

ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวต่อความสามารถในการ
ผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการตอบสนองของระดับโปรตีน
EFFECT OF STORAGE TEMPERATURE OF GREEN ALGAE STRAINS ON
HYDROGEN PRODUCTION CAPACITY AND PROTEIN-LEVEL RESPONSE



ชติภัท กาญจนระวิกุล
ณรงค์ยศ สังข์ทอง

โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF STORAGE TEMPERATURE OF GREEN ALGAE STRAINS ON
HYDROGEN PRODUCTION CAPACITY AND PROTEIN-LEVEL RESPONSE






A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวต่อความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการตอบสนองระดับโปรตีน Effect of storage temperature of green algae strains on hydrogen production capacity and protein-level response
ชื่อนักศึกษา	นายชิตภัท กายจนระวีกุล รหัสนักศึกษา 62050585 นายณรงค์ยศ สังข์ทอง รหัสนักศึกษา 62050593
ปริญญา ภาควิชา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ (ประธานกรรมการ)	
ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ (กรรมการ)	
รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ (กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา)	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวต่อความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการตอบสนองระดับโปรตีน Effect of storage temperature of green algae strains on hydrogen production capacity and protein-level response
ชื่อนักศึกษา	นายชิตภัท กายจนระวีกุล รหัสนักศึกษา 62050585 นายณรงค์ยศ สังข์ทอง รหัสนักศึกษา 62050593
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

ปัจจุบันพลังงานทดแทนมีความสำคัญเนื่องจากปัญหาการแหล่งพลังงานในปัจจุบันไม่เพียงพอ ซึ่งก๊าซไฮโดรเจนเป็นหนึ่งในพลังงานทดแทนที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ในช่วงสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคติดต่อ Covid-19 ที่ผ่านมามีการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Tetraspora* sp. CU2551 (Tetra), *Chlorella* sp. KLSc59 (KS03), *Chlorella* sp. KLSc61 (SR) และ G4 ซึ่งพบว่ามีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ลดลง ดังนั้นเพื่อเป็นการดูผลกระทบของอุณหภูมิ จึงนำสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์ มาศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเปรียบเทียบกับเซลล์สาหร่ายที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำสาหร่ายเหล่านี้เพาะเลี้ยงในอาหาร Tris acetate phosphate (TAP) บรรจุลงขวดแก้ว (Vial) และเป่าไล่ด้วยก๊าซอาร์กอนเข้าไปในขวดเพื่อไล่ออกซิเจน บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas chromatograph จากนั้นเก็บตัวอย่างเซลล์ของสาหร่าย ณ วันที่ 0 และ 7 มาวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ตัดแบบโปรตีนที่สนใจส่งตรวจสอบชนิดของโปรตีน จากการทดลองพบว่าเซลล์สาหร่ายที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากกว่าเซลล์สาหร่ายที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และจากการตรวจสอบชนิดของโปรตีนจากแบบตัวอย่างที่สนใจ 4 แบบ พบว่ามีโปรตีน Histone H2B และ Histone 3.1 ที่มีในทุกแบบโปรตีน และพบโปรตีน Chlorophyll a-b binding protein และ RuBisCo large chain เฉพาะแบบวันที่ 0 ของ Tetra ที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ SR ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเท่านั้น ซึ่งจากโปรตีนทั้ง 4 ชนิดที่พบในตัวอย่างแบบที่สนใจ 4 แบบไม่ได้ส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวโดยตรง

คำสำคัญ: สาหร่ายสีเขียว, การผลิตก๊าซไฮโดรเจน, อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Effect of storage temperature of green algae strains on hydrogen production capacity and protein-level response
Student	Mister Chitipat Kanchanaraweekul Student ID 62050585 Mister Narongyot Sangthong Student ID 62050593
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic year	2022
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Chedsak Maneerattanarungroj

Abstract

Currently, alternative energy sources are important due to the inadequacy of existing energy sources. Hydrogen gas is one of the environmentally friendly alternative energy sources. During the COVID-19 pandemic, green algae cells (*Tetraspora* sp. CU2551 - Tetra, *Chlorella* sp. KLSc59 - KS03, *Chlorella* sp. KLSc61 - SR, and G4) were maintained at a temperature of 4 degrees Celsius. It was found that hydrogen gas production decreased. To assess the impact of temperature, the four strains of green algae were studied for hydrogen gas production and compared with green algae cells stored at 25 degrees Celsius. These algae were cultured in Tris acetate phosphate (TAP) medium and placed in glass vials, which were purged with argon gas to remove oxygen. They were then incubated in a temperature-controlled shaking incubator for 24 hours. Gas chromatography was used to measure the hydrogen gas levels, and cell samples were taken at day 0 and day 7 for protein analysis using SDS-PAGE. From the experiments, it was found that green algae cells stored at 25 degrees Celsius had a higher capacity for hydrogen gas production compared to cells stored at 4 degrees Celsius. Protein analysis of the selected bands revealed the presence of Histone H2B and Histone 3.1 in all four samples, while Chlorophyll a-b binding protein and RuBisCo large chain were found only in the day 0 sample of Tetra stored at 25 degrees Celsius and SR stored at 4 degrees Celsius. These four protein types did not directly affect the hydrogen gas production from green algae.

Keywords: Microalgae, Hydrogen production, Temperature

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์จากบุคลากรหลายท่าน ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาเป็นอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษาแนะนำที่เป็นประโยชน์ระหว่างการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์และอำนวยความสะดวกในการจัดหาเครื่องมือ สารเคมี และอุปกรณ์การทดลองต่างๆในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งความช่วยเหลือจากบุคลากรหลายๆฝ่ายในการชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆจนโครงการพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ในการทำงานโครงการพิเศษในครั้งนี้ผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ ประธานกรรมการ และผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจทาน และสละเวลาเข้าร่วมการสอบโครงการพิเศษ

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยเหลือทั้งอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนการเข้าใช้ห้องปฏิบัติการ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณพี่ตี๋พี่นางสาว ณัฐวิภา เหล่าเกื้อ ที่คอยให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำงานโครงการพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณบิดา มารดาที่ได้ให้การสนับสนุนในทุกๆด้าน ทั้งกำลังกายและกำลังใจกับคณะผู้จัดทำโครงการพิเศษ รวมทั้งเพื่อนๆที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนตลอดมา จนกระทั่งคณะผู้จัดทำโครงการพิเศษประสบความสำเร็จในการทำโครงการพิเศษครั้งนี้

ชิติภัท กายจนระวีกุล

ณรงค์ยศ สังข์ทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อ.....	ข
Abstract.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่ 1.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2.....	3
2.1 สาหร่ายขนาดเล็ก.....	3
2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย.....	3
2.2.1 พลังงานไฮโดรเจน.....	3
2.2.2 ไฮโดรเจนจากสาหร่าย.....	4
2.2.3 กลไกการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายขนาดเล็ก.....	4
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย.....	8
2.3.1 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อสาหร่ายสีเขียว.....	8
2.3.2 ผลกระทบของออกซิเจนต่อสาหร่ายสีเขียว.....	9
2.3.3 ผลกระทบของค่า pH ต่อสาหร่ายสีเขียว.....	9
2.3.4 ผลกระทบของความเข้มแสงต่อสาหร่ายสีเขียว.....	9
2.3.5 ผลกระทบของสารอาหารต่อสาหร่ายสีเขียว.....	9
2.4 ผลกระทบของการเก็บรักษาสาหร่ายด้วย Cryopreservation.....	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
บทที่ 3	12
3.1 เครื่องมือ	12
3.2 อุปกรณ์	12
3.3 สารเคมี	13
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ	14
3.5 เชื้อสำหรับทดสอบ	14
3.6 ขั้นตอนในการดำเนินงาน	14
3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์	14
3.7 การตรวจวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	14
3.7.1 การเตรียมปริมาณเชื้อเริ่มต้น	14
3.7.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสำหรับการตรวจวัดการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	15
3.7.3 การวัดปริมาณการผลิตก๊าซด้วยเครื่อง Gas Chromatograph	15
3.8 การตอบสนองของเซลล์ระดับโปรตีนเบื้องต้น (SDS-PAGE)	15
3.8.1 การเตรียมเจล	15
3.8.2 การเตรียมตัวอย่าง	16
3.8.3 การรัน SDS-PAGE	17
3.8.4 การย้อมสีเจล	17
3.8.5 การอ่านเจลและส่งวิเคราะห์โปรตีน	17
บทที่ 4	18
4.1 ผลของอุณหภูมิต่อความสามารถการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย	18
4.1.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	18
4.1.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	19
4.2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้น	21
4.2.1 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	21
4.2.2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี LC/MS จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5	27
5.1 สรุปผลงานวิจัย	27
5.2 ข้อเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก.....	32
ภาคผนวก ก.....	33
ภาคผนวก ข.....	34
ภาคผนวก ค.....	35



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของ Resolving gel และ Stacking gel	16
ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากแบนที่ส่งไปทำ LC/MS ที่ศูนย์บริการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics Services Center) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล	24
ตารางที่ ก อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP)	33
ตารางที่ ข- 1 Staining solution	34
ตารางที่ ข- 2 Destaining solution	34



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1 Microalgae metabolism	3
รูปที่ 2.2 Direct biophotolysis process.....	5
รูปที่ 2.3 Indirect biophotolysis process.....	6
รูปที่ 2.4 Dark fermentation process.....	7
รูปที่ 2.5 Photo-fermentation process.....	8
รูปที่ 4.1 แสดงผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว 4 สายพันธุ์ ในรุ่นที่ 5 ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	18
รูปที่ 4.2 แสดงผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว 4 สายพันธุ์ ในรุ่นที่ 7 ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	18
รูปที่ 4.3 แสดงผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ ในรุ่นที่ 1 ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....	19
รูปที่ 4.4 แสดงผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ ในรุ่นที่ 3 ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....	20
รูปที่ 4.5 แสดงผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ ในรุ่นที่ 5 ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....	20
รูปที่ 4.6 แสดงผลโปรตีนจากเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 (SR) ที่ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส; M = marker; 1 = SR 25°C วันที่ 0; 2 = SR 25°C รุ่นที่ 5 วันที่ 7; 3 = SR 25°C รุ่นที่ 7 วันที่ 7; 4 = SR 4°C วันที่ 0; 5 = SR 4°C รุ่นที่ 1 วันที่ 7; 6 = SR 4°C รุ่นที่ 3 วันที่ 7; 7 = SR 4°C รุ่นที่ 5 วันที่ 7.....	21
รูปที่ 4.7 แสดงผลโปรตีนจากเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 (Tetra) ที่ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส; M = marker; 1 = Tetra 25°C วันที่ 0; 2 = Tetra 25°C รุ่นที่ 5 วันที่ 7; 3 = Tetra 25°C รุ่นที่ 7 วันที่ 7; 4 = Tetra 4°C วันที่ 0; 5 = Tetra 4°C รุ่นที่ 1 วันที่ 7; 6 = Tetra 4°C รุ่นที่ 3 วันที่ 7; 7 = Tetra 4°C รุ่นที่ 5 วันที่ 7.....	22
รูปที่ 4.8 แสดงผลโปรตีนจากเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 (KS03) ที่ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส; M = marker; 1 = KS03 25°C วันที่ 0; 2 = KS03 25°C รุ่นที่ 5 วันที่ 7; 3 = KS03 25°C รุ่นที่ 7 วันที่ 7; 4 = KS03 4°C วันที่ 0; 5 = KS03 4°C รุ่นที่ 1 วันที่ 7; 6 = KS03 4°C รุ่นที่ 3 วันที่ 7; 7 = KS03 4°C รุ่นที่ 5 วันที่ 7.....	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตเห็นาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.9 แสดงตัวอย่างแบนโปรตีนที่น่าสนใจและส่งไปทำ LC/MS ที่ศูนย์บริการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics Services Center) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 1 = 1-10k; 2 = 2-12k; 3 = 3-18k; 4 = 4-55k..... 23

รูปที่ ค- 1 ตัวอย่างการแสดงค่าความเชื่อมั่นโปรตีน (Protein score threshold) มากกว่า 39 35

รูปที่ ค- 2 ตัวอย่างการแสดงผลโปรตีนที่พบในแบนตัวอย่างที่มีค่าโปรตีนมากกว่าค่าความเชื่อมั่นโปรตีนที่ 39 36



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงแห่งอนาคตอันเนื่องมาจากประสิทธิภาพการเผาไหม้สูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ และไม่เป็นมลพิษกับสิ่งแวดล้อม พบว่ากระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพนั้นเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าและใช้พลังงานน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกระบวนการทางความร้อนและเคมีไฟฟ้า ซึ่งส่วนใหญ่ถูกควบคุมโดยสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสงหรือมีกระบวนการหมัก ในปัจจุบันได้มีการให้ความสำคัญกับกระบวนการทางชีวภาพมากขึ้น ไนโตรจีเนสและไฮโดรจีเนสมีความสำคัญมากขึ้น ในการตัดแปลงพันธกรรมของไซยาโนแบคทีเรียช่วยในการส่งเสริมการสร้างไฮโดรเจน (Das and Veziroglu, 2001) พลังงานไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงานที่สะอาดและเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกที่ดีกว่าเชื้อเพลิงฟอสซิล เนื่องจากมีพลังงานที่สูงถึง 122 kJ/g วิธีการเคมีฟิสิกส์ทั่วไปในการผลิตไฮโดรเจนนั้นมีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากต้องใช้พลังงานสูง การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางชีววิทยานั้นถือว่าเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากที่สุดและใช้งานได้ง่าย และมีข้อได้เปรียบมากกว่าเมื่อเทียบกับกระบวนการทางเคมีทั่วไป (Singh and Wahid, 2015) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพมีเทคนิคที่สามารถนำแหล่งพลังงานกลับมาใช้ใหม่ได้ เช่น ชีวมวล สามารถนำไปสร้างพลังงานที่สะอาดที่สุดได้เพื่อประโยชน์ของมนุษย์ สำหรับอัตราการผลิต H₂ ที่สูงขึ้น ผลผลิต H₂ ที่สูงที่สุดพบว่าเป็นกลูโคส 7.1 mol H₂/mol (Das and T. Nejat, 2008)

สาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน 4 สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ *Tetraspora* sp. CU2551 (Maneeruttanarungroj et al. 2010), *Chlorella* sp. KLSc59 (Sirawattanamongkol et al. 2020), *Chlorella* sp. KLSc61 (Laokua et al. 2022) และ G4 ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดี สาหร่ายสีเขียวหลายชนิดสามารถทนต่ออุณหภูมิที่ต่ำมากได้ ตัวอย่างเช่น สาหร่ายที่เติบโตบนหิมะและน้ำแข็ง เช่น *Chlamydomonas nivalis* และ *Chloromonas nivalis* อย่างไรก็ตาม สำหรับสาหร่ายเมโซฟิลิก ความเครียดจากความเย็นสามารถมีผลยับยั้งได้ ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เกิดความเครียดจากความเย็นคือความแข็งที่เพิ่มขึ้นในระบบเมมเบรน เมื่ออุณหภูมิลดลง การไหลของเมมเบรนเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการขนส่งอิเล็กตรอน ฟังก์ชันการสังเคราะห์แสงที่เหมาะสมที่สุดขึ้นอยู่กับการพับที่ถูกต้องของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมมเบรนที่ซับซ้อนของห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอนของสังเคราะห์ด้วยแสง ผลกระทบอื่นๆ ที่เกิดจากความเครียดจากความเย็น ได้แก่ อัตราปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลง (Morgan-Kiss et al., 2006)

ในการศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษาเซลล์สาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 4 สายพันธุ์จากการเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำจากสถานการณ์ COVID-19 ที่ผ่านมามีผลทำให้ต้องเก็บรักษาเชื้อในอุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลานาน เพื่อดูผลของอุณหภูมิต่ำต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและศึกษาการทำงานของโปรตีนที่คาดว่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการถูกยับยั้งการทำงานโดยอุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลานาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเซลล์สาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส
2. เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์ระดับโปรตีนเบื้องต้น

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเซลล์สาหร่ายสีเขียวโดยเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์ในอุณหภูมิต่างๆ ทำการศึกษาโดยการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ถูกเก็บรักษาในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คืออุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการศึกษาการตอบสนองของเซลล์ระดับโปรตีนเบื้องต้น ด้วยการวิเคราะห์โปรตีนจากการทำ SDS-PAGE ตัดแบบที่สนใจส่งทำ LC/MS ที่ศูนย์บริการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics Services Center) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อศึกษาการทำงานของโปรตีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนและผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของโปรตีนในเซลล์สาหร่ายสีเขียว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเซลล์สาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส
2. ทราบถึงโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเมื่อเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายในอุณหภูมิต่ำ
3. เป็นแนวทางในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์สาหร่ายสีเขียวเมื่อถูกเก็บรักษาในสถานการณ์ฉุกเฉิน

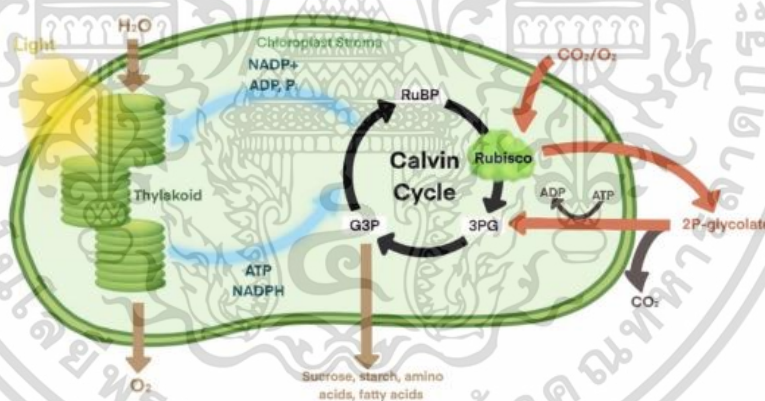
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายขนาดเล็ก

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นหนึ่งในผู้ผลิตหลักของระบบนิเวศ พบได้ทุกที่ รวมถึงในน้ำจืด สัตว์ทะเล และแม้แต่เปลือกไม้ สาหร่ายขนาดเล็กบางชนิดเป็นโฟโตออโตโทรฟ พวกมันใช้พลังงานจากแสงแดดเพื่อดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อผลิตสารอินทรีย์ ในขณะที่ชนิดอื่นเป็น heterotrophs ที่ต้องการคาร์บอนอินทรีย์และสามารถเติบโตได้ในกรณีที่ไม่มีพลังงานแสง สาหร่ายขนาดเล็กมีโครงสร้างเซลล์ที่เรียบง่าย ทำให้เป็นที่ต้องการมากที่สุดในอุตสาหกรรมเชื้อเพลิงชีวภาพ เนื่องจากต้องการเพียงการปรับสภาพที่ไม่รุนแรง นอกจากนี้ชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็ก ยังปล่อยสารยับยั้งการหมักที่เป็นพิษเพียงเล็กน้อยระหว่างการปรับสภาพ ในการเพาะเลี้ยง สาหร่ายขนาดเล็กจะปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้เป็นอย่างดี เช่น แสงแดดและสารอาหารที่มี ในขณะที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรง เช่น ค่า pH ปานกลางที่สูงมาก นอกจากนี้ สาหร่ายขนาดเล็กสามารถสร้างไฮโดรเจนภายใต้สภาวะทางสรีรวิทยาบางอย่าง เช่น สภาพแวดล้อมที่ขาดออกซิเจนและการได้รับแสงสูง ความสามารถของสาหร่ายขนาดเล็กในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้โหมดต่างๆ สามารถใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มการผลิตได้ (Ardo et al., 2022)



รูปที่ 2.1 Microalgae metabolism

ที่มา : Kuan Shiong Khoo, 2023

2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย

2.2.1 พลังงานไฮโดรเจน

พลังงานไฮโดรเจนและเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องคาดว่าจะมีบทบาทที่สำคัญในการลดการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในภาคส่วนของพลังงานต่างๆ (Scovell., 2022) ไฮโดรเจนเป็นตัวเลือกที่มีแนวโน้มมากที่สุดสำหรับพลังงานสะอาดในฐานะทรัพยากรที่อุดมสมบูรณ์ที่มีการปล่อยคาร์บอนเป็นศูนย์ที่น่าสนใจคือ ไฮโดรเจนจะปล่อยไอน้ำบริสุทธิ์ออกมาเมื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจนหรือเมื่อเผาไหม้ ดังนั้นไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคโนโลยีที่นำไฮโดรเจนมาใช้ น่าจะเป็นหนึ่งในตัวกำหนดที่สำคัญที่สุดในการลดการปล่อยก๊าซคาร์บอน (Nagar et al., 2023) ไฮโดรเจนถูกผลิตขึ้นโดยกระบวนการแยกน้ำ โดยส่วนใหญ่เป็นอิเล็กโทรไลซิส ซึ่งต้องใช้พลังงานที่ได้รับจากการเก็บเกี่ยวพลังงานแสงอาทิตย์ (Shahin et al., 2023) ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิง วัสดุที่เบาที่สุดและมีอยู่มากที่สุดในโลกคือไฮโดรเจน ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงที่มีการปล่อยสารพิษน้อยลงหรือเกือบเป็นศูนย์ เช่นเดียวกับก๊าซที่ไม่ก่อมลพิษเมื่อเกิดการเผาไหม้หรือใช้เป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียน เนื่องจากในปัจจุบันไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียนที่มีประโยชน์อย่างยิ่งในฐานะเชื้อเพลิงสีเขียว ซึ่งเชื้อเพลิงไฮโดรเจนนั้นจะมีประสิทธิภาพมากกว่าเชื้อเพลิงอื่นๆ เช่น น้ำมันเบนซินถึงสองเท่า (Nagar et al. 2023)

2.2.2 ไฮโดรเจนจากสาหร่าย

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่สามารถเติบโตได้โดยใช้พลังงานแสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงาน สาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน เม็ดสี และคาร์โบไฮเดรตในระดับสูง ดังนั้นจึงน่าสนใจสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย เช่น อาหาร อาหารสัตว์ เชื้อเพลิงชีวภาพ เครื่องสำอาง และพลาสติกชีวภาพ (Mulders et al., 2014; Wijffels et al., 2010) สาหร่ายขนาดเล็กเหมาะสมที่สุดสำหรับการสร้างไฮโดรเจน เนื่องจากเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กมีอัตราการเติบโตสูง สามารถเติบโตได้ในแหล่งที่อยู่อาศัยที่หลากหลายและพื้นที่ที่ไม่เหมาะแก่การเพาะปลูก สามารถแก้ปัญหาความขัดแย้งระหว่างเชื้อเพลิงกับอาหาร ตลอดจนสามารถดักจับและดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศ ไฮโดรเจนที่ผลิตจากสาหร่ายขนาดเล็กเป็นทางเลือกที่สะอาดและยั่งยืนเพื่อทดแทนหรือเพื่อเติมเต็มความต้องการเชื้อเพลิงฟอสซิล การเผาไหม้ของไฮโดรเจนก่อให้เกิดน้ำเท่านั้นและไม่ปล่อยก๊าซเรือนกระจกซึ่งจะลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Ardo et al., 2022)

2.2.3 กลไกการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายขนาดเล็ก

2.2.3.1 กระบวนการทางชีวเคมี

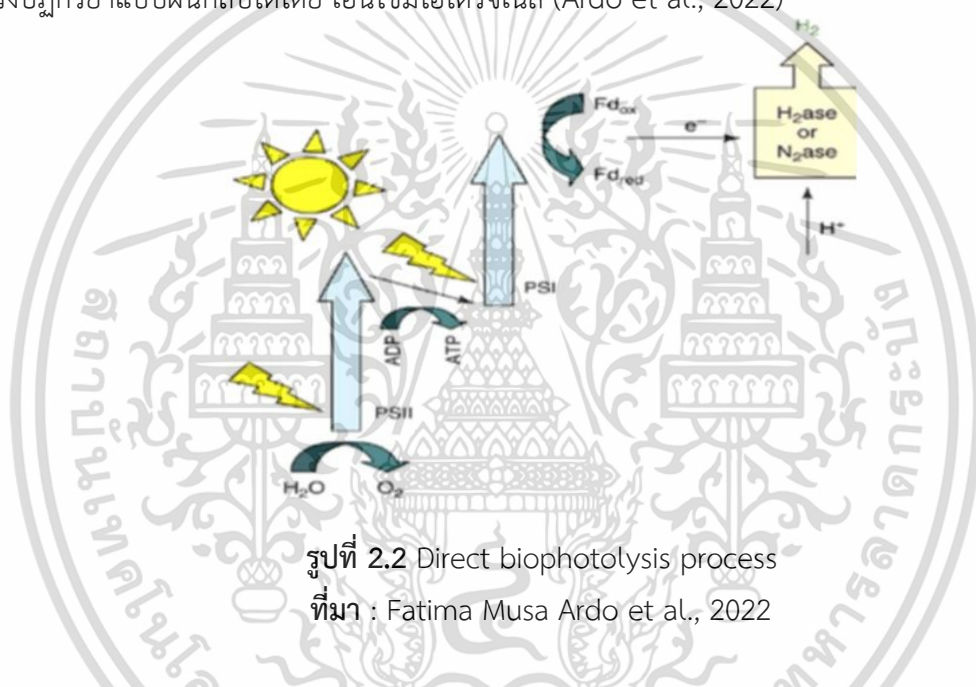
ก๊าซไฮโดรเจนและออกซิเจนถูกผลิตขึ้นโดยโฟโตออโตโทรฟ (photoautotrophs) เช่น สาหร่ายขนาดเล็ก ใน กระบวนการทางชีวเคมีที่เรียกว่าไบโอโฟโตไลซิส (biophotolysis) กระบวนการนี้ดำเนินการโดยศูนย์ปฏิกิริยาโดยมีคลอโรฟิลล์ที่ทำงานอยู่ควบคู่กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) และเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) โดยกระบวนการนี้ใช้พลังงานจากแสงและแหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนโดยการแยกโมเลกุลของน้ำ ไฮโดรเจนจะถูกผลิตขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศผ่านการโฟโตไลซิสของน้ำโดยตรง การสลายด้วยแสงทางชีวภาพสามารถทำได้ผ่านสองกลไกที่ต่างกัน นั่นคือ ผ่านวิธีการสลายด้วยแสงทางชีวภาพโดยตรงหรือวิธีการสลายด้วยแสงทางชีวภาพโดยอ้อม (Ardo et al. 2022)



2.2.3.2 กระบวนการไบโอโฟโตไลซิสโดยตรง (Direct biophotolysis process)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการไบโอโฟโตไลซิสโดยตรงเป็นกระบวนการทางชีวภาพที่ใช้น้ำผลิตพลังงานเคมีจากแสง กระบวนการนี้ใช้ระบบสังเคราะห์แสงของสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อผลิตไฮโดรเจนจากน้ำและพลังงานแสงอาทิตย์ และใช้ระบบแสงสองระบบ ได้แก่ PSI และ PSII ในการสลายด้วยแสงทางชีวภาพ ประเภทนี้พลังงานแสงจะถูกดูดซับโดยระบบแสงทั้งสอง อิเล็กตรอนเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำซึ่งเกิดขึ้นใน PSII อิเล็กตรอนเหล่านี้จะถูกส่งผ่าน electron transport chain ไปยัง PSI จาก PSII ชั้นแรก อิเล็กตรอนจะเดินทางจาก PSII ไปยังกลุ่มพลาสโตควิโนน (plastoquinone, PQ) จากนั้นผ่านไซโตโครม (cytochrome) b6-f และสุดท้ายไปยังพลาสโตไซยานิน (plastocyanin, PC) ก่อนที่จะไปถึง PSI โดยการใช้พลังงานแสงที่ดูดซับใน PSI พลังงานศักย์ของอิเล็กตรอนที่ได้รับจะเพิ่มขึ้น และใช้เพื่อลดเฟอร์ดอกซิน (ferredoxin, Fd) ซึ่งใช้ในการขับเคลื่อนการผลิตไฮโดรเจนผ่านการลดลงของโปรตอนในปฏิกิริยาที่เร่งปฏิกิริยาแบบผันกลับได้โดย เอนไซม์ไฮโดรจิเนส (Ardo et al., 2022)



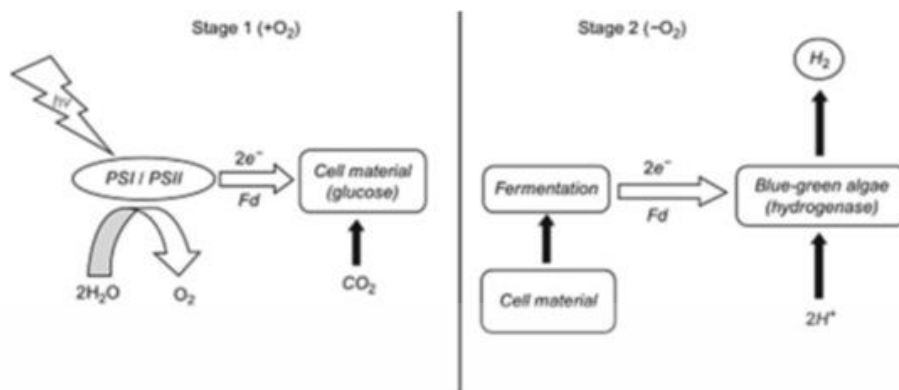
รูปที่ 2.2 Direct biophotolysis process

ที่มา : Fatima Musa Ardo et al., 2022

2.2.3.3 กระบวนการไบโอโฟโตไลซิสทางอ้อม (Indirect biophotolysis process)

ในภายใต้สภาวะบางอย่าง เช่น การกีดกันกำมะถัน สาหร่ายบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนโดยการกระตุ้นวิถีทางไฮโดรเจนของพวกมันเพื่อสังเคราะห์แสงเพื่อผลิตไฮโดรเจน กระบวนการนี้ดำเนินการในสองขั้นตอน ได้แก่ การสะสมคาร์โบไฮเดรตระหว่างการสังเคราะห์ด้วยแสง ตามด้วยการหมักแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตโมเลกุลไฮโดรเจน โดยจะมีการแยกมิติของออกซิเจนและไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นในสองขั้นตอนนี้ การแยกนี้ป้องกันการหยุดทำงานของเอนไซม์และสามารถกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากส่วนผสมของไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ได้อย่างสะดวก ซึ่งทำให้ง่ายต่อการทำให้ไฮโดรเจนบริสุทธิ์ คาร์บอนไดออกไซด์ถูกผลิตขึ้นจากการหมักคาร์โบไฮเดรต กระบวนการนี้ถูกสร้างขึ้นเพื่อจำกัดผลกระทบของออกซิเจนต่อ [Fe]-hydrogenase (Ardo et al., 2022)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 Indirect biophotolysis process

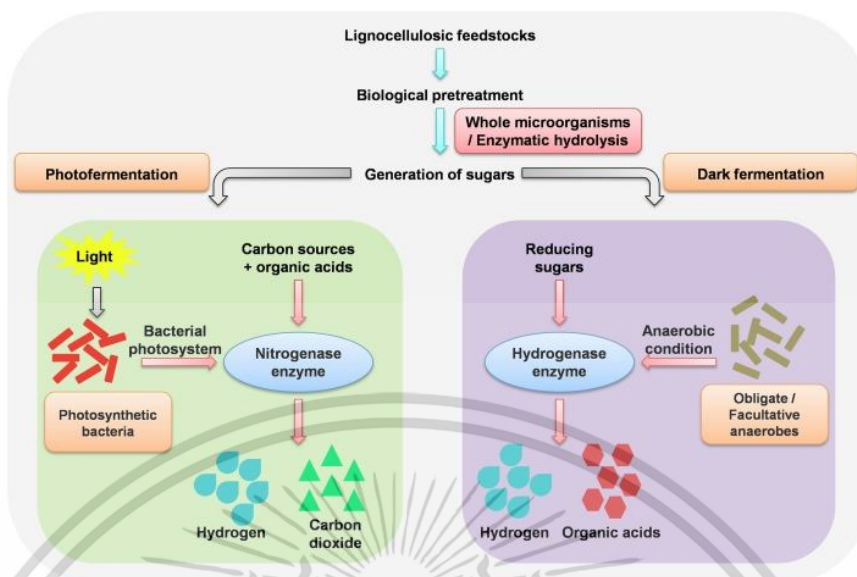
ที่มา : Fatima Musa Ardo et al., 2022

2.2.3.4 กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark fermentation process)

การหมักในที่มืดเป็นกระบวนการที่จุลินทรีย์ใช้สารอินทรีย์ตั้งต้นเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งอิเล็กตรอนเพื่อผลิตไฮโดรเจน ในเซลล์ของจุลินทรีย์ คาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส ซูโครส และไซโลส ผ่านกระบวนการไกลโคไลซิสเพื่อผลิตไพรูเวตซึ่งสามารถออกซิไดซ์เป็น acetyl-CoA ต่อไปได้ จากนั้น Acetyl-CoA จะถูกเปลี่ยนเป็นรูปแบบ (formate) โดยการทำงานของเอนไซม์ pyruvate formate lyase (PFL) หรือเป็น ferredoxin เมื่อถูกกระตุ้นโดย pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFOR) ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ว่าเป็นสิ่งมีชีวิตแบบ facultative หรือแบบ strict anaerobes ตามลำดับ เอนไซม์ที่สำคัญในการผลิตไฮโดรเจนของจุลินทรีย์คือเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งแบ่งออกเป็น [Ni-Fe] ไฮโดรจีเนส และ [Fe-Fe] ไฮโดรจีเนส ตามไซต์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา formate นี้ถูกเร่งปฏิกิริยาโดย [Ni-Fe] ไฮโดรจีเนสเพื่อสร้างไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์โดยจุลินทรีย์แบบ facultative anaerobes ในทางกลับกัน ไฮโดรเจนถูกผลิตขึ้นผ่านการรีออกซิเดชันของเฟอร์ดอกซิน (ferredoxin) ที่เร่งปฏิกิริยาโดย [Fe-Fe] ไฮโดรจีเนสโดยจุลินทรีย์แบบ strict anaerobes (Ardo et al., 2022)

กระบวนการหมักในที่มืดมีข้อได้เปรียบเนื่องจากสามารถใช้พื้นผิวได้หลายชนิด และยังสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังไม่ต้องใช้แสงและเป็นกระบวนการบำบัดทางชีวภาพที่ดี ข้อเสียบางประการของกระบวนการนี้ คือ การผลิตไฮโดรเจนต่ำเนื่องจากการสะสมของออกซิเจนซึ่งยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจน (Ardo et al., 2022)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 Dark fermentation process

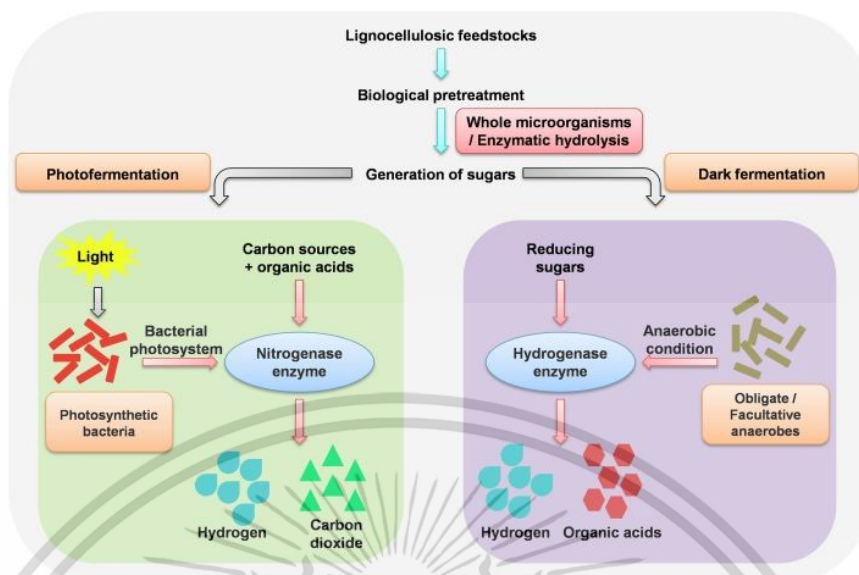
ที่มา : Rituparna Saha et al, 2022

2.2.3.5 กระบวนการหมักแบบใช้แสง (Photo-fermentation process)

การหมักแบบใช้แสงเป็นกระบวนการที่ใช้อิเล็กตรอนและโปรตอนที่ได้มาจากในปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบอินทรีย์และพลังงานจากแสงเพื่อผลิตไฮโดรเจน โดยสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงจำนวนมากสามารถผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการนี้ได้

ข้อดีบางประการของการใช้การหมักแบบใช้แสง คือ พลังงานสเปกตรัมที่หลากหลายซึ่งแบคทีเรียสังเคราะห์แสงนำไปใช้ประโยชน์ได้ ใช้สารตั้งต้นที่หลากหลายและยังสามารถใช้บำบัดน้ำเสียจากการหมักในที่มีได้อีกด้วย ในขณะที่ข้อเสียบางประการของวิธีนี้คือประสิทธิภาพการเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนต่ำ สร้างไฮโดรเจนในปริมาณที่ต่ำ และสามารถผลิตโพลีไฮดรอกซีบิวทิเรตแทนไฮโดรเจน ซึ่งเป็นผลมาจากความไม่สม่ำเสมอในการกระจายแสง (Ardo et al., 2022)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 Photo-fermentation process

ที่มา : Rituparna Saha et al, 2022

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย

2.3.1 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อสาหร่ายสีเขียว

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตมวลชีวภาพและการสะสมลิพินของสาหร่ายสีเขียว ซึ่งส่งผลต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ รวมไปถึงกิจกรรมของโปรตีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสง อุณหภูมิต่ำจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ช้าลง ซึ่งทำให้โฟตอนที่ประมวลผลโดยระบบแสงลดน้อยลง ในขณะที่อุณหภูมิสูงจะกำจัดพันธะคู่จากเมมเบรนไขมัน ซึ่งนำไปสู่การยับยั้งโฟโตอินฮิบิชัน (photoinhibition) (Zhao et al., 2019) อุณหภูมิส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและองค์ประกอบชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็กอย่างรุนแรง เมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิอื่นที่ไม่ใช่อุณหภูมิการเจริญเติบโตที่เหมาะสมซึ่งพบว่าอยู่ที่ 40°C ในช่วงกลางวัน พบว่าปริมาณเม็ดสีทั้งหมดลดลง นอกจากนี้องค์ประกอบของกรดไขมันมีแนวโน้มไปสู่ระดับความอิ่มตัวที่สูงขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น (Robin Barten et al., 2021)

อุณหภูมิเป็นหนึ่งในตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อวิถีเมแทบอลิซึมของเอนไซม์ไฮโดรจิเนส ตลอดจนทำให้วิถี hydrogen consuming pathways ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ยิ่งไปกว่านั้น อุณหภูมิยังเป็นตัวกำหนดการเพิ่มผลผลิตของไฮโดรเจนโดยมีปฏิกิริยาของเอนไซม์ (enzymatic reactions) เป็นสื่อกลาง เอนไซม์ทุกตัวมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมซึ่งทำงานได้ดีที่สุด โดยทั่วไป สาหร่ายขนาดเล็กจะเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 15 – 35 องศาเซลเซียส (Ardo et al., 2022)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ผลกระทบของออกซิเจนต่อสาหร่ายสีเขียว

ข้อจำกัดที่สำคัญของกระบวนการไปโอโฟโตไลซิสโดยตรงคือความไวของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสต่อออกซิเจน กิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะถูกยับยั้งอย่างถาวรเมื่อมีออกซิเจนอยู่ สิ่งนี้ส่งผลกระทบอย่างมากต่อการผลิตไฮโดรเจนภายใต้กระบวนการสังเคราะห์แสงด้วยออกซิเจนในสาหร่ายสีเขียว ส่งผลให้โมเลกุลไฮโดรเจนให้ผลผลิตต่ำ (Ardo et al., 2022)

2.3.3 ผลกระทบของค่า pH ต่อสาหร่ายสีเขียว

ช่วงค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายขนาดเล็กอยู่ระหว่าง 5 ถึง 7 ภายในช่วงของค่า pH ปานกลางนี้ สาหร่ายขนาดเล็กสามารถควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังมีบทบาทในการลดการเกิดออกซิเดชันในเซลล์ กรดคาร์บอนิกมักเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ สิ่งนี้จะลดค่า pH ในตอนแรก แต่เมื่อสาหร่ายขนาดเล็กสามารถดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายได้ ค่า pH ของตัวกลางจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ช่วงค่า pH ที่ 5-9 ยังเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ในระยะ lag phase จะสั้นลงโดยค่า pH ที่สูงซึ่งในท้ายที่สุดจะเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจน ในทางกลับกัน ที่ค่า pH ต่ำ ไฮโดรเจนจะถูกผลิตขึ้นผ่านทาง pyruvate-ferredoxin-oxidoreductase pathway ซึ่งไปยับยั้งการทำงานของ Fe-hydrogenase จึงทำให้สาหร่ายขนาดเล็กเผาผลาญ acetyl-CoA ผ่านเส้นทางที่ประหยัดพลังงาน นำไปสู่การผลิต acetate และ ATP มากกว่าการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ ค่า pH ยังขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ (Ardo et al., 2022)

2.3.4 ผลกระทบของความเข้มแสงต่อสาหร่ายสีเขียว

แสงเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการสังเคราะห์แสงและพลังงาน เช่นเดียวกับการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก ในช่วงสภาวะไร้อากาศ ความเข้มของแสงสูงเป็นสิ่งจำเป็นในช่วงเริ่มต้น สิ่งนี้ทำให้เกิดการยับยั้งด้วยแสง (photoinhibition) และไม่ผลิตออกซิเจนในระหว่างการสังเคราะห์ด้วยแสง เป็นผลให้ช่วยสร้างสภาวะไร้อากาศเพื่อเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน เมื่อความเข้มของแสงสูง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์จะเพิ่มขึ้นและทำให้เกิดการปลดปล่อยอิเล็กตรอนจำนวนมากขึ้นซึ่งรวมตัวกับโปรตอนเพื่อใช้ในการสร้างโมเลกุลของไฮโดรเจน นอกจากนี้ แสงยังส่งผลต่อช่วง lag phase ของสาหร่ายขนาดเล็กในการผลิตไฮโดรเจนอีกด้วย Khanal et al. ยืนยันว่าภายใต้สภาวะที่มีแสง ระยะ lag period จะลดลงในขณะที่ผลผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น รูปแบบการเสริมด้วยแสงยังสะท้อนถึงอัตราการผลิตไฮโดรเจนด้วย (Ardo et al., 2022)

2.3.5 ผลกระทบของสารอาหารต่อสาหร่ายสีเขียว

การผลิตไฮโดรเจนได้สูงและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดสามารถทำได้โดยการเพิ่มสัดส่วนที่เหมาะสมของสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และธาตุต่างๆ ธาตุไนโตรเจนจำเป็นต่อการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนและเมแทบอลิซึมการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก และสิ่งเหล่านี้ส่งผลต่อการเอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาทานาน เมื่อนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กโดยรวม ในทางกลับกัน ธาตุฟอสฟอรัสจำเป็นสำหรับการควบคุมกิจกรรมและการเผาผลาญส่วนใหญ่ของเซลล์ ธาตุอาหารรอง (trace elements) อย่าง Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} และ Fe^{3+} เป็นอาหารเสริมที่สำคัญ มีบทบาทในการปรับปรุงการเพาะเลี้ยงจุลชีพ ธาตุอาหารรองยังได้รับการแนะนำสำหรับสูตรสารอาหารในการเสริมสร้างการผลิตไฮโดรเจน โดยควรให้สารอาหารเหล่านี้ในสัดส่วนที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสาหร่ายและการผลิตไฮโดรเจนหลังจากนั้น (Ardo et al., 2022)

2.4 ผลกระทบของการเก็บรักษาสาหร่ายด้วย Cryopreservation

สารป้องกันความเย็น (Cryoprotectant, CPA) เป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งสำหรับในการเก็บรักษาสาหร่ายหลายชนิดด้วยความเย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Koji et al., 2012) การเก็บรักษาด้วยความเย็นเป็นวิธีการที่ดีสำหรับการจัดเก็บเซลล์ในระยะยาว (Shah et al., 2022) การเก็บรักษาด้วยความเย็นได้ถูกนำมาใช้ในการเก็บรักษาสาหร่ายต่างๆ เช่น ไฮยาโนแบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีแดง สาหร่ายสีน้ำตาล ยูกลีนา ไดอะตอม และ coccolthophorids การเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งมีความสามารถในการรักษาเสถียรภาพทางสรีรวิทยาและพันธุกรรม การเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งที่ประสบความสำเร็จนั้นขึ้นอยู่กับวิธีการปรับพารามิเตอร์ต่างๆ อัตราการทำให้เย็นลงยังเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการบรรลุสถานะ frozen-hydrated state โดยการกลายเป็นแก้ว (vitrification) ในสถานะที่เป็นแก้ว (vitrified state) โมเลกุลของน้ำจะแข็งตัวเป็นโครงสร้างคล้ายแก้วโดยไม่ก่อตัวเป็นเกล็ดน้ำแข็ง เนื่องจากผลึกน้ำแข็งครอบคลุมปริมาตรเซลล์ที่มากขึ้น และทำให้เกิดแรงกดและแรงเฉือนต่อออร์แกเนลล์ภายในเซลล์ เซลล์จึงเสียหายและอัตราการรอดชีวิตลดลง หากระบายความร้อน (cooling) อย่างรวดเร็วด้วยน้ำภายในเซลล์มากเกินไปจะมีน้ำไม่เพียงพอและกลายเป็นความเย็นยิ่งยวด ส่งผลให้ความเย็นไปได้ที่เซลล์จะถูกทำลายเพิ่มขึ้นจากการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งในเซลล์ ในทางกลับกัน หากระบายความร้อนได้ช้าเกินไป เซลล์จะคลายของเหลวภายในเซลล์ทำให้เกิดการขาดน้ำมากเกินไป ดังนั้น วิธีการทำความเย็นแบบควบคุม 2 ขั้นตอน ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำความเย็นขั้นต้นอย่างช้าๆ และขั้นตอนต่อมาคือการทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิของไนโตรเจนเหลว นำไปใช้กันอย่างแพร่หลายในการเก็บรักษาสายพันธุ์ของสาหร่ายด้วยความเย็น (Koji et al., 2012)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ Shirui Dong et al., (2022) ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโต การตอบสนองของโปรตีนเม็ดสีสังเคราะห์แสงและการวิเคราะห์ทรานสคริปต์ให้ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกการเอาชีวิตรอดต่อความเครียดจากความเย็นระยะสั้นในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Arthrospira* โดยการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโต เม็ดสีสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigments) และทรานสคริปโตม (transcriptome) ของ *Arthrospira* sp. TJS091 สัมผัสกับความเครียดจากความเย็นในระยะสั้นพบว่า มวลชีวภาพ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ โฟโคไซยานิน และอัลโลไฟโคไซยานินของ *Arthrospira* ลดลงเมื่อสัมผัสกับสภาวะความเครียดจากความเย็นในระยะสั้น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ทุกข์ทรมานจากความเครียดจากความเย็นจะรับรู้สัญญาณอุณหภูมิผ่านระบบการส่งสัญญาณแบบสององค์ประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อนุญาตเห็นชอบใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเปิดใช้งานชุดของกลไกการป้องกันเพื่อรักษากิจกรรมทางชีวภาพของพวกมันโดยการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมทางสรีรวิทยาที่หลากหลาย กิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาและการจับไอออนเป็นหน้าที่หลักของโมเลกุลที่รับผิดชอบในการปรับตัวของเซลล์ *Arthrospira* ต่อความเครียดจากความเย็น การเผาผลาญพลังงาน การเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนสังเคราะห์แสงเป็นเส้นทางที่เร็วที่สุดในการตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำ มีข้อมูลเชิงลึกเพิ่มเติมและเป็นพื้นฐานในการรับข้อมูลที่สำคัญสำหรับการทำความเข้าใจประเด็นทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุล ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์จาก *Arthrospira* การศึกษานี้ยังระบุถึงผลผลิตของกรดไขมันไม่อิ่มตัวและซัคซิเนตที่ต้องควบคุมและควบคุมโดยการปรับอุณหภูมิโดยรอบ ซึ่งเป็นแนวทางสำหรับการดำเนินมาตรการเพื่อปรับปรุงผลผลิตของผลิตภัณฑ์เหล่านี้

จากงานวิจัยของ Chunfang Lu et al., (2010) ได้ศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเอพีซีสีเขียว *Ammopitanthus nanus* ที่ทนต่อความเครียดภายใต้สภาวะที่เย็นจัด โดยใช้ไบโของ *Ammopitanthus nanus* ที่โตเต็มที่ในสภาวะที่เย็นจัด -29 องศาเซลเซียส และสภาวะที่เย็น -5 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดโปรตีนและรันเจลด้วย two-dimensional gel electrophoresis ที่ย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue จากการตรวจสอบพบโปรตีน 500 ชนิดในแต่ละตัวอย่าง มี 8 ชนิดที่เห็นความเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนภายใต้สภาวะต่างๆที่ระบุลักษณะโดยการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF พบว่าเมื่อใช้ PDQuest ระบุโปรตีนได้ประมาณ 500 ชนิดใน crude proteins จากตัวอย่างใน two-dimensional gel electrophoresis โดยมีโปรตีน 39 ชนิดที่เกิดการเปลี่ยนแปลงภายใต้สภาวะเย็นจัด มีโปรตีน 19 ชนิดมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและมีโปรตีน 20 ชนิดการแสดงออกลดลง ซึ่งมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงและการผลิตพลังงานในทั้ง 2 ตัวอย่าง ผลลัพธ์แสดงให้เห็นว่าไบโของ *Ammopitanthus nanus* ประกอบด้วยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเผาผลาญพลังงานซึ่งมีบทบาทในการผลิตพลังงานและต้านทานต่ออุณหภูมิที่ต่ำมากจึงทำให้ *Ammopitanthus nanus* อยู่รอดในฤดูหนาวได้

จากงานวิจัยของ Delphine Pflieger et al., (2002) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์โปรตีโอมของไมโทคอนเดรียจากยีสต์ โดยการระบุชนิดของโปรตีนอย่างรวดเร็วและละเอียดด้วยวิธีโปรตีโอมิกแบบคลาสสิกที่เกี่ยวข้องกับเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองมิติ (two-dimensional gel electrophoresis, 2DE) ซึ่งประกอบด้วย SDS-PAGE gel electrophoresis ในการวิเคราะห์โปรตีนไมโทคอนเดรียทั้งหมดร่วมกับ LC-MS/MS ในการวิเคราะห์ระบุลักษณะโปรตีนของสารสกัดทั้งหมดจากไมโทคอนเดรียของยีสต์ พบว่า การใช้โปรตีนจากไมโทคอนเดรียเพียงแค่ 40 ไมโครกรัม ทำให้สามารถระบุผลิตภัณฑ์ที่ยีนที่แตกต่างกัน 179 ชนิด โดยโปรตีน 28 ชนิดก่อนหน้านี้ไม่ทราบชนิด LC-MS/MS ในการวิเคราะห์ชิ้นเจลที่ถูกตัดออกมาทำให้สามารถยืนยันการแยกโปรตีนที่จับกับเยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีนที่ละลายน้ำ และการระบุชนิดโปรตีนที่ไม่รู้จักได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ

- 3.1.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar)
- 3.1.2 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubator)
- 3.1.3 เครื่อง Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
- 3.1.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.1.5 เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง
- 3.1.6 เครื่อง gas chromatograph (GC)
- 3.1.7 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave)
- 3.1.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- 3.1.9 ถังก๊าซอาร์กอนความดัน 0.1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
- 3.1.10 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 3.1.11 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
- 3.1.12 เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation)
- 3.1.13 ตู้ดูดสารเคมี (Fume hood)
- 3.1.14 เต้าไฟฟ้า
- 3.1.15 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 เพลทอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกพร้อมใช้งาน
- 3.2.2 ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.2.3 ขวดแก้ว (vial) ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 3.2.4 ขวดดูแรน (Duran) ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร
- 3.2.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.2.6 ห่วงเชี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.2.7 หลอดเซนติฟิว (Centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 3.2.8 ปีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 3.2.9 กระบอกตวงขนาด 200 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.2.10 ไชลิ่งค์ขนาด 20 มิลลิลิตร
- 3.2.11 ฝาขวดแก้ว
- 3.2.12 ที่ครอบฝาขวดแก้ว
- 3.2.13 ที่เปิด/ปิดฝาขวดแก้ว (Cap opener)
- 3.2.14 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ฯ อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.15 ทิป (Tips)
- 3.2.16 ที่วางหลอดเซนติฟิว (Centrifuge tube rack)
- 3.2.17 คิวเวท (Cuvette)
- 3.2.18 หลอดเอเพนดอร์ฟ (Eppendorf tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.2.19 มีดผ่าตัด (scalpel)
- 3.2.20 ปากคีบ (forcep)

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 40% Acrylamide/Bis
- 3.3.2 0.5M Tris-HCL, pH 6.8
- 3.3.3 1.5M Tris-HCL, pH 8.8
- 3.3.4 10% SDS
- 3.3.5 TEMED
- 3.3.6 10% APS
- 3.3.7 Isopropanol
- 3.3.8 β -mercaptoethanol
- 3.3.9 Loading dry
- 3.3.10 1X Running buffer
- 3.3.11 Coomassie brilliant blue
- 3.3.12 Methanol
- 3.3.13 Acetic acid
- 3.3.14 ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน
- 3.3.15 แอมโมเนียมคลอไรด์
- 3.3.16 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต
- 3.3.17 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต
- 3.3.18 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
- 3.3.19 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต
- 3.3.20 เกลือไดโซเดียม อีดีทีเอ
- 3.3.21 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต
- 3.3.22 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต
- 3.3.23 กรดบอริก
- 3.3.24 แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต
- 3.3.25 คอลเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต
- 3.3.26 แอมโมเนียมโมลิบเดต
- 3.3.27 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารของศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการศึกษานานาชาติ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 อาหารแข็ง Tris acetate phosphate (TAP)

3.4.2 อาหารเหลว Tris acetate phosphate (TAP)

3.5 เชื้อสาหร่ายทดสอบ

เชื้อสาหร่ายสีเขียวได้รับอนุเคราะห์จากภาควิชาชีววิทยา สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประกอบด้วย

3.5.1 สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLSc59 (KS03)

3.5.2 สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLSc61 (SR)

3.5.3 สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551

3.5.4 สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ G4

3.6 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์

นำเซลล์สาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่มาจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Tris acetate phosphate (TAP) ด้วยวิธีการ Cross streak โดยเซลล์สาหร่าย ใช้เวลาการเจริญเติบโตประมาณ 5-7 วัน เมื่อเซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตแล้วให้ทำการ streak ลงบนอาหารแข็ง (TAP) ชุดถัดไปเพื่อศึกษารุ่น (Generation) ต่อไป สูตรการเตรียมอาหาร TAP ในภาคผนวก ก.

จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง (TAP) ในรุ่นแรก (1st Generation) จำนวน 1 หลูปนำมาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว (TAP) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำขวดรูปชมพู่ไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิโดยสถานะที่ใช้ตลอดการทดลอง คือ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และการเขย่าอยู่ที่ 120 rpm บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นหัวเชื้อของสาหร่าย

3.7 การตรวจวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

3.7.1 การเตรียมปริมาณเชื้อเริ่มต้น

นำหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร (TAP) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำใส่หลอดเซนตริฟิว ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใส่ออก จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดตะกอนเซลล์สาหร่ายที่เหลือในหลอดเซนตริฟิว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่หลอดเอพเพนดอร์ฟ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(OD750) ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณตามสูตรดังนี้ เพื่อให้ได้ค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้น คือ 0.1

$$\text{สูตรคำนวณ } C_1V_1=C_2V_2$$

ใช้ไมโครปิเปตดูดปริมาณของผสมที่เหลือในหลอดเซนติฟิวตามที่คำนวณ ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้เชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสง คือ 0.1 และมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.7.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสำหรับการตรวจวัดการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

นำเชื้อเริ่มต้นที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ที่มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร แบ่งใส่ขวดแก้ว ขนาด 100 มิลลิลิตร ขวดละ 25 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด เพื่อเป็นการทำ 3 ซ้ำ ปิดฝาขวดแก้วแล้วนำไปอัดก๊าซโดยใช้ถังที่มีก๊าซอาร์กอนความดัน 0.1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) ทำการอัดก๊าซเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อกำจัดออกซิเจนออกจากระบบ จากนั้นนำไปหมักในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อเริ่มต้นที่เหลือจากการแบ่งใส่ขวดแก้ว (ตัวอย่างวันที่ 0) นำไปใส่หลอดเซนติฟิวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์โปรตีน

3.7.3 การวัดปริมาณการผลิตก๊าซด้วยเครื่อง Gas Chromatograph

เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมง นำขวดแก้วที่เพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายมาวัดปริมาณก๊าซที่สาหร่ายผลิตได้ด้วยเครื่อง Gas chromatograph (GC) โดยเริ่มจากการใช้เข็มดูดก๊าซไฮโดรเจนจากถัง ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ฉีดใส่เครื่อง GC แล้วบันทึกค่าที่ได้จากกราฟเพื่อเป็นค่าก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน ทำ 3 ซ้ำ ต่อมาใช้เข็มดูดก๊าซอาร์กอนจากถัง ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร แล้วฉีดใส่ขวดแก้วที่เพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย จากนั้นใช้เข็มดูดก๊าซปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ที่อยู่ในบริเวณช่องว่างด้านบนระหว่างปากขวดกับสารละลายเซลล์แล้วฉีดใส่เครื่อง GC เพื่อวัดค่าก๊าซที่สาหร่ายสามารถผลิตได้ เมื่อวัดและบันทึกค่าที่ได้จากกราฟจนครบ นำขวดแก้วที่เพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายไปบ่มต่อเหมือนเดิม โดยนับเป็นวันที่ 1 ทำซ้ำจนครบ 7 วันแล้วสร้างกราฟเพื่อศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย และนำสารละลายเซลล์สาหร่ายในขวดแก้วของวันที่ 7 (ตัวอย่างวันที่ 7) ใส่ในหลอดเซนติฟิวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์โปรตีน

ทำการทดลองซ้ำในทุกรุ่น (Generation) ของเซลล์สาหร่ายที่เป็นเลขคู่ เพื่อศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในแต่ละรุ่น ของแต่ละอุณหภูมิ

3.8 การตอบสนองของเซลล์ระดับโปรตีนเบื้องต้น (SDS-PAGE)

3.8.1 การเตรียมเจล

เตรียมชุดอุปกรณ์ SDS-PAGE นำกระจกแบบสันและแบบยาวประกบคู่กัน (gel sandwich) โดยกระจกแบบสันอยู่ด้านหน้าแล้ววางลงใน Casting frames ให้ปลายกระจกทั้งสองแผ่นเสมอกันแล้วค่อยๆ ล้อกระจก จากนั้นนำไปวางบน Casting stand โดยมี Grey gaskets รองอยู่ด้านล่างเพื่อกันเจลรั่วออก

ทำการผสมสารเคมีที่ใช้เตรียม Resolving gel ตามสัดส่วน (ดังแสดงในตาราง) จากนั้นใช้ไมโครปิเปตค่อยๆ เติม Resolving gel ที่ทำการผสมไว้แล้วลงใน gel sandwich ให้ได้ประมาณ $\frac{3}{4}$ ของกระจก เท

ทับผิวหน้าเจลด้วย Isopropanol เพื่อไล่ฟองอากาศที่เกิดขึ้นออก ตั้งทิ้งไว้ 30-45 นาที ให้ส่วน Resolving

เอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญตเห็นาไปใช้ประโยชน์ดานการค

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gel แข็งตัว เมื่อครบเวลาทำการเท Isopropanol ออกพร้อมกับฉีดน้ำกลั่นล้างและซับออกให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู

ทำการผสมสารเคมีที่ใช้เตรียม Stacking gel ตามสัดส่วน (ดังแสดงในตาราง) เมื่อเตรียมส่วนผสมของ Stacking gel ครบแล้ว จากนั้นใช้ไมโครปิเปตเติม Stacking gel ลงในพื้นที่ส่วนที่เหลือแล้วนำ comb มาใส่บริเวณส่วนบนของกระจก รอประมาณ 30-45 นาทีเพื่อให้ส่วนของ Stacking gel แข็งตัว

เมื่อครบเวลานำ comb ออกจากช่องว่างของกระจกและถอดเอากระจกทั้งสองข้างออกจาก Casting frames จากนั้นประกอบเข้าด้วยกันโดยหันหน้ากระจกแบบสลับเข้าหากัน เข้าทางด้านในของ Clamping frames เมื่อประกอบเสร็จเรียบร้อยให้นำไปใส่ Chamber ต่อขั้วไฟฟ้าให้ถูกต้อง เพื่อเตรียมการรันเจลในขั้นตอนต่อไปตามลำดับ

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของ Resolving gel และ Stacking gel

ลำดับ	สารเคมี	ปริมาณ	
		Stacking gel	Resolving gel
1	น้ำกลั่น	3.18 ml	2.175 ml
2	0.5 M Tris-HCL, pH 6.8	1.26 ml	-
3	1.5 M Tris-HCL, pH 8.8	-	1.25 ml
4	10% SDS	50 μ l	50 μ l
5	TEMED	5 μ l	2.5 μ l
6	10% APS	25 μ l	25 μ l
7	40% Acrylamide/Bis	0.5 ml	1.5 ml

3.8.2 การเตรียมตัวอย่าง

เตรียม 4X Dye โดยใช้ β -mercaptoethanol 200 μ l กับ Dye 800 μ l จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บในหลอดเซนต์ิฟิวในตู้แช่แข็ง ตัวอย่างวันที่ 0 และ ตัวอย่างวันที่ 7 ปริมาตร 150 μ l ผสมกับ 4X dye

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

50 μ l แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ก่อนทำการโหลดตัวอย่างลงในเจล

3.8.3 การรัน SDS-PAGE

เติม 1X running buffer ลงใน Chamber (ข้อ 3.8.1) ให้ถึงระดับของ Chamber ปิดประตูโปรตีนมาตรฐานและตัวอย่างโปรตีนที่เตรียม (ข้อ 3.8.2) ปริมาตร 20 μ l ลงในหลุม ปิดฝา Chamber ให้ขั้วไฟฟ้าถูกต้องแล้วต่อเข้ากับ Power supply ตั้ง Constant voltage และกำหนด Voltage = 60 V แล้ว Run จนแถบแบนเข้าสู่ Resolving gel อย่างสมบูรณ์ เพิ่ม Voltage = 120 V แล้ว Run จนแถบแบนเคลื่อนจนสุดขอบเจลด้านล่าง ใช้ Gel releaser นำเจลออกจาก Gel sandwich ตัดส่วน Stacking gel ทิ้ง แล้วล้าง Running buffer ออกด้วยน้ำกลั่น

3.8.4 การย้อมสีเจล

ทำการแช่เจลใน Staining solution (ภาคผนวกข- 1) ในสภาวะเขย่าที่ 60 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมงล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น แช่เจลใน Destaining solution (ภาคผนวกข- 2) อย่างน้อย 30 นาที 2-3 ครั้ง เมื่อสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม รอจนพื้นหลังจางลงและแทบปรากฏขึ้น

3.8.5 การอ่านเจลและสังเคราะห์โปรตีน

นำเจลที่ได้หลังจากทำ Destain แล้ว เข้าเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล ถ่ายภาพเก็บ ข้อมูลขนาดของโปรตีนที่ได้ ตัดแถบที่สนใจส่งทำ LC/MS ที่ศูนย์บริการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics Services Center) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

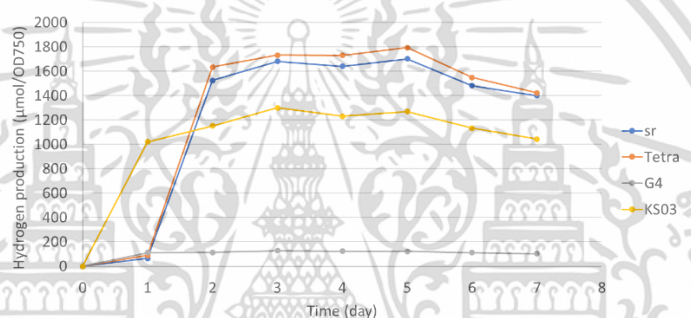
ผลการวิจัยและการอภิปราย

4.1 ผลของอุณหภูมิต่อความสามารถการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย

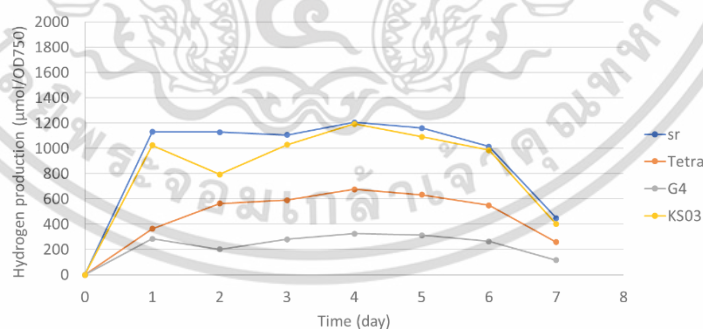
4.1.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เซลเซียส

จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงในตูบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แบบเขย่าและให้แสงเป็นเวลา 7 วัน นำมาวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง Gas chromatograph (GC) ทุกๆ 24 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง ได้ผลดังรูปที่ 4.1 และ 4.2



รูปที่ 4.1 แสดงผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว 4 สายพันธุ์ ในรุ่นที่ 5 ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.2 แสดงผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว 4 สายพันธุ์ ในรุ่นที่ 7 ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

จากกราฟแสดงให้เห็นได้ว่าในรุ่นที่ 5 ลักษณะการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวไปในทิศทางเดียวกัน คือ ในวันที่ 1-2 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายสีเขียว จะเริ่มมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

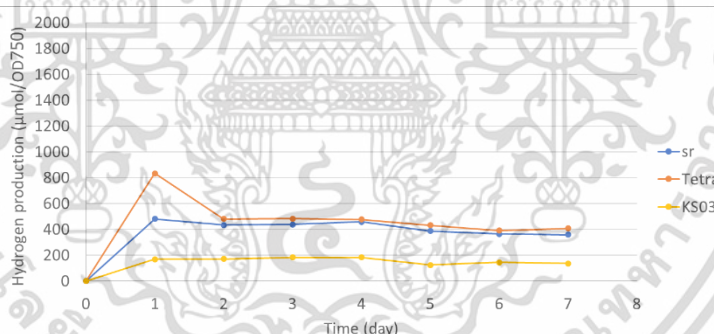
และมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนอย่างคงที่ในวันต่อมา จนเริ่มมีปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ลดลงในวันที่ 6-7 นอกจากนี้ลักษณะการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ไปในทิศทางเดียวกันแล้วในแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ใกล้เคียงกัน ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 (Tetra), *Chlorella* sp. KLSc59 (KS03) และ *Chlorella* sp. KLSc61 (SR) มีปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ใกล้เคียงกัน แต่สายพันธุ์ G4 มีลักษณะและปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่แตกต่างออกไป คือ มีการผลิตที่น้อยและคงที่ตลอดการเจริญ

ในรุ่นที่ 7 มีลักษณะการผลิตก๊าซไฮโดรเจนคล้ายคลึงกับในรุ่นที่ 5 คือเริ่มผลิตก๊าซไฮโดรเจนในวันที่ 1 จากนั้นจะมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่คงที่จนถึงในวันที่ 7 ที่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ลดลง แต่ในทางด้านปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยรวมมีปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่น้อยกว่าในรุ่นที่ 5

4.1.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา

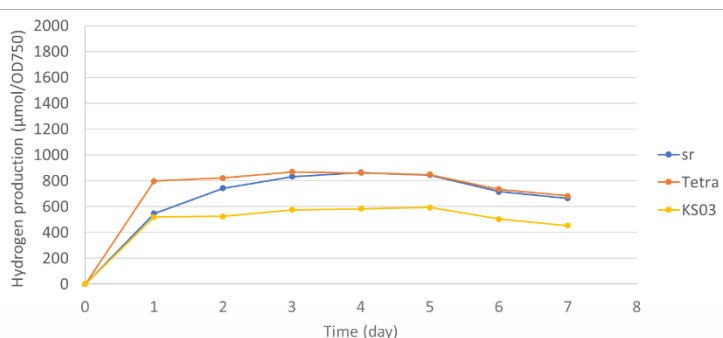
เซลเซียส

จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงในตูบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แบบเขย่าและให้แสงเป็นเวลา 7 วัน นำมาวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง Gas chromatograph (GC) ทุกๆ 24 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง ได้ผลดังรูปที่ 4.3, 4.4 และ 4.5

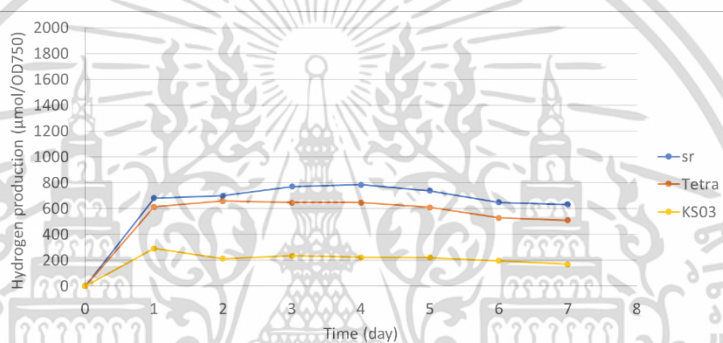


รูปที่ 4.3 แสดงผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ ในรุ่นที่ 1 ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ ในรุ่นที่ 3 ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.5 แสดงผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ ในรุ่นที่ 5 ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เนื่องจากสายพันธุ์ G4 มีลักษณะและปริมาณของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่แตกต่างและน้อยจนเกินไป นอกจากนั้นในการเตรียมหัวเชื้อของสาหร่าย (ข้อ 3.6.1) สายพันธุ์ G4 ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีการเจริญบนอาหาร TAP ทำให้ทางผู้จัดทำไม่สามารถทำการทดลองของเซลล์สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ G4 ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จากกราฟแสดงให้เห็นได้ว่าทั้ง 3 รุ่น มีลักษณะการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ใกล้เคียงกัน คือ เริ่มมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจะคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง ส่วนปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ของ *Tetraspora* sp. CU2551 (Tetra) และ *Chlorella* sp. KLSc61 (SR) มีความใกล้เคียงกันอย่างมากในทุกรุ่นและ *Chlorella* sp. KLSc59 (KS03) จะมีปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่น้อยกว่า

ซึ่งโดยรวมลักษณะการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมีความคล้ายคลึงกับเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ในส่วนของปริมาณนั้น เซลล์สาหร่ายสีเขียวที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีปริมาณโดยรวมที่มากกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส ดังนั้นการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายในอุณหภูมิต่ำไม่ได้ทำให้เซลล์สาหร่ายหยุดการเจริญเติบโต เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือหยุดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนไป แต่มีผลทำให้ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลงไป ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเซลล์สาหร่ายที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้โปรตีนภายในเซลล์หยุดการทำงานไป หลังจากถูกกระตุ้นแล้วโปรตีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนอาจยังไม่ทำงานได้ดี จากการศึกษาของ Zhao et al. กล่าวว่าอุณหภูมิต่ำทำให้การทำงานของเอนไซม์ซัลเฟอร์ ซึ่งทำให้โฟตอนที่ประมวลผลโดยระบบแสง (photosystems) น้อยลง (Zhao et al., 2019)

4.2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้น

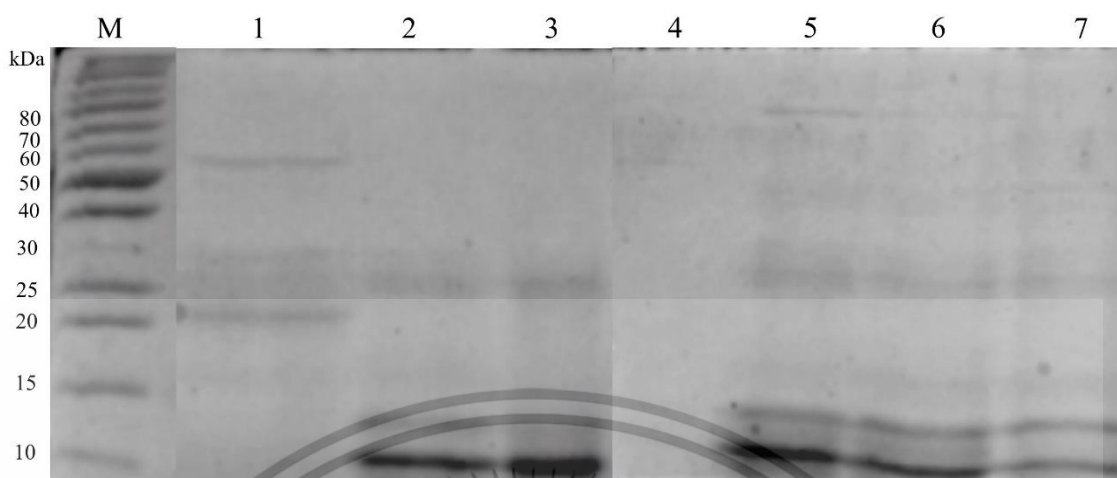
4.2.1 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

หลังจากการทดลองเพื่อการดูความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ว่าอุณหภูมินั้นมีผลต่อการทำงานของโปรตีนภายในเซลล์จึงใช้วิธี SDS-PAGE ตามหัวข้อที่ 3.8 ในการเปรียบเทียบและวิเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ของสาหร่ายทั้ง 2 อุณหภูมิ ผลดังรูปที่ 4.6, 4.7 และ 4.8

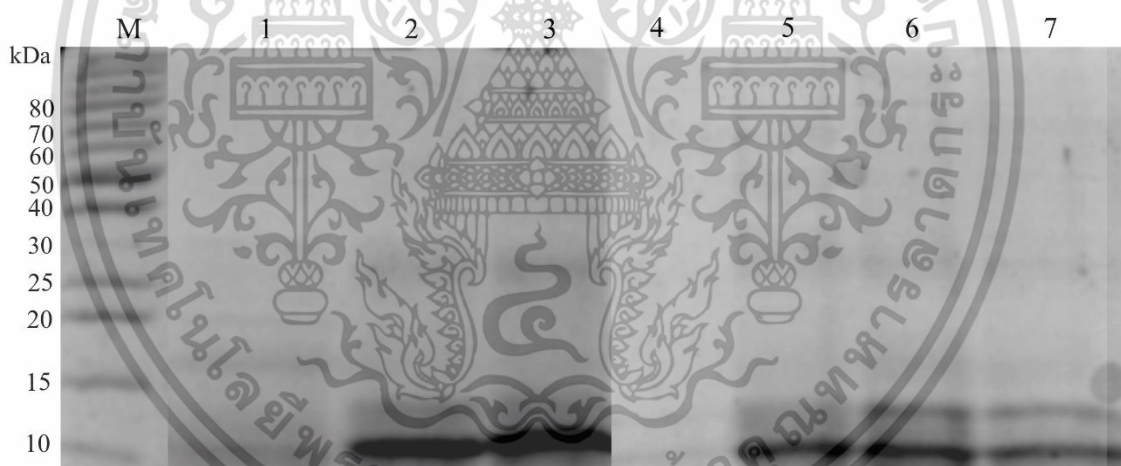


รูปที่ 4.6 แสดงผลโปรตีนจากเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLS61 (SR) ที่ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส; M = marker; 1 = SR 25°C วันที่ 0; 2 = SR 25°C รุ่นที่ 5 วันที่ 7; 3 = SR 25°C รุ่นที่ 7 วันที่ 7; 4 = SR 4°C วันที่ 0; 5 = SR 4°C รุ่นที่ 1 วันที่ 7; 6 = SR 4°C รุ่นที่ 3 วันที่ 7; 7 = SR 4°C รุ่นที่ 5 วันที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงผลโปรตีนจากเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 (Tetra) ที่ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส; M = marker; 1 = Tetra 25°C วันที่ 0; 2 = Tetra 25°C รุ่งที่ 5 วันที่ 7; 3 = Tetra 25°C รุ่งที่ 7 วันที่ 7; 4 = Tetra 4°C วันที่ 0; 5 = Tetra 4°C รุ่งที่ 1 วันที่ 7; 6 = Tetra 4°C รุ่งที่ 3 วันที่ 7; 7 = Tetra 4°C รุ่งที่ 5 วันที่ 7



รูปที่ 4.8 แสดงผลโปรตีนจากเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLS59 (KS03) ที่ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส; M = marker; 1 = KS03 25°C วันที่ 0; 2 = KS03 25°C รุ่งที่ 5 วันที่ 7; 3 = KS03 25°C รุ่งที่ 7 วันที่ 7; 4 = KS03 4°C วันที่ 0; 5 = KS03 4°C รุ่งที่ 1 วันที่ 7; 6 = KS03 4°C รุ่งที่ 3 วันที่ 7; 7 = KS03 4°C รุ่งที่ 5 วันที่ 7

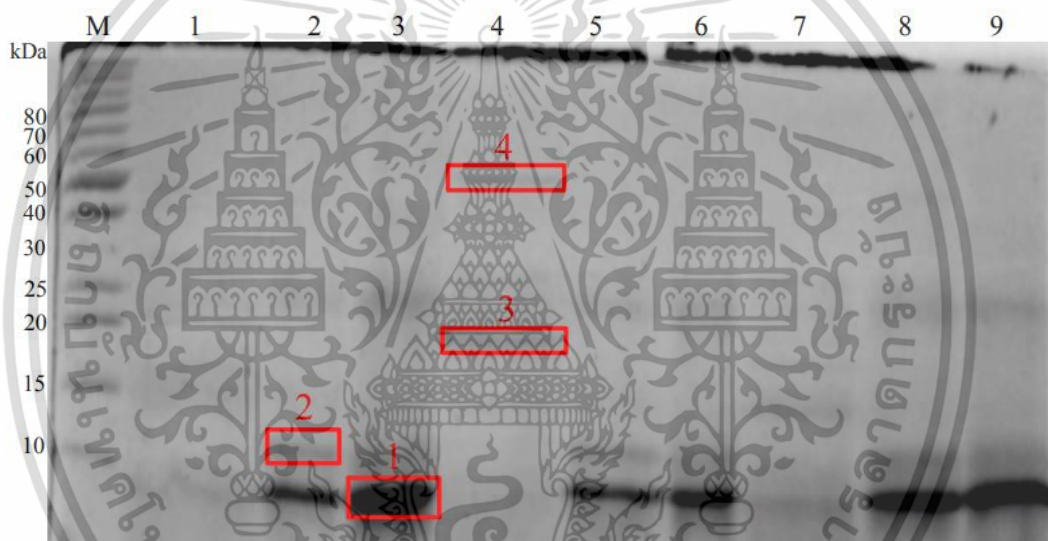
จากภาพแสดงให้เห็นว่ามีการทำงานของโปรตีนภายในเซลล์สาหร่ายที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส จากการขึ้นแบนในแต่ละแถว แต่จะเห็นได้ว่ามีแบนบางตำแหน่งที่มีขึ้นในบางแถวเท่านั้น แสดงถึงการทำงานของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงตามสภาวะที่เซลล์ได้รับ มีการศึกษาของ Chunfang Lu et al. (2010) พบว่าการวิเคราะห์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสองมิติของโปรตีนจากใบ *Ammopiptanthus* ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

nanus โดยใช้ PDQuest ระบุจุดโปรตีนประมาณ 500 จุดในโปรตีนหยาบทั้งหมดจากตัวอย่าง พบความแตกต่างของรูปแบบการแสดงออกระหว่างสองตัวอย่าง โปรตีน 39 ชนิดเปลี่ยนแปลงไปอย่างมากภายใต้สภาวะที่เย็นจัด โดยโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น 19 ชนิดและโปรตีนที่แสดงออกลดลง 20 ชนิด ดังนั้น อุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของโปรตีน ทั้งแสดงออกมากขึ้นหรือลดลงและไม่มีการทำงาน

4.2.2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี LC/MS จากคณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยมหิดล

ทางผู้จัดคัดเลือกตำแหน่งที่น่าสนใจเพื่อตัดแบนที่สนใจส่งทำ LC/MS ที่ศูนย์บริการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics Services Center) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยผลการคัดเลือกที่ได้เป็นดังรูปที่



รูปที่ 4.9 แสดงตัวอย่างแบนโปรตีนที่น่าสนใจและส่งไปทำ LC/MS ที่ศูนย์บริการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics Services Center) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 1 = 1-10k; 2 = 2-12k; 3 = 3-18k; 4 = 4-55k

จากภาพแสดงให้เห็นตัวอย่างแบนทั้งหมด 4 แบนที่เลือกส่งไปทำ LC/MS ที่ศูนย์บริการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics Services Center) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่คาดว่าจะใช้เป็นดังตารางนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนจากแบนที่ส่งไปทำ LC/MS ที่ศูนย์บริการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics Services Center) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

band	Protein score threshold	Possible target	Protein score	Molecular Weight
4-55k	38	RuBisCo large chain	349	50-55
		ATP synthase subunit beta	253	52
		Citrate synthase	83	45-50
3-18k	39	Chlorophyll a-b binding protein	244	20-30
		Ribonuclease	106	10-40
		Elongation factor Tu	82	43-47
2-12k	39	Histone H3.1	52	15-17
		40s ribosomal S18	49	16-19
		Ribosomal protein L18e/L15P	41	15-20
1-10k	39	Histone H2B	126	13-15
		RuBisCo small subunits	71	12-15
		Histone H2A	62	13-15

จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE นั้นเป็นการวิเคราะห์โปรตีนแบบ 1 มิติ ทำให้สามารถคัดแยกได้ตามขนาดและเปรียบเทียบกับขนาดของโปรตีนมาตรฐาน (marker) เท่านั้น แต่ไม่สามารถคัดแยกตามค่า pI ได้ทำให้ในแถบแบน 1 แบนที่เห็นอาจแสดงถึงโปรตีนหลายชนิดที่มีขนาดเท่ากันแต่ค่า pI ต่างกันได้ โดยจากตารางเป็นโปรตีนที่คาดว่าอยู่ในแบนตัวอย่าง เนื่องจากดูจากค่าความเชื่อมั่นโปรตีน (Protein score threshold) และขนาดโมเลกุล

จากข้อมูลในตารางที่ 2 แบน 1-10k คาดว่าเป็นโปรตีน Histone H2B เนื่องจาก Protein score มีค่าเท่ากับ 126 ซึ่งสูงที่สุดและสูงกว่าค่าความเชื่อมั่นโปรตีน (Protein score threshold) ที่ 39 และมีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับโปรตีนมาตรฐาน โดย Histone H2B เป็นหนึ่งในฮิสโตนหลัก อยู่ในรูปของไดเมอร์ มีหน้าที่ทางพันธุกรรมมากมาย เช่น การควบคุมการแสดงออกของยีนและการทำเครื่องหมายบริเวณที่เสียหายของดีเอ็นเอเพื่อซ่อมแซม (Romana et al, 2020) โดยจากรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่า เมื่อเวลาผ่านไปโปรตีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น แสดงว่า Histone H2B มีความสำคัญในการเจริญ เพราะในตอนแรกไม่มีการทำงานในวันที่ 0 แต่ในวันที่ 7 เห็นความเข้มข้น แสดงให้เห็นถึงการทำงานมากขึ้น นอกจากนั้นรูปที่ 4.6, 4.7 และ 4.8 ยังเห็นลักษณะที่เหมือนกันของแบน 1-10k ที่เข้มที่สุดของทุกๆสายพันธุ์ตัวอย่าง

แบน 2-12K คาดว่าเป็นโปรตีน Histone H3.1 เนื่องจาก Protein score มีค่าเท่ากับ 52 ซึ่งสูงที่สุดและสูงกว่าค่าความเชื่อมั่นโปรตีน (Protein score threshold) ที่ 39 และมีขนาดโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับโปรตีนมาตรฐาน โดย Histone H3.1 เป็นฮิสโตนหลักอยู่ในรูปของไดเมอร์ เช่นเดียวกับกับ Histone H2B เช่นกัน จากรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่า แบน 2-12k กับ แบน 1-10k มีลักษณะคล้ายกัน คือ เมื่อเวลาผ่านไปโปรตีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ในตอนแรกไม่มีการทำงานในวันที่ 0 แต่ในวันที่ 7 เห็นความเข้มข้น แสดงให้เห็นถึงการทำงานมากขึ้นและเป็นลักษณะเดียวกันในทุกๆสายพันธุ์ตัวอย่าง แต่จากรูปที่ 4.6, 4.7 และ 4.8 จะได้เห็นว่าเป็นแบน 2-12k จะเห็นแบนน้อยกว่าแบน 1-10k เสมอ

แบน 3-18k คาดว่าเป็นโปรตีน Chlorophyll a-b binding protein เนื่องจาก Protein score มีค่าเท่ากับ 244 ซึ่งสูงที่สุดและสูงกว่าค่าความเชื่อมั่นโปรตีน (Protein score threshold) ที่ 39 และมีขนาดโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับโปรตีนมาตรฐาน โดย Chlorophyll a-b binding protein เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสง ชนิดของโปรตีนเมมเบรนของคลอโรฟิลล์ a-b binding protein (LHCs) ที่สังเคราะห์ด้วยแสงมีสมาชิกอย่างน้อย 30 ตัว ซึ่งจับกับโมเลกุลเม็ดสีเพื่อสร้างสารเชิงซ้อนตัวรับสัญญาณดูดซับแสงของศูนย์ปฏิกิริยาแสง I (PS I) และ II (PS II) หน้าที่หลักคือการดูดกลืนพลังงานแสงและการถ่ายโอนพลังงานที่ตามมาไปยังศูนย์ปฏิกิริยา (Zhen Liu, 2022) จากรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของโปรตีนในตัวอย่าง Tetra ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในวันที่ 0 และไม่มีการแสดงออกในรุ่นที่ 5 รุ่นที่ 7 กับ รุ่นที่ 7 วันที่ 7 และจากรูปที่ 4.7 จากตัวอย่าง SR ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่แสดงออกในวันที่ 0 เท่านั้น เช่นเดียวกับกับ Tetra แสดงว่าการทำงานของ Chlorophyll a-b binding protein ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป

แบน 4-55k คาดว่าเป็นโปรตีน RuBisCo large chain เนื่องจาก Protein score มีค่าเท่ากับ 349 ซึ่งสูงที่สุดและสูงกว่าค่าความเชื่อมั่นโปรตีน (Protein score threshold) ที่ 38 และมีขนาดโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับโปรตีนมาตรฐาน โดย RuBisCo large chain พบได้ในพืชทุกชนิด สาหร่าย ไชยาโนแบคทีเรีย และโปรตีนโอแบคทีเรียประเภทโฟโตโทรฟิกและเคโมลิโธออโตโทรฟิกส่วนใหญ่ (Yuwei Mao et al, 2022) ทำหน้าที่ในขั้นตอนสำคัญขั้นตอนหนึ่งในการสังเคราะห์ด้วยแสง หน้าที่หลักคือการเร่งปฏิกิริยาเคมีต่างๆ โดยปฏิกิริยาที่สำคัญที่สุดคือปฏิกิริยาแรกของวัฏจักรคัลวิน ลำดับของปฏิกิริยานี้เริ่มต้นด้วยการดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และสิ้นสุดด้วยการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต RuBisCO จึงมีหน้าที่ในการตรึงคาร์บอนอนินทรีย์มากกว่า 90% ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นชีวมวล นอกจากนี้ยังเป็นหนึ่งในโปรตีนที่แพร่หลายมากที่สุด ในธรรมชาติ โดยพบในเนื้อเยื่อสังเคราะห์แสงของพืช "สีเขียว" ทั้งหมด สาหร่าย ไชยาโนแบคทีเรีย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงหลากหลายชนิด และแบคทีเรียที่ไม่สังเคราะห์แสงบางชนิดเช่นกัน (Madalena et al., 2023) จากรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นการแสดงออกของโปรตีนในวันที่ 0 ของตัวอย่าง Tetra ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และไม่เห็นการแสดงออกในรุ่นที่ 5 วันที่ 7 กับ รุ่นที่ 7 วันที่ 7 และจากรูปที่ 4.7 จากตัวอย่าง SR ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่แสดงออกในวันที่ 0 เท่านั้น เช่นเดียวกันกับ Tetra แสดงว่าการทำงานของ RuBisCo large chain ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป เพราะ RuBisCo จะทำงานต่อเมื่อต้องการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แต่เมื่ออยู่บนอาหาร TAP ซึ่งมีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้โปรตีน RuBisCo ไม่จำเป็นต้องตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเวลาผ่านไปการทำงานของโปรตีน RuBisCo จึงลดลง และมีการศึกษาของ Makoto et al, (2007) พบว่า RuBisCO ตั้งอยู่ในคลอโรพลาสต์ ระดับการแสดงออกของพวกมันลดลงโดยความเครียดจากความเย็น ซึ่งบ่งชี้ถึงความเสียหายต่อคลอโรพลาสต์และอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ลดลงภายใต้เงื่อนไขเหล่านี้ จากรูปที่ 4.6, 4.7 จะพบว่าแบน 4-55k มีลักษณะเหมือนกับแบน 3-18k ที่เป็น Chlorophyll a-b binding protein ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงและการสร้างชีวมวล

เมื่อทำการเปรียบเทียบโปรตีนที่พบจากการวิเคราะห์ตัวอย่างของเซลล์สาหร่ายที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าแบน 1-10k และ 2-12k เป็น Histone ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนและการเจริญ จึงไม่พบในวันที่ 0 แต่พบการทำงานมากขึ้นเมื่อเซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตในทั้งสองอุณหภูมิทุกสายพันธุ์ แต่แบน 3-18k ซึ่งคือ Chlorophyll a-b binding protein และแบน 4-55k คือ RuBisCo large chain พบได้จากตัวอย่างวันที่ 0 ของเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 (Tetra) ที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ เซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLSc61 (SR) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แสดงถึงกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและการสร้างชีวมวลที่ลดลงเมื่อเซลล์สาหร่ายเจริญเติบโต ซึ่งโปรตีนที่พบจากแบนที่สนใจทั้ง 4 แบนนั้น ไม่ได้ส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวโดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลงานวิจัย

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *Tetraspora* sp. CU2551 (Tetra), *Chlorella* sp. KLSc59 (KS03), *Chlorella* sp. KLSc61 (SR) และ G4 ที่มาจากการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอาหาร Tris acetate phosphate (TAP) นำไปวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนพบว่า เซลล์สาหร่ายที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีลักษณะของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่คล้ายกัน คือ เริ่มผลิตก๊าซไฮโดรเจนในวันที่ 1 และคงที่ในวันต่อมา แต่ในช่วงวันที่ 6-7 นั้น ที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณลดลงในส่วนของปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยรวม เซลล์สาหร่ายที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนโดยรวมที่ผลิตได้มากกว่าเซลล์สาหร่ายที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนสาหร่าย G4 ที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีลักษณะและปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่มัน้อยจนเกินไปและยังไม่เจริญจากที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จึงไม่มีผลของสาหร่าย G4 ที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จากการทดลองจึงพบว่า เซลล์สาหร่ายที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ดีกว่าเซลล์สาหร่ายที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากการศึกษาการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นด้วยวิธี SDS-PAGE โดยจากแบนที่สนใจพบว่า มีโปรตีนที่สำคัญที่ขึ้นทุกแบนคือ Histone H2B และ Histone H3.1 ที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีนและการเจริญ ส่วนโปรตีนที่น่าสนใจที่พบคือ Chlorophyll a-b binding protein และ RuBisCo large chain ซึ่งพบได้จากเซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 (Tetra) วันที่ 0 ที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ *Chlorella* sp. KLSc61 (SR) วันที่ 0 ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แสดงถึงกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและการสร้างชีวมวลที่ลดลงเมื่อเซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตในเวลาต่อมา ซึ่งโปรตีนที่พบจากแบนที่สนใจนั้นไม่ได้ส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวโดยตรง ดังนั้น เซลล์สาหร่ายที่ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการวัดปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายที่เก็บที่อุณหภูมิแตกต่างกันโดยการทดลองแบ่งตามรุ่น (generation) ของเซลล์สาหร่าย ทางผู้จัดทำทำในรุ่นเลขที่เท่ากัน ซึ่งยังเห็นผลที่ไม่ชัดเจนมากในการทำรุ่นเลขที่ ดังนั้นสามารถทำรุ่นของเซลล์สาหร่ายที่ห่างกันมากขึ้น และมีจำนวนมากขึ้นได้ จะทำให้สามารถเห็นลักษณะการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและลักษณะการทำงานของโปรตีนที่ละเอียดและสมบูรณ์มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนั้นจะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นด้วยวิธี SDS-PAGE ไม่ได้ทำการวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธีต่างๆ อย่างเช่น แบริดฟอร์ด จึงทำให้ปริมาณโปรตีนที่เห็นในเจลไม่เป็นแบนชัดเจนเท่าที่ควร และในแบนมีโปรตีนมากกว่า 1 ชนิดจากการทำ SDS-PAGE แบบ 1D ดังนั้นถ้าสามารถทำ SDS-PAGE แบบ 2D ได้จะสามารถเห็นผลโปรตีนที่เกี่ยวข้องได้สมบูรณ์มากกว่า



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- Chunfang Lu, Linke Yin & Kaihui Li, 2010. Proteome expression patterns in the stress tolerant evergreen *Ammopiptanthus nanus* under conditions of extreme cold. *Plant growth regulation* 62, 65-70.
- Debabrata Das & T.Nejat Veziroglu, 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International journal of hydrogen energy* 26, 13-28.
- Debabrata Das, T.Nejat Veziroglu, 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *International journal of hydrogen energy* 33, 6046-6057.
- Delphine Pflieger, J. L. Le Caer, C. Lemaire, B. Bernard, G. Dujardin, J. Rossier, 2002. Systematic identification of mitochondrial proteins by LC-MS/MS. *Analytical chemistry* 74, 2400-2406.
- Fatima Musa Ardo, Jun Wei Lim, Anita Ramli, Man Kee Lam, Worapon Kiatkittipong, Eman Alaaeldin Abdelfattah, Muhammad Kashif Shahid, Anwar Usman, Suwimol Wongsakulphasatch & Nurul Tasnim Sahrin, 2022. A review in redressing challenges to produce sustainable hydrogen from microalgae for aviation industry. *Fuel* 330, 125646.
- Hashimoto M, Komatsu S, 2007. Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. *Proteomics*. 7(8), 1293-302.
- Kim J M Mulders, Packo P Lamers, Dirk E Martens & Rene H Wijffels, 2014. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *Journal of phycology* 50, 229-242.
- Koji Iwamoto, Sohjiro Fukuyo, Masaaki Okuda, Masami Kobayashi & Yoshihiro Shiraiwa, 2012. Cryopreservation of the Chlorophyll d-Containing Cyanobacterium *Acaryochloris Marina*. *Procedia environmental sciences* 15, 118-125.
- Kuan Shiong Khoo, Imran Ahmad, Kit Wayne Chew, Koji Iwamoto, Amit Bhatnagar, Pau Loke Show, 2023. Enhanced microalgal lipid production for biofuel using different strategies including genetic modification of microalgae: A review. *Progress in energy and combustion science* 96, 101071.
- Lakhveer Singh, Zularisam A. Wahid, 2015. Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. *Journal of industrial and engineering chemistry* 21, 70-80.
- Madalena Grácio, Sabrina Oliveira, Ana Lima, Ricardo Boavida Ferreira, 2023. RuBisCO as a protein source for potential food applications: A review. *Food Chemistry*. Volume 419, 135993.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Mahfuzur R. Shah, Erin N. Morrison, Adam J. Noble, Scott C. Farrow, 2022. A simple and effective cryopreservation protocol for the industrially important and model organism, *Euglena gracilis*. STAR Protocols 3, 101043.
- Maneeruttanarungroj, Peter Lindblad & Aran Incharoensakdi, 2010. A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. International journal of hydrogen energy 35, 13193-13199.
- Mitchell D.Scovell, 2022. Explaining hydrogen energy technology acceptance: A critical review. International journal of hydrogen energy 47, 10441-10459.
- Mohamed S. Shahin, Mehmet F. Orhan, Kenan Saka, Ahmed T. Hamada & Faruk Uygul, 2023. Energy assessment of an integrated hydrogen production system. International journal of thermofluids 17, 100262.
- Natwikar Laokua, Nutnicha Rittiyan, Yosita Kornrawudaphikasama, Rachaneekorn Klinsalee, Yothawut Tonawut, Nathanan Preechaphonkul, Wuttinun Raksajit, Wanthanee Khetkorn, Wipawee Dejtisakdi & Cherdasak Maneeruttanarungroj, 2022. Optimal conditions for maximized H₂ yield from a new green algal strain *Chlorella* sp. KLSc61. Journal of applied phycology 34, 1909-1919.
- Rachael M Morgan-Kiss, John C Priscu, Tessa Pocock, Loreta Gudynaite-Savitch & Norman P A Huner, 2006. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. Microbiology and Molecular Biology Reviews 70, 222-52.
- Rene H Wijffels, Maria J Barbosa & Michel H M Eppink, 2010. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. Biofuels Bioproducts & Biorefining 4, 287-295.
- Rituparna Saha, Debalina Bhattacharya, Mainak Mukhopadhyay, 2022. Enhanced production of biohydrogen from lignocellulosic feedstocks using microorganisms: A comprehensive review. Energy conversion and management: X 13, 100153.
- Robin Barten, Yovita Djohan, Wendy Evers, Rene Wijffels & Maria Barbosa, 2021. Towards industrial production of microalgae without temperature control: The effect of diel temperature fluctuations on microalgal physiology. Journal of biotechnology 336, 56-63.
- Romana Bacova, Martina Kolackova, Borivoj Klejdus, Vojtech Adam, Dalibor Huska, 2020. Epigenetic mechanisms leading to genetic flexibility during abiotic stress responses in microalgae: A review. Algal Research Volume 50, 101999.
- Rupali Nagar, Sumita Srivastava, Sterlin Leo Hudson, Sandra L. Amaya, Ashish Tanna, Meenu Sharma, Ramesh Achayalingam, Sanjiv Sonkaria, Varsha Khare & Sesha S.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Srinivasan, 2023. Recent developments in state-of-the-art hydrogen energy technologies – Review of hydrogen storage materials. *Solar compass* 5, 100033.
- Shirui Dong, Yuyang Jiang, Yaying Bu, Suying Wang, Hongyu Zhang & Ruibin Wang, 2022. Growth, photosynthetic pigment proteins responses and transcriptome analysis provide insights into survival strategies against short-term cold stress in the blue-green algae, *Arthrospira*. *Aquaculture reports* 27, 101403.
- Sirawattanamongkol, Thanaporn & Maswana, Thanaporn & Maneeruttanarungroj, Cherdasak. (2020). A newly isolated green alga *Chlorella* sp. KLSc59: potential for biohydrogen production. *Journal of Applied Phycology*. 32. 10.1007/s10811-020-02140-1.
- Thanaporn Sirawattanamongkol, Thanaporn Maswana, Cherdasak Maneeruttanarungroj, 2020. A newly isolated green alga *Chlorella* sp. KLSc59: potential for biohydrogen production. *Journal of applied phycology* 32, 2927-2936.
- Weiqiao Zhao, Peipei Zhou, Caixia Gong, Zhenhuan Ouyang, Jie Wang, Nenggan Zheng & Zhefeng Gong, 2019. *Nature Communications* volume 10, 124.
- Xurui Zhao, Ruijuan Ma, Xiaoting Liu, Shih-Hsin Ho, Youping Xie & Jianfeng Chen, 2018. Strategies related to light quality and temperature to improve lutein production of marine microalga *Chlamydomonas* sp. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 40, 435-443
- Yoong Kit Leong & Jo-Shu Chang, 2023. Lutein biosynthesis from microalgae — Recent advances and circular economy. *Environmental Technology & Innovation* 30, 103097.
- Yuwei Mao, Ella Catherall, Aranzazú Díaz-Ramos, George R L Greiff, Stavros Azinas, Laura Gunn, Alistair J McCormick, 2022. The small subunit of Rubisco and its potential as an engineering target. *Journal of Experimental Botany*, Volume 74, Issue 2, 11.
- Zhen Liu, Chengmin Yu, Benchun Xiang, Jianxin Niu, Yinying Zheng, 2022. Processing tomato chlorophyll a/b-binding protein 1C interacts with CMV 2b protein. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Volume 120, 101857.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ ก อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม)	Stock (มิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)		
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base)	2.42	100	10		
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH ₄ Cl)	0.40	250	25		
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0.05				
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.10				
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	0.05	10	1		
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K ₂ HPO ₄)	0.10				
เกล็ดโซเดียม อีดีทีเอ (Na ₂ -EDTA)	0.05	10	1		
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	5.60 มิลลิกรัม				
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	22.00 มิลลิกรัม				
กรอบอริก (H ₃ BO ₃)	11.40 มิลลิกรัม				
แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต (MnCl ₂ ·4H ₂ O)	5.52 มิลลิกรัม				
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.16 มิลลิกรัม				
แอมโมเนียมโมลิบเดต ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O)	1.10 มิลลิกรัม				
โคบอลตคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	0.16 มิลลิกรัม				
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	-			-	1
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น				1ลิตร	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
สารเคมีในการย้อมสีเจล

ตารางที่ ข- 1 Staining solution

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิลิตร)
Coomassie brilliant blue	6
Methanol	100
Acetic acid	20
น้ำกลั่น	80

ตารางที่ ข- 2 Destaining solution

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิลิตร)
Ethanol	400
Acetic acid	100
น้ำกลั่น	500

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

รูปภาพแสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี LC/MS ที่ศูนย์บริการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics Services Center) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

รูปที่ ค- 1 ตัวอย่างการแสดงความเชื่อมั่นโปรตีน (Protein score threshold) มากกว่า 39

4/21/23, 3:34 PM

../data/20230421/F001770.dat (Mascot Search Results)

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

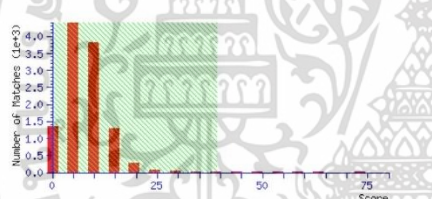
User : mtproteomics
 E-mail : mtproteomics@mahidol.ac.th
 MS data file : 1-10k.mgf
 Database : uniprot-compressed_Chlorell-20230421 (83,365 sequences; 39,338,473 residues)
 Timestamp : 21 Apr 2023 at 08:28:06 GMT

Not what you expected? Try [the select summary](#).

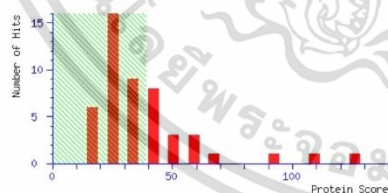
▼ Search parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
 Enzyme : Trypsin/P
 Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications : Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein mass : Unrestricted
 Peptide mass tolerance : ± 1.6 Da
 Fragment mass tolerance : ± 0.8 Da
 Max missed cleavages : 2
 Instrument type : Default
 Number of queries : 15,238

▼ Score distribution



Peptide score distribution. Ions score is $-10 \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. There are **25** peptide matches above identity threshold and **66** matches above homology threshold for **15,238** queries. On average, individual ions scores **> 39** (beyond green shading) indicate **identity or extensive homology** ($p < 0.05$).



[Deprecated] Protein score distribution. Score distribution for family members in the first 50 proteins. Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein families.

► Modification statistics

► Legend

Protein Family Summary

Significance threshold $p <$ Max. number of families
 Display non-sig. matches Dendrograms cut at
 Preferred taxonomy

► Sensitivity

Protein families 1-49 (out of 49)

per page

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ค- 2 ตัวอย่างการแสดงผลโปรตีนที่พบในแบนตัวอย่างที่มีค่าโปรตีนมากกว่าค่าความเข้มข้นโปรตีนที่
39

		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI
1.1	<u>A0A2P6TCI9 A0A2P6</u>	126	97438	88 (13)	13 (5)	0.16
	Histone H2B OS=Chlorella sorokiniana OX=3076 GN=C2E21_9087 PE=3 SV=1					



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 28 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นายชิตภัท กาญจนระวีกุล รหัสประจำตัว 62050585

นายณรงค์ยศ สังข์ทอง รหัสประจำตัว 62050593

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยา

ขอรับรองว่าโครงการพิเศษเรื่อง

ชื่อภาษาไทย ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวต่อความสามารถในการผลิต
ก๊าซไฮโดรเจนและการตอบสนองระดับโปรตีน

ชื่อภาษาอังกฤษ EFFECT OF STORAGE TEMPERATURE OF GREEN ALGAE STRAINS ON
HYDROGEN PRODUCTION CAPACITY AND PROTEIN-LEVEL RESPONSE

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาระดับสมบูรณ์แล้ว
โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.00%

ลงชื่อ.....ชิตภัท.....กาญจนระวีกุล.....

(นายชิตภัท กาญจนระวีกุล)

นักศึกษา

ลงชื่อ.....ณรงค์ยศ.....สังข์ทอง.....

(นายณรงค์ยศ สังข์ทอง)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษ
ของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้
เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....เชิดศักดิ์.....

(รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ผ่านการ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้