

อิทธิพลของความยาวคลื่นแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว
Influence of light wavelength on hydrogen production from green algae



โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Influence of light wavelength on hydrogen production from green algae.

Natchanon Luxsiroj
Natthapol Horsakulchai

A SPECIAL SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT
FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRY MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ อิทธิพลของความยาวคลื่นแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว
Influence of light wavelength on hydrogen production from green algae




ชื่อนักศึกษา ณัฐชนน ลักษณะสิริโรจน์ รหัสนักศึกษา 63050471
ณัฐพล หอสกุลชัย รหัสนักศึกษา 63050476

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2566

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา
อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2566

คณะกรรมการสอบ	ลายเซ็นมือ
ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการ	
รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	อิทธิพลของความยาวคลื่นแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว Influence of light wavelength on hydrogen production from green algae
ชื่อนักศึกษา	ณัฐชนน ลักษณะสิริโรจน์ รหัสนักศึกษา 63050471 ณัฐพล หอสกุลชัย รหัสนักศึกษา 63050476
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

ปัจจุบันพบว่าปริมาณแก๊สเรือนกระจกอยู่ในชั้นบรรยากาศปริมาณมากและเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดภาวะโลกร้อน ก๊าซไฮโดรเจนเป็นก๊าซธรรมชาติที่เมื่อเกิดการเผาไหม้แล้วจะให้พลังงานที่สูงมากและไม่ก่อให้เกิดมลพิษ แต่การจะผลิตก๊าซไฮโดรเจนในปัจจุบันมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง มีการศึกษาก่อนหน้าพบว่ากระบวนการสังเคราะห์แสงของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงอย่างสาหร่ายสีเขียวสามารถรวมอิเล็กตรอนและโปรตอนให้เกิดเป็นก๊าซไฮโดรเจนขึ้นมาได้ด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส งานวิจัยนี้จึงศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ที่นำไปบ่มในสภาวะเขย่าภายใต้แสงไฟ LED ที่มีสีของแสงที่ต่างกันทั้งหมด 4 สี ได้แก่ แดง น้ำเงิน ม่วง และ ขาว โดยใช้ความเข้มแสงที่ 290 ลักซ์ พบว่า *Tetraspora* sp. CU2551 และ *Chlorella* sp. KLSc61 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนและเจริญได้ดีที่สุดในแสงสีแดง คิดเป็น 698.4 และ 725.8 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความเข้มข้นเซลล์ ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการทดลองหาความเข้มแสงที่เหมาะสมโดยนำสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด ไปบ่มในสภาวะเขย่าภายใต้แสงสีแดงที่มีความเข้มแสงต่างกัน 4 ความเข้มแสง ได้แก่ 420 ลักซ์, 380 ลักซ์, 290 ลักซ์ และมี 0 ลักซ์ เป็นตัวควบคุม ซึ่งพบว่าสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนและเจริญได้ดีที่สุดในแสงสีแดงที่มีความเข้มแสง 420 ลักซ์ จากนั้นได้นำสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ดังกล่าวมาปรับสภาวะการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยอาหาร Tris-Acetate-Phosphate ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม เติมเอทานอลและปรับค่าความเป็น กรด - เบส ให้เท่ากับ 9 บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าภายใต้แสงสีแดงที่มีความเข้มแสง 420 ลักซ์ อุณหภูมิ 26 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่า *Tetraspora* sp. CU2551 มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1,432.28 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความเข้มข้นเซลล์ และ *Chlorella* sp. KLSc61 มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1,140.9 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความเข้มข้นเซลล์

คำสำคัญ : การปรับสภาวะ การผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 *Tetraspora* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Influence of light wavelength on hydrogen production from green algae
Student Name	Natthapol Horsakulchai Student ID 63050476 Natchanon Luxsiriroy Student ID 63050471
Degree	Master of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic year	2023
Advisor	Assoc.Prof.Dr. Cherdsak Maneerattananarungroj

Abstract

Currently, it is found that there is a large amount of greenhouse gases within the atmosphere, which is the main cause of global warming. Hydrogen gas, a natural gas, produces very high energy when burned and does not cause air pollution. However, currently producing hydrogen gas is quite expensive. Previous studies have found that the photosynthesis process of photosynthetic microorganisms such as green algae can combine electrons and protons to produce hydrogen gas with the catalysis hydrogenase. This research focuses on the growth and hydrogen gas production of all four strains of green algae cultured under LED light with four different colors: red, blue, purple, and white, using a light intensity of 290 lux. It was found that *Tetraspora* sp. and *Chlorella* sp. KLSc61 exhibited the highest growth and hydrogen gas production under red light, representing 698.4 และ 725.8 $\mu\text{molH}_2/\text{OD}_{750}$. Then, experiments were conducted to determine the optimal light intensity by subjecting both types of algae to shaking incubation under red light with varying intensities: 420 lux, 380 lux, 290 lux, and a control with 0 lux. It was observed that both aforementioned strains of algae performed best in terms of hydrogen gas production and growth under red light with an intensity of 420 lux. Following this, both strains of algae were subjected to nitrogen gas production conditions using Tris-Acetate-Phosphate medium deficient in potassium phosphate, supplemented with ethanol, and pH adjusted to 9, and cultured in shaking incubators under red light with an intensity of 420 lux at $26\pm 1^\circ\text{C}$ for 12 days. *Tetraspora* sp. exhibited the highest hydrogen gas yield at 1,432.28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$\mu\text{molH}_2/\text{OD}_{750}$, while *Chlorella* sp. KLSc61 showed a maximum nitrogen gas yield of 1140.9 $\mu\text{molH}_2/\text{OD}_{750}$.

Keywords : *Chlorella* sp. KLSc61, Green algae, Hydrogen production, Optimization, *Tetraspora* sp.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี อันเนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของทุกท่าน ทั้งนี้ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการฉบับนี้ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำข้อคิดเห็น แนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหา ให้คำปรึกษาและสนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำโครงการพิเศษในครั้งนี้ พร้อมเอาใจใส่และให้กำลังใจเสมอ ผู้เขียนจึงกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการ และ ผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบโครงการพิเศษครั้งนี้ ซึ่งคอยชี้แนะและแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ผู้เขียนขอขอบพระคุณสมาชิกภายในห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งผู้เขียนไม่สามารถกล่าวนามในที่นี้ได้ทั้งหมด ที่คอยอบรม สั่งสอน ให้คำแนะนำพร้อมแนะนำวิธีการแก้ปัญหาต่างๆและชี้แนะการทำโครงการพิเศษจนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ ที่คอยสนับสนุน อบรมและคอยให้คำแนะนำอย่างดีมาเสมอจนศึกษาเล่าเรียนจนจบ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่คอยอำนวยความสะดวก ในการดำเนินโครงการพิเศษให้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ท้ายนี้ผู้เขียนขอโน้มรำลึกถึงอำนาจามิของพระคุณศรีรัตนตรัย และสิ่งศักดิ์สิทธิ์ทั้งหลายที่อยู่ในสากลโลก อันเป็นที่พึ่งให้ผู้เขียนมีสติปัญญาในการจัดทำโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีตลอดจนผู้เขียนหนังสือ และบทความต่างๆที่ให้ความรู้แก่ผู้เขียน หากมีข้อผิดพลาดและบกพร่องประการใด ข้าพเจ้าขอน้อมรับไว้ทั้งหมด และขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ณัฐชนน ลักษณะสิริโรจน์

ณัฐพล หอสกุลชัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2.....	3
2.1 ไฮโดรเจน.....	3
2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน.....	3
2.2.1 Thermo Chemical Process (กระบวนการความร้อนเคมี).....	3
2.2.2 Electro Chemical Processes (กระบวนการไฟฟ้าเคมี).....	4
2.2.3 Biochemical Processes (กระบวนการชีวเคมี)	4
2.3 สาหร่ายสีเขียว	6
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	7
2.4.1 สายพันธุ์หรือชนิดของสาหร่ายสีเขียว	7
2.4.2 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	7
2.4.3 แสง.....	8
2.4.4 ค่าความเป็นกรดเบส (pH).....	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

2.5 โพรตีนในสาหร่ายสีเขียว.....	8
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
บทที่ 3.....	10
3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้.....	10
3.2 อาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่าย.....	10
3.2.1. อาหารสูตร TAP pH 7.2.....	10
3.2.2. อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียม (TAP-K) pH 9.....	10
3.3 สารเคมี.....	10
3.3.1 สารเคมีในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	10
3.3.2 สารเคมีในการทำ Anthrone.....	10
3.3.3 สารเคมีในการทำ SDS-PAGE.....	11
3.4 อุปกรณ์.....	11
3.5 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว.....	12
3.6 การเตรียมเชื้อสาหร่ายสีเขียวในการบรรจุลงในขวดแก้วยาฉีด (Vials).....	12
3.7 การวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้ความยาวคลื่นต่างๆ.....	13
3.7.1 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	13
3.7.2 การศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของสาหร่าย.....	13
3.8 การหาปริมาณแป้งจากสาหร่ายด้วยวิธีการ Anthrone.....	13
3.9 การวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย SDS-PAGE.....	14
3.9.1 วิธีการย้อมสีด้วย silver.....	14
บทที่ 4.....	16
4.1 การวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้ความยาวคลื่นต่างๆ.....	16
4.2 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

4.3 การศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของสาหร่าย.....	20
4.4 การหาปริมาณแบ่งจากสาหร่ายด้วยวิธีการ Anthrone.....	21
4.5 การวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย SDS-PAGE.....	22
บทที่ 5.....	24
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	24
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	24
เอกสารอ้างอิง.....	25
ภาคผนวก.....	28
ภาคผนวก ก.....	29



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ 4.1	กราฟแสดงปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ใน 7 วัน ภายใต้แสงสีขาว.....	17
รูปที่ 4.2	กราฟแสดงปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ใน 7 วัน ภายใต้แสงสีน้ำเงิน.....	17
รูปที่ 4.3	กราฟแสดงปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ใน 7 วัน ภายใต้แสงสีแดง.....	17
รูปที่ 4.4	กราฟแสดงปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ใน 7 วัน ภายใต้แสงสีม่วง.....	18
รูปที่ 4.5	กราฟแสดงปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 ใน 7 วันที่ความเข้มแสงต่างๆ.....	19
รูปที่ 4.6	กราฟแสดงปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ใน 7 วันที่ความเข้มแสงต่างๆ.....	19
รูปที่ 4.7	กราฟแสดงปริมาณไฮโดรเจนในอาหารขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KLSc61.....	20
รูปที่ 4.8	กราฟแสดงปริมาณไฮโดรเจนในอาหารขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมของสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551.....	21
รูปที่ 4.9	กราฟแสดงปริมาณแป้งของสาหร่าย 2 ชนิด ในอาหาร TAP และ TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม.....	22
รูปที่ 4.10	ภาพการแยกของแถบโปรตีนในเซลล์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ตารางเปรียบเทียบระหว่างค่าพลังงานของเชื้อเพลิงไฮโดรเจนกับค่าพลังงานของเชื้อเพลิงชนิดอื่น.....	3
ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของ Separating gel และ Stacking gel.....	15
ตารางที่ ก-1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP).....	29
ตารางที่ ก-2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K).....	30



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันพบว่ามีปริมาณแก๊สเรือนกระจกที่เกิดการเผาไหม้ของพลังงานฟอสซิล เช่น ถ่านหิน (coal) น้ำมันดิบ (crude oil) และก๊าซธรรมชาติ (natural gas) เพื่อใช้ในการใช้ชีวิตประจำวันของมนุษย์ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) อยู่ในชั้นบรรยากาศมากและยังมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดภาวะโลกร้อน (global warming) (Society, 2024) ซึ่งพลังงานไฮโดรเจนที่เป็นพลังงานสะอาดที่ไม่มีมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาเป็นพลังงานทดแทนและสามารถนำมาแก้ปัญหาดังที่กล่าวข้างต้นได้

ไฮโดรเจน (H_2) เป็นพลังงานธรรมชาติหมุนเวียนชนิดหนึ่งที่ให้พลังงานสูงแต่ไม่สร้างมลพิษ (Jolly, 2020) เนื่องจากเมื่อเผาไหม้แล้วจะเกิดน้ำ (H_2O) ออกมาซึ่งในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในปัจจุบันนั้นใช้ค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง (M & G, 2023) และหากมองในแง่พลังงานจะพบว่าพลังงานไฮโดรเจนนั้นสามารถเป็นพลังงานที่หมุนเวียนได้ (renewable energy) และเชื่อว่าเป็นแหล่งพลังงานในอนาคตได้ (Balthasar, 1984) ซึ่งวิธีการที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนด้วยจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง (photosynthetic microorganism) เช่น สาหร่ายสีเขียว (green algae) เพื่อแก้ปัญหาต่างๆ สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตสังเคราะห์แสงจึงต้องใช้แสงในการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) ซึ่งเป็นกระบวนการที่จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงแปลงพลังงานแสงเป็นพลังงานเคมีเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของมันเอง โมเลกุลที่จุลินทรีย์ใช้ในการดูดซับแสง เรียกว่า รงควัตถุ (Pigment) หรือสารสี ซึ่งสารสีแต่ละชนิดนี้มีการดูดซับช่วงคลื่นแสง (wavelength) ที่แตกต่างกันซึ่งจากทฤษฎีจะมีเพียงช่วงความยาวคลื่นที่เป็นแสงสีฟ้าและแดงเท่านั้นที่นำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง มีการศึกษาก่อนหน้าพบว่ากระบวนการสังเคราะห์แสงของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงอย่างสาหร่ายสีเขียวสามารถแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนและโปรตอนให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนขึ้นมาได้ด้วยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) (Edenharter *et al.*, 2024) และยังคงพบวิธีการปรับสภาวะการผลิตไฮโดรเจนให้เหมาะสม (Laokua *et al.*, 2022) ภายใต้แสง LED ได้อีกด้วย

ปัจจุบันหน่วยวิจัยพลังงานชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังมีการเก็บเกี่ยวสาหร่ายสีเขียวหลายสายพันธุ์ ในเบื้องต้นพบว่ามีสาหร่ายบางสายพันธุ์ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาปัจจัยสีของแสง LED ที่ส่งผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากไฮโดรเจนจะเป็นพลังงานสะอาดที่ถูกนำไปเป็นพลังงานทดแทนในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของความยาวคลื่นแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว
2. เพื่อศึกษาความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด
3. เพื่อศึกษาสภาวะขาดธาตุอาหารที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงและติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 4 ชนิด
2. การวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน
3. ศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน
4. การศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของเซลล์
5. การหาปริมาณแก๊สจากสาหร่ายด้วยวิธีการ Anthrone
6. การวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย SDS-PAGE

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงช่วงความยาวคลื่นแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิด
2. ทราบถึงความเข้มของแสงที่มีผลต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิด
3. ทราบถึงสภาวะการขาดธาตุอาหารของสาหร่ายมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนอย่างไร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจน

ไฮโดรเจน เป็นธาตุที่มีน้ำหนักเบาที่สุดในตารางธาตุ และเป็นองค์ประกอบของน้ำซึ่งมีมากที่สุดบนโลก ซึ่งคุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจนคือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส และมีความสามารถในการติดไฟง่าย ไม่เป็นมลพิษกับสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ เนื่องจากมีความสะอาดสูงมาก เมื่อเผาไหม้จะได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งไฮโดรเจนมี 3 สถานะ ได้แก่

1. ของแข็ง ไม่มีสี มีโครงสร้างผลึก 6 เหลี่ยม
2. ของเหลว ไม่มีสี มีค่าความหนืดต่ำ เคลื่อนที่ได้เร็ว
3. ก๊าซ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นพิษ โดยก๊าซไฮโดรเจน 1 ลิตร มีมวล 0.0898 กรัม

ตารางที่ 2.1 ตารางเปรียบเทียบระหว่างค่าพลังงานของเชื้อเพลิงไฮโดรเจนกับค่าพลังงานของเชื้อเพลิงชนิดอื่น

	ปิโตรเลียม	โซลา	ก๊าซโซลีน	แอลกอฮอล์	ก๊าซธรรมชาติ	ไฮโดรเจน
ปริมาณความร้อน (kcal/kg)	8100	10590	10630	4770	11930	28700
CO ₂ ที่เกิดขึ้น (Kg/10 ⁴ kcal)	4.52	2.91	2.90	2.88	2.30	0

2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน

เทคโนโลยีในการผลิตไฮโดรเจน สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 เทคโนโลยีหลัก ได้แก่ Thermo Chemical Processes, Electro Chemical Processes และ Biochemical Processes

2.2.1 Thermo Chemical Process (กระบวนการความร้อนเคมี)

ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้โดยวิธีทางเคมีโดยใช้ความร้อน มีวัตถุดิบหลักที่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน ชีวมวล เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ ก๊าซสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย ไฮโดรเจน (H₂), คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) น้ำ (H₂O) และมีเทน (CH₄) จากนั้นจะผ่านกระบวนการแยกสารเป็นเอกสารที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มเติมเพื่อให้ได้ไฮโดรเจนที่บริสุทธิ์ขึ้น ซึ่งการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการความร้อนเคมี ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (Steam Reforming) กระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification)

ปัจจุบันการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำจากก๊าซธรรมชาติ เป็นกระบวนการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในเชิงพาณิชย์ ซึ่งในประเทศไทยใช้กระบวนการนี้ในการผลิตไฮโดรเจนเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่างๆ

2.2.2 Electro Chemical Processes (กระบวนการไฟฟ้าเคมี)

เป็นการใช้ไฟฟ้าเพื่อแยกน้ำเพื่อให้ได้ไฮโดรเจนและออกซิเจนโดยไฟฟ้าที่มาจากแหล่งกำเนิดไฟฟ้าทุกชนิดสามารถใช้ได้กับกระบวนการนี้ไม่ว่าจะเป็นไฟฟ้าจากแหล่งพลังงานหมุนเวียน ซึ่งในกระบวนการนี้ราคาต้นทุนเกือบทั้งหมดของกระบวนการขึ้นอยู่กับมูลค่าของพลังงานไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกสลายน้ำ ถ้าหากจะนำก๊าซไฮโดรเจนมาเป็นเชื้อเพลิงในการผลิตกระแสไฟฟ้าโดยใช้เซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) พบว่า ค่าพลังงานไฟฟ้าที่ได้ยังไม่คุ้มค่ากับต้นทุน

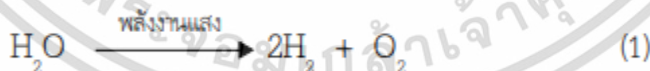
2.2.3 Biochemical Processes (กระบวนการชีวเคมี)

กระบวนการนี้เป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก หรือจุลินทรีย์ และสาหร่ายสีเขียว ซึ่งสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเหล่านี้จะเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นไฮโดรเจน

2.2.3.1 กระบวนการใช้แสง (Light - driven process)

2.2.3.1.1) การแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis)

การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงเป็นกระบวนการที่ใช้ระบบแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เช่น สาหร่ายสีเขียว (green algae) เพื่อแยกน้ำโดยการดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์โดยตรงให้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนด้วยอัตราส่วน 2:1 ดังสมการที่ (1)



ออกซิเจนมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จึงมีความจำเป็นต้องรักษาระดับออกซิเจนให้มีค่าต่ำกว่า 0.1% เพื่อให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างยั่งยืน (Hallenbeck and Benemann, 2002) สาหร่ายสีเขียวหลายชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำโดยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงได้ เช่น *Chlamydomonas reinhardtii* (Melis et al., 2000) และ *Chlorella fusca* (Winkler et al., 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.1.2 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis)

การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อมจะพบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) หรือไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ซึ่งมีคุณสมบัติในการใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนที่แยกออกจากกัน การผลิตไฮโดรเจนแบบนี้จะสามารถแก้ปัญหาเนื่องจากออกซิเจนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ผลิตไฮโดรเจน เพราะกระบวนการสร้างออกซิเจนและไฮโดรเจนเกิดแยกกันโดยในขั้นตอนแรกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะใช้พลังงานแสงผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงที่หนึ่งและสองรวมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตเก็บสะสมเป็นชีวมวลของสาหร่าย ดังสมการที่ (2) และในขั้นตอนที่สองชีวมวลของสาหร่ายจะถูกนำไปใช้ในการสร้างไฮโดรเจน ดังสมการที่ (3)



สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิดสามารถผลิต ไฮโดรเจนจากน้ำโดยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม ได้เช่น *Gloeocapsa alpicola* (Troshina *et al.*, 2002)

2.2.3.1.3 กระบวนการหมักแบบใช้แสง (Photofermentation)

การผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสงเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น แบคทีเรียสีม่วง (purple bacteria) โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะประกอบด้วยระบบสังเคราะห์แสงเดี่ยวและไม่สร้างออกซิเจน ซึ่งแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สาหร่ายและพืชชั้นสูง แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะผลิตไฮโดรเจนผ่านเอนไซม์ไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะที่ใช้แสงและสารประกอบอินทรีย์หรือชีวมวล ภายใต้สภาวะไร้อากาศ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้กรดอินทรีย์อย่างง่ายเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านไปยังเฟอร์ริดอกซินโดยพลังงานในรูป ATP ซึ่งอิเล็กตรอน 1 ตัวจะต้องการพลังงาน 2 ATP จากนั้นเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเพื่อสร้างไฮโดรเจน สมการที่ (4) แสดงการผลิตไฮโดรเจนจากกรดแลคติก

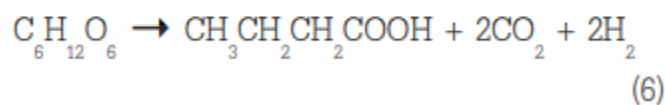


2.2.3.2 กระบวนการแบบไม่ใช้แสง (Non light-driven process)

การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงจะเกิดในแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ ซึ่งมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและสามารถใช้สารตั้งต้นพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลกลูโคส ชีวมวลผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของเสียจากการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรมในสภาวะไม่ใช้แสงเพื่อการผลิตไฮโดรเจน เมื่อใช้กลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 โมล เป็นสารตั้งต้น จะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 4 โมล เมื่อมีกรดอะซีติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ดังแสดงในสมการที่ (5) หรือผลิตไฮโดรเจนได้ 2 โมล เมื่อมีกรดบิวทีริกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ดังแสดงในสมการที่ (6)



2.3 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายและมีความสำคัญทางชีวภาพในระบบนิเวศน์ สาหร่ายสีเขียวเป็นหนึ่งในกลุ่มสาหร่ายที่มีคุณค่าทางอาหารและประโยชน์มากมายต่อมนุษย์ เช่น ด้านอุตสาหกรรม ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์เดี่ยวหรือหลายเซลล์ เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้โดยใช้คลอโรฟิลล์ ซึ่งสาหร่ายสีเขียวมีลักษณะที่สำคัญต่างๆ คือ 1.มีคลอโรฟิลล์ a และ b มีรงควัตถุเช่น แคโรทีน แซนโทฟิลล์ 2.ผนังเซลล์ประกอบด้วยเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ 3.อาหารสะสมในเซลล์ คือ แป้ง สาหร่ายสีเขียวมีแหล่งที่อยู่อาศัยหลากหลายพบได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมน้ำจืดบนบกบริเวณที่มีความชื้นและส่วนน้อยจะพบในน้ำเค็ม

สาหร่ายสีเขียวยังเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีผลผลิตชีวมวลและการสะสมโปรตีนและสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยจะแยกโมเลกุลของน้ำให้เป็นไอออนไฮโดรเจนและออกซิเจนผ่านกระบวนการใช้แสงและยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบที่ไม่ใช้แสงได้อีกด้วย (Gaffon and Rubin 1942) ซึ่งสาหร่าย *Chlorella* sp. เป็นที่นิยมในการนำมาผลิตไฮโดรเจน *Chlorella* sp. มักจะมีขนาดเล็กและสีเขียวเข้ม โดยมักจะเจริญอยู่ในน้ำจืดหรือบ่อน้ำที่มีความเค็มน้อยเพราะสภาพน้ำเหล่านี้เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *Chlorella* sp. ดีที่สุด *Chlorella* sp. มีคุณสมบัติที่น่าสนใจในการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและมีสารสีเขียวในเซลล์ที่ช่วยในกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งช่วยให้สาหร่ายสามารถใช้พลังงานจากแสงแดดเพื่อผลิตอาหารและสารอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งยังมีโครงสร้างเซลล์ที่แข็งแรง ทำให้เหมาะสำหรับการปรับปรุงและการขยายพันธุ์เพื่อผลิตสารไฮโดรเจน

สาหร่ายสีเขียวยังคงเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างมากในการนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวเพื่อนำก๊าซไฮโดรเจนที่ได้ไปใช้ในการเป็นแหล่งพลังงานทดแทนในอนาคต หรือสาหร่ายมีปริมาณโปรตีนที่สูงจึงเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

2.4.1 สายพันธุ์หรือชนิดของสาหร่ายสีเขียว

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายแต่ละชนิดจะให้ผลผลิตและการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยารีดอกซ์ ตำแหน่งภายในเซลล์ หน้าที่ตัวเร่งปฏิกิริยาหรือตัวควบคุม (Lubitz and Ogata 2013) อย่างไรก็ตาม ปัจจัยอื่น ๆ ยังคงมีส่วนเกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนอีกด้วย

2.4.2 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

การเลี้ยงสาหร่ายด้วยสูตรอาหารที่มีธาตุอาหารครบถ้วน หรือการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยการขาดธาตุอาหารต่างๆ เช่น

2.4.2.1 การขาดธาตุอาหารซิลิเฟออร์

การขาดธาตุอาหารซิลิเฟออร์มีผลต่อวัฏจักรของการซ่อมแซมระบบการสังเคราะห์แสง (PSII repair cycle) (Mckinlay and Harwood 2010) ทำให้สาหร่ายกลายเป็นการเพาะเลี้ยงแบบไม่ใช้อากาศภายใต้สภาวะให้แสง ส่งผลให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าในสภาวะปกติ (Zhang *et al.* 2002)

2.4.2.2 การขาดธาตุอาหารไนโตรเจน

ส่งผลให้เกิดความเครียดอย่างรุนแรงภายในเซลล์ เนื่องจากธาตุไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีน มีผลกับวัฏจักรการซ่อมแซมระบบการสังเคราะห์แสง (PSII repair cycle) (Philipps *et al.* 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายมีการสะสมแป้งมากขึ้นเมื่อขาดธาตุอาหารไนโตรเจน ซึ่งแป้งที่สะสมจำนวนมากนำมาสลายเป็นแหล่งอิเล็กตรอนที่สำคัญในการสังเคราะห์แสงสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ส่งเสริมให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากขึ้นกว่าในสภาวะปกติ (Hicks *et al.*, 2001; Swanny *et al.* 2005)

2.4.2.3 การขาดธาตุอาหารฟอสฟอรัส

การขาดธาตุอาหารฟอสฟอรัสสามารถยับยั้งการสร้างก๊าซออกซิเจนได้ นอกจากนี้ยังคงส่งผลให้ประสิทธิภาพการเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานกระตุ้นน้อยลง เมื่อกระบวนการสังเคราะห์แสงน้อยลงจึงเกิดปฏิกิริยาหายใจระดับเซลล์มากขึ้น ส่งเสริมให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากขึ้นกว่าในสภาวะปกติ (Batyrova *et al.* 2012)

2.4.2.4 การขาดธาตุอาหารโพแทสเซียม

อิทธิพลการขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมเกี่ยวข้องกับชีวเคมี เนื่องจากธาตุอาหารโพแทสเซียมสามารถถูกแทนที่ด้วยธาตุโซเดียมได้บางส่วนส่งผลให้ระบบต่างๆยังคงทำงานปกติ อย่างไรก็ตามโซเดียมไม่สามารถที่จะแทนที่โพแทสเซียมในกระบวนการเปลี่ยนกลูโคสเป็นแป้ง (Gattward *et al.* 2012) ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่ส่งผลให้เพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ขาดโพแทสเซียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 แสง

แสงเป็นองค์ประกอบสำคัญสำหรับสาหร่ายซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตสังเคราะห์แสง การเพาะเลี้ยงโดยใช้แสงจากแหล่งต่างๆเพื่อให้เกิดการเจริญเติบโตและกระบวนการสังเคราะห์แสง เช่น แสงจากแหล่งที่มาจากหลอดไฟ LED ที่สำคัญความเข้มแสงก็เป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ซึ่งความเข้มแสงที่เพียงพอจะเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Gabrielyan *et al.* 2017; Sargsyan *et al.* 2015) และสีของแสงก็ยังคงมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Narong, Jessada Phattaralephon, Suphasit Sitthaphanit 2019)

2.4.4 ค่าความเป็นกรดเบส (pH)

ค่าความเป็นกรดเบสมีอิทธิพลอย่างมาก เนื่องมาจากจะสามารถกำหนดความสามารถในการละลายของคาร์บอนไดออกไซด์ รวมไปถึงการดูดซึมสารอาหารต่างๆที่สภาวะกรดจะรบกวนกระบวนการทำงานและการดูดซึมสารอาหารของเซลล์ ในขณะที่สภาวะเบสจะลดการจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และวัฏจักรของเซลล์ทำงานช้า

2.5 โปรตีนในสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวมีปริมาณโปรตีนที่สูงมาก ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่ดี สาหร่าย *spirulina* เป็นสาหร่ายที่มีปริมาณโปรตีนสูงถึง 50-70% ของน้ำหนักแห้ง (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542) ซึ่งพบว่าปริมาณโปรตีนมากกว่าอาหารทั่วไป เช่น เนื้อวัว ข้าวสาลี เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบัน

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยของ Melis และคณะ (Melis *et al.*, 2000) พบว่าสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* เมื่อบ่มเซลล์ในอาหารที่ปราศจากซัลเฟอร์ นานกว่า 24 ชั่วโมง เซลล์จะถูกเหนี่ยวนำให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากธาตุซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบสำคัญของกรดอะมิโนซิสเทอีนและเมไทโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน โดยเฉพาะโปรตีน D1 ทำให้ระบบสังเคราะห์แสงทำงานช้าลง ปริมาณออกซิเจนลดลง ส่งผลให้ตัวยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสน้อยลง เมื่อทำให้เอนไซม์ทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ จึงได้ผลผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น

งานวิจัยของ Troshina และคณะ (Troshina *et al.*, 2002) พบว่า สาหร่าย *Gloeocapsa alpicola* ที่เลี้ยงโดยมีปริมาณไนเตรทจำกัด จะสร้างไฮโดรเจนได้มากขึ้น เฉพาะถูกเลี้ยงไว้ที่มีดและไม่มีออกซิเจน ซึ่งเป็นผลมาจากการหมักไกลโคเจนที่สะสมในระหว่างการเจริญเติบโตของโฟโตออโตโทรฟิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยของ Gaffon and Rubin 1942 พบว่า สาหร่ายสีเขียวยังเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีผลผลิตชีวมวลและการสะสมโปรตีนและสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยจะแยกโมเลกุลของน้ำให้เป็นไอออนไฮโดรเจนและออกซิเจนผ่านกระบวนการใช้แสง และยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบที่ไม่ใช้แสงได้อีกด้วย

งานวิจัยของ Hicks และคณะ (Hicks *et al.*, 2001; Swanny *et al.* 2005) พบว่า การขาดธาตุอาหารไนโตรเจน สาหร่ายมีการสะสมแป้งมากขึ้น ซึ่งแป้งที่สะสมจำนวนมากนำมาสลายเป็นแหล่งอิเล็กตรอนที่สำคัญในการสังเคราะห์แสงสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ส่งเสริมให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากขึ้นกว่าในสภาวะปกติ

งานวิจัยของ Batyrova และคณะ (Batyrova *et al.* 2012) พบว่า การขาดธาตุอาหารฟอสฟอรัสสามารถยับยั้งการสร้างก๊าซออกซิเจนได้ เมื่อกระบวนการสังเคราะห์แสงน้อยลงจึงเกิดปฏิกิริยาหายใจระดับเซลล์มากขึ้น จึงส่งเสริมให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากขึ้นกว่าในสภาวะปกติ

งานวิจัยของ Gattward และคณะ (Gattward *et al.* 2012) พบว่า การขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมเกี่ยวข้องกับชีวเคมี เนื่องจากธาตุอาหารโพแทสเซียมสามารถถูกแทนที่ด้วยธาตุโซเดียมได้บางส่วน ส่งผลให้ระบบต่างๆยังคงทำงานปกติ อย่างไรก็ตามโซเดียมไม่สามารถที่จะแทนที่โพแทสเซียมในกระบวนการเปลี่ยนกลูโคสเป็นแป้ง ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่ส่งผลให้เพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ขาดโพแทสเซียม

งานวิจัยของ Gabrielyan และคณะ (Gabrielyan *et al.* 2017; Sargsyan *et al.* 2015) พบว่า ความเข้มแสงที่เพียงพอจะทำให้เกิด ATP ผ่านการส่งผ่านอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน

งานวิจัยของ Narong, Jessada Phattaralephon, Suphasit Sitthaphanit 2019 พบว่า สีของแสงยังคงมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย ผลการทดลองพบว่า *C. vulgaris* เปรียบเทียบกับหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ระดับความเข้มแสง $200 \mu\text{mol proton}/\text{m}^2/\text{s}$ เวลาการให้แสง 12:12 ชั่วโมงพบว่า น้ำหนักแห้งและการสะสมน้ำมันของสาหร่าย *C. vulgaris* จากหลอด LED สีน้ำเงินมีค่าสูงกว่าหลอด ฟลูออเรสเซนต์ (CDW 2.73 และ 1.63 g/L, Lipid 23.5 และ 18.5%)

งานวิจัยของลัดดา วงศ์รัตน์, 2542 พบว่า สาหร่าย *Spirulina* sp. เป็นสาหร่ายที่มีปริมาณโปรตีนสูงถึง 50-70% ของน้ำหนักแห้งและมีอัตราการสังเคราะห์แสงค่อนข้างสูง ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงในชั้นอุตสาหกรรม โดยผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ ชนิดที่นิยมเลี้ยง คือ *S. platensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้

เชื้อสาหร่ายสีเขียวได้รับการอนุเคราะห์จากภาควิชาชีววิทยา สาขาจุลชีววิทยาสหกรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้แก่ *Chlorella* sp. KLSc59, *Chlorella* sp. KLSc61, สาหร่ายโค๊ค G4 และ *Tetraspora* sp. CU2551

3.2 อาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่าย

3.2.1. อาหารสูตร TAP pH 7.2

3.2.2. อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียม (TAP-K) pH 9

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1.1 Tris base

3.3.1.2 TAP salt

3.3.1.3 Ammonium chloride

3.3.1.4 Magnesium sulphate

3.3.1.5 Calcium chloride

3.3.1.6 Potassium hydrogen phosphate

3.3.1.7 Potassium dihydrogen phosphate

3.3.1.8 Glacial acetic acid

3.3.1.9 Trace Element

3.3.1.10 Distilled water

3.3.2 สารเคมีในการทำ Anthrone

3.3.2.1 Perchloric acid

3.3.2.2 Sulfuric acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.3 Anthrone reagent

3.3.2.4 Distilled water

3.3.2.5 แป้งมันสำปะหลัง

3.3.2.6 Ethanol

3.3.3 สารเคมีในการทำ SDS-PAGE

3.3.3.1 Running buffer

3.3.3.2 Acrylamide

3.3.3.3 Ammonium persulfate

3.3.3.4 TEMED

3.3.3.5 Tris HCl

3.3.3.6 Sodium Dodecyl Sulfate

3.3.3.7 50% methanol

3.3.3.8 12% acetic acid

3.3.3.9 37% formaldehyde

3.3.3.10 50% ethanol

3.3.3.11 sodium thiosulfate

3.3.3.12 silver nitrate

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.4.1 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.4.2 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave)

3.4.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.4.4 เครื่องมือวัดค่ากรด-ด่าง (pH meter)

3.4.5 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

3.4.6 เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง

3.4.7 เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)

3.4.8 หลอด Centrifuge

3.4.9 Vials ขนาด 100 มิลลิลิตร

3.4.10 อุปกรณ์สำหรับการทำ SDS-PAGE

3.4.11. เครื่องแก้วต่างๆ (Glassware)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.12 เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas chromatograph)

3.4.13 ไมโครปิเปต

3.4.14 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

3.4.15 เข็มเขี่ยเชื้อรูปวง (Loop)

3.4.16 ตู้บ่มแบบเขย่า (Shaker Incubator)

3.4.17 ตราซิ่ง 4 ตำแหน่ง

3.4.18 คิวเวต

3.4.19 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.4.20 หลอด Centrifuge ขนาดเล็ก

3.4.21 เข็มฉีดยา ขนาด 10 ml (Syring)

3.4.22 ชุดอุปกรณ์เซตเจลสำหรับ SDS-PAGE

3.4.23 เครื่องวิเคราะห์เจล

3.5 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว

ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak สาหร่ายทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Chlorella* sp. KLSc59, *Chlorella* sp. KLSc61, สาหร่ายไคต์ G4 และ *Tetraspora* sp. บนอาหาร Tris-Acetate-Phosphate Agar (TAP Agar) จนได้เป็นโคโลนีเดี่ยวและนำมาทำการ inoculation ในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate medium (TAP medium)(ภาคผนวก ก ตารางที่ ก-1) จำนวน 1 โคโลนีที่บรรจุอยู่ในพลาสติกขนาด 250 ml บ่ม ณ อุณหภูมิห้อง 34 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองถัดไป

3.6 การเตรียมเชื้อสาหร่ายสีเขียวในการบรรจุลงในขวดแก้วยาฉีด (Vials)

ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์จากการทดลอง 3.5 ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์สาหร่ายด้วย TAP medium 3 ครั้ง หลังจากทำการปั่นเหวี่ยงเรียบร้อยแล้ว ทำการกระจายเซลล์ด้วย TAP โดยให้มีค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ที่ค่าความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร จากนั้นทำการบรรจุลงในขวดแก้วยาฉีด (vials) ขนาด 100 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรขวดละ 20 มิลลิลิตร พร้อมพ่นอาร์กอนที่ความดัน 0.1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนออกจากขวด vials

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้ความยาวคลื่นต่างๆ

หลังจากทำการบรรจุลงในขวดแก้วยาฉีด (vials) ดังวิธีการเตรียมในการทดลอง 3.6 เรียบร้อยแล้ว หลังจากนั้นนำไปป่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีและป่มภายใต้สภาวะที่เปิดแสง 4 สี ได้แก่ แดง น้ำเงิน ม่วง และ ขาวเป็นตัวควบคุม โดยที่มีความเข้มแสงเท่ากันที่ 290 ลักซ์ เมื่อทำการป่มครบทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 7 วัน นำมาตรวจวัดก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นด้วยการใช้เข็ม (Syringe) ดึงก๊าซที่อยู่ในบริเวณช่องว่าง บริเวณเหนือของเหลวในขวดเพาะเลี้ยง (head space) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตรและวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ แล้วจึงทำการเลือกสภาวะแสงที่ดีที่สุดเพื่อนำไปเข้าสู่กระบวนการถัดไป

3.7.1 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

ในการทดลองนี้จะทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 3.7 แต่ในการทดลองครั้งนี้จะคัดเลือกสาหร่ายชนิดที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุดและให้นำสาหร่ายแต่ละ vials ไปป่มในแสงสีที่มีสภาวะที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 3.7 โดยจะทำการป่มในความเข้มแสงที่ต่างกัน 4 ความเข้มแสง ได้แก่ 420 ลักซ์, 380 ลักซ์, 290 ลักซ์ และมี 0 ลักซ์ เป็นตัวควบคุม ณ อุณหภูมิห้อง 34 ± 1 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เมื่อทำการป่มครบทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 7 วันนำก๊าซที่อยู่บริเวณ head space มาวิเคราะห์อัตราการการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟดังในการทดลองที่ 3.7

3.7.2 การศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของสาหร่าย

ในการทดลองนี้จะคัดเลือกสาหร่ายชนิดที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุดและจะทำการดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากที่เคยใช้ TAP medium จะนำมาทำการเปลี่ยนแปลงเป็นอาหาร TAP medium ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (ภาคผนวก ก ตารางที่ ก-2) และเติมเอทานอลลงไป 50 ไมโครลิตรปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 9 และปิเปตสารละลายเซลล์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงในขวด vials ขนาด 100 มิลลิลิตรและปิดฝาพร้อมพ่นอาร์กอนที่ความดัน 0.1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10-15 นาทีเพื่อกำจัดออกซิเจนออกจากระบบนำขวด vials ไปป่มในความเข้มแสงที่มีสภาวะที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 3.7.1 ณ อุณหภูมิห้อง 34 ± 1 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นำก๊าซที่อยู่บริเวณ head space มาวิเคราะห์อัตราการการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟดังในการทดลองที่ 3.7

3.8 การหาปริมาณแบ่งจากสาหร่ายด้วยวิธีการ Anthrone

เนื่องจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่ามีปริมาณแบ่งในเซลล์ลดลงโดยที่ชั้นแรกนำน้ำแบ่งมาทำเป็นสารมาตรฐาน และทำการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard growth curve) โดยนำน้ำแบ่งมาเขย่ากับ perchloric เอ็กสแทรนเป็นเอ็กสแทรนที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acid จนได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) จากนั้นนำไปทดสอบกับน้ำยา Anthrone โดยปิเปตน้ำ แบ่ง 200 μ l ผสมกับน้ำยา Anthrone 800 μ l หากให้ผลบวกจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ที่มีสี น้ำเงินแกมเขียวแล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ 625 นาโนเมตร หลังจากนั้นก็นำตัวอย่างเซลล์มาชะสีด้วยการแช่ด้วยเอทานอลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนเป็นน้ำออกแล้วปิเปต perchloric 1 ml ทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากครบ 10 นาที ให้ปิเปตมา 200 μ l ผสมกับน้ำยา Anthrone 800 μ l นำไปต้ม 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่นที่ 625 นาโนเมตรและนำค่าที่ได้ไปแทนค่าในสมการเส้นตรงจาก standard growth curve จะได้ปริมาณแบ่งที่ได้จากการทดสอบ

3.9 การวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย SDS-PAGE

ในการทดลองนี้จะทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งจะทำการเตรียม 12% Separating gel และ 4% Stacking gel (เตรียมสารดังตารางที่ 3.1) โดยทำการปิเปตสารละลายลงใน Gel sandwich อย่างช้าๆ เมื่อเติมสารละลายได้ประมาณ $\frac{3}{4}$ ของพื้นที่ทั้งหมด จากนั้นเททับด้วย Isopropanol จากนั้นรอจนกระทั่งเจลแข็งตัว ประมาณ 45-60 นาที เมื่อเจลแข็งตัวให้เท Isopropanol ออกล้างเจลด้วยน้ำกลั่น จากนั้นค่อยๆ โหลด stacking gel ที่ผสมเรียบร้อยแล้วลงไปให้ท่วมกระจกและใส่ comb ให้ใส่ระหว่างช่องว่างของกระจกและ notched alumina plates รอจน Stacking gel แข็งตัว ประมาณ 40 นาทีเมื่อ stacking gel แข็งตัวให้ถอด Gel sandwich แล้วนำไปประกอบเข้ากับ gasket ใน chamber แล้วเท Running buffer จนเต็ม จากนั้นค่อยๆ ดึง comb ออกจาก stacking gel นำโปรตีนมาผสมกับ loading dye แล้วนำไปต้ม 5 นาทีแล้วนำไปโหลดในหลุมเจล โดยทุกตัวอย่างจะโหลด 15 μ l หลังจากโหลดตัวอย่างโปรตีนเรียบร้อยแล้วให้ปิดฝาให้แน่น จากนั้นต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ power supply ให้ถูกต้อง ตั้งค่าความต่างศักย์เริ่มแรกที่ 40 โวลต์ และ 120 โวลต์ ตามลำดับ จากนั้นเริ่มทดสอบทำการย้อมสีด้วย silver เพื่อดูขนาดโปรตีน

3.9.1 วิธีการย้อมสีด้วย silver

การย้อมสีด้วย silver เริ่มจากการแช่เจลไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในสารละลาย 50 ml โดยมี 50% methanol กับ 12% acetic acid และมี 37% formaldehyde 25 μ l เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้วทำการแช่ด้วย 50% ethanol เป็นเวลา 20 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างสารละลายออก ขั้นตอนถัดไปทำการแช่เจลเป็นเวลา 2 นาที ด้วย sodium tiosulfate (0.01g sodium tiosulfate ในน้ำ 50ml) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วแช่เจลในสารละลาย (silver nitrate + formaldehyde) เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ในขั้นตอนนี้การเตรียมสารละลายจะต้องเตรียม silver nitrate ซึ่งจะเตรียมมา 0.1 g ในน้ำ 50 ml และต้องเติมสารละลาย formaldehyde 38 μ l ลงไปด้วยก่อนที่จะเทสารละลายลงในเจล เมื่อครบ 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที่แล้วให้ล้างด้วยน้ำกลั่นด้วยความไวเป็นเวลา 60 วินาที ทำซ้ำทั้งหมด 2 ครั้ง จากนั้นให้แช่เจลในสารละลายที่มี 50% methanol กับ 12% acetic acid ผสมกันอยู่แช่ไว้เป็นเวลา 15 นาที หรือเขย่าจนเกิดการเปลี่ยนสีของแถบโปรตีน

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของ Separating gel และ Stacking gel

ลำดับ	สารเคมี	12% separating gel	4% stacking gel
1	H ₂ O	3.35 ml	3.18 ml
2	30% Acrylamide/Bis	4 ml	0.5 ml
3	1.5 M Tris-HCl (pH=8.8)	2.5 ml	-
4	0.5 M Tris-HCl (pH=6.8)	-	1.26 μ l
5	10% SDS	100 μ l	50 μ l
6	10% Ammonium persulfate	100 μ l	50 μ l
7	TEMED	10 μ l	10 μ l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

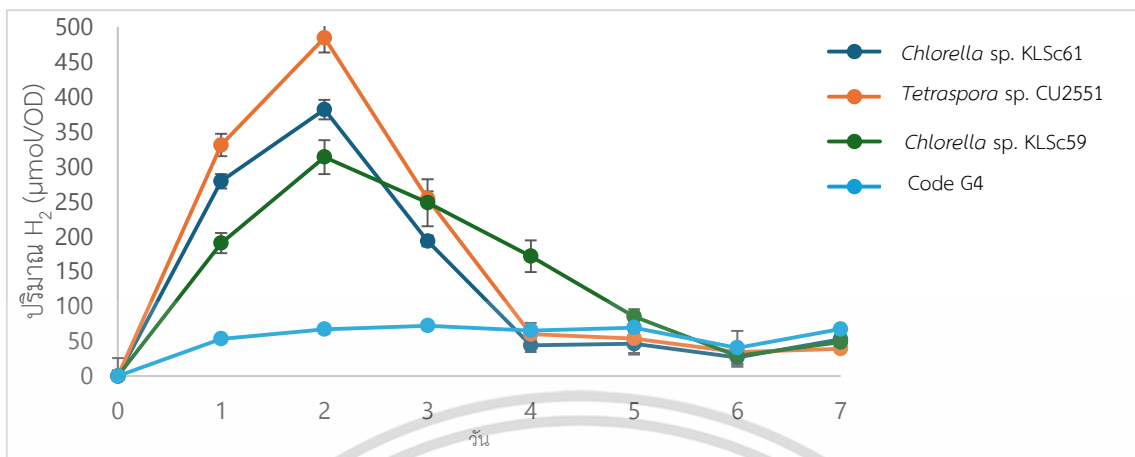
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้ความยาวคลื่นต่างๆ

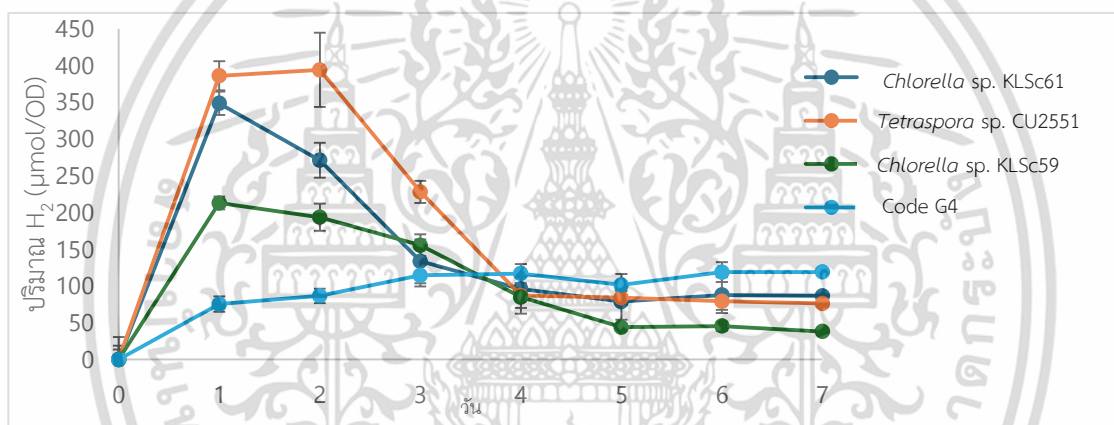
จากการศึกษาการวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย 4 ชนิดโดยที่ควบคุมให้มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 0.1 ที่การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร บ่มภายใต้แสง 4 ชนิด คือ แดง ฟ้าม่วง โดยมีสีขาวเป็นตัวควบคุมแบบบวก ณ อุณหภูมิ 26 ± 1 องศาเซลเซียสที่ความเข้มแสง 290 ลักซ์และเก็บผลทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน

พบว่าจากแสงทั้งหมด 4 สี สาหร่ายทั้ง 4 ชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนขึ้นได้ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Magnuson และคณะ (2020) และของ Wan Mahari และคณะ (2024) กล่าวว่า เมื่อเกิดการสังเคราะห์แสงจะเกิดการกระตุ้นด้วยแสงทำให้เกิดการหลุดของอิเล็กตรอนทั้งจากภายในเซลล์และด้วยการแตกตัวของน้ำ และจะเกิดการขนส่งอิเล็กตรอนไปจนถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายที่ชื่อว่า เฟอริดอกซิน (ferredoxin) ก่อนจะส่งต่อไปให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อทำการผลิตก๊าซไฮโดรเจนขึ้นมา (Magnuson et al., 2020) และยังสามารถใช้แสงจากหลอดไฟ LED เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงได้ (Wan Mahari et al., 2024) โดยที่ *Chlorella* sp. KLSc61 และสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 มีการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด (รูปที่ 4.1-4.4) ซึ่งที่แสงสีแดงนั้นมีปริมาณไฮโดรเจนมากที่สุดจากทุกสีโดยที่สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 และสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 นั้นมีปริมาณไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆนับตั้งแต่วันที่ 0 และมีปริมาณไฮโดรเจนมากที่สุดในวันที่ 2 อยู่ที่ 725.8 และ 698.4 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความเข้มข้นเซลล์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.3) และจะลดลงจนถึงวันที่ 4 หลังจากนั้นจะมีปริมาณไฮโดรเจนคงที่ดังนั้นจึงเลือกนำสาหร่ายทั้งสองชนิดนี้มาศึกษาต่อในสถานะแสงสีแดงต่อไป สาเหตุที่แสงสีแดงส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าแสงสีขาวสันนิษฐานว่าแสงสีขาวนั้นประกอบไปด้วย 7 ช่วงความยาวคลื่นแสงทำให้พลังงานจากการกระตุ้นในกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลงในขณะที่แสงสีแดงมีช่วงความยาวคลื่นแสงเดียวทำให้มีพลังงานกระตุ้นมากกว่าแสงสีขาวในความเข้มแสงเท่าๆกัน

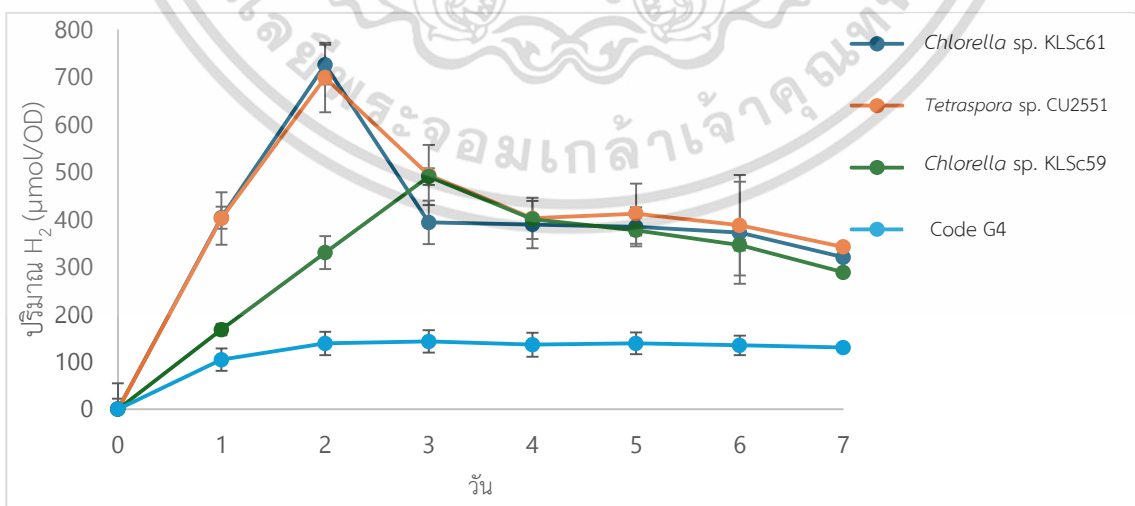
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ใน 7 วัน ภายใต้แสงสีขาว

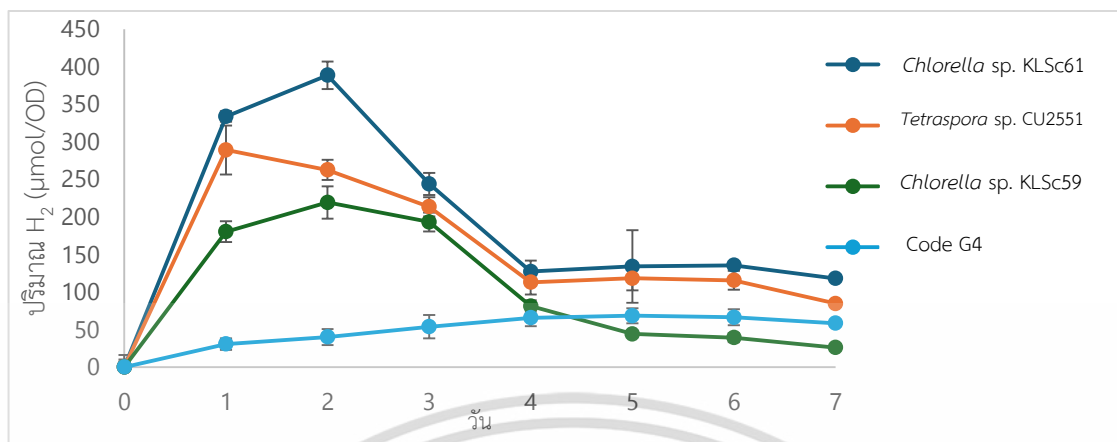


รูปที่ 4.2 กราฟแสดงปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ใน 7 วัน ภายใต้แสงสีน้ำเงิน



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ใน 7 วัน ภายใต้แสงสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

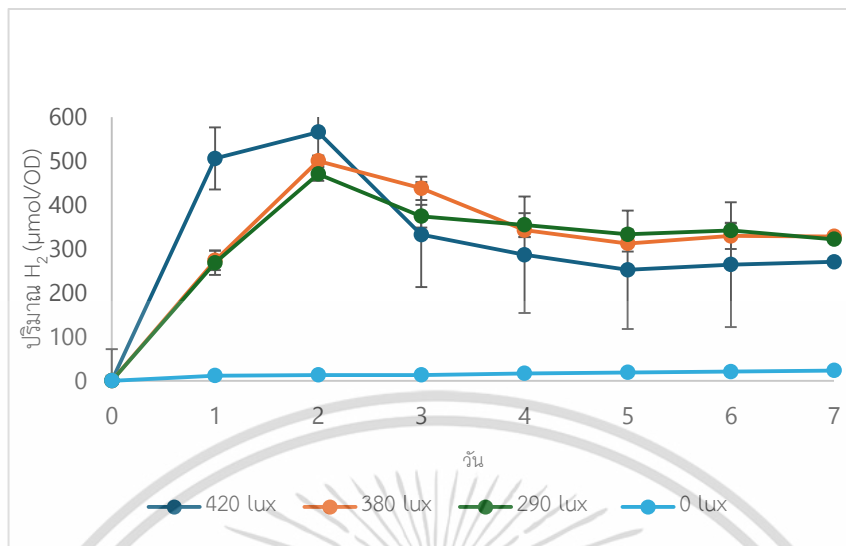


รูปที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ใน 7 วัน ภายใต้แสงสีม่วง

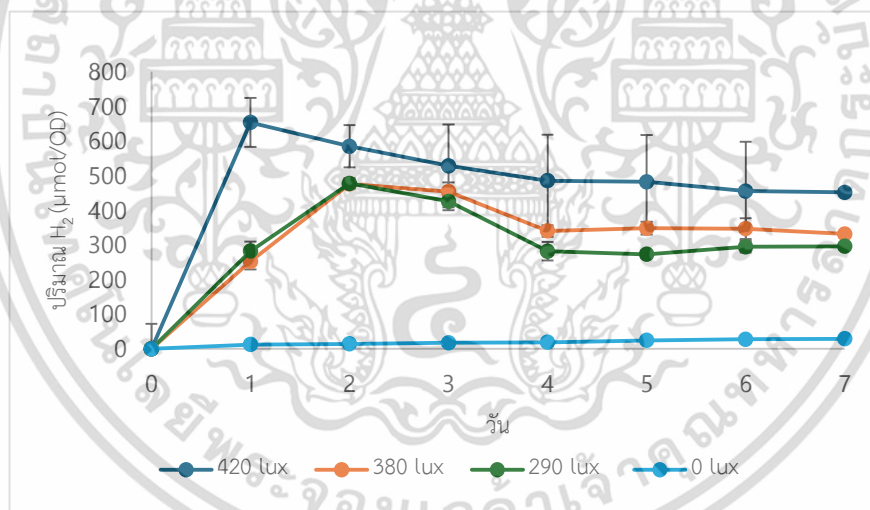
4.2 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากผลการทดลองที่ 4.1 ได้นำสาหร่ายสีเขียว 2 ชนิด คือ *Tetraspora* sp. CU2551 และ สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 มาศึกษาต่อโดยที่เลี้ยงสาหร่ายไว้ในสภาวะแสงสีแดง ณ อุณหภูมิ 26 ± 1 องศาเซลเซียส และมีค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ 0.1 ที่การดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยเลี้ยงไว้ทั้งหมด 4 ความเข้มแสง คือ 420 ลักซ์ 380 ลักซ์ 290 ลักซ์ โดยมี 0 ลักซ์ เป็นตัวควบคุมแบบลบ ทำการเก็บผลทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน พบว่าที่ความเข้มแสง 420 ลักซ์สามารถส่งผลทำให้สาหร่ายทั้งสองชนิดมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด ตามมาด้วย 380 และ 290 ลักซ์ตามลำดับ โดยที่สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 มีปริมาณไฮโดรเจนสูงสุดที่วันที่ 2 อยู่ที่ 566.3 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความขุ่นเซลล์ (รูปที่ 4.5) และจะลดลงจนถึงวันที่ 3 หลังจากนั้นจะมีปริมาณไฮโดรเจนคงที่และสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 มีปริมาณไฮโดรเจนสูงสุดที่วันที่ 2 อยู่ที่ 653.37 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความขุ่นเซลล์ (รูปที่ 4.6) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Gürgan และคณะ (2020) ที่กล่าวว่าเมื่อมีความเข้มแสงมากขึ้น จะเกิดการกระตุ้นในกระบวนการสังเคราะห์แสงให้เกิดการผลิตของอิเล็กตรอนมากขึ้นและเกิดการขนส่งอิเล็กตรอนไปที่ เฟอร์ริดอกซิน และส่งต่อไปให้อนไซม์ไฮโดรจิเนสผลิตไฮโดรเจนมากขึ้นตาม (Gürgan et al., 2020) ในขณะที่ความเข้มแสง 0 ลักซ์นั้นจะมีปริมาณที่ค่อนข้างต่ำโดยที่ *Chlorella* sp. KLSc61 มีปริมาณไฮโดรเจนมากที่สุดอยู่ที่ 23.1 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความขุ่นเซลล์ (รูปที่ 4.5) และสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 มีปริมาณไฮโดรเจนมากที่สุดอยู่ที่ 28.7 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความขุ่นเซลล์สอดคล้องกับการรายงานของ Magnuson และคณะ (2020) เนื่องจากเมื่ออยู่ในสภาวะไร้แสงจะเกิดกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลงอย่างมากเนื่องจากหากไร้แสงมากกระตุ้นจะไม่เกิดผลิตของอิเล็กตรอนภายในเซลล์ ไม่เกิดการขนส่งอิเล็กตรอนและทำให้เอนไซม์ไฮโดรจิเนสไม่สามารถทำงานได้และไม่เกิดก๊าซไฮโดรเจน (Magnuson et al., 2020)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLS61 ใน 7 วันที่ความเข้มแสงต่างๆ

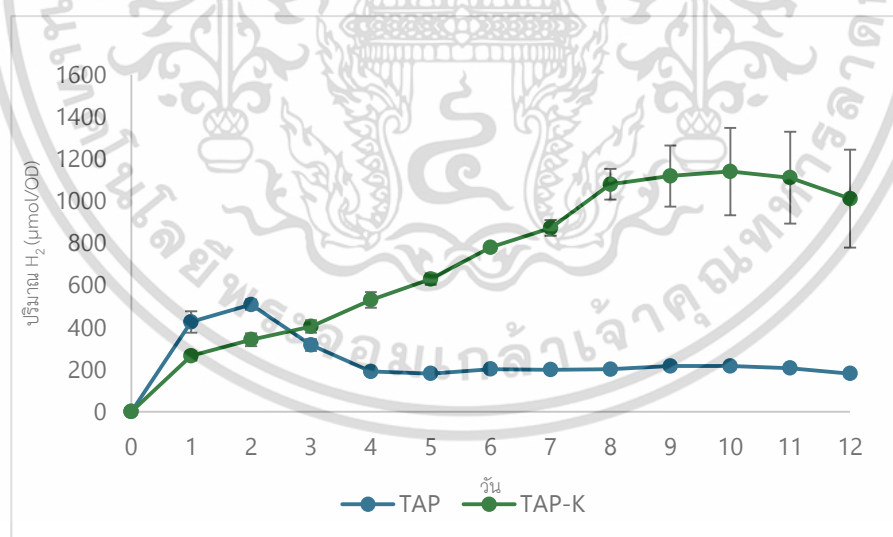


รูปที่ 4.6 กราฟแสดงปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ใน 7 วันที่ความเข้มแสงต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

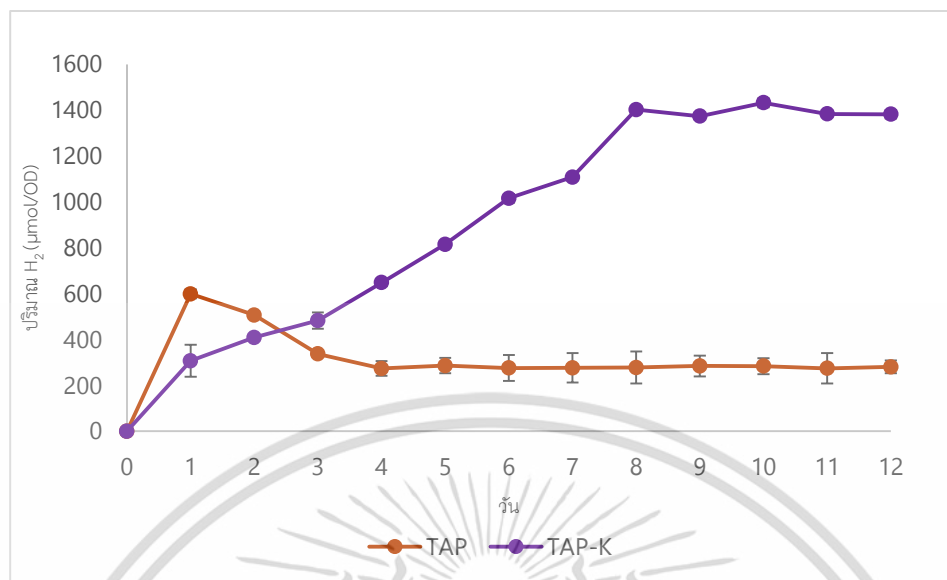
4.3 การศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของสาหร่าย

จากผลการทดลองที่ 4.1 และ การทดลองที่ 4.2 ที่ได้ผู้ทดลองทำการนำสาหร่ายสีเขียว 2 ชนิด คือ *Tetraspora* sp. CU2551 และ สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 มาศึกษาต่อโดยที่เลี้ยงสาหร่ายไว้ภายใต้สภาวะแสงสีแดง ณ อุณหภูมิ 26 ± 1 องศาเซลเซียสและมีค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ 0.1 ที่การดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยเลี้ยงไว้ภายใต้แสงสีแดงที่มีความเข้มแสง 420 ลักซ์ แต่ที่ในการทดลองนี้จะทำการดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากที่เคยใช้ TAP medium จะนำมาทำการเปลี่ยนแปลงเป็นอาหาร TAP medium ที่ขาดธาตุโพแทสเซียมและเติมเอทานอลและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 9 ทำการเก็บผลทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 12 วัน โดยมีสาหร่ายในอาหาร TAP medium เป็นชุดควบคุมแบบบวพบว่าในช่วง 2 วันแรกสาหร่ายในอาหาร TAP medium นั้นมีปริมาณไฮโดรเจนมากกว่าและจะลดลงจนถึงวันที่ขณะที่ในสภาวะอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียมปริมาณไฮโดรเจนจะค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 8 โดยในสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 มีปริมาณไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1,140.0 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความขุ่นเซลล์และในสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 มีปริมาณไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1,432.3 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความขุ่นเซลล์ สอดคล้องกับการรายงานของ Papazi และคณะ (2014) กล่าวว่าเมื่อขาดธาตุโพแทสเซียมจะทำให้เซลล์เกิดความเครียดและเกิดการสลายแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสและนำน้ำตาลกลูโคสเข้ากระบวนการไกลโคไลซิสแล้วเกิด NADH มากขึ้นซึ่งเป็นตัวที่ช่วยขนส่งอิเล็กตรอนไปให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น (Papazi et al., 2014) หลังจากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายทั้ง 2 ชนิดเพื่อทำการหาปริมาณแป้งและหาขนาดโปรตีนต่อไป



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณไฮโดรเจนในอาหารขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

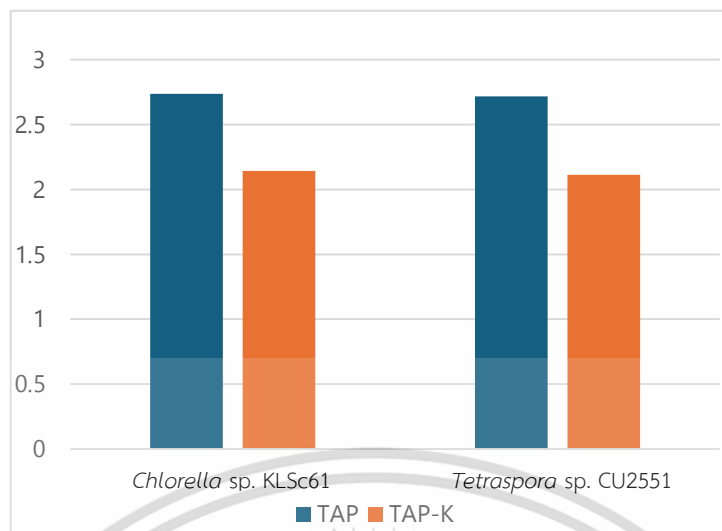


รูปที่ 4.8 กราฟแสดงปริมาณไฮโดรเจนในอาหารขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

4.4 การหาปริมาณแป้งจากสาหร่ายด้วยวิธีการ Anthrone

จากการเก็บเกี่ยวเซลล์ ณ วันที่ 12 ของการทดลองที่ 4.3 มาทำการหาปริมาณแป้งด้วยวิธีการ Anthrone และใช้น้ำแป้งมันสำปะหลังเป็นกราฟมาตรฐานพบว่าปริมาณแป้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 จากชุดควบคุมในอาหาร TAP medium มีปริมาณแป้ง 2.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความเข้มข้นเซลล์ ลดลงเหลือ 2.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความเข้มข้นเซลล์ในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียม ในขณะที่ปริมาณแป้งของ *Tetraspora* sp. CU2551 จากชุดควบคุมในอาหาร TAP medium มีปริมาณแป้ง 2.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความเข้มข้นเซลล์ ลดลงเหลือ 2.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความเข้มข้นเซลล์ในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียม ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Papazi และคณะที่กล่าวว่าในอาหารที่ขาดโพแทสเซียมนั้นจะเกิดการสลายแป้งเพื่อนำไปใช้กระบวนการไกลโคไลซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

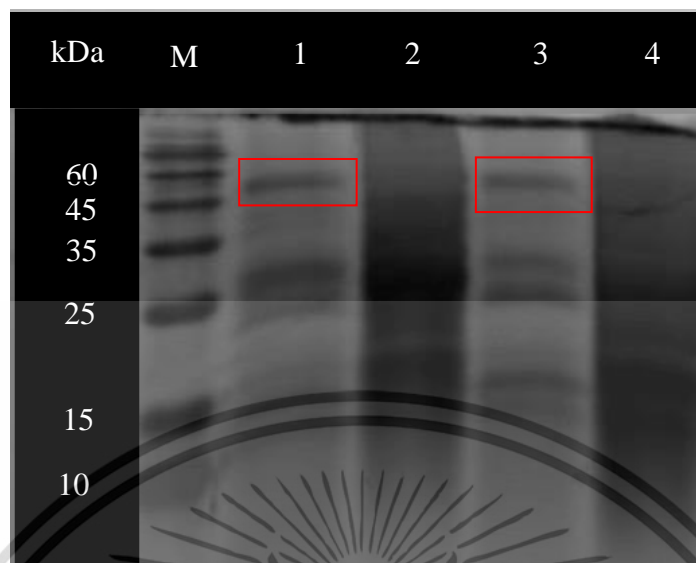


รูปที่ 4.9 กราฟแสดงปริมาณแบ่งของสาหร่าย 2 ชนิด ในอาหาร TAP และ TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม

4.5 การวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย SDS-PAGE

จากตัวอย่างเซลล์ที่ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์จากการทดลองที่ 4.3 มาทำการหาขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าในสภาวะอาหาร TAP-K ของสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดนั้นมีแถบโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปสอดคล้องกับรายงานของ Papazi และคณะ (2020) กล่าวว่า การขาดโพแทสเซียมส่งผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนทำให้โปรตีนที่มีเปลี่ยนแปลงไปจากสภาวะเดิม และหลังจากทำการแยกมวลโมเลกุล (รูปที่ 4.10) ของแถบโปรตีนที่สนใจในกรอบพบว่า แถบดังกล่าวมีมวลโมเลกุลประมาณ 55.67 kDa โดยสันนิษฐานว่าโปรตีนที่หายไปนั้นเป็นตัวยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจากในสภาวะที่ขาดธาตุโพแทสเซียมนั้นส่งผลให้โปรตีนแถบดังกล่าวหายไปแล้วเกิดการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มมากยิ่งขึ้นแต่เนื่องจากเวลาและงบประมาณที่จำกัดจึงไม่สามารถระบุชื่อโปรตีนจากแถบดังกล่าวได้อย่างไรก็ตามหากอยากทราบขนาดของแถบโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปนี้สามารถส่งไปทำ LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ภาพการแยกโปรตีนภายในเซลล์เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในสภาวะอาหาร TAP และ TAP-K ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ; M=Marker, 1=*Chlorella* sp. KLSc61, 2=*Chlorella* sp. KLSc61-K, 3=*Tetraspora* sp. CU2551 และ 4=*Tetraspora* sp. CU2551-K

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

เมื่อนำสาหร่ายทั้ง 4 ชนิดมาเลี้ยงในอาหาร TAP medium จากการทดลองการวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้ความยาวคลื่นต่างๆพบว่าภายใต้สภาวะแสงสีแดงนั้นส่งผลให้สาหร่ายทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดโดยมีสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 และ *Tetraspora* sp. CU2551 ที่มีปริมาณไฮโดรเจนสูงที่สุดจาก 4 ชนิด โดยสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 มีปริมาณไฮโดรเจนมากที่สุดที่ 725.8 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความเข้มข้นเซลล์และสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 มีปริมาณไฮโดรเจนมากที่สุดที่ 698.4 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความเข้มข้นเซลล์และสาหร่าย จากการทดลองการศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนพบว่าที่ความเข้มแสง 420 ลักซ์ ส่งผลให้สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 และ *Tetraspora* sp. CU2551 มีปริมาณในการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดอยู่ที่ 1,140.95 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความเข้มข้นเซลล์ และ 1,432.282 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความเข้มข้นเซลล์ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการทดลองการศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของสาหร่ายพบว่าในการเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP medium ที่ทำการแปลงสูตรอาหารโดยขาดธาตุโพแทสเซียมและเติมเอทานอลพบว่าสามารถส่งผลต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจนอย่างมาก โดยมีปริมาณมากกว่าในอาหาร TAP medium ถึง 2 เท่า หลังจากนั้นทำการทดลองการหาปริมาณแบ่งจากสาหร่ายด้วยวิธีการ Anthrone เนื่องจากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าปริมาณแบ่งในเซลล์จะลดลงในสภาวะอาหารขาดธาตุโพแทสเซียมจึงเลือกทำการทดลองนี้เพื่อศึกษาอิทธิพลของแสงสีแดงนี้พบว่าปริมาณแบ่งของเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 มีปริมาณแบ่งลดลงจาก 2.737718 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความเข้มข้นเซลล์เหลือ 2.253519 มิลลิกรัมต่อและสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 มีปริมาณแบ่ง 2.717852 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความเข้มข้นเซลล์ ลดลงเหลือ 2.113163 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความเข้มข้นเซลล์ และจากการทดลองการวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย SDS-PAGE ด้วยสภาวะอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียม นั้นส่งผลให้มีแถบโปรตีนหายไปโดยแถบโปรตีนที่หายไปนั้นมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 55.694 kDa

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าในการเลี้ยงสาหร่ายไว้ภายใต้สภาวะแสงสีแดงที่ความเข้มแสง 420 ลักซ์และทำการตัดแปลงสูตรอาหารโดยการขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมเติมเอทานอลและปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 9 นั้นส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจริง แต่ไม่สามารถอธิบายได้ว่าเหตุใดถึงมีการลดลงของแบ่งภายในเซลล์และการหายไปของแถบโปรตีนในสภาวะดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Balthasar, W. (1984). Hydrogen production and technology: today, tomorrow and beyond.

International Journal of Hydrogen Energy, 9 (8), 649-668.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0360-3199\(84\)90263-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0360-3199(84)90263-5)

Batyrova K, Tsygankov A, Kosourov S (2012)Sustained hydrogen photoproductio

phosphorus deprived Chlamydomonas reinhardtii cultures. *International*

Journal of Hydrogen Energy 37:8834-8839.

doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.01.068

Edenharter, K., Jaworek, M. W., Engelbrecht, V., Winter, R., & Happe, T. (2024). H₂ production

under stress: [FeFe]-hydrogenases reveal strong stability in high pressure environments.

Biophysical Chemistry, 308, 107217.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bpc.2024.107217>

Gabrielyan L, Hakobyan L, Trchounian A (2017) Characterization of light-dependent

hydrogen production by new green microalga Parachlorella kessleri in

various conditions. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*

175:207-210. doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.09.006

Gaffron H, Ruben J(1942) Fermentative and photochemical production of

hydrogen in algae. *Journal of General Physiology* 26 (2):219-240.

doi:10.1085/jgp.26.2.219

Gattward JN, Almeida A-AF, Souza Jr JO, Gomes FP, Kronzucker HJ (2012) Sodium-

potassium synergism in Theobroma cacao: stimulation of photosynthesis,

water-use efficiency and mineral nutrition. *Physiologia Plantarum* 14 6

(3):350-362.

doi:https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01621.x

Gürkan, M., Koku, H., Eroglu, I., & Yücel, M. (2020). Microarray analysis of high light intensity

stress on hydrogen production metabolism of Rhodobacter capsulatus. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(5), 3516-3523.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.12.205>

Hallenbeck PC, Benemann JR (2002) Biological hydrogen production; fundamentals

and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 27 (11):1185-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ห้ามนำไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1193.

doi:[https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00131-3)

Jolly, W. L. (2020). *Hydrogen*. <https://www.britannica.com/science/hydrogen>

Laokua, N., Rittiyon, N., Kornrawudaphikasama, Y., Klinsalee, R., Tonawut, Y., Preechaphonkul, N., Raksajit, W., Khetkorn, W., Dejtisakdi, W., & Maneeruttanarungroj, C. (2022). Optimal conditions for maximized H₂ yield from a new green algal strain *Chlorella* sp. KLSc61. *Journal of Applied Phycology*, 34 (4), 1909-1919. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02779-y>

Lubitz W, Ogata H (2013) Hydrogenases, Structure and Function. In: Lennarz WJ, Lane MD (eds) *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*. Academic Press, Waltham, pp 562-567.

doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00205-X>

Magnuson, A., Mamedov, F., & Messinger, J. (2020). Toward Sustainable H₂ Production: Linking Hydrogenase with Photosynthesis. *Joule*, 4(6), 1157-1159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.joule.2020.05.014>

M, A., & G, P. K. (2023). Hydrogen towards sustainable transition: A review of production, economic, environmental impact and scaling factors. *Results in Engineering*, 20, 101456. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.101456>

Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M.L., 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.

McKinlay JB, Harwood CS (2010) Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. *Current Opinion in Biotechnology* 21 (3):244-251

Narong Kamolrat, Jessada Phattaralephon and Suphasit Sitthaphanit (2019) Effects of LED light on growth performance of *Chlorella vulgaris*. :559-566

Papazi, A., Gjindali, A.-I., Kastanaki, E., Assimakopoulos, K., Stamatakis, K., & Kotzabasis, K. (2014). Potassium deficiency, a “smart” cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(34), 19452-19464. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.09.096>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Society, N. G. (2024, February 21). *Global Warming*. Retrieved from National Geographic: <https://education.nationalgeographic.org/resource/global-warming/>
- Swanny F, Hemschemeier A, Amandine C, Pruvost J, Legrand J, Happe T, Peltier G, Cournac L (2005) Autotrophic and Mixotrophic Hydrogen Photoproduction in Sulfur-Deprived Chlamydomonas Cells. *Applied and environmental microbiology* 71:6199-6205
doi:10.1128/AEM.71.10.6199-6205.2005
- Troshina, O., Serebryakova, L., Sherwmetieva, M., Lindblad, P. 2002. Production of H₂ by the unicellular Cyanobacterium *gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27:1283-1289
- Wan Mahari, W. A., Wan Razali, W. A., Waiho, K., Wong, K. Y., Foo, S. S., Kamaruzzan, A. S., Derek, C. J. C., Ma, N. L., Chang, J.-S., Dong, C.-D., Chisti, Y., & Lam, S. S. (2024). Light-emitting diodes (LEDs) for culturing microalgae and cyanobacteria. *Chemical Engineering Journal*, 485, 149619. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.149619>
- Winkler, M., Heil, B., Heil, B., Happe, T. 2002. Isolation and molecular characterization of the [Fe]- hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression*. 1576:330-334
- Zhang L, Happe T, Melis A (2002) Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and Hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta* 214 (4):552-561. doi:10.1007/s004250100660

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ ก-1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม)	Stock (มิลลิลิตร)	ปริมาณ (มิลลิลิตร)
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีโนมีเทน (Tris-base)	2.42	100	10
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	0.40		
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	250	25
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.10		
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.05	10	1
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.10		
เกลือโตโซเดียม อีดีทีเอ ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	0.05		
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5.60 มิลลิกรัม		
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.00 มิลลิกรัม		
กรอบอริก (H_3BO_3)	11.40 มิลลิกรัม		
แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	5.52 มิลลิกรัม	10	1
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.16 มิลลิกรัม		
แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1.10 มิลลิกรัม		
โคบอลตคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.16 มิลลิกรัม		
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	-	-	1
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น		1 ลิตร	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม)	Stock (มิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)		
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีโนมีเทน (Tris-base)	2.42	100	10		
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.437	250	25		
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0.05				
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.10				
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	0.89	10	1		
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K ₂ HPO ₄)	0.81				
เกลือไดโซเดียม 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				
โซเดียมโมลิบเดตไฮเดรต (NaMoO ₄ ·2H ₂ O)	2.08 มิลลิกรัม				
โคบอลตคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	0.16 มิลลิกรัม				
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	-			-	1
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น				1 ลิตร	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้