเข้มข้นของแก๊สไฮโดรเจน} \frac{75.4 \times Z}{100} = \text{mL}$$

จาก

แก๊ส 24.615 ลิตร มีปริมาณ 1 โมล

จะได้ $\frac{i \text{ (ml)} \times 1 \text{ (mol)}}{24.615 \text{ (Lit)}} = j \text{ mol}$

2. การคำนวณหาปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์สาหร่าย

จาก

$$y = 1.7915X$$

กำหนด $y =$ ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{750}

$X =$ น้ำหนักเซลล์แห้ง

ค่าการดูดกลืนแสงที่ $\text{OD}_{750} = K$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่กลุ่มผู้วิจัยเป็นเจ้าของลิขสิทธิ์และสงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะได้ $\frac{K}{1.7915} \times 25 \text{ (ml)} = P \text{ (mgDw)}$

3. การคำนวณอัตราการผลิตในหน่วย $\mu\text{mol/mgDw}$

จะได้ $\frac{J}{P} = Q \mu\text{mol/mgDw}$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้