การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN ALGAE UNDER AEROBIC CONDITION

ปัญญาพร สายสินธุ์
โยธิน กุลศิโรรัตน์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN ALGAE UNDER AEROBIC CONDITION

PANYAPORN SAISIN

YOTHIN KULSIRORAT

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีอากาศ Hydrogen Production by Green Algae under Aerobic Condition
ชื่อนักศึกษา	นางสาวปัญญาพร สายสินธุ์ รหัสนักศึกษา 57050850 นายโยธิน กุลศิโรรัตน์ รหัสนักศึกษา 57050880
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	**ลายมือชื่อ**
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ	
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีอากาศ
ชื่อนักศึกษา นางสาวปัญญาพร สายสินธุ์ รหัสนักศึกษา 57050850
นายโยธิน กุลศิโรรัตน์ รหัสนักศึกษา 57050880
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2560
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

บทคัดย่อ

ในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเป็นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งไวต่อออกซิเจนในสภาวะแวดล้อม ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีอากาศ จากการวัดการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. A25.1, *Chlorella* sp. CirGreen และ *Tetraspora* sp. พบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP สามารถผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีและปราศจากอากาศ ในขณะที่สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเท่านั้น ส่วนสาหร่ายสีเขียวอีก 2 สายพันธุ์ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนภายใต้ทั้ง 2 สภาวะ ในสภาวะการขาดธาตุอาหารพบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 และ *Chlorella* sp. A25.1 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP และ อาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจนร่วมกับขาดซัลเฟอร์ (TAP-NS) ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศและในที่มืด แสงกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-S และในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-NS นอกจากนี้ สารยับยั้งระบบแสงสอง CCCP และ DCMU ไม่สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 และ *Chlorella* sp. A25.1 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : การผลิตไฮโดรเจน สภาวะที่มีอากาศ สาหร่ายสีเขียว

Title	Hydrogen production by green algae under aerobic condition
Students	Miss Panyaporn Saisin Student ID 57050850
	Mr. Yothin Kulsirorat Student ID 57050880
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Asst.Prof.Dr.Saranya Phunpruch

Abstract

In recent years, much attention has been paid to H_2 production by green algae. Green algae can produce H_2 by an activity of hydrogenase which is sensitive to O_2 in the environment. Therefore, this study aimed to investigate H_2 production by green algae under aerobic condition. By measuring H_2 production by four strains of green algae, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. A25.1, *Chlorella* sp. CirGreen and *Tetraspora* sp., it was found that the green alga *C. reinhardtii* CC-124 incubated in TAP medium could produce H_2 production under aerobic and anaerobic conditions whereas green alga *Chlorella* sp. A25.1 incubated in TAP medium could produce H_2 production only under anaerobic condition. The other two green algal strains could not produce H_2 under both conditions. Under nutrient deprivation, *C. reinhardtii* CC-124 and *Chlorella* sp. A25.1 gave the highest H_2 production when incubated in TAP medium and nitrogen- and sulfur-deprived TAP medium (TAP-NS), respectively, under dark aerobic condition. Light promoted H_2 production by *C. reinhardtii* CC-124 incubated in TAP and TAP-S media and also by *Chlorella* sp. A25.1 incubated in TAP and TAP-NS media. In addition, the photosytem II inhibitors, CCCP and DCMU could not enhance H_2 production by both *C. reinhardtii* CC-124 and *Chlorella* sp. A25.1.

Keywords : Hydrogen production, Aerobic condition, Green algae

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) โครงงานพิเศษนี้ได้ดำเนินการและสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาและความอนุเคราะห์ช่วยเหลือเป็นอย่างดีจาก ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาพร้อมทั้งให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ นอกจากนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการ และ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้คำแนะนำและแก้ไขรูปเล่มโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณพี่ๆ นักศึกษาในระดับปริญญาดุษฎีบัณฑิตและระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่าน ที่กรุณาให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในด้านการปฏิบัติงาน จนทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการเบิกอุปกรณ์ สารเคมีและการใช้เครื่องมือในการทำงานวิจัยต่างๆ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา จนกระทั่งโครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาและครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ และคอยให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยหวังว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไฮโดรเจน หากโครงงานพิเศษฉบับนี้มีข้อบกพร่องประการใด คณะผู้จัดทำขออภัยไว้ ณ ที่นี้

ปัญญาพร สายสินธุ์
โยธิน กุลศิโรรัตน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 พลังงานไฮโดรเจน	3
2.2 คุณสมบัติของไฮโดรเจน	3
2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว	4
2.4 สาหร่ายสีเขียว	5
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	5
2.5.1 สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจน	5
2.5.2 สภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์	5
2.5.3 แสง	6
2.6 สารยับยั้งการทำงานของระบบแสงสอง	6
2.6.1 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU)	6
2.6.2 Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP)	6
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	10
3.1 สาหร่ายสีเขียว	10
3.2 สารเคมี	10
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย	10
3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	10
3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การยับยั้งระบบแสงสอง	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน	11
3.4 อุปกรณ์	11
3.5 วิธีการทดลอง	12
3.5.1 วิธีการเตรียมหัวเชื้อของสาหร่ายสีเขียว	12
3.5.2 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว	12
3.5.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน	12
3.5.4 วิธีการศึกษาผลของแหล่งอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	13
3.5.5 วิธีการศึกษาผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	14
3.5.6 วิธีการศึกษาผลของชนิดของสารยับยั้ง (Inhibitor) ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	15
4.1 การศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในอาหาร TAP ในสภาวะที่มีอากาศและสภาวะที่ปราศจากอากาศ	15
4.2 ผลของการขาดธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	17
4.3 ผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 และ *Chlorella* sp. A25.1	25
4.4 ผลของสารยับยั้งการสังเคราะห์แสง CCCP และ DCMU ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 และ *Chlorella* sp. A25.1	28
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	34
5.1 สรุปผลการวิจัย	34
5.2 ข้อเสนอแนะ	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	39
ภาคผนวก ก	40
ภาคผนวก ข	41
ภาคผนวก ค	42
ภาคผนวก ง	43
ภาคผนวก จ	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 ชนิดและแหล่งที่มาของสาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง 10

3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง 4
2.2 การยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองโดย DCMU 7
2.3 การยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองโดย CCCP 7
4.1 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (ก) และสภาวะที่ปราศจากอากาศ (ข) 16
4.2 อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. A25.1, *Chlorella* sp. CirGreen และ *Tetraspora* sp. ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS ภายใต้สภาวะที่มีอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) และ 48 ชั่วโมง (ข) 19
4.3 อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. A25.1, *Chlorella* sp. CirGreen และ *Tetraspora* sp. ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) และ 48 ชั่วโมง (ข) 20
4.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS ในสภาวะที่มีอากาศ (ก) และสภาวะที่ปราศจากอากาศ (ข) 22
4.5 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS ในสภาวะที่มีอากาศ (ก) และสภาวะที่ปราศจากอากาศ (ข) 23
4.6 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS ในสภาวะที่มีอากาศ (ก) และสภาวะที่ปราศจากอากาศ (ข) 24
4.7 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS ในสภาวะที่มีอากาศ (ก) และสภาวะที่ปราศจากอากาศ (ข) 25
4.8 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-S ภายใต้สภาวะที่มีแสงและที่มืด ในสภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ 27
4.9 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-NS ภายใต้สภาวะที่มีแสงและที่มืด ในสภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ 27
4.10 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-S ที่มีการเติมสาร CCCP ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (ก) และปราศจากอากาศ (ข) 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.11 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-NS ที่มีการเติมสาร CCCP ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (ก) และปราศจากอากาศ (ข) 30

4.12 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-S ที่มีการเติมสาร DCMU ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (ก) และปราศจากอากาศ (ข) 32

4.13 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-NS ที่มีการเติมสาร DCMU ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (ก) และปราศจากอากาศ (ข) 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พลังงานเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ รวมถึงเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อการผลิตในภาคธุรกิจและอุตสาหกรรม ในปัจจุบัน สถานการณ์ความต้องการใช้พลังงานของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ตอบสนองต่อการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจและการเพิ่มจำนวนประชากรของโลกอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้แหล่งพลังงานที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมีปริมาณลดลงและกำลังจะหมดไปในไม่ช้า พลังงานที่ใช้อยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่นั้นได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน น้ำมันดิบ เป็นต้น ซึ่งมีอยู่ในปริมาณจำกัด ดังนั้น หน่วยงานต่างๆ ทั่วโลกจึงจำเป็นต้องหาพลังงานอื่นมาทดแทนพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิล ตัวอย่างของพลังงานทดแทนที่สำคัญ ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังงานน้ำ พลังงานจากความร้อนใต้พิภพ และพลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น

พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานทดแทนชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากพลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่สะอาด ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น เมื่อทำการเผาไหม้ไฮโดรเจนจะไม่มีการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา จึงไม่ส่งผลให้เกิดก๊าซเรือนกระจก (Greenhouse gas) อันจะนำไปสู่ภาวะโลกร้อน ดังนั้น ไฮโดรเจนจึงจัดเป็นพลังงานที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานไฮโดรเจนยังมีประสิทธิภาพในการเผาไหม้สูง รวมถึงได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญในอนาคต กระบวนการผลิตพลังงานไฮโดรเจนนั้นสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ กระบวนการอิเล็กโทรไลซิส และกระบวนการทางชีวภาพ เป็นต้น

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีทางชีวภาพเป็นการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต ไฮโดรเจนที่ผลิตได้อาจเรียกว่า“ไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen)” จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ แบคทีเรีย (Bacteria) แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria) ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) และสาหร่ายสีเขียว (Green algae) การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวสามารถใช้พลังงานและแหล่งวัตถุดิบจากธรรมชาติที่มีอยู่อย่างไม่จำกัด เช่น แสงอาทิตย์ และ น้ำ มาใช้ในการสังเคราะห์แสงเพื่อผลิตไฮโดรเจน เมื่อระบบแสงสองได้รับพลังงานแสง ทำให้น้ำแตกตัวได้ผลิตภัณฑ์เป็นโปรตอน อิเล็กตรอนและออกซิเจน อิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไปผ่านระบบแสงหนึ่งไปยังเฟอร์รีดอกซินซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย เฟอร์รีดอกซินส่งอิเล็กตรอนไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจนมาก ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนจึงต้องทำในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน ในการกำจัดออกซิเจน สามารถทำได้โดยการพ่นก๊าซเฉื่อย ซึ่งจะเป็นการเพิ่มขั้นตอนของการผลิตไฮโดรเจนและยังเพิ่มค่าใช้จ่ายในการผลิตอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษนี้ จึงสนใจศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 4 ชนิด ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. A25.1, *Chlorella* sp. CirGreen และ *Tetraspora* sp. ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ และแปรผันปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ การขาดธาตุอาหารไนโตรเจนและซัลเฟอร์ แสง และสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง เช่น Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) และ 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) เป็นต้น เพื่อนำไปสู่การปรับปรุงและพัฒนางานวิจัยด้านพลังงานทดแทนให้สัมฤทธิ์ผลในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

2) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิดในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว Tris Acetate Phosphate (TAP) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าและให้แสงสว่างตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวและกระจายเซลล์สาหร่ายในอาหารเหลว TAP ทำการบ่มในสภาวะเขย่าและให้แสงสว่างตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธี Gas Chromatography จากนั้น ศึกษาผลของการขาดธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ ผลของแสง และผลของสารยับยั้งระบบแสงที่สองต่อการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีและปราศจากอากาศ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบสายพันธุ์และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลังงานไฮโดรเจน

ในปัจจุบัน ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว รวมถึงมีการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกมากขึ้น ทำให้ความต้องการในการใช้พลังงานสูงขึ้นตามไปด้วย พลังงานเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์และใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ พลังงานที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่จะเป็นพลังงานที่ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น ถ่านหิน ปิโตรเลียม และแก๊สธรรมชาติ ฯลฯ ซึ่งการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงเหล่านี้ก่อให้เกิดมลพิษและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในปริมาณสูง ส่งผลให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก (Greenhouse effect) ซึ่งนำไปสู่ภาวะโลกร้อน (Global warming)

จากการขยายตัวของภาคอุตสาหกรรมและการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรโลก ทำให้ความต้องการทางด้านพลังงานเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้แหล่งพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ใช้อยู่ในปัจจุบันกำลังจะหมดไป ดังนั้น นักวิจัยจึงจำเป็นต้องแสวงหาแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ให้พลังงานสูงและราคาไม่แพง ซึ่งแหล่งพลังงานทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจคือ พลังงานไฮโดรเจน

พลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen, H_2) ได้รับการยอมรับว่าเป็นพลังงานทดแทนที่สำคัญในอนาคต เนื่องจากเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่สะอาด เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อเกิดการเผาไหม้ไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์คือน้ำ ไม่ปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ก่อให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก นอกจากนี้ พลังงานไฮโดรเจนสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับงานที่ต้องใช้พลังงานเดิมได้ เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงในครัวเรือน ในเครื่องยนต์สันดาปภายในและในเครื่องไอพ่น เป็นต้น ก๊าซไฮโดรเจนสามารถนำไปใช้กับเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) ใช้ในการขับเคลื่อนรถ การผลิตกระแสไฟฟ้า อุปกรณ์อิเล็คทรอนิคส์ขนาดเล็กและอื่นๆ

2.2 คุณสมบัติของไฮโดรเจน

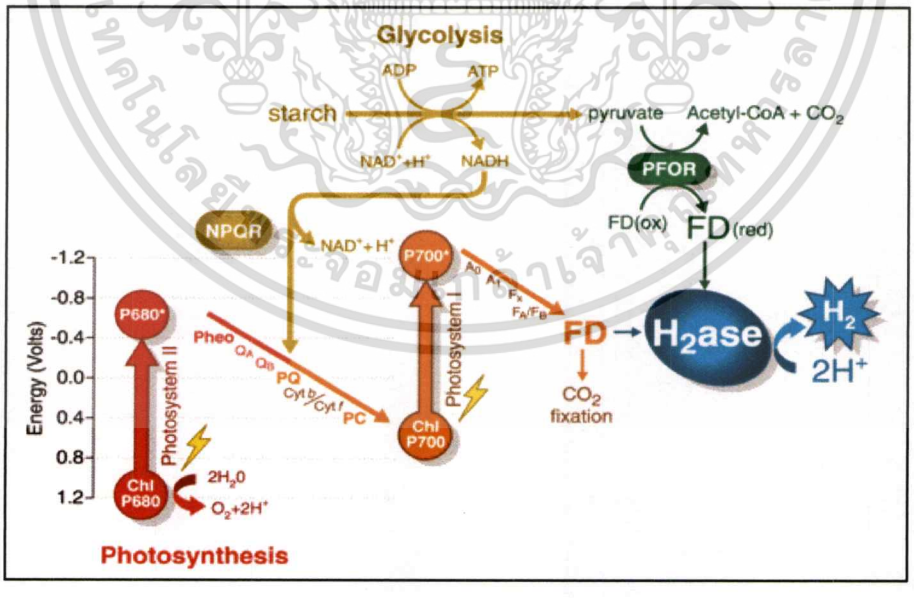
ไฮโดรเจนอะตอม (Hydrogen atom, H) เป็นธาตุเคมีที่มีเลขอะตอมเท่ากับ 1 มีสัญลักษณ์ธาตุคือ H มีน้ำหนักอะตอมเฉลี่ย 1.00794 กรัม ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นธาตุที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ นอกจากนี้ ยังเป็นธาตุที่อยู่ในโมเลกุลของสารประกอบอื่นๆ เช่น สารประกอบจำพวกไฮโดรคาร์บอน (HC) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปิโตรเลียมที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาทางเศรษฐกิจของประเทศ ก๊าซไฮโดรเจนประกอบด้วยไฮโดรเจน 2 อะตอม โดยในชั้นบรรยากาศของโลกมีก๊าซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา หรือนำไปเผยแพร่ต่อ

ไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ส่วนในล้านส่วน ไฮโดรเจนมีค่าความหนาแน่นของพลังงานสูงถึง 122 กิโลจูลต่อกรัม (Madawar และคณะ, 2000) คุณสมบัติทั่วไปของก๊าซไฮโดรเจน คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย นอกจากนี้ ก๊าซไฮโดรเจนจัดเป็นเป็นเชื้อเพลิงที่มีค่าออกเทนสูง ทำให้เกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์ ส่งผลให้เกิดมลพิษน้อยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ โดยใช้แหล่งพลังงานจากธรรมชาติที่มีอยู่คือ แสงและน้ำ ในการผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เมื่อระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) ในสาหร่ายสีเขียวได้รับพลังงานแสง พลังงานแสงจะกระตุ้นให้เกิดการแตกตัวของน้ำหรือที่เรียกว่า “Water splitting” ได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน (O_2) โปรตอน (H^+) และอิเล็กตรอน (e^-) จากนั้น อิเล็กตรอนจากระบบแสงสองจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (Plastoquinone, PQ) ไซโตโครมบี 6 เอฟ (Cytochrome b6f, Cyt b6f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin, PC) และเข้าสู่ระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) เมื่อระบบแสงหนึ่งได้รับพลังงานแสง อิเล็กตรอนจะหลุดออกมาและถูกส่งต่อไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือเฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin, Fd) เฟอร์รีดอกซินที่ถูกรีดิวซ์จะส่งอิเล็กตรอนไปรวมกับโปรตอนที่มาจากกระบวนการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์คือไฮโดรเจน (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง

ที่มา: Posewitz และคณะ, 2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) จัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Division Chlorophyta) เป็นกลุ่มสาหร่ายกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด คือ มีสมาชิกทั้งหมดราว 450 สกุล 7,500 ชนิด สาหร่ายสีเขียวโดยส่วนใหญ่ (90 เปอร์เซ็นต์) จะพบได้ในแหล่งน้ำจืด และอีกประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นสาหร่ายทะเล สาหร่ายสีเขียวมีการดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนพืช และมีบางชนิดที่ดำรงชีวิตโดยการยึดเกาะกับดิน พืชน้ำ หรือ หินใต้น้ำ รงควัตถุที่พบได้ในสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ *เอ* คลอโรฟิลล์ *บี* แคโรทีน ได้แก่ แอลฟา-แคโรทีน เบต้า-แคโรทีน และแกมมา-แคโรทีน แซนโทฟิลล์ ได้แก่ ลูเทอิน ซีแซนธิน ไวโอโลแซนธิน และนีโอแซนธิน รงควัตถุทั้งหมดของสาหร่ายสีเขียวจะอยู่ภายในคลอโรพลาสต์ ซึ่งในสาหร่ายกลุ่มนี้มีรูปร่างของคลอโรพลาสต์ที่แตกต่างกันมาก เช่น รูปถ้วย รูปเกือกม้า ตาข่าย ขดเป็นเกลียว แฉกรูปดาวและเป็นแฉก ฯลฯ ผนังเซลล์โดยทั่วไปจะมีเซลลูโลสเป็นโครงสร้างหลัก ประกอบด้วยเมทริกซ์ของเฮมิเซลลูโลสและสารเพกติก สาหร่ายสีเขียวสะสมคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งอาหาร ได้แก่ อะไมโลสและอะไมโลเพคติน โดยสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมหรือคลอโรพลาสต์

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

2.5.1 สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจน

สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen deprivation) มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากการขาดแหล่งไนโตรเจนส่งผลให้เกิดการยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงสองลดลง ภายใต้การขาดแหล่งไนโตรเจน เซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ส่งผลให้โปรตีน Oxygen evolving complex (OEC) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแตกตัวของน้ำเสียสภาพ ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการแตกตัวของน้ำ (Water splitting) ในระบบแสงสองลดลง ส่งผลให้เซลล์สาหร่ายสามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น (Li และคณะ, 2015)

2.5.2 สภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์

สภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์ (Sulfur deprivation) มีผลต่อการผลิตไฮโดรจนของสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากซัลเฟอร์มีความจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน D1 ที่อยู่ในศูนย์กลางของระบบแสงสอง (Reaction center) ดังนั้น เมื่อเซลล์ถูกบ่มภายใต้สภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์จะส่งผลให้ระบบแสงสองหยุดการสังเคราะห์โปรตีน D1 เมื่อการสังเคราะห์โปรตีน D1 ลดลง อัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวจึงลดลง ทำให้กระบวนการแตกตัวของน้ำลดลงและปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิเจนจึงลดลงด้วย จนในที่สุด ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น (Melis และคณะ, 2000; Zhang และคณะ, 2002)

2.5.3 แสง

แสง (Light) มีความสำคัญต่อการกระบวนการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากแสงมีผลต่อการทำงานของระบบแสงสอง ความเข้มแสงสูงจะส่งผลให้สาหร่ายมีการผลิตออกซิเจนมากขึ้น แต่ในสภาวะที่ความเข้มแสงต่ำ สาหร่ายจะใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจมากกว่าที่ได้มาจากการสังเคราะห์แสง ทำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจน ส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Tsygankov และคณะ, 2006) นอกจากนี้ แสงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย แต่หากความเข้มแสงสูงเกินไป จะยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากความเข้มแสงสูงมีผลทำให้ระบบแสงสองเกิดความเสียหาย (Photoinhibition) (Kim และคณะ, 2006)

2.6 สารยับยั้งการทำงานของระบบแสงสอง

สารยับยั้งการทำงานของระบบแสงสอง (PSII Inhibitor) ที่ใช้ในการศึกษานี้มี 2 ชนิด คือ

2.6.1 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU)

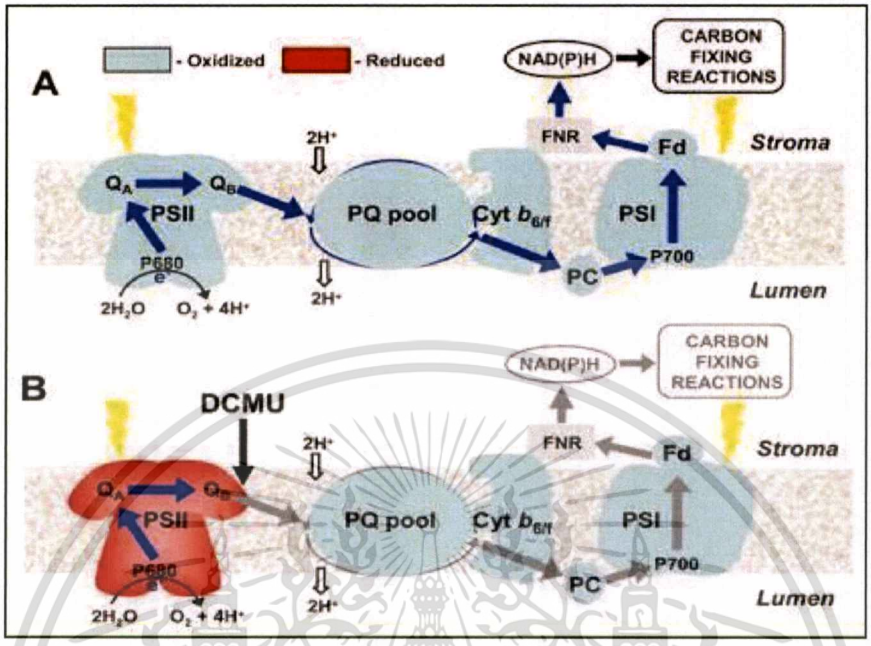
สาร DCMU เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยมีตำแหน่งของการยับยั้ง (Site of action) ที่บริเวณโปรตีน D1 (Q_B protein) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของระบบแสงสอง และฝังตัวอยู่ในเยื่อไทลาคอยด์ สาร DCMU จะเข้าไปสร้างพันธะแทนที่พลาสโตควิโนน ทำให้พลาสโตควิโนนไม่สามารถเข้ามารับอิเล็กตรอนบริเวณ Q_B binding site ได้ ส่งผลให้กระบวนการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในระบบแสงสองหยุดชะงักลง (สุภาพร และคณะ, 2547) ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้รับอิเล็กตรอนจากระบบแสงหนึ่งเพียงอย่างเดียว ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนลดลง (Zhang และคณะ, 2014) (รูปที่ 2.2)

2.6.2 Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP)

สาร CCCP เป็นสารประเภท Protonophore uncoupler ซึ่งเป็นตัวช่วยเคลื่อนย้ายโปรตอนผ่านเยื่อหุ้มต่างๆ โดยช่วยกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว เช่น *Chlamydomonas reinhardtii* (Ran และคณะ, 2006) สาร CCCP สามารถลดการผลิตออกซิเจนโดยการยับยั้งการทำงานของระบบแสงสอง โดยไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการหายใจภายในเซลล์ (Yang และคณะ, 2014) และสาร CCCP ทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแตกตัวของน้ำและกิจกรรมทั้งหมดของระบบแสงสอง นอกจากนี้ สาร CCCP จะทำให้โปรตอนผ่านเยื่อหุ้มไทลาคอยด์มาอยู่บริเวณ

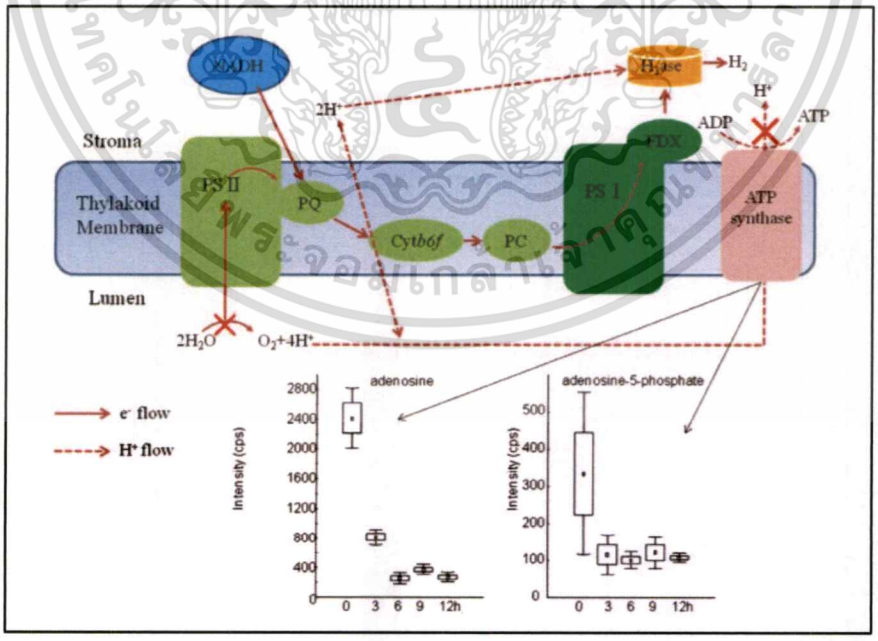
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สโตรมา ซึ่งมีเฟอร์รีดอกซินและเอนไซม์ไฮโดรจีเนสอยู่บริเวณนี้ ทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนได้ (Ran และคณะ, 2006) (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.2 การยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองโดย DCMU

ที่มา: Kurepin และคณะ, 2013



รูปที่ 2.3 การยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองโดย CCCP

ที่มา: Yang และคณะ, 2014

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุภาพร และคณะ (2547) ศึกษาการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงในคลอโรพลาสต์ของปวยเล้งเปรียบเทียบกับพืชตัวอย่าง 6 ชนิด โดยทำการเติมสาร 3-(-3,4-Dicholorophenyl) 1-1 dimetheyl (DCMU) และให้โพแทสเซียมเฟอร์ริไซยาไนด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน พบว่าการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อได้รับสาร DCMU ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น เนื่องจากสาร DCMU มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยมีตำแหน่งของการยับยั้งที่บริเวณโปรตีน D1 สาร DCMU จะเข้าไปสร้างพันธะที่พลาสโตควิโนน ทำให้พลาสโตควิโนนไม่สามารถเข้ามารับอิเล็กตรอนบริเวณโปรตีน D1 ได้ ทำให้กระบวนการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในระบบแสงสองหยุดชะงักลง

Zhang และคณะ (2014) ศึกษากลไกการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella protothecoides* ภายใต้สภาวะการจำกัดแหล่งไนโตรเจนและการขาดแหล่งซัลเฟอร์พบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. protothecoides* ผลิตไฮโดรเจนได้มากในสภาวะการจำกัดแหล่งไนโตรเจนร่วมกับการขาดซัลเฟอร์ (LNS) และในสภาวะการจำกัดแหล่งไนโตรเจน (LN) การจำกัดแหล่งไนโตรเจนร่วมกับการขาดซัลเฟอร์ (LNS) ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของโปรตีน Oxygen evolving complex (OEC) ในระบบแสงสองลดลง ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนลดลง เมื่อในระบบมีออกซิเจนลดลง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงทำงานได้ดีขึ้นและส่งผลให้สาหร่ายสีเขียว *C. Protothecoides* ผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น นอกจากนี้ สาร DCMU ยังไปยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนในระบบแสงสอง ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้รับอิเล็กตรอนจากระบบแสงหนึ่งเพียงอย่างเดียว ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น

Peltier และ Schmidt (1991) ศึกษาการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมภายในเซลล์สีเขียว *C. reinhardtii* 2137 โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจนภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป ภายใต้ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีพบว่า เมื่อสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* 2137 เจริญเติบโตในอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในไทลาคอยด์ เช่น Light harvesting complex (LHC) เป็นต้น นอกจากนี้การขาดแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงจะส่งผลให้เซลล์ของสาหร่ายเกิดการสะสมของแป้งและไขมันเพิ่มมากขึ้น

Scoma และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ภายใต้สภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์ โดยทำการเติมสาร 3-(-3,4-Dicholorophenyl) 1-1 dimetheylurea (DCMU) ลงไปในชั่วโมงที่ 14 และ 24 ก่อนทำการย้ายเซลล์ของสาหร่ายเข้าสู่สภาวะการขาดแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซัลเฟอร์พบว่า เมื่อเติมสาร DCMU ลงไปในชั่วโมงที่ 24 สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* มีปริมาณของแป้งลดลงอย่างช้าๆ และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 70 มิลลิลิตรต่อลิตร ในทางตรงกันข้าม เมื่อทำการเติมสาร DCMU ที่เวลาชั่วโมงที่ 14 ก่อนการย้ายเซลล์ของสาหร่ายเข้าสู่สภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์ สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* มีปริมาณของแป้งลดลงอย่างรวดเร็วและไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น

Yang และคณะ (2014) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* โดยทำการเติมสาร Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) 15 ไมโครโมลาร์ ลงในอาหาร Tris acetate phosphate (TAP) พบว่าสาร CCCP ยับยั้งการทำงานของระบบแสงสอง ภายใต้สภาวะที่มีแสง นอกจากนี้ ยังพบว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ในอาหาร TAP ที่เติม CCCP จะเพิ่มขึ้นเป็น 13 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร TAP ที่ไม่เติม CCCP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 4 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ชนิดและแหล่งที่มาของสาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่าย	แหล่งที่มา
Chlamydomonas reinhardtii CC-124	Chlamydomonas resource center
Chlorella sp. A25.1	แหล่งน้ำจืดจากนาข้าว จังหวัดชัยนาท
Chlorella sp. CirGreen	แหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร
Tetraspora sp.	แหล่งน้ำจืด จังหวัดปทุมธานี

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

อาหาร TAP (Tris Acetate Phosphate medium) (ภาคผนวก ก) (Harris, 1989)

3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.2.1 กรดบอริก (H_3BO_3) (Carlo Erba, Italy)

3.2.2.2 กรดอะซีติก (Glacial acetic acid) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.2.3 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (Mallinckrodt Baker, USA)

3.2.2.4 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Carlo Erba, Italy)

3.2.2.5 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) (Fluka, Switzerland)

3.2.2.6 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka, Switzerland)

3.2.2.7 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Merck, Germany)

3.2.2.8 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) (British Drug Houses, England)

3.2.2.9 เปปโตน (Peptone) (Difco, USA)

3.2.2.10 ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA) (Promega, USA)

3.2.2.11 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Carlo Erba, Italy)

3.2.2.12 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Carlo Erba, Italy)

3.2.2.13 ทริสเบส (Tris-base) (Vivantis Ltd., UK)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.14 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Carlo Erba, Italy)

3.2.2.15 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)

3.2.2.16 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy

3.2.2.17 อะการ์ (Agar) (Difco, USA)

3.2.2.18 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (Carlo Erba, Italy)

3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การยับยั้งระบบแสงสอง

3.2.3.1 Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) (Sigma, Germany)

3.2.3.2 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) (Sigma, Germany)

3.3 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

3.3.1 ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอน (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Praxair, Thailand)

3.3.2 ก๊าซอาร์กอน (ความบริสุทธิ์ 99.999%) (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Thonburiwattana Ltd., Thailand)

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 กระบอกตวง (Cylinder) (Kartell, Italy)

3.4.2 ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร (Vial)

3.4.3 คิวเวตต์ควอตซ์ (Quartz cuvette) (Starna Scientific, UK)

3.4.4 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares) (Pyrex, USA)

3.4.5 ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes) (Labnet, USA)

3.4.6 จานเพาะเลี้ยง (Plate) (Pyrex, USA)

3.4.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)

3.4.8 พาราฟิล์ม M (Parafilm) (Bemis company, USA)

3.4.9 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.4.10 หลอดเซ็นตริฟิวจ์ (Centrifuge Tube)

3.4.11 เข็มฉีดก๊าซ (Scientific Glass Engineering, Australia)

3.4.12 เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)

3.4.13 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.14 เครื่องชั่งสาร (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)

3.4.15 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortech Z38K, Germany)

3.4.16 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)

3.4.17 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1601, Japan)

3.4.18 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)

3.4.19 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)

3.4.20 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)

3.4.21 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 วิธีการเตรียมหัวเชื้อของสาหร่ายสีเขียว

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์บนอาหารแข็ง Tris acetate phosphate (TAP) ภายใต้การให้แสงสว่างตลอดเวลาที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้น นำลูปเขี่ยโคโลนีของสาหร่ายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำฟลาสก์บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีและให้แสงสว่างตลอดเวลาภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน

3.5.2 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว

นำหัวเชื้อของสาหร่ายสีเขียวตามหัวข้อ 3.5.1 มาใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP จำนวน 2 ครั้งและกระจายเซลล์ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 นำฟลาสก์ไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีและให้แสงสว่างตลอดเวลาภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

3.5.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิด ในฟลาสก์ที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (หัวข้อ 3.5.2) จากนั้น นำเซลล์ใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้งและกระจายเซลล์ในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดสอบ บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีและให้แสงสว่างตลอดเวลาภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง ล้างเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบ โดยปรับให้มีความหนาแน่นของเซลล์ให้คงที่ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8 จากนั้น ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ใส่ลงในขวดแก้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร แบ่งการทดลองออกเป็น 2 สภาวะคือ สภาวะที่มีอากาศและสภาวะที่ปราศจากอากาศ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ จะทำการปิดฝาและห่อฟอยล์ขวดแก้วให้มืดสนิท นำขวดแก้วไปห่อฟอยล์และปิดฝา จากนั้น พ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที เพื่อไล่อากาศในขวดแก้ว ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 0, 2, 12, 24, 48, 72 และ 96 ด้วยเครื่อง GC-TCD ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD))

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Column	Packed column 2 m, Molecular sieve 5 ^{0}A 60/80 mesh
Detector	Thermal conductivity detector (TDC)
Temperature Program	Injector temperature : 100 °C
	Column temperature: 50 °C
	Detector temperature: 100 °C
Carrier gas	Argon flow rate 20 ml/min (99.999% purity)

3.5.4 วิธีการศึกษาผลของแหล่งอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิดตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.2 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้งและกระจายเซลล์ในฟลาสก์ที่มีอาหารทดสอบ ได้แก่ อาหาร TAP ปกติ, อาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (TAP-N), อาหาร TAP ที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) และอาหารที่ขาดทั้งแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ (TAP-NS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้น นำฟลาสก์ไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีและให้แสงสว่างตลอดเวลาภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง ล้างเซลล์และกระจายเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.8 ปิเปตสารละลายเซลล์ใส่ลงในขวดแก้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศและสภาวะที่ปราศจากอากาศ โดยสภาวะที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปราศจากอากาศนำขวดแก้วไปปิดฝาและห่อฟอยล์ จากนั้น พ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที เพื่อไล่อากาศในขวดแก้ว ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.3

3.5.5 วิธีการศึกษาผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.2 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้งและกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบ จากนั้น นำเซลล์ไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีและให้แสงสว่างตลอดเวลาภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง ล้างเซลล์และกระจายเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.8 ปิเปตสารละลายเซลล์ใส่ลงในขวดแก้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดและนำไปบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศและสภาวะที่ปราศจากอากาศ นำขวดไปบ่มในที่มืดและในที่มีแสงที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ จากนั้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.3

3.5.6 วิธีการศึกษาผลของชนิดของสารยับยั้ง (Inhibitor) ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.2 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้งและกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบ จากนั้น นำเซลล์ไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีและให้แสงสว่างตลอดเวลาภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ล้างเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบโดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.8 ปิเปตสารละลายเซลล์ใส่ลงในขวดแก้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารยับยั้งระบบแสงสอง ได้แก่ Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) และ 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์ลงในสารแขวนลอยเซลล์ ปิดฝาขวดและนำไปบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศและสภาวะที่ปราศจากอากาศ นำขวดไปบ่มในที่มืดและในที่มีแสงที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ จากนั้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

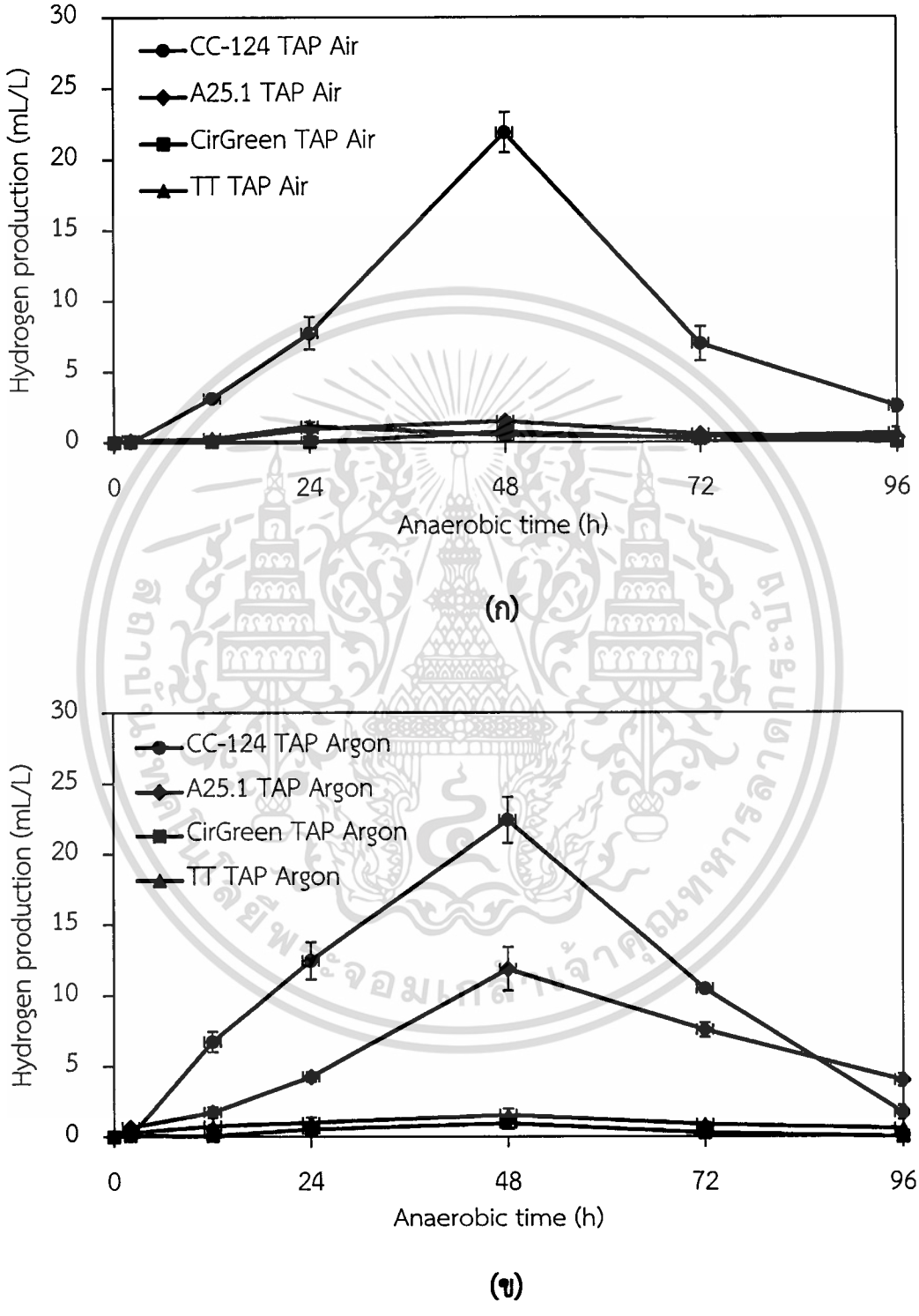
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในอาหาร TAP ในสภาวะที่มีอากาศและสภาวะที่ปราศจากอากาศ

จากการนำสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. A25.1, *Chlorella* sp. CirGreen และ *Tetraspora* sp. มาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว Tris acetate phosphate (TAP) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำฟลาสก์ไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง ล้างและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP สูตรปกติที่มีแหล่งอาหารสมบูรณ์ นำไปบ่มในสภาวะเขย่าและให้แสงต่อเนื่องภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และปิเปตสารละลายเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวด Vial นำ Vial ไปบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศและสภาวะที่ปราศจากอากาศ วิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟในชั่วโมงที่ 0, 2, 12, 24, 48, 72 และ 96 จากผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 21.90 ± 1.40 และ 22.40 ± 1.65 มิลลิลิตรต่อลิตร ภายหลังการบ่มในสภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.1 ก และ ข) ซึ่งจะเห็นได้ว่า การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ภายใต้สภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายชนิดนี้มีความทนต่อออกซิเจนในอากาศสูง สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 11.86 ± 1.53 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูปที่ 4.1ข) เมื่อบ่มภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แต่ผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณต่ำเมื่อบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (รูปที่ 4.1ก) แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. A25.1 มีความไวต่อออกซิเจนมาก นอกจากนี้ ยังพบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. CirGreen และ *Tetraspora* sp. ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ทั้งภายใต้สภาวะที่มีอากาศหรือปราศจากอากาศ (รูปที่ 4.1ก และ ข) ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิดนี้มีความไวต่อออกซิเจน เมื่อบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ จะทำให้มีปริมาณออกซิเจนในระบบมากเกินไป ซึ่งโมเลกุลของออกซิเจนมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่บ่มภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ghirardi และคณะในปี ค.ศ. 1997 ที่พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในสภาวะที่ปราศจากอากาศ เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ([Fe-Fe] hydrogenase) มีความไวต่อโมเลกุลของออกซิเจนเป็นอย่างมาก



รูปที่ 4.1 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (ก) และสภาวะที่ปราศจากอากาศ (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของการขาดธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

จากการนำสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. A25.1, *Chlorella* sp. CirGreen และ *Tetraspora* sp. มาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะเขย่าและให้แสงสว่างอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ล้างและกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ อาหาร TAP สูตรปกติที่มีแหล่งอาหารสมบูรณ์ (เป็นอาหารควบคุม) อาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) และอาหาร TAP ที่ขาดทั้งแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ (TAP-NS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปบ่มภายใต้สภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิห้องและให้แสงต่อเนื่องภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ล้างและกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบ ปิเปตสารละลายเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ในขวด Vial นำไปบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศและสภาวะที่ปราศจากอากาศ แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟในชั่วโมงที่ 0, 2, 12, 24, 48, 72 และ 96 จากผลการทดลองพบว่า ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด รองลงมาคือ *Chlorella* sp. A25.1 ในขณะที่สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen และ *Tetraspora* sp. มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำสุดอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.2) ในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อบ่มในอาหาร TAP เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.47 ± 0.03 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.2 ข) ซึ่งมากกว่าเมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.32 ± 0.05 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.2 ก) ในขณะที่สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงเมื่อนำเซลล์มาบ่มในอาหาร TAP-S และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุด เมื่อนำเซลล์มาบ่มในอาหาร TAP-N และ TAP-NS (รูปที่ 4.2 ก และ ข) แสดงให้เห็นว่า การขาดแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ไม่ส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า เมื่อเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหารที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ ทำให้เซลล์มีกิจกรรมของระบบแสงสองลดลง (Melis และคณะ, 2000) เนื่องจากซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบหลักของกรดอะมิโนซีสเทอีนและเมธไทโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนสำคัญของโปรตีน D1 ที่อยู่บริเวณศูนย์กลางของระบบแสงสองและทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของระบบแสงสอง (Melis และคณะ, 2000; Zhang และคณะ, 2002) เมื่อโปรตีน D1 เกิดความเสียหายเนื่องจากไม่ได้รับการซ่อมแซม ส่งผลให้กระบวนการสังเคราะห์แสงถูกยับยั้งและทำให้กระบวนการแตกตัวของน้ำลดลง ออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการแตกตัวของน้ำถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจมากกว่าออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการแตกตัวของน้ำ สภาวะการเพาะเลี้ยงของเซลล์จึงเข้าสู่สภาวะปราศจากอากาศได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้น เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกมากขึ้น (Ghirardi และคณะ,

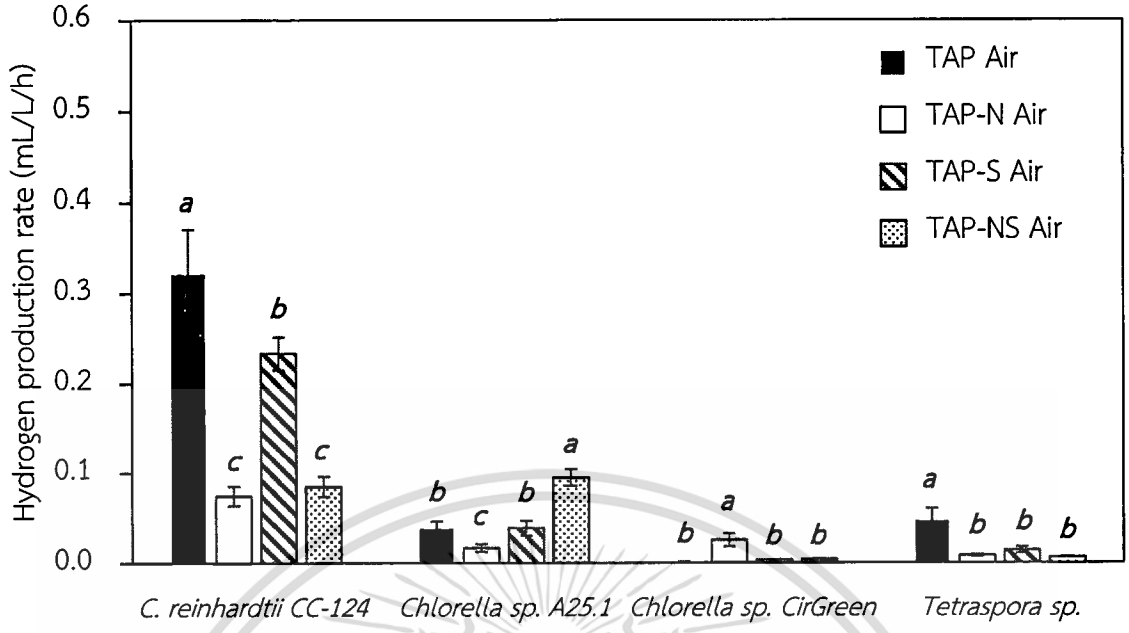
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2000; Melis และคณะ, 2000; Zhang และคณะ, 2002) ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์สูงขึ้น

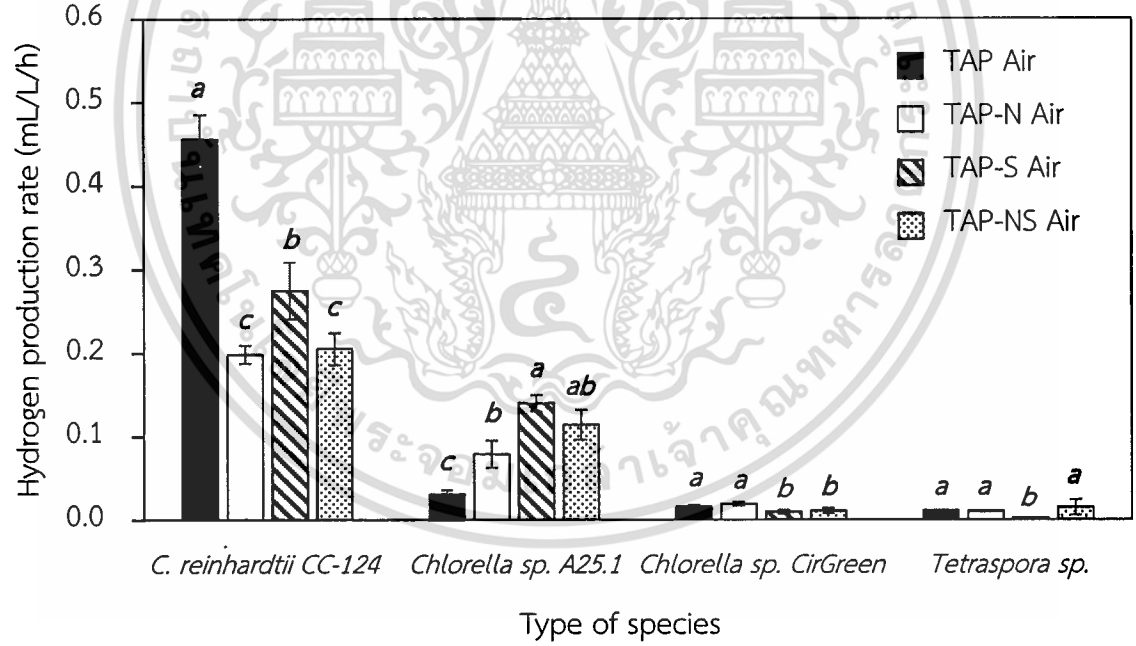
ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ สาหร่าย *Chlorella* sp. A25.1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-NS เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.10 ± 0.05 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูปที่ 4.1 ก และ ข) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก เมื่อเซลล์สาหร่ายขาดแหล่งอาหารทั้งธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงที่สองลดลง ส่งผลให้ออกซิเจนในระบบลดลง เมื่อออกซิเจนลดลง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถทำงานได้เต็มที่ และทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ คือ ภายใต้การขาดไนโตรเจน เซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ส่งผลต่อโปรตีน Oxygen evolving complex (OEC) จะเสียสภาพไป ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการแตกตัวของน้ำ (Water splitting) ในระบบแสงสองลดลง (Zhang และคณะ, 2014) ประกอบกับสภาวะการขาดซัลเฟอร์ที่มีผลให้โปรตีน D1 เกิดความเสียหาย เนื่องจากการซ่อมแซมของระบบแสงสองถูกยับยั้งและทำให้กระบวนการแตกตัวของน้ำลดลง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกมากขึ้น (Ghirardi และคณะ, 2000; Melis และคณะ, 2000; Zhang และคณะ, 2002) ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ภายใต้สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์จึงสูงขึ้นตามไปด้วย

ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศ โดยเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 0.52 ± 0.06 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.3 ก) และมีค่าใกล้เคียงกับเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.3 ข) ผลการทดลองยืนยันว่า อาหาร TAP เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 และการบ่มภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศจะช่วยเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายชนิดนี้ได้ (รูปที่ 4.2 ก และ 4.3 ก) เนื่องจากสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 มีประสิทธิภาพในการทนต่อออกซิเจน ทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนได้ในอาหาร TAP ได้สูงสุด เนื่องจากอาหาร TAP มีธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว นอกจากนี้ ยังพบว่า ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศจะช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีความไวต่อโมเลกุลของออกซิเจนเป็นอย่างมาก (Ghirardi และคณะ, 1997) เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศจะไม่มีโมเลกุลของออกซิเจนมาจับที่บริเวณ Active site ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกมากขึ้น การผลิตไฮโดรเจนก็สูงขึ้นตามไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



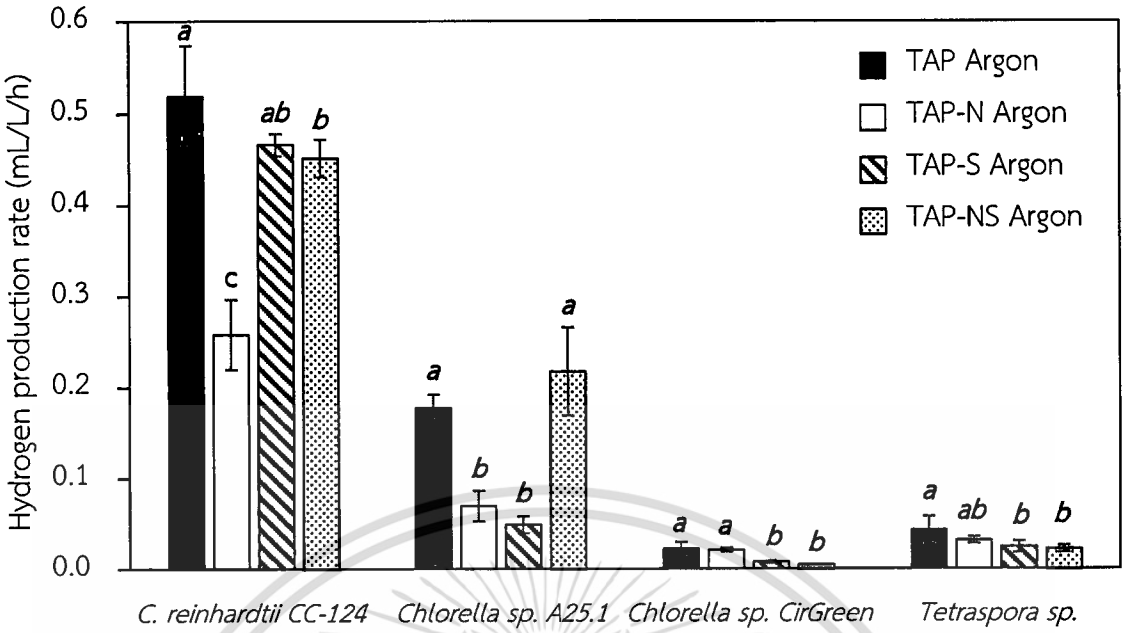
(ก)



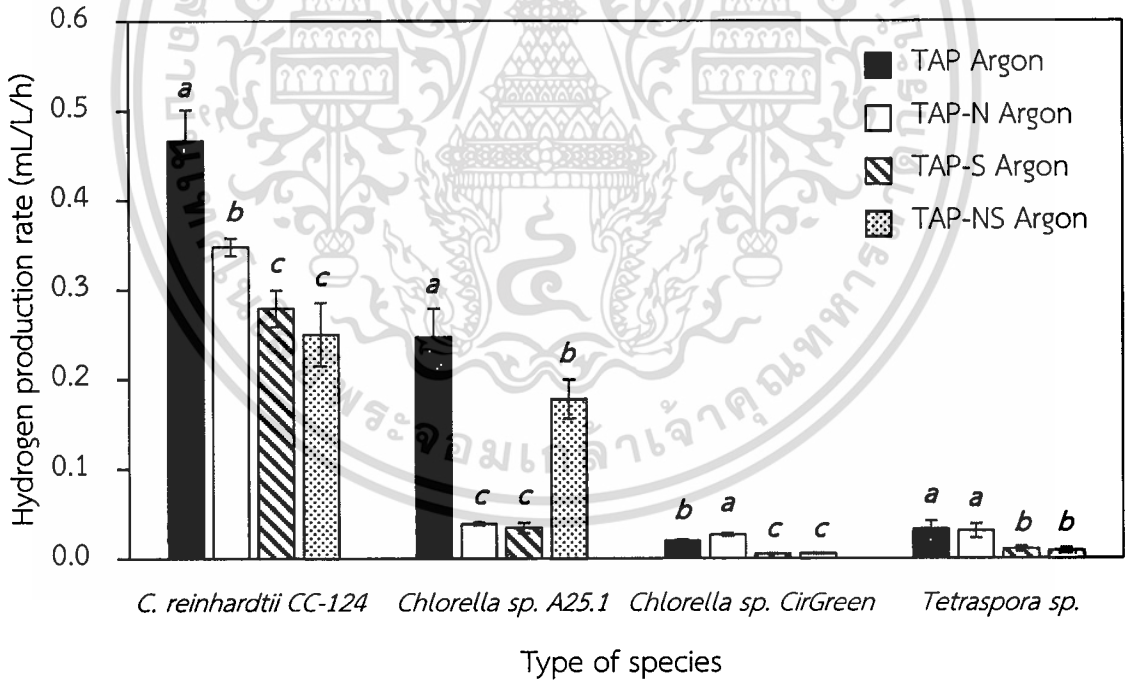
(ข)

รูปที่ 4.2 อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. A25.1, *Chlorella* sp. CirGreen และ *Tetraspora* sp. ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS ภายใต้สภาวะที่มีอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) และ 48 ชั่วโมง (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.3 อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. A25.1, *Chlorella* sp. CirGreen และ *Tetraspora* sp. ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) และ 48 ชั่วโมง (ข)

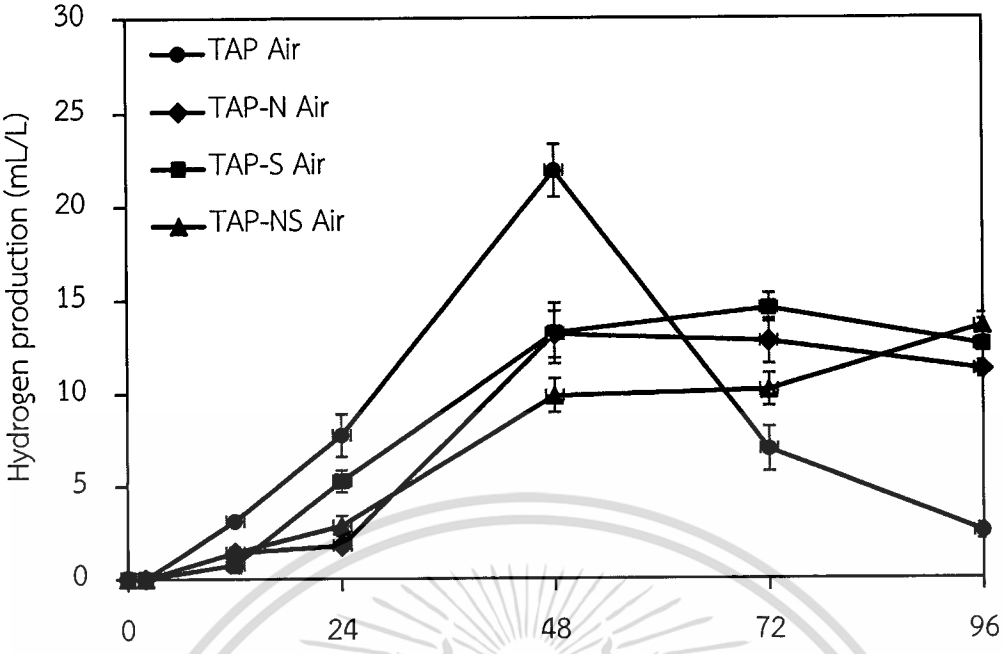
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen และ *Tetraspora* sp. มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนค่อนข้างต่ำ เมื่อบ่มเซลล์ในอาหารทุกชนิดทั้งภายใต้สภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ เนื่องจากการขาดธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ไม่สามารถช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย 2 ชนิดนี้ (รูปที่ 4.2 และรูปที่ 4.3) อาจเป็นผลมาจากสาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิดนี้มีเมแทบอลิซึมของการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างจากสาหร่ายชนิดอื่นในการตอบสนองต่อการขาดแหล่งอาหารต่างๆ จึงส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณค่อนข้างต่ำ

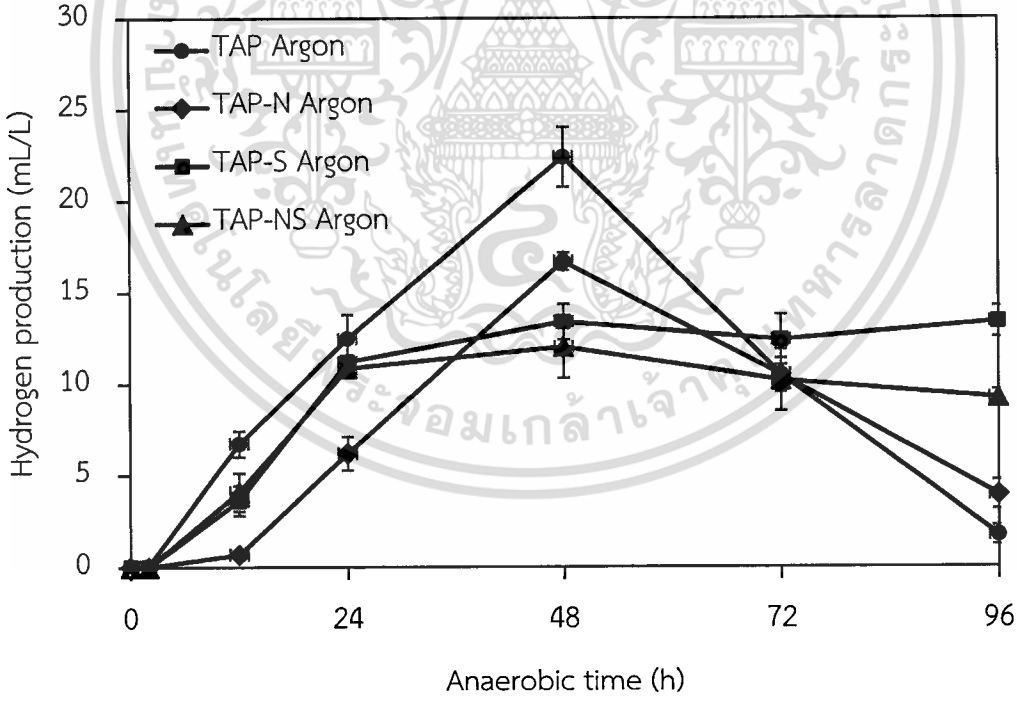
จากการวิเคราะห์ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS เป็นเวลา 0, 2, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่เพาะลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ โดยสามารถผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 21.90 ± 1.41 และ 22.46 ± 1.65 มิลลิลิตรต่อลิตรตามลำดับ และการผลิตไฮโดรเจนจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหารที่ขาดธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ (TAP-N, TAP-S, TAP-NS) พบว่าการผลิตไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นช้ากว่าในช่วงเริ่มต้นของการบ่ม แต่เมื่อเวลาผ่านไป การผลิตไฮโดรเจนจะลดลงในอัตราที่ช้ากว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP (รูปที่ 4.4)

จากการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS เป็นเวลา 0, 2, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่เพาะลี้ยงในอาหาร TAP-NS เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดภายใต้สภาวะที่มีอากาศ โดยสามารถผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 11.24 ± 1.93 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูปที่ 4.5 ก) แต่เมื่อเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ปราศจากอากาศ พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยสามารถผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 11.86 ± 1.53 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูปที่ 4.5 ข) แสดงให้เห็นว่า สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang และคณะในปี ค.ศ. 2014 ที่พบว่า ในสภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์จะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของโปรตีน Oxygen evolving complex (OEC) ในระบบแสงสองลดลง ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการแตกตัวของน้ำลดลงตามไปด้วย เมื่อในระบบมีออกซิเจนลดลง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงทำงานได้ดีขึ้นและส่งผลให้สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



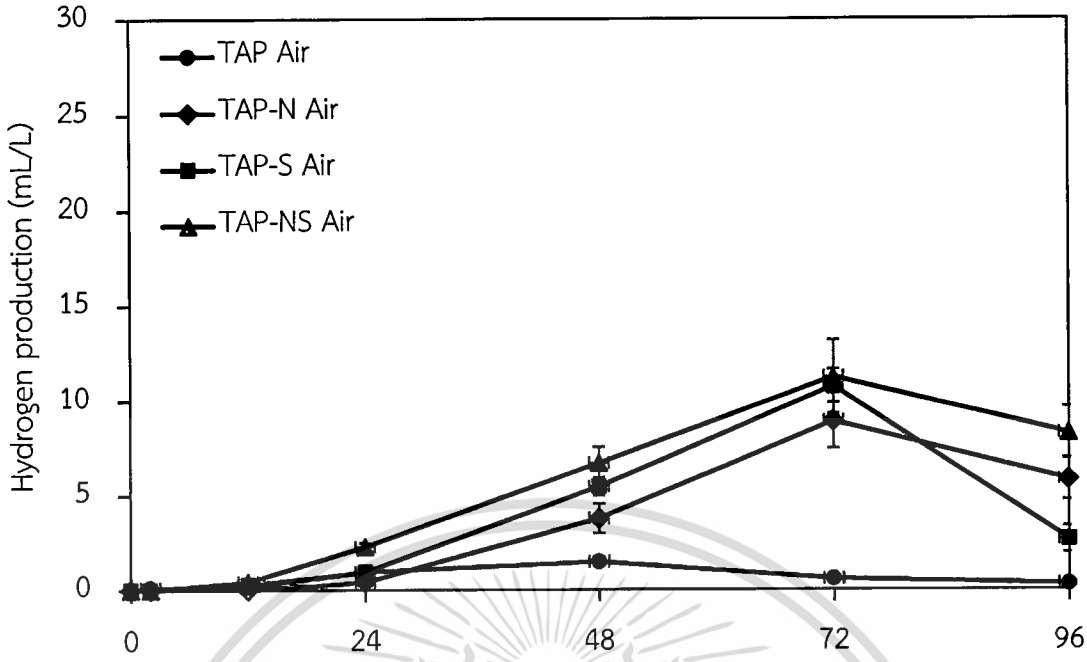
(ก)



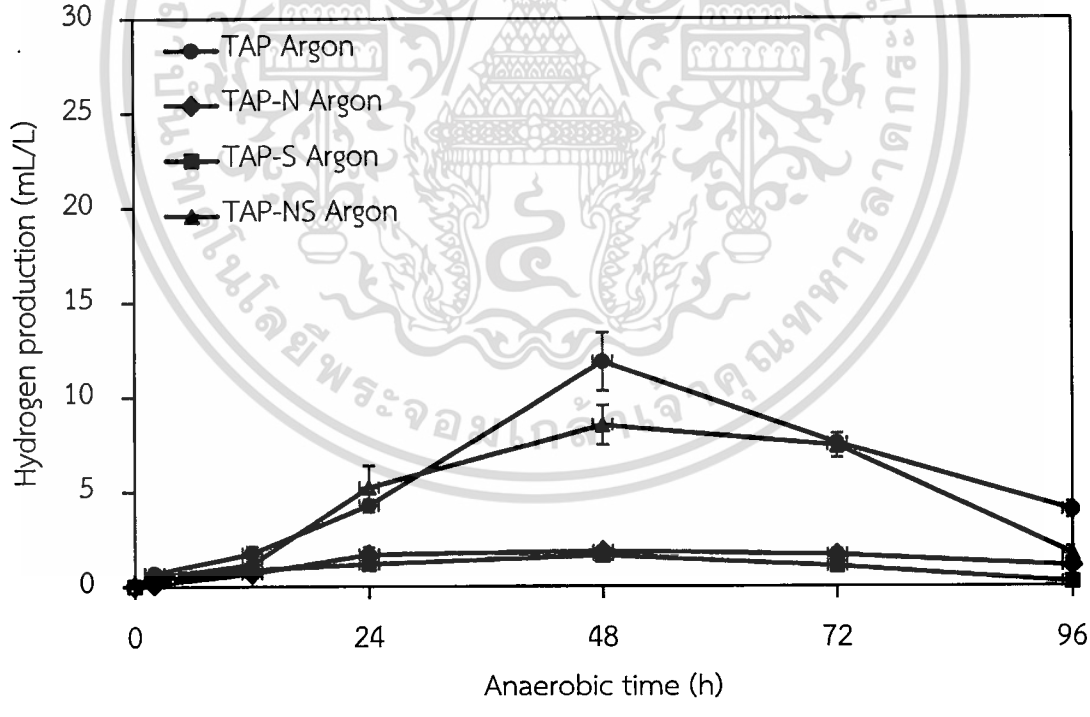
(ข)

รูปที่ 4.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS ในสภาวะที่มีอากาศ (ก) และสภาวะที่ปราศจากอากาศ (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)

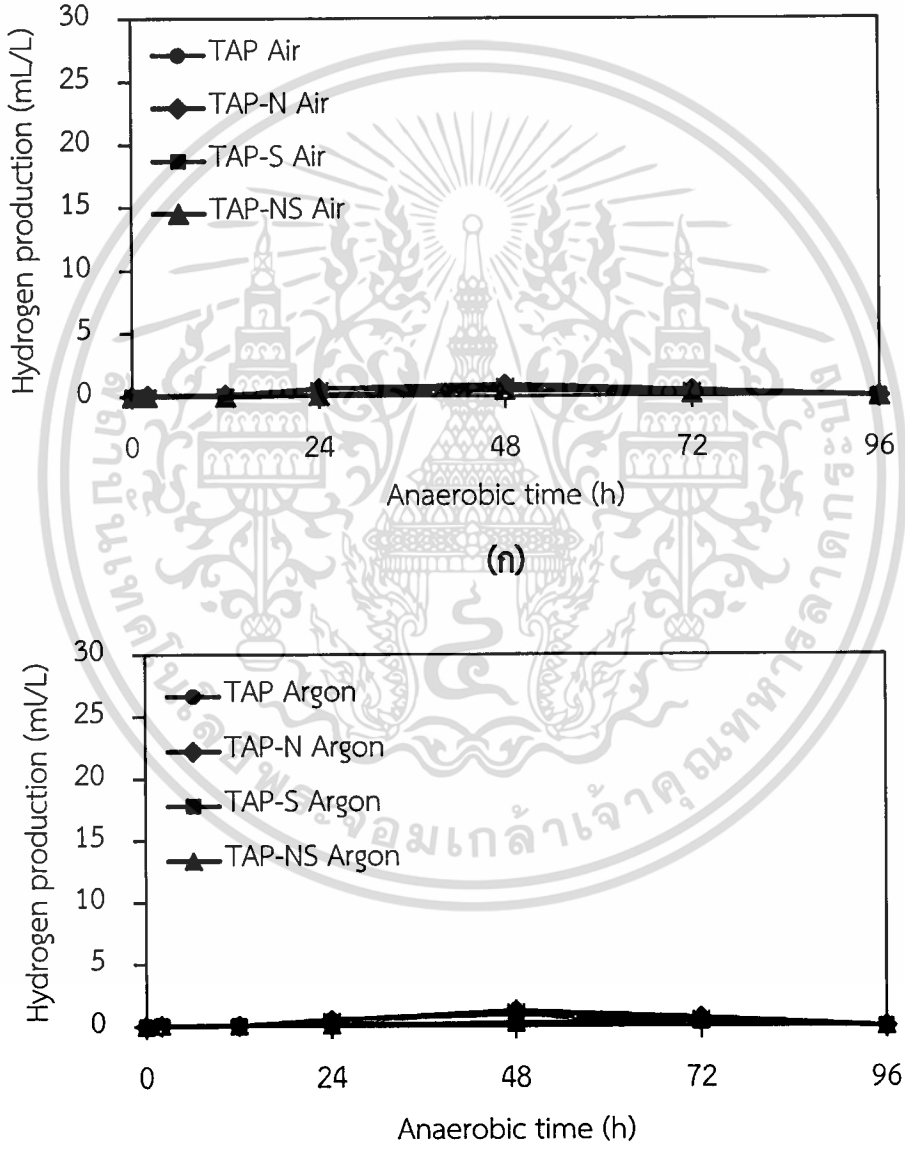


(ข)

รูปที่ 4.5 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS ในสภาวะที่มีอากาศ (ก) และสภาวะที่ปราศจากอากาศ (ข)

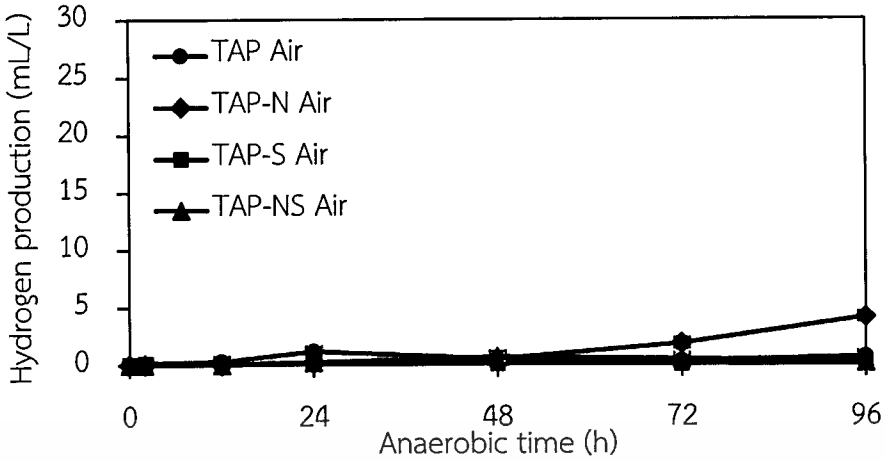
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen และ *Tetraspora* sp. ในอาหาร TAP, TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N), TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) และ TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ (TAP-NS) บ่มเป็นเวลา 0, 2, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศพบว่า สาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิดนี้มีการผลิตไฮโดรเจนค่อนข้างต่ำเมื่อบ่มในอาหารทุกชนิดภายใต้สภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ (รูปที่ 4.6 และรูปที่ 4.7) ดังนั้น จึงไม่นำสาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิดนี้ไปทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

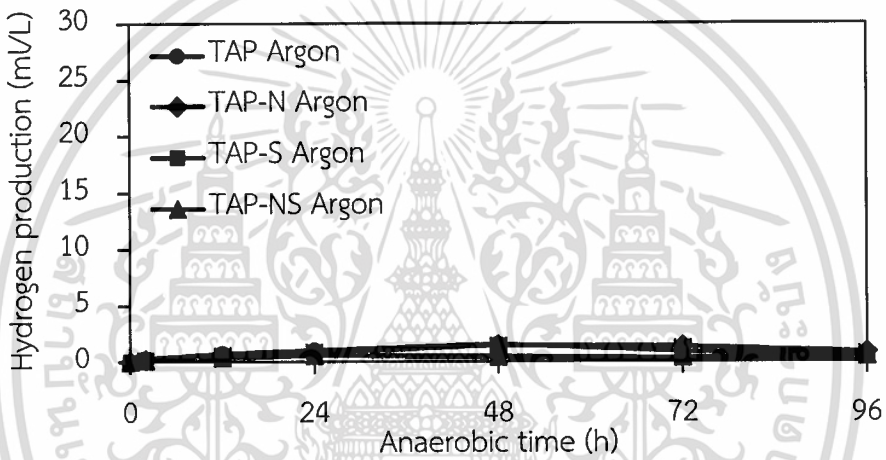


รูปที่ 4.6 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS ในสภาวะที่มีอากาศ (ก) และสภาวะที่ปราศจากอากาศ (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.7 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-S และ TAP-NS ในสภาวะที่มีอากาศ (ก) และสภาวะที่ปราศจากอากาศ (ข)

4.3 ผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 และ *Chlorella* sp. A25.1

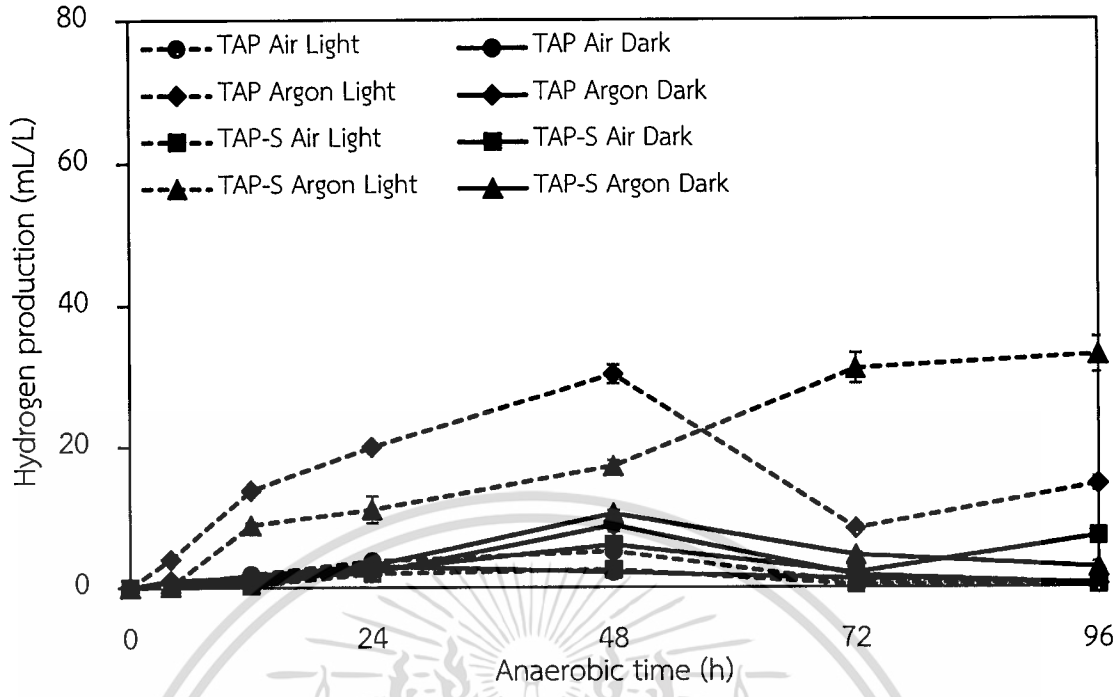
จากการศึกษาผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิด โดยนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-S และสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-NS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเก็บเกี่ยวเซลล์ ล้างและกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) เท่ากับ 0.8 จากนั้น ปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงขวด Vial ขนาด 12.5 มิลลิลิตร บ่มในที่มีแสงภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ และบ่มในที่มืดโดยการห่อฟอยล์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

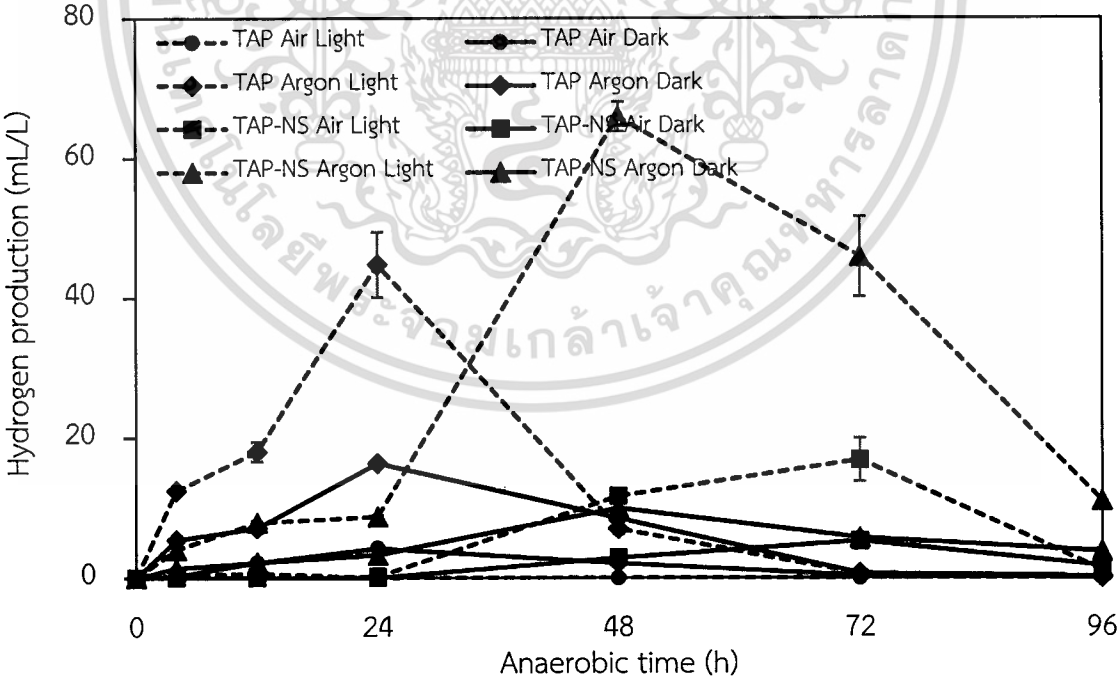
แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟที่ชั่วโมงที่ 0, 4, 12, 24, 48, 72 และ 96 จากผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 30.34 ± 1.32 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศและมีแสงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.8) นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ยังผลิตไฮโดรเจนได้สูงเช่นกัน คือ ผลิตได้ 33 ± 2.48 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-S ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (รูปที่ 4.8)

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-NS ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศและภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 65.96 ± 2.11 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูปที่ 4.9) หลังจากนั้น การผลิตไฮโดรเจนจะลดลง ในขณะที่เซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดภายหลังการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 44.76 ± 4.68 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูปที่ 4.9) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการบ่มภายใต้สภาวะที่มีแสง ทำให้เกิดกระบวนการแตกตัวของน้ำได้เป็นโปรตอน อิเล็กตรอนและออกซิเจนเพิ่มขึ้น ทำให้มีกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนจากระบบแสงสองเพิ่มมากขึ้น (Kim และคณะ, 2006) ถึงแม้จะมีการแตกตัวของน้ำได้ออกซิเจนออกมา แต่ในสภาวะที่ปราศจากอากาศ ปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอที่จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังนั้น เมื่อมีอิเล็กตรอนในระบบมากขึ้น จะทำให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น แต่ในสภาวะที่มีอากาศและแสงพบว่าไม่สามารถทำให้เซลล์สาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากในสภาวะที่มีอากาศ จะมีการแตกตัวของน้ำได้ออกซิเจน เมื่อมีออกซิเจนอยู่ในระบบมาก ออกซิเจนจะไปยังยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลงตามไปด้วย (Laurinavichene และคณะ, 2004) ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Antal และคณะในปี ค.ศ. 2016 ที่พบว่าแสงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย โดยความเข้มข้นสูงจะยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงและยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน แต่ถ้าสาหร่ายสีเขียวได้รับแสงน้อยเกินไป จะทำให้การเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนถูกจำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-S ภายใต้สภาวะที่มีแสงและที่มืด ในสภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ



รูปที่ 4.9 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-NS ภายใต้สภาวะที่มีแสงและที่มืด ในสภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ

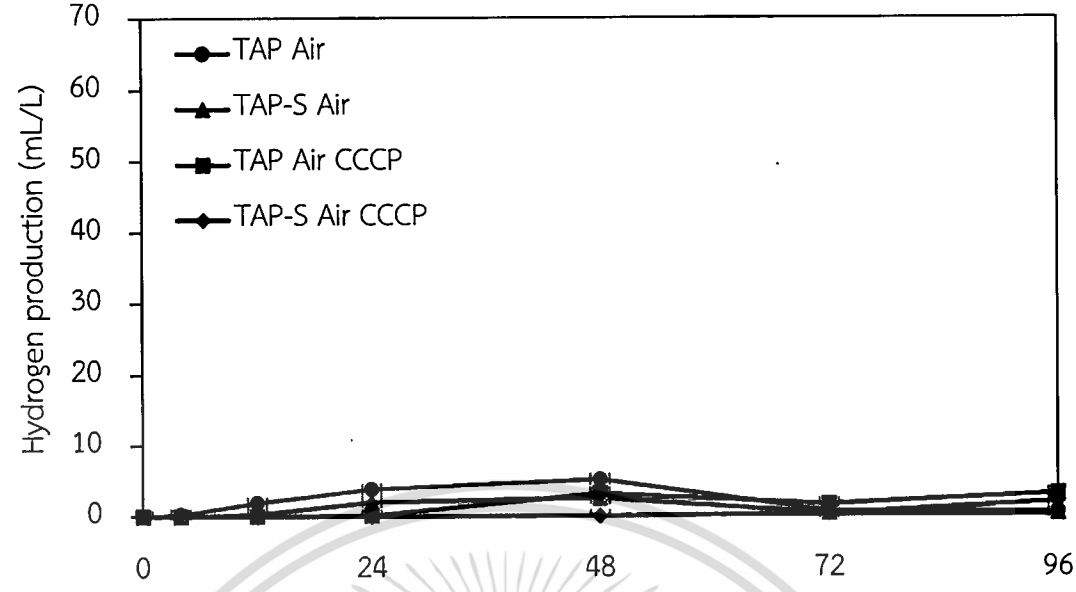
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของสารยับยั้งการสังเคราะห์แสง CCCP และ DCMU ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 และ *Chlorella* sp. A25.1

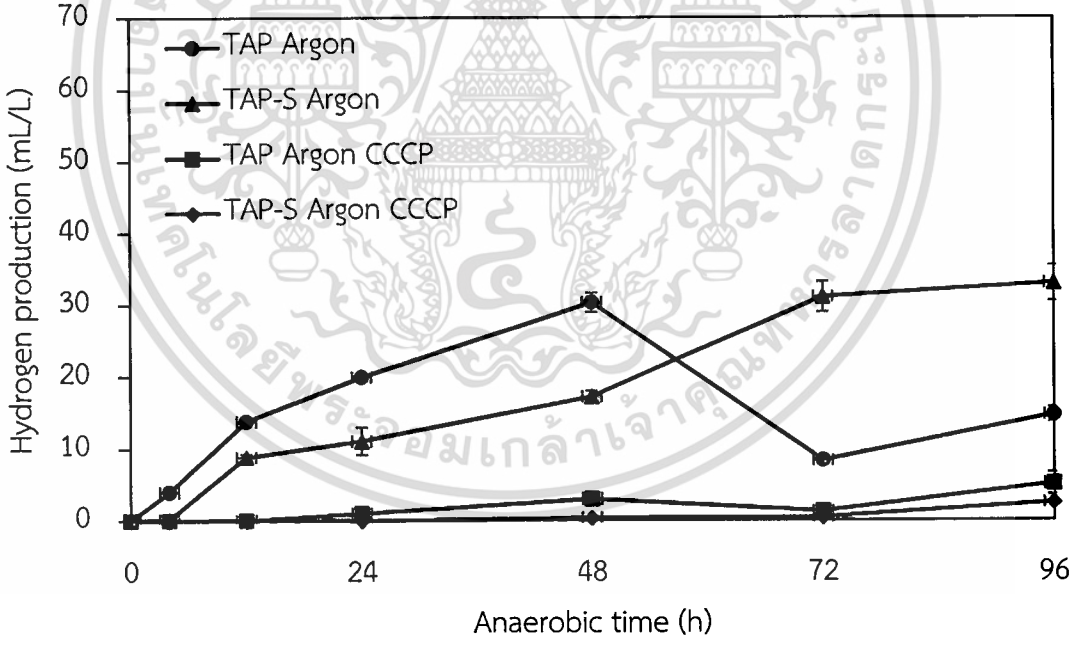
จากการนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-S และสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-NS เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาเก็บเกี่ยวเซลล์ ล้างและกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบและปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรให้เท่ากับ 0.8 ปิเปตสารแขวนลอยด์เซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงขวด Vial ขนาด 12.5 มิลลิลิตร นำไปศึกษาผลของสารยับยั้งระบบแสงสอง 2 ชนิดคือ สาร CCCP และ DCMU โดยเติมสารยับยั้งระบบแสงสองให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์ จากนั้น นำไปบ่มในที่มีแสงภายใต้สภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ วิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟที่ชั่วโมงที่ 0, 4, 12, 24, 48, 72 และ 96 ของการบ่ม พบว่าทั้งในสภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหารทุกชนิดที่มีการเติมสาร CCCP ลงไปมีการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่ไม่มีการเติมสาร CCCP โดยสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-S ที่ไม่มีการเติมสาร CCCP ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 31.11 ± 2.12 มิลลิลิตรต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 72 รองลงมาเป็นสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 30.34 ± 1.32 มิลลิลิตรต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 4.10 ข) ซึ่งสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีการเติมสาร CCCP ลงไปทั้งในสภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศมีการผลิตไฮโดรเจนได้ใกล้เคียงกันและต่ำมาก (รูปที่ 4.10 ก และ ข)

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหารที่ไม่มีการเติมสาร CCCP ภายใต้สภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่เติมสาร CCCP สาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มในอาหาร TAP-NS ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่ม โดยมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 65.96 ± 2.11 มิลลิลิตรต่อลิตร รองลงมาคือสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP ที่ชั่วโมงที่ 24 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 44.76 ± 4.68 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูป 4.11 ข) นอกจากนี้ ในสภาวะที่มีอากาศสาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในอาหาร TAP-NS ที่ไม่มีการเติมสาร CCCP ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 16.83 ± 3.12 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูป 4.11 ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



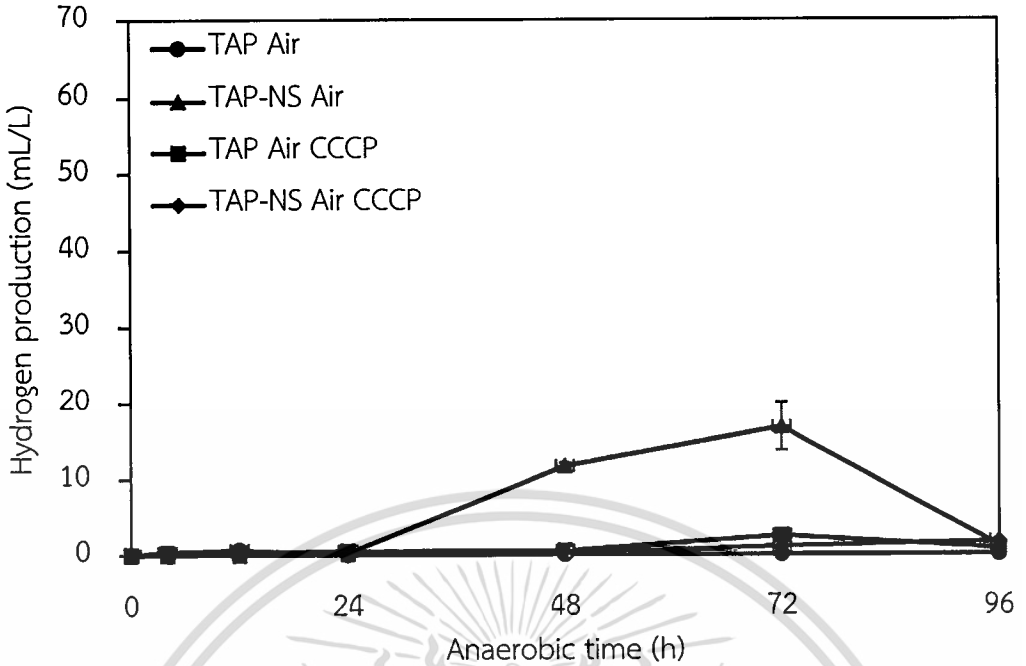
(ก)



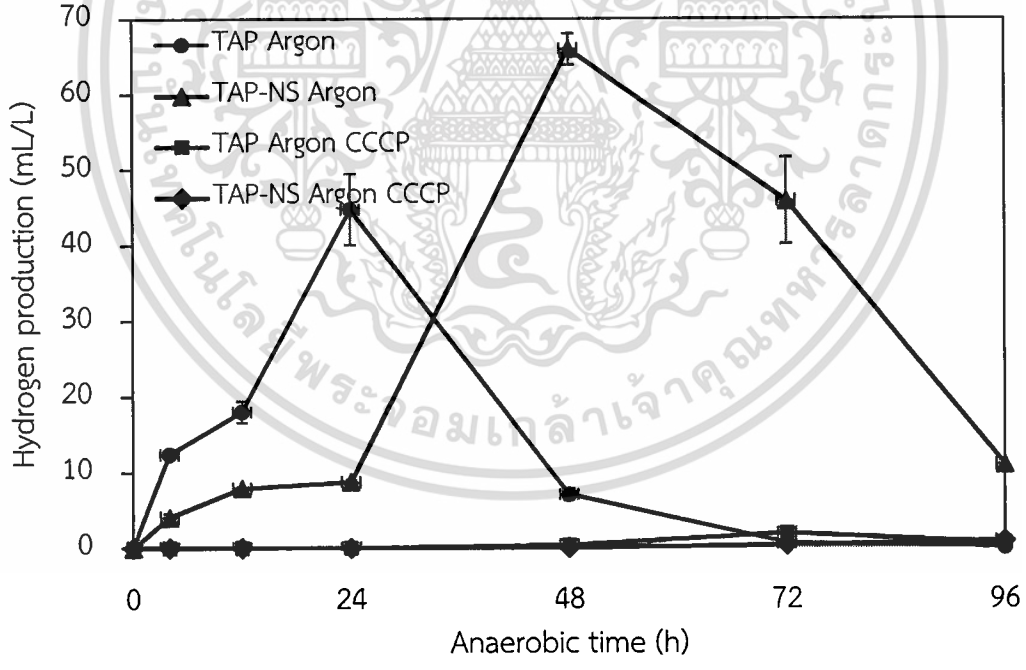
(ข)

รูปที่ 4.10 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-S ที่มีการเติมสาร CCCP ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (ก) และปราศจากอากาศ (ข)

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



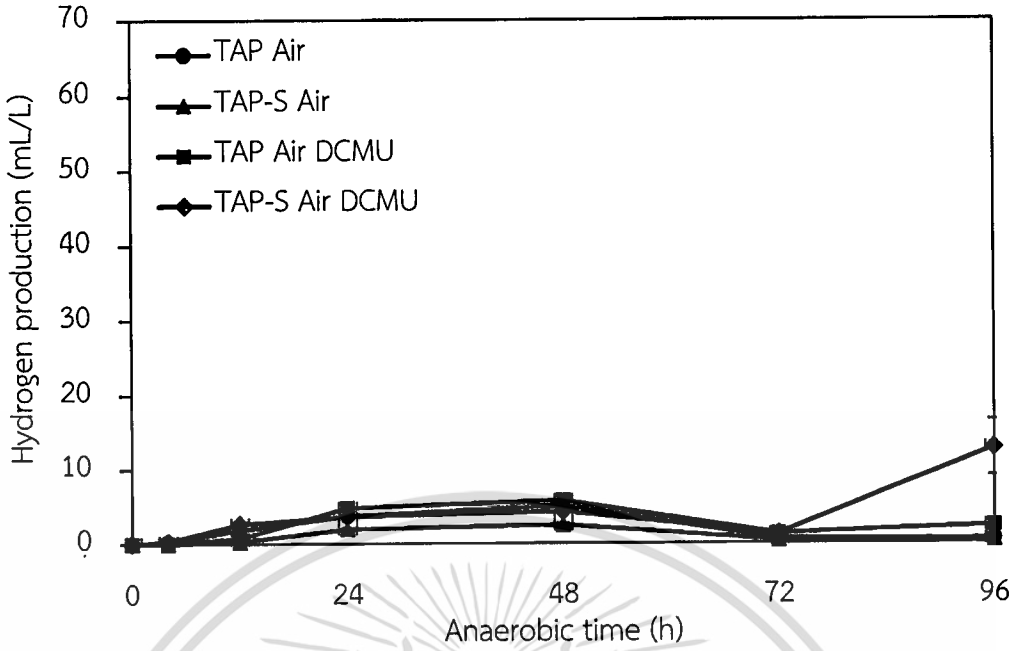
(ข)

รูปที่ 4.11 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-NS ที่มีการเติมสาร CCCP ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (ก) และปราศจากอากาศ (ข)

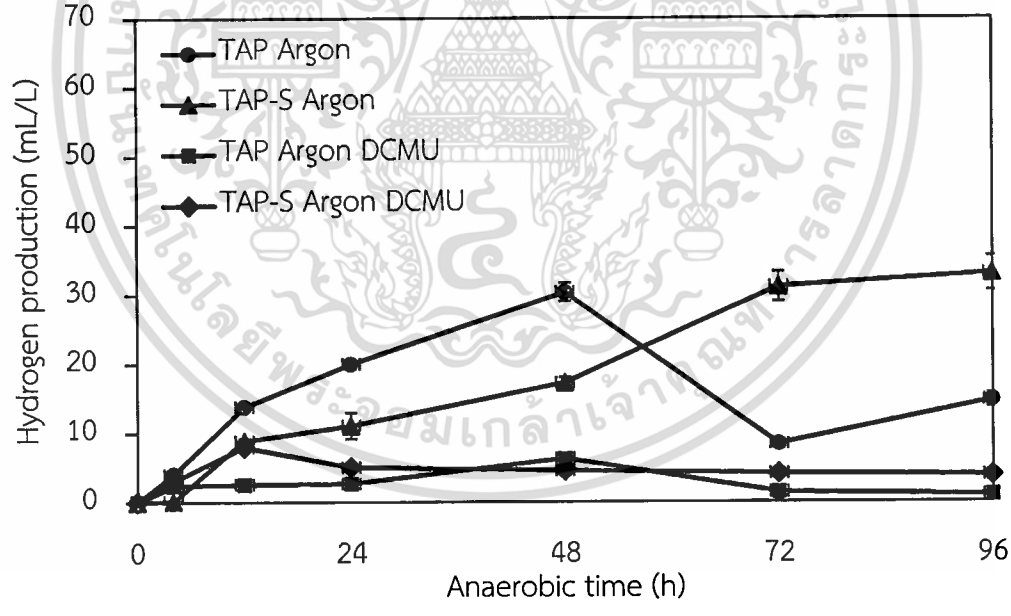
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาผลของสารยับยั้งการทำงานของระบบแสงสอง DCMU ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดพบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหารที่ไม่ได้เติมสาร DCMU ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ มีการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีการเติมสาร DCMU สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-S โดยมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 33.00 ± 2.48 มิลลิลิตรต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 (รูปที่ 4.12 ข) ส่วนสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-NS ที่ไม่มีการเติมสาร DCMU ภายใต้สภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศเท่ากับ 65.96 ± 2.11 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูปที่ 4.13 ข) ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่าการเติมสารยับยั้งการทำงานของระบบแสงสอง CCCP และ DCMU ไม่สามารถทำให้สาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์ผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ โดยเมื่อเติมสารยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองลงไป สารยับยั้งจะทำให้การขนส่งอิเล็กตรอนจากระบบแสงสองถูกยับยั้ง ทำให้อิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำเข้าสู่ระบบลดลง ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลงตามไปด้วย ผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang และคณะพบในปี ค.ศ. 2014 ที่พบว่า สาร CCCP สามารถลดการผลิตออกซิเจน โดยไปยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองโดยไม่มีผลต่อกระบวนการหายใจระดับเซลล์ที่เกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย ปฏิกิริยานี้ส่งผลให้เกิดสภาวะไร้อากาศและมีการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมากขึ้น นอกจากนี้ ยังสามารถเพิ่ม Proton gradient ผ่านเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ไป ทำให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น และงานวิจัยของ Zhang และคณะในปี ค.ศ. 2014 ที่พบว่า สาร DCMU จะไปยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนในระบบแสงสอง ทำให้ระบบแสงสองอยู่ในสภาพถูกรีดิวซ์ ดังนั้น ระบบแสงสองจึงไม่จำเป็นต้องรับอิเล็กตรอนที่ได้มาจากกระบวนการแตกตัวของน้ำ ทำให้ปริมาณออกซิเจนในระบบลดลง ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้รับอิเล็กตรอนจากระบบแสงหนึ่งเพียงอย่างเดียว ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



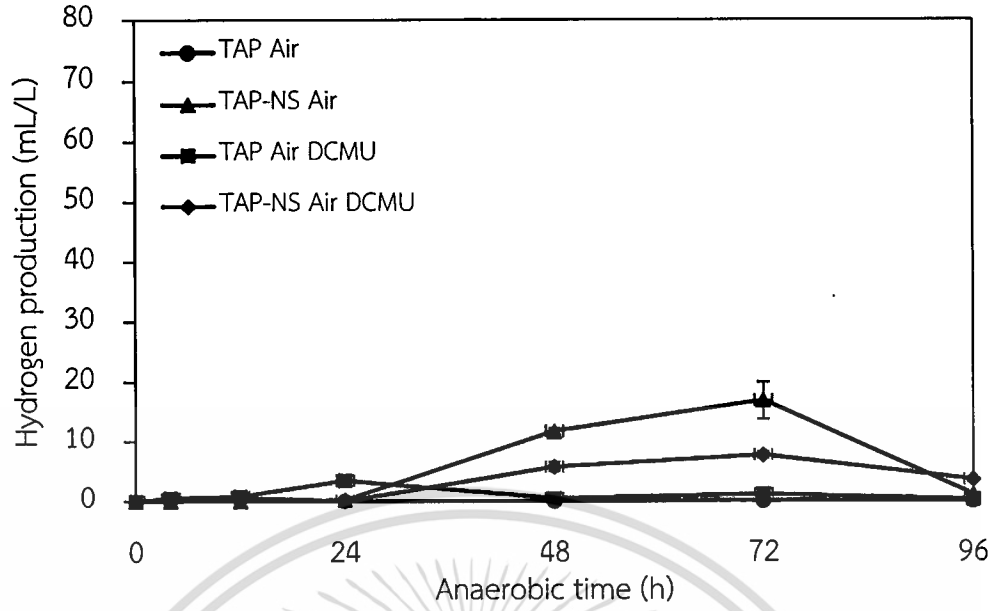
(ก)



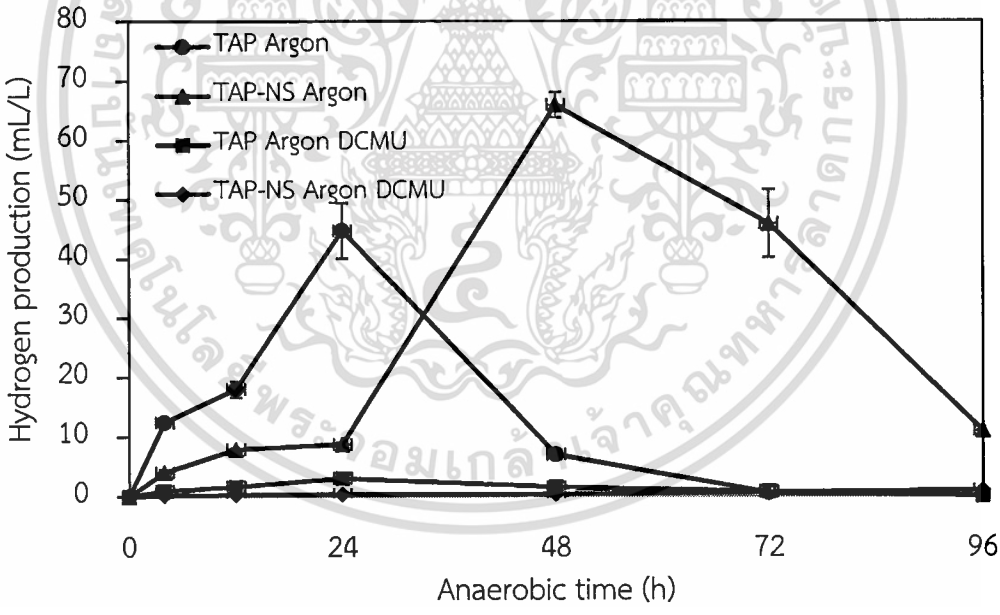
(ข)

รูปที่ 4.12 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-S ที่มีการเติมสาร DCMU ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (ก) และปราศจากอากาศ (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.13 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-NS ที่มีการเติมสาร DCMU ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (ก) และปราศจากอากาศ (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1) จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 4 ชนิดในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะที่มีอากาศเปรียบเทียบกับสภาวะที่ปราศจากอากาศ สรุปได้ว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดทั้งภายใต้สภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ

2) จากการศึกษาผลของการขาดธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว สรุปได้ว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ทั้งในสภาวะมีอากาศและปราศจากอากาศ ในขณะที่สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อบ่มในอาหาร TAP-NS ทั้งในสภาวะมีอากาศและปราศจากอากาศ

3) จากการศึกษาผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 และ *Chlorella* sp. A25.1 ในสภาวะที่มีอากาศเปรียบเทียบกับสภาวะที่ปราศจากอากาศ สรุปได้ว่าแสงมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 และ *Chlorella* sp. A25.1 โดยเฉพาะสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. A25.1 ที่บ่มในอาหาร TAP-NS ภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากอากาศจะมีอัตราการผลิตเพิ่มขึ้น 5 เท่าเมื่อเทียบกับการบ่มในที่มืด

4) จากการศึกษาผลของสารยับยั้งการสังเคราะห์แสง CCCP และ DCMU ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 และ *Chlorella* sp. A25.1 ในสภาวะที่มีอากาศเปรียบเทียบกับสภาวะที่ปราศจากอากาศ สรุปได้ว่า สาร CCCP และ DCMU ไม่สามารถทำให้สาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิดผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและปราศจากอากาศ

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาความเข้มข้นของสารยับยั้งการสังเคราะห์แสงเพิ่มเติม เช่น แปรผันความเข้มข้นของสารยับยั้งที่ส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว นอกจากนี้ ควรทำการตรวจสอบความเป็นพิษของสารยับยั้งต่อเซลล์ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2559. **คู่มือความรู้พลังงานไฮโดรเจน**. สารานุกรมพลังงานทดแทน. หน้า 1-3.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2557. **พลังงานไฮโดรเจน**. สารานุกรมพลังงานทดแทน. หน้า 61.

ณิชชา บูรณสิงห์. 2559. **เชื้อเพลิงไฮโดรเจน : แหล่งพลังงานทางเลือกเพื่อลดโลกร้อน.** [Online]. Available: http://library2.parliament.go.th. เข้าถึงเมื่อวันที่ 11 มิ.ย. 2560.

พลังงานทดแทนมีข้อดีอย่างไรและมีความสำคัญอะไรต่อมนุษย์. [Online]. Available: http://www.biofuelreview.com. เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 มิ.ย. 2560.

พลังงานทดแทนคืออะไร. [Online]. Available: http://www.thaibiotech.info. เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 มิ.ย. 2560.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. **สาหร่ายวิทยา**. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 122-125.

วิทวัส แจ้งเอี่ยม. 2553. **กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่าย**. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ ปีที่ 13, ฉบับที่ 1 มกราคม - มิถุนายน 2553.

สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ และ อรัญ อินเจริญศักดิ์. 2557. การผลิตไบโอไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่แยกได้จากนาข้าวของประเทศไทย. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุภาพร และคณะ. 2547. การศึกษาเปรียบเทียบการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงในคลอโรพลาสต์ของปวยเล้งกับพืชบางชนิด. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร ภาควิชาพฤกศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สรฉัตร เทียมดาว. 2559. **สาหร่ายวิทยา**. เอกสารประกอบการเรียน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

อิศกฤตา โลหพรหม. 2557. การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้พลังงานแสงอาทิตย์. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

Antal, T.K., Kukarskikh, G.P., Volgusheva, A.A., Krendeleva, T.E., Tyystjärvi, E. and Rubin, A.B. 2016. "Hydrogen photoproduction by immobilized S-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* : Effect of light intensity and spectrum, and initial medium pH." *Algal Research*. 1607 : 153–160

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fouchard, S., Hemschemerier, A., Carunana, A., Pruvost, J., Legrand, J., Happe, T., Pltier, G. and Cournac, L. 2005. "Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur deprived *Chlamydomonas* cell." *Applied and Environmental Microbiology.* 10:6199-6205.

Ghirardi, M.L., Togasaki, R.K. and Seibert, M. 1997. "Oxygen sensitivity of algal H_2-production." *Appl Biochem Biotechnol.* 63:141-151.

Ghirardi, M.L., Zhang, L., Lee, J.W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E. and Melis A. 2000. "Microalgae: a green source of renewable H_2." *Book Reviews.* 18:506511.

Greenbaum E. 1990. "Hydrogen production by photosynthetic water splitting." In: Veziroglu TN, Takashashi PK, editors. Hydrogen energy progress VIII. Proceedings 8th WHEC. Hawaii, New York. 743-745.

He, M.L., L. Li, L. Zhang, and J.G. Liu. 2012. "The enhancement of hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides* exposed to nitrogen limitation and sulfur deprivation." *International Journal of Hydrogen Energy.* 37:4046-4056.

Kim, J.P., Kang, C.D., Park T.H., Kim, M.S. and Sim, S.J. 2006. "Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture." *International Journal of Hydrogen Energy.* 31(11):15851590.

Kurepin, L.V., Dahal, K.P., Savitch, L.V., Singh, J., Bode, R., Ivanov, A.G., Hurry, V. and Hüner, N.P.A. 2013. "Role of CBFs as Integrators of Chloroplast Redox, Phytochrome and Plant Hormone Signaling during Cold Acclimation." *International Journal of Molecular Science.* 14(6):12729-12763.

Laurinavichene, T., Irena, T. and Tsygankov, A.A. 2004. "The effect of light intensity on hydrogen production by sulfur-deprived Chlamydomonas reinhardtii." *Journal of Biotechnology.* 114:143-151.

Li, L., Zhang, L. and Liu, J. 2015. "The enhancement of hydrogen photoproduction in marine *Chlorella pyrenoidosa* under nitrogen-deprivation." *International Journal of Hydrogen Energy.* 40:14784-14789.

Liu, J.Z., Ge, Y.M., Xia, S.Y., Sun, J.Y., Mu, J. 2016. Photoautotrophic hydrogen production by *Chlorella pyrenoidosa* without sulfur-deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy.* 41:8427-8432.

Madawar, D., Garg, N. and Shah, V. 2000. "Cyanobacterial hydrogen production World." *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 16:757-767.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Maness, P.C., Yu, J., Eckert, C. and Ghirardi, M.L. 2009. "Photobiological Hydrogen Production Prospects and Challenges." *Microbe.* 4:275-280.

Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M.L. and Seibert, M. 2000. "Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii.*" *Plant Physiology.* 122:127-135.

Meyer, J. 2007. "[FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective." *Cellular and Molecular Life Sciences.* 64:1063–1084.

Ni, M., Leung, D.Y.C., Leung, M.K.H., Sumathy, K. 2006. "An overview of hydrogen production from biomass." *Fuel Processing Technology.* 87:46-472.

Peltier, G. and Schmidt, G.W. 1991. "Chlororespiration: An adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 88:4791-4795.

Posewitz, M.C., Dubini, A., Meuser, J.E., Seibert, M., Ghirardi, M.L. 2009. "Hydrogenases, hydrogen production and anoxia." In Organellarand Metabolic Processes, edn 2. Edited by Stern DB. In The Chlamydomonas Sourcebook,Vol. 2. Edited by Harris EE. The Chlamydomonas Sourcebook. Vol. 2AcademicPress. 217-246.

Proschold, T., Harris, E.H. and Coleman, A.W. 2005. "Portrait of a Species: *Chlamydomonas reinhardtii.*" *Genetics.* 170:1601-1610.

Ran, C.Q., Zhang, W., Yu, X.J., Jin, M.F. and Deng, M.C. 2006. "Regulation of hydrogen production by uncoupler CCCP in green algae *Chlamydomonas reinhardtii". Chem J Chinese Univ.* 27:62-6.

Scoma, A., Bertin, L., Pintucci, C., Raddi, S. and Fava, F. 2012. "Inhibition of photosystem 2 in starch-enriched *Chlamydomonas reinhardtii* cells prevents the efficient induction of H2 production in sulfur-depleted cultures." *International Journal of Hydrogen Energy.* 37:10604-10610.

Tatyana V. Laurinavichene, Alexander S. Fedorov, Maria L. Ghirardi, Michael Seibert, Anatoly A. Tsygankov. 2005. "Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived Chlamydomonas reinhardtii cells." International Journal of Hydrogen Energy. 31(5):659-667.

Tinpranee, N., A. Incharoensakdi and S. Phunpruch. 2016. "Hydrogen production by unicellular green alga *Chlorella* sp. LSD-W2 isolated from seawater in Thailand." *KKU Research Journal.* 22(1):256-266.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tsygankov, A.A., Kosourov, S.,Tolstygina, I.V., Ghiraradi, M.L. and Seibert, M.L. 2006. " Hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions." *International Journal of Hydrogen Energy.* 31:1547-1584.

Yang, D., Zhang, Y., Bar, D.K., Fan, X., Gustafson, R., Guo, R. and Fiehn, O. 2014. "Metabolomics of photobiological hydrogen production induced by CCCP in *Chlamydomonas reinhardtii.*" *International Journal of Hydrogen Energy.* 39:150-158.

Zhang, L., Happe, T. and Melis, A. 2002. "Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H2 production *Chlamydomonas reinhardtii* (green algae)." *Planta.* 214:552-561.

Zhang, L., He, M. and Liu, J. 2014. "The enhancement mechanism of hydrogen photoproduction in *Chlorella prothecoides* under nitrogen limitation and sulfur deprivation". *International Journal of Hydrogen Energy.* 39:8969-8976.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris acetate phosphate (TAP) (Harris, 1989)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

2X Filner's Beijernicks Solution	25	มิลลิลิตร
1M Potassium Phosphate	1	มิลลิลิตร
Trace mineral solution	5	มิลลิลิตร
Tris-Base	2.42	กรัม/ลิตร
Glacial Acetic Acid (17.4 mM acetate)	1	มิลลิลิตร

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernicks Solution (500 มิลลิลิตร)

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2{\cdot}2H_2O$)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4{\cdot}7H_2O$)	2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

ประกอบด้วยสารละลาย Na_2EDTA 5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคน ปรับพีเอช 6.5 ด้วยนอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารตามด้านล่างเพิ่มตามลำดับ

เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4{\cdot}7H_2O$)	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4{\cdot}7H_2O$)	2.2	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2{\cdot}4H_2O$)	0.51	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4{\cdot}5H_2O$)	0.016	กรัม
โซเดียมโมลิเบตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$)	0.073	กรัม
โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2{\cdot}6H_2O$)	0.016	กรัม

ส่วนประกอบ Buffer

20 ml 1M stock โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (1M stock: 6.8 กรัม /50มิลลิลิตร) 30 ml 1M stock ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (1M stock: 8.7 กรัม /50 มิลลิลิตร) (ปรับพีเอช 7.2) สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น 1.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ขาดแหล่งไนโตรเจน (TAP-N medium)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

2X Filner's Beijernicks Solution	25	มิลลิลิตร
1M Potassium Phosphate	1	มิลลิลิตร
Trace mineral solution	5	มิลลิลิตร
Tris-Base	2.42	กรัม/ลิตร
Glacial Acetic Acid (17.4 mM acetate)	1	มิลลิลิตร

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernicks Solution (500 มิลลิลิตร)

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

ประกอบด้วยสารละลาย Na_2EDTA 5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคน ปรับพีเอช 6.5 ด้วย นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารตามด้านล่างเพิ่มตามลำดับ

เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	2.2	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0.51	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.016	กรัม
โซเดียมโมลิเบตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.073	กรัม
โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.016	กรัม

ส่วนประกอบ Buffer

20 ml 1M stock โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (1M stock 6.8 กรัม/50มิลลิลิตร)
30 ml 1M stock ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (1M stock 8.7 กรัม/50 มิลลิลิตร)
(ปรับพีเอช 7.2) ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ขาดแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S medium)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

2X Filner's Beijernicks Solution	25	มิลลิลิตร
1M Potassium Phosphate	1	มิลลิลิตร
Trace mineral solution	5	มิลลิลิตร
Tris-Base	2.42	กรัม/ลิตร
Glacial Acetic Acid (17.4 mM acetate)	1	มิลลิลิตร

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernicks Solution (500 มิลลิลิตร)

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2{\cdot}2H_2O$)	1	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2{\cdot}6H_2O$)	1.642	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

ประกอบด้วยสารละลาย Na_2EDTA 5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคน ปรับพีเอช 6.5 ด้วยนอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารตามด้านล่างเพิ่มตามลำดับ

เฟอรัสคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_2{\cdot}6H_2O$)	0.486	กรัม
ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	1.04	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2{\cdot}4H_2O$)	0.51	กรัม
คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2{\cdot}2H_2O$)	0.0126	กรัม
โซเดียมโมลิเบตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$)	0.073	กรัม
โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2{\cdot}6H_2O$)	0.016	กรัม

ส่วนประกอบ Buffer

20 ml 1M stock โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (1M stock 6.8 กรัม/50มิลลิลิตร)
30 ml 1M stock ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (1M stock 8.7 กรัม/50 มิลลิลิตร) (ปรับพีเอช 7.2) ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ขาดแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-NS medium)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

2X Filner's Beijernicks Solution	25	มิลลิลิตร
1M Potassium Phosphate	1	มิลลิลิตร
Trace mineral solution	5	มิลลิลิตร
Tris-Base	2.42	กรัม/ลิตร
Glacial Acetic Acid (17.4 mM acetate)	1	มิลลิลิตร

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernicks Solution (500 มิลลิลิตร)

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

ประกอบด้วยสารละลาย Na_2EDTA 5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคน ปรับพีเอช 6.5 ด้วยนอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารตามด้านล่างเพิ่มตามลำดับ

เฟอรัสคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.486	กรัม
ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	1.04	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0.51	กรัม
คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.0126	กรัม
โซเดียมโมลิเบตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.073	กรัม
โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.016	กรัม

ส่วนประกอบ Buffer

20 ml 1M stock โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (1M stock 6.8 กรัม/50มิลลิลิตร)
30 ml 1M stock ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (1M stock 8.7 กรัม/50 มิลลิลิตร)
(ปรับพีเอช 7.2) ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

1. นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละจากกราฟมาตรฐาน
2. นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ มาเปรียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร โดยคิดเทียบจากพื้นที่ช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) ที่ใช้ในการทดลอง
3. นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร มาคิดเทียบกับอาหารเพาะเลี้ยง 1 ลิตร จะได้ปริมาณไฮโดรเจนต่อลิตร
4. นำปริมาณไฮโดรเจนต่อลิตรที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมง จะได้หน่วยเป็นมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้