ผลของสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

EFFECT OF REDUCING AGENT ON HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN ALGA *Tetraspora* sp. CU2551

นันทนัท ธรรมเที่ยง
นิชาภัทร วังสิยานนท์
พิมพ์มาดา สิงหรัตน์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

EFFECT OF REDUCING AGENT ON HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN ALGA *Tetraspora* sp. CU2551

T149327

นันทนัท ธรรมเที่ยง
นิชาภัทร วังสิยานนท์
พิมพ์มาดา สิงหรัตน์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....149327
รับ เดือน ปี 12 ก.พ. 2561
b.12881910
l.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF REDUCING AGENT ON HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN ALGA *Tetraspora* sp. CU2551

NUNTANUT THAMTHIANG

NICHAPHAT WANGSIYANON

PIMMADA SINGHARAT

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (ENVIRONMENTAL CHEMISTRY)
DEPARTMENT OF CHEMISTRY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 Effect of Reducing Agent on Hydrogen Production by Green Alga *Tetraspora* sp. CU2551	
ชื่อนักศึกษา	นายนันทนัท ธรรมเที่ยง	รหัสนักศึกษา 56050709
	นางสาวนิชาภัทร วังสิยานนท์	รหัสนักศึกษา 56050712
	นางสาวพิมพ์มาดา สิงหรัตน์	รหัสนักศึกษา 56050733
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)	
ภาควิชา	เคมี	
ปีการศึกษา	2559	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์	

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน ประธานกรรมการ	
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการ	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ผลของสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

ชื่อนักศึกษา นายนันทนัท ธรรมเที่ยง รหัสนักศึกษา 56050709
นางสาวนิชาภัทร วังสิยานนท์ รหัสนักศึกษา 56050712
นางสาวพิมพ์มาดา สิงหรัตน์ รหัสนักศึกษา 56050733

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา เคมี
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2559
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของสารรีดิวซ์ต่อการเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU 2551 โดยสารรีดิวซ์ที่เลือกมี 7 ชนิดได้แก่ ทิน(II)คลอไรด์, โซเดียมไทโอซัลเฟต, โพแทสเซียมไอโอไดด์, กรดออกซาลิก, กรดแอสคอร์บิก, เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล และ ทริส (2-คาร์บอกซีเอทิล)ฟอสฟีน ไฮโดรคลอไรด์ (TCEP) ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ปกติในสารทุกชนิดในช่วงความเข้มข้น 0.01 – 1 mM ผลการผลิตไฮโดรเจนพบว่า โซเดียมไทโอซัลเฟต, กรดออกซาลิก, กรดแอสคอร์บิก และ TCEP จะเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้ ต่อมาได้ทำการแปรความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซ พบว่า ความเข้มข้นของสารทั้งสี่คือ 10 mM, 0.03 mM, 0.10 mM และ 1.0 mM ตามลำดับ ความเข้มข้นดังกล่าวยังเหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเซลล์โดยไม่ให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารเหลว TAP สูตรปกติ ดังนั้นในการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องจึงทดลองในสองวิธีคือ การผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องจากการเลี้ยง (non-adaptation) และการผลิตไฮโดรเจนแบบเปลี่ยนอาหารเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง (adaptation) พบว่า TCEP 1.00 mM และ $Na_2S_2O_3$ 10 mM ให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดในแต่ละวิธี โดยให้ผลผลิตเท่ากับ 10.13 และ 3.12 $\mu molH_2/mg$ DW ตามลำดับ ในภาพรวม สภาวะที่ดีที่สุดจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้ 76% เมื่อเทียบกับอาหาร TAP ที่ไม่ได้เติมสารรีดิวซ์ การศึกษาครั้งนี้จึงได้เปิดโอกาสสำหรับกับการผลิตไฮโดรเจนในระดับใหญ่ขึ้นต่อไป

คำสำคัญ : การผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องจากการเลี้ยง การผลิตไฮโดรเจนแบบเปลี่ยนอาหารเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง สารรีดิวซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Effect of Reducing Agent on Hydrogen Production by Green Alga *Tetraspora* sp. CU2551
Students	Mr. Nuntanut Thamthiang Student ID 56050709
	Miss Nichaphat Wangsiyanon Student ID 56050712
	Miss Pimmada Singharat Student ID 56050733
Degree	Bachelor of Science (Environmental Chemistry)
Department	Chemistry
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2559
Advisor	Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj

Abstract

This project aims to study the effect of reducing agent on hydrogen production from green alga *Tetraspora* sp. CU2551. The seven reducing agents chosen were $SnCl_2$, $Na_2S_2O_3$, KI, Oxalic acid, Ascorbic acid, β-mercaptoethanol and Tris(2-carboxyethyl)phosphine HCl (TCEP). The results revealed that the algae could grow in those chemicals the concentration range of 0.01 – 1 mM. The hydrogen production results showed that $Na_2S_2O_3$, Oxalic acid, Ascorbic acid and TCEP could increase the production rate. The concentrations were further optimized to 10 mM, 0.03 mM, 0.10 mM and 1.0 mM. Those concentrations of each chemical were suitable for cell growing with no significantly different to that in normal TAP medium. Thus, the experiment was further extended to time-course analysis comprising non-adaptation and adaptation techniques. The results found that TCEP 1.00 mM and $Na_2S_2O_3$ 10 mM increase the most production rate. In the overall, the condition with TCEP 1.00 mM showed the highest production rate which enhanced the rate by 76% when compared to the rate from normal TAP medium. Our study enables the opportunities for the production in up-scale.

Keywords : non-adaptation , adaptation , reducing agent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความช่วยเหลือและความร่วมมือของทุกๆ ท่าน ขอขอบพระคุณ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ที่คอยให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษ ขอขอบพระคุณกรรมการและประธานสอบโครงงานพิเศษ คือ ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน และ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ที่ให้ข้อเสนอแนะและข้อคิดเห็นเพื่อนำไปปรับปรุงโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ นางสาวธนาภรณ์ มาศวรรณา นักศึกษาปริญญาโท สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ สาขาวิชาเคมีที่คอยให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ สาขาวิชาเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และเงินทุนในการทำโครงงานพิเศษ

ท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา เพื่อนๆ และบุคคลอื่นๆ ที่ไม่ได้กล่าวมาที่คอยให้กำลังใจและคำปรึกษาที่ดี ผู้จัดทำโครงงานขอขอบพระคุณทุกคนเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

นันทนัท ธรรมเที่ยง
นิชาภัทร วังสิยานนท์
พิมพ์มาดา สิงหรัตน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
คำย่อและสัญลักษณ์ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ไฮโดรเจน 3
2.1.1 คุณสมบัติของไฮโดรเจน 3
2.1.2 แหล่งที่มาของพลังงานไฮโดรเจน 4
2.2 กระบวนการผลิตไบโอไฮโดรเจน 5
2.2.1 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง 5
2.2.2 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม 6
2.3 สาหร่ายสีเขียว 7
2.3.1 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว 7
2.3.2 สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์ 8
2.3.3 ระยะของการเจริญเติบโตของสาหร่าย 8
2.4 การสังเคราะห์แสง 9
2.4.1 การไหลของอิเล็กตรอน 11
2.4.2 Enzymatic Reaction 11
2.5 ปฏิกิริยารีดอกซ์ 12
2.5.1 ตัวออกซิไดซ์และตัวรีดิวซ์ 12
2.5.2 ศักย์ไฟฟ้ามาตรฐาน 13
2.6 เครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี 14
2.6.1 หลักการทำงานของเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี 14
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 20
3.1 สารเคมี 20
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ 21
3.3 การเลือกชนิดรีดิวซ์ 21
3.4 การคัดกรองความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ของสารรีดิวซ์ 7 ชนิด 22
3.5 การวัดปริมาณไฮโดรเจน 22
3.6 การหาผลของความเข้มข้นต่อการผลิตไฮโดรเจน 23
3.7 ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในสารรีดิวซ์ชนิดต่างๆ 24
3.8 ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลา 24
3.8.1 ผลการผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องจากการเลี้ยง (non-adaptation) 24
3.8.2 ผลการผลิตไฮโดรเจนแบบเปลี่ยนอาหารเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง (adaptation) 25
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 26
4.1 ผลการเลือกชนิดสารรีดิวซ์ 26
4.2 ผลการคัดกรองความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ของสารรีดิวซ์ 7 ชนิด 27
4.3 ผลการวัดปริมาณไฮโดรเจน 28
4.4 ผลของความเข้มข้นต่อการผลิตไฮโดรเจน 29
4.5 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายในสารรีดิวซ์ต่างๆ 33
4.6 ผลการผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลา 33
4.6.1 ผลการผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องจากการเลี้ยง (non-adaptation) 33
4.6.2 ผลการผลิตไฮโดรเจนแบบเปลี่ยนอาหารเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง (adaptation) 34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 36
5.1 สรุปผลการวิจัย 36
5.2 ข้อเสนอแนะ 37
เอกสารอ้างอิง 38
ภาคผนวก 40
ภาคผนวก ก วิธีการเลี้ยงสาหร่าย 41
ภาคผนวก ข วิธีการคำนวณ 43
ภาคผนวก ค ผลการคัดกรองความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ของสารรีดิวซ์ 7 ชนิด 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 รงควัตถุที่ปรากฏอยู่ในพืชชนิดต่าง ๆ 10
ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ.... 23
ตารางที่ 4.1 ผลการศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้ารีดักชันมาตรฐาน (ค่า E °) ของสารรีดิวซ์ 7 ชนิด..... 26
ตารางที่ 4.2 ผลการคัดกรองความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ของสารรีดิวซ์ 7 ชนิด
โดยพิจารณาจากสีของอาหาร TAP 27
ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด..... 30
ตารางที่ ค-1 ผลการคัดกรองความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ของสารรีดิวซ์ 7 ชนิด
โดยพิจารณาจากปริมาณตะกอนของสาหร่ายหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน..... 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 ไอโซโทป 3 ชนิด ของไฮโดรเจน 4
รูปที่ 2.2 คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน 4
รูปที่ 2.3 แหล่งพลังงานไฮโดรเจน 5
รูปที่ 2.4 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง 6
รูปที่ 2.5 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม 7
รูปที่ 2.6 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlamydomonas* sp. 7
รูปที่ 2.7 การเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย 9
รูปที่ 2.8 ค่าศักย์ไฟฟ้ารีดักชันมาตรฐานที่ 25°C (298 K) 13
รูปที่ 2.9 ส่วนประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ 15
รูปที่ 4.1 ผลการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีเปลี่ยนอาหารในสารรีดิวซ์ 7 ชนิด 29
รูปที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นของ TCEP ต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีเปลี่ยนอาหาร 31
รูปที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไทโอซัลเฟตต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีเปลี่ยนอาหาร 31
รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีเปลี่ยนอาหาร 32
รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของกรดออกซาลิกต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีเปลี่ยนอาหาร 32
รูปที่ 4.6 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายในสารรีดิวซ์ 4 ชนิดเทียบกับ TAP ปกติ 33
รูปที่ 4.7 ผลการผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลาแบบต่อเนื่องจากการเลี้ยง 34
รูปที่ 4.8 ผลการผลิตไฮโดรเจนแบบเปลี่ยนอาหารเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 35
รูปที่ ข-1 ตัวอย่างการแสดงผลพีคไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
TAP	ทริสอะซิเตตฟอสเฟต
TCEP	ทริส(2-คาร์บอกซีเอทิล)ฟอสฟีน ไฮโดรคลอไรด์
kGy	กิโลเกรย์
mL	มิลลิลิตร
mg	มิลลิกรัม
DTT	ไดไทโอทริอิทอล
mL/g	มิลลิลิตรต่อกรัม
mL/h	มิลลิลิตรต่อชั่วโมง
°C	องศาเซลเซียส
g/L	กรัมต่อลิตร
PSI	ระบบแสง1
PSII	ระบบแสง2
V	โวลต์
µL	ไมโครลิตร
UV	อัลตร้าไวโอเลต
mg/mL	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
mV	มิลลิโวลต์
OD	การวัดค่าการดูดกลืนแสง
OD_{730}	การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร
g	กรัม
mmol C/L	มิลลิโมลคลอไรด์ต่อลิตร
$mmolH_2/mgDW/hr$	มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง
$nmolH_2/mgChl/h$	มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง
mL/L/h	มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง
lux	ลักซ์
rpm	รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากการขยายตัวของภาคเศรษฐกิจ ภาคอุตสาหกรรมและการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรทำให้ความต้องการใช้พลังงานมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น สถานการณ์พลังงานของโลกในปัจจุบันมีความน่าเป็นห่วง เนื่องจากแหล่งพลังงานที่ใช้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล ได้แก่ ถ่านหิน น้ำมันดิบ และก๊าซธรรมชาติ ซึ่งเป็นพลังงานที่มีวันหมดไป พลังงานหมุนเวียน (Renewable Energy) จึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นพลังงานที่สามารถผลิตหรือก่อกำเนิดขึ้นเองได้ สามารถหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ เป็นพลังงานสะอาด และไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

พลังงานหมุนเวียน (Renewable Energy) คือ พลังงานที่ได้จากธรรมชาติ ไม่มีวันหมด สามารถสร้างทดแทนได้ในช่วงเวลาสั้นๆ โดยธรรมชาติหลังจากที่มีการใช้ไป เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานน้ำ พลังงานลม พลังงานไฮโดรเจน พลังงานชีวภาพ เป็นต้น หนึ่งในพลังงานงานที่น่าสนใจ ได้แก่ พลังงานไฮโดรเจน โดยการผลิตไฮโดรเจนมีหลายวิธีด้วยกัน วิธีที่เลือกใช้ในโครงงานพิเศษนี้คือ การผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตโดยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง (direct biophotolysis) เนื่องจากเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูง ต้นทุนต่ำ ใช้พื้นที่น้อย และไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม สิ่งมีชีวิตที่เลือกใช้ในโครงงานพิเศษนี้ ได้แก่ สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียว ถูกพบในภาคกลางของประเทศไทย เป็นสาหร่ายที่มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ (Maneeruttanarungroj. et al., 2010) สาหร่ายสีเขียวผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีทางชีวภาพที่ใช้แสงโดยใช้กลไกของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (ระบบแสง) ในการแยกสลายน้ำแล้วส่งอิเล็กตรอนไปให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (HYD) เพื่อสร้างก๊าซไฮโดรเจนออกมาดังสมการที่ (1)

$$2H^{+} + 2e^{-} \xrightarrow{\text{hydrogenase}} H_2 \qquad (1)$$

จากสมการที่ (1) พบว่าหากจำนวนอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นด้วยจึงใช้สารรีดิวซ์ (reducing agent) ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในการเพิ่มปริมาณผลผลิตไฮโดรเจน ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงได้ถูกจัดทำขึ้นเพื่อศึกษาว่าสารรีดิวซ์ตัวใด ที่ความเข้มข้นใดจะมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณผลผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ในสภาวะที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551
2. เพื่อศึกษาผลของสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551
3. เพื่อศึกษาผลของการผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลาของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. สายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ในการศึกษาคือ *Tetraspora* sp. CU2551 จากภาควิชา ชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถูกนำมาเตรียมและเก็บรักษาเป็นหัวเชื้อ (stock culture) ในอาหารเหลวสูตร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) โดย ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์
2. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas-Chromatography คอลัมน์ Molecular sieve 13X ดีเทคเตอร์ Thermal Conductivity Detector (TCD)
3. วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) โดยการวัดความขุ่นของสารละลายเซลล์ด้วยเครื่อง UV-Visible ที่ความยาวคลื่น 730 nm (OD_{730})

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ทำให้ทราบชนิดและความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่ทำให้สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 เจริญเติบโตได้ดีที่สุด
2. ทำให้ทราบผลของสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551
3. ทำให้ทราบถึงผลของการผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลาของสาหร่าย *Tetraspora* sp.CU2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นองค์ประกอบของน้ำ ที่มีมากที่สุดบนโลก นอกจากนี้ยังเป็นธาตุที่รวมอยู่ในโมเลกุลของสารประกอบอื่นๆ เช่น สารประกอบจำพวกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปิโตรเลียมที่มีความสำคัญสำหรับการพัฒนาทางเศรษฐกิจของประเทศ คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย มีความสะอาดสูง ไม่เป็นพิษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ประโยชน์ของการนำก๊าซไฮโดรเจนมาใช้งานคือ ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการเผาไหม้และให้ความร้อนออกมา หรือใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงโดยปฏิกิริยาทางเคมีแล้วเกิดกระแสไฟฟ้าซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ทั้งในการขับเคลื่อนรถ ผลิตกระแสไฟฟ้า อุปกรณ์อิเล็คทรอนิคส์ขนาดเล็กและอื่นๆ

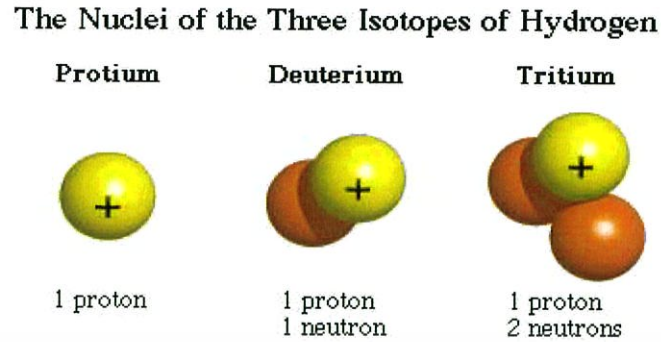
2.1.1 คุณสมบัติของไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นโมเลกุลที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ โดยบรรยากาศในโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ppm มีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุล เท่ากับ 104 กิโลแคลอรีต่อโมล ดังนั้น เมื่อต้องการให้ไฮโดรเจนโมเลกุลทำปฏิกิริยา จึงต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลดังกล่าว เช่น เพิ่มอุณหภูมิ หรือใช้สารเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น ไฮโดรเจนอะตอมประกอบด้วยนิวเคลียสอยู่กลาง ภายในนิวเคลียส ประกอบด้วยโปรตอนและนิวตรอน และมีอิเล็กตรอนวิ่งรอบนอกเหมือนธาตุอื่นๆ ไฮโดรเจนมี 3 ไอโซโทป ขึ้นกับจำนวนโปรตอนและจำนวนนิวตรอนที่ต่างกัน ดังนี้

1. โปรเตียม มีจำนวนโปรตอน 1 โปรตอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 1.0078
2. ดิวเทอเรียม (Deuterium) มีจำนวนโปรตอน 1 โปรตอน จำนวนนิวตรอน 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 2.0141
3. ตริเที่ยม (Tritium) มีจำนวนโปรตอน 1 โปรตอน จำนวนนิวตรอน 2 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 3.0161

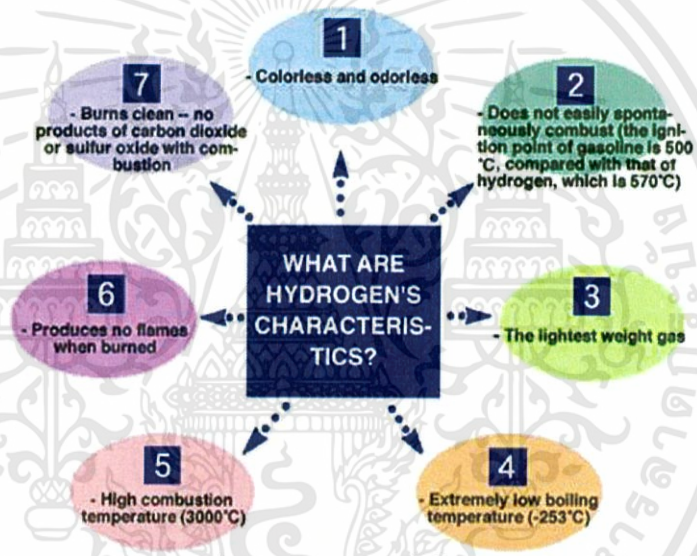
ลักษณะทั่วไปของไฮโดรเจนทั้ง 3 สถานะ คือ ไฮโดรเจนที่เป็นของแข็งจะไม่มีสี มีโครงสร้างผลึก 6 เหลี่ยม ปริมาตรต่อโมล (Molar Volume) เท่ากับ 2.56 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อโมล ส่วนไฮโดรเจนที่เป็นของเหลวจะไม่มีสีมีค่าความหนืด (Viscosity) ต่ำ เคลื่อนที่ได้เร็ว ขณะที่ไฮโดรเจนที่เป็นก๊าซจะไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นพิษ ก๊าซไฮโดรเจน 1 ลิตร มีมวล 0.0898 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ไอโซโทป 3 ชนิด ของไฮโดรเจน

ที่มา : http://www.tint.or.th/nkc/nkc5002/nkc5002a.html



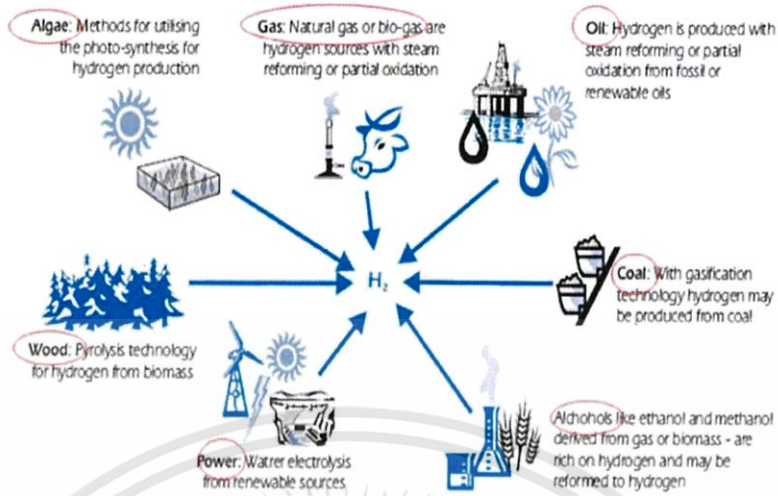
รูปที่ 2.2 คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน

ที่มา : http://www.enaa.or.jp/WE-NET/suiso/suiso1_e.html

2.1.2 แหล่งที่มาของพลังงานไฮโดรเจน

ปัจจุบันการผลิตไฮโดรเจนเมื่อพิจารณา จากวัตถุดิบเป็นหลักแบ่งออกเป็น 3 แหล่งหลัก คือ จากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น แก๊สธรรมชาติ ถ่านหิน น้ำมันปิโตรเลียม จากแหล่งพลังงานหมุนเวียน เช่น ชีวมวล และน้ำ เป็นต้น และจากพลังงานนิวเคลียร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แหล่งพลังงานไฮโดรเจน
ที่มา : Hydrogen Production and Storage IEA,2006

2.2 กระบวนการผลิตไบโอไฮโดรเจน

กระบวนการผลิตไบโอไฮโดรเจนที่ใช้แสงแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการหลัก

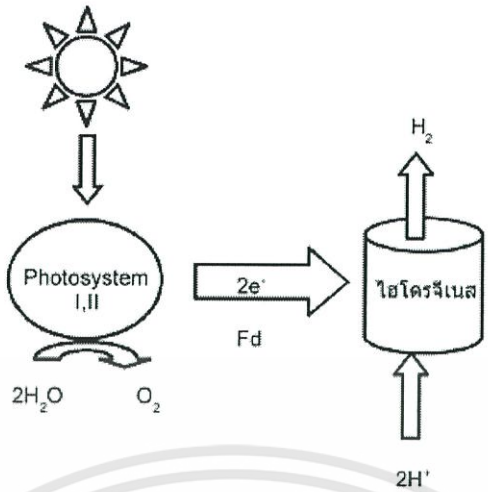
2.2.1 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง (direct biophotolysis)

กระบวนการผลิตไบโอไฮโดรเจนที่ใช้แสงด้วยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงเป็นกระบวนการที่ใช้ระบบแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เช่น สาหร่ายสีเขียว (green algae) เพื่อแยกน้ำโดยการดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์โดยตรงให้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนด้วยอัตราส่วน 2:1 ดังสมการที่ (2.1) (Ni et al., 2006)

$$H_2O \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} 2H_2 + O_2 \qquad (2.1)$$

ระบบแสงที่สอง (photosystem II, PSII) ดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์ทำให้น้ำแตกตัวเป็นออกซิเจน โปรตรอน (H^+) และอิเล็กตรอน (e^-) จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังเฟอร์รีดอกซิน (Fd) โดยพลังงานแสงอาทิตย์ที่ถูกดูดซับโดยระบบแสงที่หนึ่ง (photosystem I, PSI) เฟอร์รีดอกซินที่ถูกรีดิวซ์จะส่งอิเล็กตรอนให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อสร้างไฮโดรเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง
ที่มา : home.kku.ac.th/uac/journal/year_18_3-4_2553/3.pdf

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

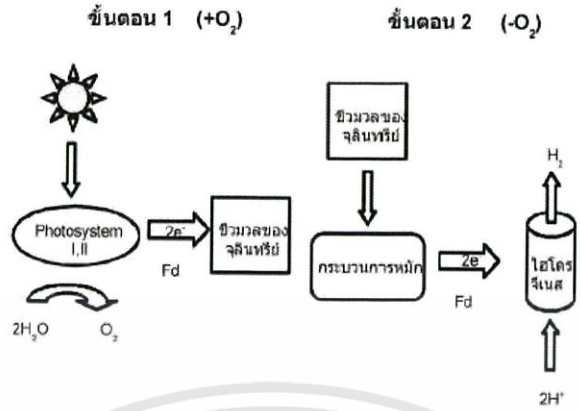
2.2.2 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม (indirect biophotolysis)

กระบวนการผลิตไบโอไฮโดรเจนที่ใช้แสงด้วยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อมจะพบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) ซึ่งมีคุณสมบัติในการใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนที่แยกออกจากกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.5 การผลิตไฮโดรเจนแบบนี้จะสามารถแก้ปัญหาเนื่องจากออกซิเจนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ผลิตไฮโดรเจน เพราะกระบวนการสร้างออกซิเจนและไฮโดรเจนเกิดแยกกันโดยในขั้นตอนแรกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะใช้พลังงานแสงผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงที่หนึ่งและสองร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตเก็บสะสมเป็นชีวมวลของสาหร่าย ดังสมการที่ (2.2) และในขั้นตอนที่สอง ชีวมวลของสาหร่ายจะถูกนำไปใช้ในการสร้างไฮโดรเจนดังสมการที่ (2.3) (Levin et al., 2004)

$$12H_2O + 6CO_2 \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \qquad (2.2)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 12H_2O \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} 12H_2 + 6CO_2 \qquad (2.3)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม
ที่มา : home.kku.ac.th/uac/journal/year_18_3-4_2553/3.pdf

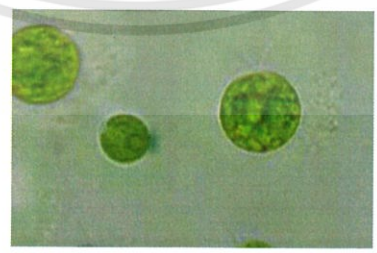
สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำโดยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อมได้ เช่น *Gloeocapsa alpicola* (Troshina et al., 2002)

2.3 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (green algae) จัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (eukaryote) อยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (chlorophyta) พบทั้งในน้ำจืด น้ำทะเล น้ำกร่อย และที่ชื้นแฉะ สาหร่ายสีเขียวบางชนิดเป็นอิสระลอยอยู่ตามผิวน้ำ มีรูปร่างลักษณะมากมาย มีทั้ง เซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ต่อกันเป็นสายยาวหรือรวมกันเป็นกลุ่ม มีทั้งเคลื่อนที่ได้ และเคลื่อนที่ไม่ได้ สาหร่ายสีเขียวสามารถจัดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

2.3.1 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว

สาหร่ายกลุ่มนี้สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลัมที่ใช้ในการโบกพัดจำนวน 2-4 เส้น ตัวอย่างเช่น *Chlamydomonas* sp. เป็นต้น สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวบางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้โดยไม่มีแฟลกเจลลัม เช่น *Chlorella* sp., *Chlorococcoum* sp. เป็นต้น



รูปที่ 2.6 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlamydomonas* sp.
ที่มา : https://kingdomprotista00.wordpress.com/algae/species-4-chlamydomonas/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์

สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์มีทั้งชนิดที่ต่อกันเป็นสายยาว ได้แก่ *Ulothrix* sp., *Spirogyra* sp. เป็นต้น และที่อยู่เป็นกลุ่ม ได้แก่ *Volvox* sp., *Scenedesmus* sp. เป็นต้น

สาหร่ายสีเขียวมีรงควัตถุที่พบเช่นเดียวกับรงควัตถุที่พบในพืชชั้นสูง คือ มีคลอโรฟิลล์ เอ และบี แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ รงควัตถุทั้งหมดนี้จะรวมกันอยู่ในเม็ดสีหรือพลาสติด (Plastid) ที่อยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่าคลอโรพลาสต์ โดยอาจจะมี 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 อัน ซึ่งทำให้สามารถสังเคราะห์แสงได้เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง สาหร่ายสีเขียวมีการสืบพันธุ์ได้ทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีการรวมกันของแกมีตซึ่งมีทั้งแบบ Isogamy, Anisogamy และ Oogamy ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีทั้งการแบ่งเซลล์ การสร้างสปอร์ และการสร้าง Akinete

2.3.3 ระยะของการเจริญเติบโตของสาหร่าย

เมื่อนำเซลล์สาหร่าย (ธวัชชัย, 2547) จำนวนหนึ่ง ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลวแล้วจัดสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจน ให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จะพบว่าเซลล์สาหร่ายมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น รูปแบบของการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายจะเป็นไป ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ซึ่งแบ่งเป็นระยะต่างๆ ได้ 4 ระยะ ดังนี้

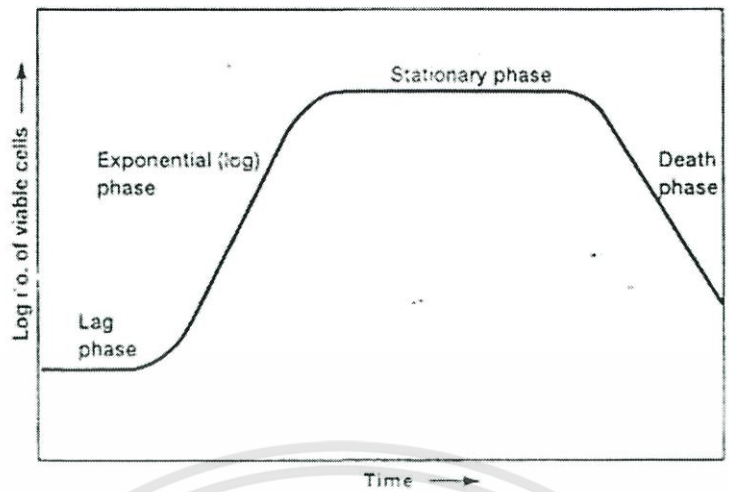
1. Lag phase (ระยะพัก) เป็นระยะแรกที่เซลล์สาหร่าย เริ่มพบกับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ จะปรับตัวให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมนั้นมีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสมที่จะใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อมีการสร้างโปรตีน และส่วนประกอบอื่นๆ ที่สำคัญของเซลล์ ตอนระยะท้ายๆ ของระยะนี้ เซลล์อาจจะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อยและพร้อมที่จะแบ่งตัวระยะ lag นี้อาจจะยาวนานแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. Exponential หรือ log phase (ระยะแบ่งตัวทวีคูณ) เป็นระยะที่เซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด มีอัตราการแบ่งตัวคงที่ ส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์ และขบวนการต่างๆ ตลอดจนคุณสมบัติทางสรีรวิทยา เป็นแบบเดียวกัน

3. Stationary phase (ระยะคงจำนวนเซลล์) เป็นระยะที่เซลล์มีจำนวนคงที่ ซึ่งแสดงว่าเซลล์สาหร่ายไม่มีการเพิ่มจานวนอีก หรือคืออัตราเกิดเท่ากับอัตราตาย การที่เซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตแล้วเข้าสู่ระยะ Stationary นี้เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้จะหมดลง จึงเจริญช้าลง นอกจากนี้ ของเสียที่เซลล์สาหร่ายสร้างขึ้นยังยับยั้งการเจริญเติบโตด้วย

4. Death phase หรือ decline phase (ระยะเซลล์ตาย) เป็นระยะสุดท้าย เซลล์สาหร่ายที่มีอยู่จะตายลงมากกว่าเซลล์สาหร่ายที่เพิ่มจำนวนขึ้น ทั้งนี้ เป็นเพราะอาหารอาจหมด มีสารพิษสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 การเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย
ที่มา : ธวัชชัย, 2547

2.4 การสังเคราะห์แสง

การสังเคราะห์แสง คือ กระบวนการซึ่งพืชสังเคราะห์สารอินทรีย์จากสารประกอบอนินทรีย์ โดยมีแสงปรากฏอยู่ด้วย สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและรักษาสภาพเดิมให้คงอยู่ สาหร่าย พืชชั้นสูง และแบคทีเรียบางชนิดสามารถรับพลังงานโดยตรงจากแสงอาทิตย์ และใช้พลังงานนี้ในการสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ แต่สัตว์ไม่สามารถรับพลังงานโดยตรงจากแสงอาทิตย์ ต้องรับพลังงานโดยการบริโภคพืชและสัตว์อื่น ดังนั้นแหล่งของพลังงานทางเมตาบอลิสม์ในโลกคือ ดวงอาทิตย์และกระบวนการสังเคราะห์แสง จึงจำเป็นสำหรับชีวิตบนโลก

การที่พืชรับพลังงานแสงจากดวงอาทิตย์ได้โดยตรงนี้ พืชต้องมีกลไกพิเศษคือ มีรงควัตถุ (Pigment) สีเขียว ซึ่งเรียกว่า คลอโรฟิลล์ (Chlorophylls) ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวน Pyrrole 4 วง เรียงติดกัน มี Mg อยู่ตรงกลาง ซึ่งเป็นส่วนที่ดูดแสงเรียกว่า Head ส่วน Tail คือ Phytol ซึ่งคลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุที่ปรากฏอยู่ในคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่ในการจับพลังงานจากแสง นอกจากคลอโรฟิลล์แล้วรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงยังมีคาโรทีนอยด์ (Carotenoids) และไฟโคบิลินส์ (Phycobilins) สิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงได้จะมีรงควัตถุหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิด รงควัตถุเหล่านี้แสดงอยู่ในตารางที่ 2.1

คลอโรฟิลล์ เอ นั้นจัดว่าเป็น primary pigment ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงโดยตรง ส่วนรงควัตถุชนิดอื่นๆ ต้องรับแสงแล้วจึงส่งต่อให้คลอโรฟิลล์ เอ เรียกว่าเป็น Accessory pigment ในพืชชั้นสูงทั่วๆ ไปจะมีคลอโรฟิลล์ เอ มากกว่าคลอโรฟิลล์ บี ประมาณ 2-3 เท่า ส่วนแบคทีเรียบางชนิด เช่น Green bacteria และ Purple bacteria จะมีรงควัตถุซึ่งเรียกว่า Bacteriochlorophyll ซึ่งปรากฏอยู่ในไธลาคอยด์ การสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียจะต่างจากการสังเคราะห์แสงของพืชชั้นสูง เพราะไม่ได้ใช้น้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและโปรตอน แต่ใช้ H_2S แทน และเมื่อสิ้นสุดการสังเคราะห์แสงจะไม่ได้ก๊าซออกซิเจนออกมา แต่จะได้สารอื่น เช่น กำมะถันแทน

ตารางที่ 2.1 รงควัตถุที่ปรากฏอยู่ในพืชชนิดต่าง ๆ

ชนิดของรงควัตถุ	ช่วงแสงที่ดูดกลืนแสง (nm)	ชนิดของพืช
คลอโรฟิลล์		
คลอโรฟิลล์ เอ	420, 660	พืชชั้นสูงทุกชนิดและสาหร่าย
คลอโรฟิลล์ บี	435, 643	พืชชั้นสูงทุกชนิดและสาหร่ายสีเขียว
คลอโรฟิลล์ ซี	445, 625	ไดอะตอมและสาหร่ายสีน้ำตาล
คลอโรฟิลล์ ดี	450, 690	สาหร่ายสีแดง
คาร์โรทีนอยด์		
เบตา คาร์โรทีน	425, 450, 480	พืชชั้นสูงและสาหร่ายส่วนใหญ่
แอลฟา คาร์โรทีน	420, 440, 470	พืชส่วนใหญ่และสาหร่ายบางชนิด
ลูตีออล (Luteol)	425, 445, 475	สาหร่ายสีเขียว สีแดงและพืชชั้นสูง
ไวโอลาแซนธอล (Violaxanthol)	425, 450, 475	พืชชั้นสูง
แกมมา คาร์โรทีน	-	แบคทีเรีย
ฟูโคแซนธอล (Fucoxanthol)	425, 450, 475	ไดอะตอมและสาหร่ายสีน้ำตาล
ไฟโคบิลินส์		
ไฟโคอีรีธรินส์ (Phycoerythrins)	490, 546, 576	สาหร่ายสีแดง และสาหร่ายสีน้ำเงิน
ไฟโคไซยานินส์ (Phycocyanins)	618	สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว และสาหร่ายสีแดงบางชนิด

ที่มา : http://web.agri.cmu.ac.th/hort/course/359311/PPHY4_photosyn.htm

รงควัตถุ จะกระจายอยู่ในส่วนของลาเมลลาของคลอโรพลาสต์ นอกจากนั้นในคลอโรพลาสต์ยังมีโปรตีน ไขมัน และควิโนน อีกหลายชนิดกระจายตัวอยู่ เช่น ไซโตโครม บี 6 (Cytochrome b6) และไซโตโครม เอฟ (Cytochrome f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีทองแดงประกอบอยู่ด้วยเฟอร์ริดอกซิน (Ferredoxin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีเหล็กประกอบอยู่ด้วยและเป็น non heme โลหะพบในลาเมลลา คือ สังกะสี เหล็ก และแมกนีเซียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสังเคราะห์แสง เป็นกระบวนการซึ่งประกอบด้วยกระบวนการสองกระบวนการใหญ่ๆ คือ

2.4.1 การไหลของอิเล็กตรอน

การไหลของอิเล็กตรอน หรือ Light Reaction ซึ่งแบ่งเป็น

1. Hill Reaction ซึ่งคือ การแตกตัวของน้ำโดยพลังงานแสง พบโดย Robert Hill เมื่อน้ำแตกตัวแล้วจะให้อิเล็กตรอนออกมา ซึ่งตามธรรมชาติของการสังเคราะห์แสงตัวรับอิเล็กตรอนคือ $NADP^+$ ทำให้กลายเป็น NADPH ซึ่งเป็นสารที่มีศักยภาพในการรีดิวซ์สารอื่นสูงมาก และจะนำไปใช้รีดิวซ์ CO_2 ในกระบวนการต่อไป

การที่น้ำแตกตัวเป็นออกซิเจนได้นี้ เกิดโดยพลังงานแสงที่คลอโรฟิลล์ดูดแล้วส่งไปช่วยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่แยกโมเลกุลของน้ำ (Water Splitting enzyme) ให้เกิดปฏิกิริยาได้อิเล็กตรอนและก๊าซออกซิเจนนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแตกตัวของน้ำคือโปรตอน ซึ่งจะใช้เป็นตัวพาอิเล็กตรอนและนำไปสร้างสารให้พลังงานสูง NADPH นอกจากนั้นอิเล็กตรอนยังถูกส่งเข้าไปทดแทนอิเล็กตรอนของคลอโรฟิลล์ซึ่งสูญเสียไปในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนดังจะได้กล่าวถึงต่อไป

2. Photophosphorylation คือ การสังเคราะห์สารเคมีที่ให้พลังงานสูง ATP จากการไหลของอิเล็กตรอนจากน้ำไปสู่ $NADP^+$ ซึ่ง $NADP^+$ ไม่สามารถรับอิเล็กตรอนได้โดยตรง ต้องไหลผ่านสารอื่นๆ หลายชนิด ในระหว่างการไหลนี้ทำให้เกิด ATP ขึ้นมา

2.4.2 Enzymatic Reaction

เกิดในสโตรมาเป็นกระบวนการที่เปลี่ยน CO_2 ให้เป็นน้ำตาลสามารถเกิดได้ในที่มืดและที่มีแสง เนื่องจากแสงมีลักษณะเป็นคลื่นและมีพลังงาน แสงจะมาในลักษณะเป็นควอนตา (Quanta) หรือโฟตอน (Photon) ซึ่งเป็นพลังงาน พลังงานแต่ละโฟตอนจะเป็นสัดส่วนผกผันกับความยาวคลื่นแสง ดังนั้นแสงสีม่วงและน้ำเงิน จะมีพลังงานมากกว่าแสงสีแดงและสีส้ม

หลักพื้นฐานของการดูดซับแสง เรียกว่า Einstein's Law ซึ่งกล่าวว่า รงควัตถุใดๆ สามารถดูดซับแสงได้ทีละหนึ่งโฟตอน และหนึ่งโฟตอนนี้จะทำให้เกิดการ Excitation ของอิเล็กตรอนหนึ่งอิเล็กตรอนซึ่งอิเล็กตรอนที่หมุนอยู่รอบๆ นิวเคลียสในสภาพ Ground State นั่นเอง อิเล็กตรอนในสภาพ Excitation นี้สามารถหลุดออกไปจากนิวเคลียสได้ รงควัตถุที่มีอิเล็กตรอนในสภาพ Excitation นั้นถือว่าอยู่ในสภาพ Excited State

คลอโรฟิลล์และรงควัตถุอื่นๆ อาจจะคงอยู่ในสภาพ Excited State เป็นระยะเวลาสั้นๆ ประมาณ 10-9 ของหนึ่งวินาที พลังงานที่ได้จากการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอน อาจจะเสียไปในรูปของความร้อนเมื่ออิเล็กตรอนกลับเข้าสู่ Ground State ซึ่งเกิดในกรณีที่คลอโรฟิลล์ได้รับแสงสีน้ำเงิน ดังนั้นแสงสีน้ำเงินจึงใช้ในการสังเคราะห์แสงไม่ได้ ดังเหตุผลข้างต้น แต่ถ้าคลอโรฟิลล์ได้รับแสงสีแดง จะทำให้คลอโรฟิลล์ อยู่ในสภาพ Excited แล้วอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ไปถึงจุดศูนย์กลางของปฏิกิริยาซึ่งจุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศูนย์กลางของปฏิกิริยานี้อยู่ในไธลาคอยส์ (Thylakoids) ของคลอโรพลาสต์มีรงควัตถุที่เป็นคลอโรฟิลล์ เอ รวมกับโปรตีนบางชนิด แสงสีเขียวนั้นคลอโรฟิลล์ไม่ได้ดูดซับเอาไว้จะสะท้อนออกมาหรือผ่านไป ส่วนคาร์โรทีนอยด์จะดูดซับแสงสีน้ำเงินและม่วงและสะท้อนแสงสีเหลืองและแดงทำให้เห็นเป็นสีเหลือง

2.5 ปฏิกิริยารีดอกซ์

ปฏิกิริยารีดอกซ์ เป็นกระบวนการเผาไหม้ การเกิดสนิมและการหายใจ เดิมหมายถึง ปฏิกิริยาที่มีการเกี่ยวข้องกับออกซิเจนและไฮโดรเจน ปัจจุบันหมายถึง ปฏิกิริยาที่มีการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเกิดเป็นพลังงานทางเคมี แล้วปล่อยออกมาในรูปพลังงานไฟฟ้า ซึ่งพบในเซลล์ถ่านไฟฉาย แบตเตอรี่รถยนต์

Redox มาจากคำว่า Reduction + Oxidation

ปฏิกิริยา Reduction (รีดักชัน) หมายถึง ปฏิกิริยาที่มีการรับอิเล็กตรอน

ปฏิกิริยา Oxidation (ออกซิเดชัน) หมายถึง ปฏิกิริยาที่มีการให้อิเล็กตรอน

ดังนั้น ปฏิกิริยารีดอกซ์ (รีดักชัน + ออกซิเดชัน) จึงหมายถึง ปฏิกิริยาที่มีการให้และรับอิเล็กตรอน หรือปฏิกิริยาที่มีการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังอีกสารหนึ่ง

ปฏิกิริยาเคมีแบ่งโดยการใช้การถ่ายโอนอิเล็กตรอนเป็นเกณฑ์มี 2 ชนิด คือ

1. ปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox reaction) ปฏิกิริยารีดอกซ์ หรือปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน คือ ปฏิกิริยาที่มีการถ่ายโอนอิเล็กตรอน หรือเป็นปฏิกิริยาที่มีการให้และรับอิเล็กตรอน

2. ปฏิกิริยานอนรีดอกซ์ (Non-redox reaction) คือ ปฏิกิริยาที่ไม่มีการถ่ายโอนอิเล็กตรอนหรือเป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีการให้และรับอิเล็กตรอนในปฏิกิริยานั้น

2.5.1 ตัวออกซิไดซ์และตัวรีดิวซ์

ปฏิกิริยารีดอกซ์ หรือปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน เป็นปฏิกิริยาที่มีการถ่ายโอนอิเล็กตรอนหรือเป็นปฏิกิริยาที่มีเลขออกซิเดชันของธาตุเปลี่ยนแปลง ซึ่งเขียนแยกเป็นสองส่วนได้ และแต่ละส่วนของปฏิกิริยามีชื่อเรียกแตกต่างกัน ซึ่งประกอบด้วย 2 ปฏิกิริยาดังนี้

1. ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation Reaction) คือ ปฏิกิริยาที่มีการให้อิเล็กตรอนเกิดขึ้น โดยเรียกสารที่ให้อิเล็กตรอนว่า ตัวรีดิวซ์ (Reducer หรือ Reducing agent)

2. ปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction reaction) คือ ปฏิกิริยาที่มีการรับอิเล็กตรอนเกิดขึ้น โดยเรียกสารที่รับอิเล็กตรอนว่า ตัวออกซิไดส์ (Oxidizing agent)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 ศักย์ไฟฟ้ามาตรฐาน (E°)

ครึ่งเซลล์มาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบความสามารถในการให้รับอิเล็กตรอนของครึ่งเซลล์ต่างๆ จะใช้ครึ่งเซลล์ไฮโดรเจนเขียนแทนด้วย Pt (s) | H_2 (1atm) | H^+ (1M) และกำหนดให้ค่าศักย์ไฟฟ้าของไฮโดรเจนที่สภาวะมาตรฐาน (25°C, 1 atm) มีค่าเท่ากับศูนย์โวลต์

$$E° H_2 = 0.00 \text{ Volt}$$

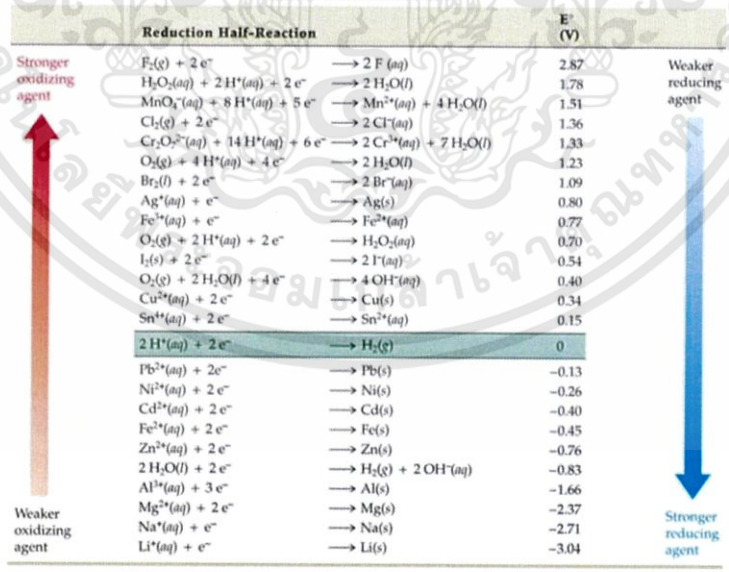
การวัดค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐาน ของเซลล์ไฟฟ้าใดๆ ทำได้โดยการนำครึ่งเซลล์มาตรฐานไฮโดรเจนต่อกับครึ่งเซลล์ที่สนใจ และขั้วไฟฟ้าจะต้องจุ่มอยู่ในสารละลายเข้มข้น 1 Molarโดย

$$E° \text{ Cell} = E° \text{ แคโทด} - E° \text{ อาโนด}$$

ข้อควรทราบเกี่ยวกับค่า E°

1. ถ้ามีการกลับสมการ ค่า E° จะเท่าเดิม แต่เครื่องหมายตรงกันข้าม
2. ถ้ามีการคูณสมการด้วยตัวเลขใดๆ ค่า E° จะเท่าเดิม ไม่เปลี่ยนแปลง
3. ค่า E° reduction ยิ่งมาก แสดงว่าสารนั้นยิ่งรับอิเล็กตรอนได้ดี (แนวโน้มความเป็นตัวออกซิไดซ์มากขึ้น) ค่า E° reduction ยิ่งต่ำ แสดงว่าสารนั้นยิ่งให้อิเล็กตรอนได้ดี (แนวโน้มความเป็นตัวรีดิวซ์มากขึ้น)

โดยทั่วไปเมื่อกล่าวถึง E° หากไม่มีการระบุว่าเป็น E° reduction หรือ E° oxidation ให้ถือว่าเป็น E° reduction ค่าศักย์ไฟฟ้ารีดักชันมาตรฐานที่ 25°C (298 K) แสดงอยู่ในรูปที่ 2.6



Reduction Half-Reaction		E° (V)	
Stronger oxidizing agent			Weaker reducing agent
$F_2(g) + 2e^-$	$\longrightarrow 2F^-(aq)$	2.87	
$H_2O_2(aq) + 2H^+(aq) + 2e^-$	$\longrightarrow 2H_2O(l)$	1.78	
$MnO_4^-(aq) + 8H^+(aq) + 5e^-$	$\longrightarrow Mn^{2+}(aq) + 4H_2O(l)$	1.51	
$Cl_2(g) + 2e^-$	$\longrightarrow 2Cl^-(aq)$	1.36	
$Cr_2O_7^{2-}(aq) + 14H^+(aq) + 6e^-$	$\longrightarrow 2Cr^{3+}(aq) + 7H_2O(l)$	1.33	
$O_2(g) + 4H^+(aq) + 4e^-$	$\longrightarrow 2H_2O(l)$	1.23	
$Br_2(l) + 2e^-$	$\longrightarrow 2Br^-(aq)$	1.09	
$Ag^+(aq) + e^-$	$\longrightarrow Ag(s)$	0.80	
$Fe^{3+}(aq) + e^-$	$\longrightarrow Fe^{2+}(aq)$	0.77	
$O_2(g) + 2H^+(aq) + 2e^-$	$\longrightarrow H_2O_2(aq)$	0.70	
$I_2(s) + 2e^-$	$\longrightarrow 2I^-(aq)$	0.54	
$O_2(g) + 2H_2O(l) + 4e^-$	$\longrightarrow 4OH^-(aq)$	0.40	
$Cu^{2+}(aq) + 2e^-$	$\longrightarrow Cu(s)$	0.34	
$Sn^{4+}(aq) + 2e^-$	$\longrightarrow Sn^{2+}(aq)$	0.15	
$2H^+(aq) + 2e^-$	$\longrightarrow H_2(g)$	0	
$Pb^{2+}(aq) + 2e^-$	$\longrightarrow Pb(s)$	−0.13	
$Ni^{2+}(aq) + 2e^-$	$\longrightarrow Ni(s)$	−0.26	
$Cd^{2+}(aq) + 2e^-$	$\longrightarrow Cd(s)$	−0.40	
$Fe^{2+}(aq) + 2e^-$	$\longrightarrow Fe(s)$	−0.45	
$Zn^{2+}(aq) + 2e^-$	$\longrightarrow Zn(s)$	−0.76	
$2H_2O(l) + 2e^-$	$\longrightarrow H_2(g) + 2OH^-(aq)$	−0.83	
$Al^{3+}(aq) + 3e^-$	$\longrightarrow Al(s)$	−1.66	
$Mg^{2+}(aq) + 2e^-$	$\longrightarrow Mg(s)$	−2.37	
$Na^+(aq) + e^-$	$\longrightarrow Na(s)$	−2.71	
$Li^+(aq) + e^-$	$\longrightarrow Li(s)$	−3.04	
Weaker oxidizing agent			Stronger reducing agent

รูปที่ 2.8 ค่าศักย์ไฟฟ้ารีดักชันมาตรฐานที่ 25°C (298 K)

ที่มา : http://www.il.mahidol.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 แก๊สโครมาโตกราฟี

แก๊สโครมาโทรากราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับแยกตัวอย่างที่เป็นสารผสมที่ระเหยได้ โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง ไอที่เกิดขึ้นจะถูกนำเข้าสู่คอลัมน์โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ carrier gas ตาม flow rate ที่ต้องการภายในคอลัมน์บรรจุด้วยสารที่ทำหน้าที่ในการแยก เรียกว่าเฟสคงที่ (stationary phase) สารผสมจะถูกแยกออกเป็นส่วนๆ ที่คอลัมน์นี้ด้วยความแตกต่างของสมบัติทางเคมี โครงสร้าง น้ำหนักโมเลกุล จุดเดือด สารที่แยกได้ผ่านออกไปสู่ส่วนตรวจวัด (detector) ทำให้เกิดสัญญาณไฟฟ้าส่งไปยังระบบประมวลผล (Data system) ซึ่งสามารถคำนวณและรายงานผลออกมาเป็นโครมาโตแกรม ให้ทราบถึงองค์ประกอบหรือเทียบปริมาณของสารตัวอย่างได้ กล่าวคือสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ

2.6.1 หลักการทำงานของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

1. Carrier gases หรือแก๊สพามีหน้าที่นำแก๊สตัวอย่างจากจุดฉีด (injection port) ผ่านเข้าสู่คอลัมน์และไปยัง detector แก๊สที่ใช้งานกับเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ เป็นแก๊สเฉื่อยที่ไม่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารตัวอย่าง เช่น แก๊สฮีเลียม ไฮโดรเจน หรือไนโตรเจน

2. Injector port เป็นส่วนที่ใช้ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์โดยทั่วไปส่วนที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าไป (inlet) มักจะมีตัวให้ ความร้อน (heater) ติดตั้งอยู่ด้วย เพื่อทำให้สารตัวอย่างกลายเป็นไอ การเลือกใช้งานว่าจะใช้ inlet แบบใดนั้นขึ้นอยู่กับสารตัวอย่าง หากสารตัวอย่างเป็นแก๊สมักจะฉีดตัวอย่างเข้าไปด้วย gas sampling valve หากสารตัวอย่างเป็นของเหลวโดยมากจะใช้ micro syringe ดูดสารตัวอย่างขึ้นมาตามปริมาตรที่ต้องการแล้วฉีดผ่าน silicone septum ที่ injection port ไปยังปลายของคอลัมน์

3. Column เป็นส่วนที่ใช้แยกสารตัวอย่าง คอลัมน์ที่ใช้กันทั่วไปในแก๊สโครมาโตกราฟี นั้นมีอยู่ 2 ประเภท คือ packed column และ capillary column การเลือกใช้คอลัมน์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารผสมไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน แต่สามารถพิจารณาเลือกจาก catalog ที่บริษัทผู้ผลิตคอลัมน์ออกมาจำหน่ายและค้นคว้าจากงานวิจัยในวารสารด้านโครมาโตกราฟี

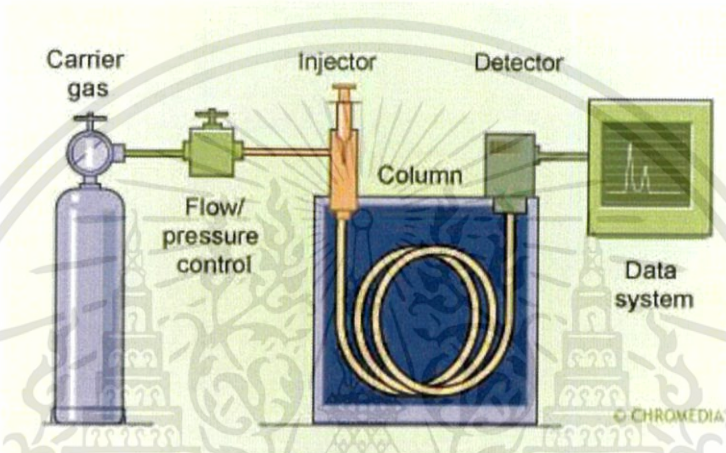
4. Detector หรือส่วนตรวจวัด เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารเชิงเดี่ยวที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์แล้วส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยังระบบประมวลผลสามารถจำแนกประเภทของส่วนตรวจวัดได้เป็นหลายประเภทตามคุณสมบัติการตรวจวัดโดยรูปแบบตรวจวัดที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง และสามารถทำได้ในเครื่อง GC-2014 ได้แก่

4.1 Flame Photometric Detector (FID) ใช้ใน การตรวจหาสารประกอบอินทรีย์ (สารประกอบที่มี C-C, C-H bonds)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 Electron Capture Detector (ECD) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่ดีในการตรวจหาสารประกอบที่มีแฮโลเจนอะตอมเป็นองค์ประกอบ เช่น ยาฆ่าแมลง และยาปราบวัชพืช เป็นต้น

5. Data system หรือระบบประมวลผล เป็นส่วนที่ ประมวลผลและข้อมูลต่างๆ ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ซึ่งคำนวณและรายงานผลเป็น retention time คือเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ผ่านคอลัมน์จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสูงสุดของของพีคที่ได้จากโครมาโตแกรม retention time สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อระบุว่าเป็นสารชนิดใดเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน นอกจากนี้ลักษณะและขนาดของพีคที่ได้จากโครมาโตแกรมใช้เป็นข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้



รูปที่ 2.9 ส่วนประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ
ที่มา: http://www.chromedia.org

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ripoll. *et al.* (2016) การวิจัยนี้จะตรวจสอบการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายชีวมวลในกระบวนการเผาไหม้ของก๊าซธรรมชาติแบบกรองอากาศ โดยประกอบด้วยอนุภาคของสาหร่ายชีวมวลอะลิทอริคและอลูมิเนียมทรงกลม ซึ่งผลิตภัณฑ์ซึ่ง ได้แก่ H_2, CO, CO_2, CH_4 ทำหน้าที่เป็นตัววัดปริมาณของสาหร่าย สาหร่ายที่นำมาวิเคราะห์มี 3 ชนิด ได้แก่ *Ulva lactuca, Lessonia trabeculata* และ *Lessonia nigrescens* ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิการเผาไหม้ไฮโดรเจนและอัตราผลตอบแทนจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณสาหร่ายส่วนที่อยู่ในฐานไฮบริดและการเพิ่มขึ้นของปริมาณความชื้นของสาหร่าย L. *trabeculata* ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายอีกสองสายพันธุ์ ซึ่งผลตอบแทนสูงสุดของพลังงานมากกว่าพลังงานที่ให้ไปถึง 50% โดยใช้ค่าสัดส่วนของปริมาตรสาหร่ายเท่ากับ 50% และค่าความชื้นของสาหร่ายเท่ากับ 5%

Gabrielyan *et al.* (2014) ได้ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักโดยใช้แสงด้วยแบคทีเรียสีม่วง *Rhodobacter sphaeroides* MDC6521 ซึ่งมาจากน้ำแร่ในอาร์มาเนีย ถูกควบคุมโดยตัวรีดิวซ์และตัวออกซิไดส์ ตัวรีดิวซ์ เช่น DL- dithiotheritol (DTT) และ dithionite จะยับยั้งการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่จะเพิ่มปริมาณผลผลิตไฮโดรเจน ในทางกลับกันตัวออกซิไดส์อย่าง ferricyanide จะยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย R. *sphaeroides* ผลของ DTT ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ DCCD-inhibited F_0F_1–ATPase ในเยื่อหุ้มของแบคทีเรีย โดย DTT จะช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ DCCD-inhibited F_0F_1–ATPase ดังนั้นค่าความสามารถในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน (E_h) ที่ยิ่งลดลงเมื่อเติม DTT อาจช่วยควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ F_0F_1–ATPase ได้ การมีส่วนร่วมในปฏิกิริยารีดอกซ์ในการผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการหมักโดยใช้แสงนั้นถูกแนะนำ เอนไซม์นี้อาจมีหน้าที่ที่เจาะจงในกระบวนการเหล่านี้ของแบคทีเรียสีม่วง

Yin. *et al.* (2014) การฉายรังสีแกมมาเป็นวิธีการปรับสภาพขั้นต้นเพื่อเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนจากกากตะกอนโดยแบคทีเรีย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มของรังสีแกมมาเท่ากับ 5.0 kGy เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดเมื่อศึกษาค่าความเข้มรังสีแกมมาตั้งแต่ 0.5-10 kGy ค่าไฮโดรเจนสะสมสูงสุด (maximum cumulative hydrogen production), ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (maximum hydrogen yield), อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (maximum hydrogen production rate) และค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายสารตั้งต้นของตะกอนที่ถูกฉายรังสี มีค่าเท่ากับ 529.4 mL, 267.7 mL/g, 37.25 mL/h และ 98.9% ตามลำดับ เมื่อทำการทดลองหมักที่อุณหภูมิ 36°C, ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และความเข้มข้นสารตั้งต้นกลูโคสเท่ากับ 10 g/L เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการปรับสภาพแบบเดิมพบว่ารังสีแกมมาเป็นวิธีการปรับสภาพที่มีประสิทธิภาพมากกว่าสำหรับการเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนจากกากตะกอนโดยแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามผลกระทบของการฉายรังสีแกมมาต่อกลุ่มโครงสร้างจุลินทรีย์ในการปรับสภาพขั้นต้นยังคงต้องศึกษาเพิ่มในอนาคตต่อไป

Laurinavichene. *et al.* (2013) แก๊สไฮโดรเจนเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเชื้อเพลิงที่ประกอบด้วยคาร์บอน เป็นพลังงานที่มีประสิทธิภาพ ไม่มีมลพิษ และมีพลังงานสูง ปัจจุบันไฮโดรเจนถูกสังเคราะห์ด้วยวิธีการเปลี่ยนรูปร่างทางเคมีจากเชื้อเพลิงฟอสซิล ในขณะที่กระบวนการทางชีวภาพมากมายถูกค้นพบอย่างกว้างขวางแต่ไม่มีวิธีใดที่มีความเหมาะสมเชิงเศรษฐกิจเลย ในบรรดากระบวนการทางชีวิภาพสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียมีกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ใช้สารอินออร์แกนิกที่ไม่แพงทำให้สาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจ โดยปกติแล้วระหว่างการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียจะมีการพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จะเห็นได้ว่ากระบวนการนี้มีความเป็นมิตรทั้งต่อสิ่งแวดล้อมและทางเศรษฐกิจ อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตไฮโดรเจนขนาดใหญ่ถูกจำกัดด้วยทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรม ระบบเมตาบอลิซึมและด้านสรีรวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสังเคราะห์แสงโดยใช้ออกซิเจน การพัฒนาใหม่ทางกลยุทธ์ของกระบวนการทางชีวภาพและพันธุวิศวกรรมในอนาคตทำโดยปรับปรุงเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงโดยตัดบริเวณที่สัมผัสกับอากาศทิ้งและเพิ่มประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อแสง แต่ผลผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวิภาพยังคงให้ผลผลิตน้อยเมื่อเทียบกับผลผลิตที่ได้จากการใช้สารเคมี อย่างไรก็ตามการพัฒนาเหล่านี้ยังคงต้องการเทคโนโลยีที่ก้าวหน้าในอนาคตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Tamburic. *et al.* (2012) สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนที่สะอาดโดยผ่านกระบวนการทางชีวภาพที่ใช้แสงของน้ำซึ่งเกิดขึ้นภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน โดยปกติจะต้องแยกถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งมีราคาแพงและใช้พลังงานสูง และเทคนิคการแลกเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งทำให้กระบวนการยากขึ้น

จุดมุ่งหมายของรายงานฉบับนี้คือ แสดงให้เห็นว่าสองขั้นตอนนี้สามารถเกิดขึ้นในเครื่องปฏิกรณ์เดียว ด้วยเหตุนี้จึงต้องขจัดทั้งขั้นตอนการแยกและเครื่องปฏิกรณ์รวม โดยใช้ซัลเฟตและอะซิเตทในการทดสอบอัตราการดูดซึมระหว่างการเจริญเติบโตของสาหร่ายภายใต้สภาวะความเข้มแสงที่ต่างกัน สาหร่ายเริ่มต้นจะใช้ความเข้มข้นของซัลเฟตและอะซิเตทที่เหมาะสมที่สุด ดังนั้นธาตุอาหารเหล่านี้จะถูกขับออกไปในเวลาที่แน่นอนเมื่อความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายถึงจุดสูงสุด วิธีการควบคุมธาตุอาหารจะทำเมื่อสาหร่ายเจริญเติบโตเต็มที่เพื่อเข้าสู่การผลิตไฮโดรเจน อัตราการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณผลผลิตถูกวัดโด membrane-inlet mass spectrometry (MIMS) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดแบบที่ให้แสงถูกออกแบบใหม่เพื่อให้กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวง่ายขึ้น วิธีการควบคุมธาตุอาหารด้วยการขาดซัลเฟอร์ได้รับการพิสูจน์ว่าดีกว่าวิธีการปั่นเหวี่ยงและวิธีการเจือจางแบบเดิม การผลิตไฮโดรเจนและการควบคุมสารอาหารมีอัตราสูงสุดถึง 1.30 mL/l/h และมีปริมาณผลผลิตถึง 112.7 mL/l วิธีการควบคุมธาตุอาหารถูกระบุว่าเป็นตัวเลือกสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

Dubini (2011) ได้สนใจพลังงานสีเขียวโดยศึกษาการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยได้ทำการแสดงเมตาบอลิซึมของไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียวสามารถกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีทางชีวภาพที่ใช้แสงโดยใช้กลไกของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง [ระบบแสงที่ 2 (PSII) และระบบแสงที่ 1 (PSI)] โดยการแยกสลายน้ำและส่งอิเล็กตรอนไปให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (HYD) ซึ่งจะปล่อยก๊าซไฮโดรเจนออกมา โดยมีออกซิเจนเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งในสภาวะที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์จะหลีกเลี่ยงการเกิดออกซิเจนได้ และได้อธิบายการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวผ่านกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงซึ่งเป็นการหมักที่ไม่ใช้ออกซิเจน โดยจะมีสารตั้งต้นเป็นพวกคาร์โบไฮเดรต เมื่อถูกสลายได้ไพรูเวตจะถูกออกซิไดส์โดยเอนไซม์ pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (PFR) ได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และ acetyl-CoA และเฟอร์รีดอกซินที่ถูกรีดิวซ์จะส่งอิเล็กตรอนให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนแต่กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงยังคงเป็นทางเลือกที่ 2 ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

Srirangan. *et al.* (2011) ปฏิกิริยาระหว่างสปีชีส์ของแบคทีเรียมีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจน โดยการผลิตไฮโดรเจนจะใช้จุลินทรีย์หลายชนิด (ชุมชนจุลินทรีย์) หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตถูกพบในกระบวนการย่อยสลายแป้งในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดยแบคทีเรียชนิดนี้จะส่งผลยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนโดยไม่ใช้แสงของแบคทีเรียสีม่วงที่ไม่ใช้ซัลเฟอร์ การยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนได้ถูกสาธิตให้ดูโดยการเลี้ยงแบคทีเรีย *Rhodobacter sphaeroides*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
149327

ร่วมกับ *Desulfomicrobium baculatum* ไว้ด้วยกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบสัดส่วนสารอาหารที่แน่นอน การยับยั้งได้ถูกควบคุมโดยการผลิตซัลไฟด์ซึ่งมีอิทธิพลมากกว่าไฮโดรเจนที่ใช้ไปและสารอินทรีย์ตั้งต้น การเพิ่มความเข้มข้นของซัลไฟด์ให้ผลคล้ายกันกับแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตคือ เกิดการยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยที่ไม่ได้ยับยั้งการเจริญเติบโต การรวมเซลล์และการเพิ่มขึ้นของปริมาณคาร์โบไฮเดรต ในการทดลองระยะยาวการผลิตไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งเมื่อใช้ซัลไฟด์ความเข้มข้นประมาณ 0.3 mM แต่เมื่อทดลองระยะสั้นแบคทีเรีย Rd. *sphaeroides* N7 กลับทนต่อความเข้มข้นของซัลไฟด์ได้ถึง 3.2 mM และไม่มีผลในการยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน การเติมโมลิบเดตมีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตและซัลไฟด์ลดลง

Maneeruttanarungroj. *et al.* (2010) ได้ทำการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ซึ่งถูกพบในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย โดยพบว่าสาหร่ายชนิดนี้ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่าสั้นที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) โดยสาหร่ายที่อายุ 24 ชั่วโมง เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงที่ 37 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส จะแสดงความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เหมาะสม การผลิตก๊าซจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มจาก 5.75 ถึง 9.30 และลดลงเมื่อ pH ถึง 5.25 การเติม 0.5 mM ของ β-mercaptoethanol ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มเป็นสองเท่า การขาดแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ทำให้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 50% การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะเกิดสูงสุดเมื่อขาดแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ภายใต้ความเข้มแสงประมาณ 29 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ซึ่งเป็นค่าการผลิตที่สูงเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่น ยีน sulfate permease (*sulP*) ทำหน้าที่ขนส่งซัลเฟตเข้าสู่คลอโรพลาสต์และยีน hydrogenase (*hydA*) ทำหน้าที่แปลรหัสให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสร้างก๊าซไฮโดรเจน ระดับการแสดงออกของยีน *sulP* และ *hydA* ของ *Tetraspora* sp. เพิ่มขึ้น 2.3 เท่า ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและกิจกรรมของระบบแสงที่สอง (PSII) ลดลงหลังจากอยู่ในภาวะขาดแหล่งซัลเฟอร์ จะถูกฟื้นฟูเมื่อเพิ่มแหล่งซัลเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Villano. *et al.* (2010) แบคทีเรียที่ไม่ผลิตคลอรีนแสดงการกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนด้วยปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนด้วยอิเล็กโทรด ทั้งการมีหรือไม่มีตัวกลางรีดอกซ์ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียโดยมีเมธิลไวโอโลเจน แบคทีเรีย *Desulfitobacterium* และ *Dehalococcoides* ให้การผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้นในอัตรา 12.4 μeq/mgVSS/d โดยตั้งค่าแคโทดเท่ากับ -450 mV ใกล้เคียงกับค่าศักย์ไฟฟ้าผันกลับได้ของ H^+/H_2 ที่ pH 7 ซึ่งมีค่าเท่ากับ -414 mV ในสภาวะที่ดีขึ้นแบคทีเรีย *Desulfitobacterium* สามารถเร่งการผลิตไฮโดรเจนโดยปราศจากตัวกลางที่ค่าศักย์ไฟฟ้าแคโทดต่ำกว่า -700 mV อัตราการผลิตไฮโดรเจนด้วย *Desulfitobacterium* spp. เท่ากับ 13.5 μeq/mgVSS/d ซึ่งสูงกว่าการควบคุมสภาวะเกือบสี่เท่า ภาพรวมในการศึกษานี้เสนอความเป็นไปได้ของการใช้แบคทีเรียที่ไม่ผลิตคลอรีนในการกระตุ้นไฮโดรเจน เทคโนโลยีพลังงานใหม่ เช่น เซลล์อิเล็กโทรลิซิสแบคทีเรีย และควรระบุเส้นทางของอิเล็กตรอนไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างเต็มศักยภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรัญญา และ อรัญ (2557) ไฮโดรเจนที่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวเป็นแหล่งพลังงานหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากการผลิตไฮโดรเจนนี้เป็นการนำเอาพลังงานแสงอาทิตย์มาใช้เป็นแหล่งพลังงานโดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง ในการศึกษานี้ ได้คัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจำนวน 59 ไอโซเลทจากแหล่งดินและแหล่งน้ำในนาข้าวของประเทศไทย เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ได้ 9 ไอโซเลท และสาหร่ายสีเขียวที่บริสุทธิ์ได้ 9 ไอโซเลทเช่นกัน ในบรรดาไอโซเลททั้งหมด ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวไอโซเลท AngS1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 389.630 ± 72.084 nmolH_2/mg chl/h เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาบ่มในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและปรับตัวภายใต้สภาวะปราศจากอากาศในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลกลูโคส แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต และเหล็กไอออน คือ ความเข้มข้น 0.189 mmolC/L 3 mM และ 20 µM ตามลำดับ นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 มีการสะสมไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 4,174.364 ± 278.324 nmolH_2/mg Chl เมื่อบ่มในอาหารที่เหมาะสมเป็นเวลา 11 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี

1. ทิน(II)คลอไรด์ ($SnCl_2$) Carlo Erba Reagent AR Grade Italy
2. โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) Fisher Chemical AR Grade
3. โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) Carlo Erba Reagent AR Grade Italy
4. กรดออกซาลิก (Oxalic Acid) Fisher Chemical AR Grade
5. กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic Acid) Carlo Erba Reagent AR Grade Italy
6. เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล (β-mercaptoethanol) MP Biomedicals AR Grade
7. ทริส(2-คาร์บอกซีเอทิล)ฟอสฟีน ไฮโดรคลอไรด์ Tris(2-carboxyethyl)phosphine HCl (TCEP) Acros Organics AR Grade Belgium
8. ผงวุ้น (Agar) SDFCL SD Fine-Chem Limited AR Grade India
9. แอมพิซิลิน (Ampicillin) VWR Life Science AR Grade India
10. ทริซ (Tirs) Carlo Erba Reagent AR Grade Italy
11. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) Loba Chemie AR Grade India
12. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
13. แคลเซียมคลอร์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) Carlo Erba Reagent AR Grade Italy
14. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) Loba Chemie AR Grade India
15. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) Loba Chemie AR Grade India
16. ไดโซเดียมอีดีทีเอไดไฮเดรต ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
17. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
18. กรดบอริก(H_3BO_3) Loba Chemie AR Grade India
19. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
20. ไอรอนซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
21. โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) Carlo Erba Reagent AR Grade Italy
22. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
23. แอมโมเนียมโมลิบเดรตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
24. กรดอะซิติก CH_3COOH (con.) Reagents Duksan GR Grade South Korea

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
2. เครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer) Thermo Scientific รุ่น Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer USA
3. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ (Auto Crave) JSAC-60 Korea
4. ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet) JSCB-1200SB Korea
5. เครื่องชั่ง (Weight Scale) Mettler Toledo รุ่น ML204 Switzerland
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) Heraeus Megafuge 8R Thailand
7. ตู้แช่ (Fridge) Toshiba รุ่น GR-S26KPB Thailand
8. ตู้อบไมโครเวฟ (Microwave Oven) Electrolux Thailand
9. ตู้ดูดควัน (Fume Hood) Flexlab รุ่น FH5-13/FB\ Thailand
10. ไมโครปิเปต (Micro Pipet) Rainin รุ่น Pipet-Lite XLS USA
11. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) Hewlett Packard รุ่น 5890 Series II USA
12. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) Thailand

3.3 การเลือกชนิดสารรีดิวซ์

เนื่องจากต้องการหาสารรีดิวซ์ที่ดีที่จะไปช่วยเพิ่มจำนวนอิเล็กตรอนและส่งผลให้เซลล์เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้นจงพิจารณาที่ค่าศักย์ไฟฟ้ารีดักชันมาตรฐาน (ค่า E °) ที่ 25°C โดยทำการเทียบกับค่า E ° ของไฮโดรเจนซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0 V สารรีดิวซ์ที่ต้องการควรจะมีค่าที่น้อยกว่าหรือใกล้เคียง 0.0 V เมื่อเลือกได้แล้วทำตามวิธีดังนี้

1. แบ่งสารรีดิวซ์ที่สนใจออกเป็น 2 ชนิด คือ สารรีดิวซ์ทางเคมี (Chemical reducing agent) และสารรีดิวซ์ทางชีวภาพ (Biological reducing agent)
2. ศึกษาสารรีดิวซ์แต่ละตัวโดยตัดสารรีดิวซ์ที่เกิดปฏิกิริยากับน้ำ มีความเป็นพิษสูงและมีราคาสูงออก
3. ได้สารรีดิวซ์ที่ใช้ในการทดลอง 7 สาร ดังนี้
   1.) ทริชทูคาร์บอกซีเอททิลฟอสฟีนไฮโดรคลอไรด์ Tris(2-carboxyethyl) phosphineHCl (TCEP)
   2.) ทิน(II)คลอไรด์ ($SnCl_2$)
   3.) โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)
   4.) โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)
   5.) กรดออกซาลิก (Oxalic Acid)
   6.) กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic Acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.) เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล (β-mercaptoethanol)

เมื่อได้สารรีดิวซ์ที่ต้องการแล้วจึงนำไปคัดกรองความเข้มข้นต่อไป

3.4 การคัดกรองความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ของสารรีดิวซ์ 7 ชนิด

เพื่อตัดชนิดและความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่สาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตได้ออก โดยเลี้ยงสาหร่าย (สภาวะในตู้บ่มดังแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 2.7) ในสารรีดิวซ์แต่ละชนิด ชนิดละ 3 ความเข้มข้น คือ 0.01 mM, 0.1 mM และ 1.0 mM ตามลำดับ ทำการทดลองดังนี้

1. เตรียมอาหารเหลว TAP (สูตรอาหารเหลว TAP ดังแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 1) ปริมาตร 100 mL จำนวน 3 ขวดต่อสารรีดิวซ์ 1 ตัว
2. เทอาหารเหลว TAP ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL 3 ขวด ขวดละ 100 mL แล้วเติม Ampicillin (การเตรียม Ampicillin ดังแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 2.1) แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขวดละ 100 mL
3. ปิเปตสารรีดิวซ์ใส่ขวดรูปชมพู่ 3 ขวด โดยคำนวณให้มีความเข้มข้นเป็น 0.01 mM, 0.1 mM และ 1.0 mM แล้วคนให้เข้ากัน (วิธีคำนวณความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่ต้องใช้ ดังแสดงในภาคผนวก ข ข้อ 1)
4. ปิเปตสาหร่ายจาก starter (วิธีทำ starter ดังแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 2.6) ใส่ขวดรูปชมพู่ โดยให้สาหร่ายมีความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 (OD_{730} = 0.1) แล้วคนให้เข้ากัน
5. แบ่ง TAP ที่ใส่สาหร่ายแล้วใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 mL ขวดละ 50 mL 2 ขวด (ซ้ำ 1, ซ้ำ 2) โดยสารรีดิวซ์ 1 ชนิด มี 3 ความเข้มข้น เมื่อเทแบ่งเป็นขวดละ 50 mL แล้วจะได้ทั้งหมด 6 ขวด (2 ซ้ำ) ต่อ 1 สารรีดิวซ์ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่ม
6. ติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายในสารรีดิวซ์แต่ละชนิด แต่ละความเข้มข้นโดยทำการบันทึกภาพการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วัน

เมื่อได้ความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้แล้วจึงนำไปวัดปริมาณไฮโดรเจนต่อไป

3.5 การวัดปริมาณไฮโดรเจน

เพื่อคัดกรองสารรีดิวซ์ที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดโดยเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ ทำการทดลองดังนี้

1. เทอาหารเหลว TAP ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 mL ปริมาณ 50 mL 9 ขวด แล้วปิเปต Ampicillin ใส่ขวดรูปชมพู่ขวดละ 50 mL จากนั้นปิเปตสาหร่ายมีความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ (OD_{730}=0.01) ทุกขวด แล้วบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมงแล้ว นำขวดรูปชมพู่ทั้ง 9 ขวด มาเทรวมกันในบีกเกอร์ขนาด 1 L นำไปวัดความขุ่นแล้วคำนวณให้มีความขุ่นเป็น 0.2 โดยใช้ TAP เจือจางให้มีปริมาตรเท่าเดิม
3. เทอาหาร TAP ที่มีความขุ่นเป็น 0.2 ใส่หลอดเซนติฟิวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 20 mL โดยสารรีดิวซ์ 1 สารมี 3 ความเข้มข้น คือ 0.01 mM, 0.1 mM และ 1.0 mM จึงใช้หลอดเซนติฟิวสารละ 3 หลอด สารรีดิวซ์ 7 สาร รวมกับหลอดที่ไม่ใส่สารรีดิวซ์ทั้งหมด 22 หลอด
4. ทำ stock สารรีดิวซ์ โดยมีความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 10 mL จากนั้นปิเปตสารรีดิวซ์ใส่หลอดเซนติฟิวให้มีความเข้มข้น 0.01 mM, 0.1 mM และ 1.0 mM
5. ปิเปตอาหารเหลว TAP ที่ใส่สารรีดิวซ์แล้วใส่ขวดไวแอลขนาด 12 mL ปริมาตร 5 mL จะได้ขวดไวแอลทั้งหมด 66 ขวด
6. ปิดขวดไวแอล แล้วนำไปไล่ก๊าซออกซิเจนด้วยก๊าซอาร์กอนขวดละประมาณ 3 นาที จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (สภาวะในตู้บ่มดังแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 2.7) แล้วนำไปหาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (วิธีการคำนวณหาปริมาณไฮโดรเจนที่วัดได้ ดังแสดงในภาคผนวก ข ข้อ 4)

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Column	Pack column 2 m; Molecular sieve 13x
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Temperature Program	· Injector temperature : 100 °C · Column temperature : 50 °C · Detector temperature : 100 °C
Carrier gas	Argon 99.99% purity (flow rate 70-80 mL/min)
Standard	4% H_2 in Ar

เมื่อได้สารรีดิวซ์ที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดแล้วจึงนำไปแปรความเข้มข้นเพื่อหาความเข้มข้นที่ดีที่สุดต่อไป

3.6 การหาผลของความเข้มข้นต่อการผลิตไฮโดรเจน

เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดโดยคัดเลือกจากข้อที่ 3.5 ทำได้โดยนำมาแปรความเข้มข้นให้ละเอียดขึ้น

ตัวอย่างการกำหนดความเข้มข้นของ TCEP จากขั้นตอนที่ 3.5 TCEP ให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดที่ความเข้มข้น 1.0 mM จึงกำหนดความเข้มข้นให้ละเอียดขึ้นเป็น 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 mM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.5.1-3.5.6 โดยใช้ความเข้มข้นข้างต้นแทน เมื่อได้ค่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดของสารรีดิวซ์แต่ละตัวแล้วจึงนำไปศึกษาการเจริญเติบโตต่อไป

3.7 ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในสารรีดิวซ์ชนิดต่างๆ

เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารรีดิวซ์จากข้อ 3.6 ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยหาเวลาที่สาหร่ายมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว (mid log phase) เทียบกับ control คือ อาหาร TAP ปกติ ทำการทดลองดังนี้

1. เลี้ยงสาหร่าย (สภาวะในตู้บ่มดังแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 2.7) โดยให้มีความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 (OD_{730}= 0.1) ในสภาวะที่มีสารรีดิวซ์ที่ผ่านการหาชนิดและความเข้มข้นที่ดีที่สุดของสารรีดิวซ์ โดยเลือกสารรีดิวซ์ที่น่าสนใจจากการเปรียบเทียบผลผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายที่ไม่ได้เติมสารรีดิวซ์
2. ติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่เติมสารรีดิวซ์จากการคัดเลือกไว้แล้ว โดยวัดค่าความขุ่น OD_{730} ทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อทำกราฟการเจริญเติบโต

เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่ายในสารรีดิวซ์ชนิดต่างๆ แล้วจึงนำไปศึกษาการผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลาการเจริญเติบโตของสาหร่ายต่อไป

3.8 ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลา

เพื่อศึกษาช่วงเวลาในการเลี้ยงสาหร่ายว่ามีผลอย่างไรต่อปริมาณไฮโดรเจน ทำได้โดยเพิ่มเวลาในการเลี้ยงสาหร่ายให้ยาวนานขึ้นและวัดผลผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลาที่กำหนด โดยได้ออกแบบการทดลองเป็น 2 วิธี ดังนี้

3.8.1 การผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องจากการเลี้ยง (non-adaption)

ทำได้โดยเลี้ยงสาหร่าย (สภาวะในตู้บ่มดังแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 2.7) ในอาหารเหลวสูตร TAP แล้วเติมสารรีดิวซ์ TCEP 1.0 mM, โซเดียมไทโอซัลเฟต 10 mM, กรดแอสคอร์บิก 0.10 mM และกรดออกซาลิก 0.03 mM (ได้ผลการทดลองจากข้อที่ 3.6) เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ได้ผลการทดลองจากข้อที่ 3.7) แล้ววัดผลผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลาที่กำหนด ทำการทดลองดังนี้

1. เทอาหารเหลว TAP ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 100 mL ปริมาตร 65 mL 5 ขวด จากนั้นเติมสารรีดิวซ์แต่ละตัวลงไป โดยขวดที่ 1 เติม TCEP ให้มีความเข้มข้น 1.0 mM, ขวดที่ 2 โซเดียมไทโอซัลเฟต ให้มีความเข้มข้น 10 mM, ขวดที่ 3 กรดแอสคอร์บิก ให้มีความเข้มข้น 0.10 mM, ขวดที่ 4 กรดออกซาลิก ให้มีความเข้มข้น 0.03 mM และขวดที่ 5 ไม่ต้องใส่สารรีดิวซ์ใช้ TAP ปกติ เป็น control เมื่อใส่สารรีดิวซ์ครบทุกขวด จากนั้นเติม Ampicillin ปริมาตร 0.065 mL ลงไปทุกขวด และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุดท้ายใส่สาหร่ายโดยให้มีความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.01 (OD_{730}= 0.01) นำไปบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้แต่ละขวดมาเทแบ่งใส่ขวดไวแอลขนาด 120 mL ขวดละ 20 mL โดยสารรีดิวซ์ 1 สารจะแบ่งใส่ขวดไวแอลได้ 3 ขวด
3. จากนั้นนำสารที่เหลือจากการแบ่งมาวัด OD_{730} เพื่อใช้ในการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน
4. นำขวดไวแอลที่ได้ไปเป่าด้วยก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่ก๊าซออกซิเจน แล้วจึงนำไปบ่มในตู้บ่มต่อ
5. นำไปหาปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครโมโตกราฟหลังจากบ่มครบทุก 4, 8, 16, 32 และ 48 ชั่วโมง

3.8.2 การผลิตไฮโดรเจนแบบเปลี่ยนอาหารเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง (Adaption)

ทำได้โดยเลี้ยงสาหร่าย (สภาวะในตู้บ่มดังแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 2.7) ในอาหารเหลวสูตร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารรีดิวซ์ TCEP 1.0 mM, โซเดียมไทโอซัลเฟต 10 mM, กรดแอสคอร์บิก 0.10 mM และกรดออกซาลิก 0.03 mM (ได้ผลการทดลองจากข้อที่ 3.6) แล้ววัดผลผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลาที่กำหนด ทำการทดลองดังนี้

1. เทอาหารเหลว TAP ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 100 mL ปริมาตร 65 mL เติม Ampicillin ปริมาตร 0.065 mL ลงไปทุกขวด และสุดท้ายใส่สาหร่ายโดยให้มีความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.01 (OD_{730}= 0.01) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. หลังจากครบ 24 ชั่วโมงแล้ว นำมาปรับค่าความขุ่น OD_{730} ให้เป็น 0.2 จากนั้นเติมสารรีดิวซ์แต่ละตัวลงไป โดยขวดที่ 1 เติม TCEP ให้มีความเข้มข้น 1.0 mM, ขวดที่ 2 โซเดียมไทโอซัลเฟต ให้มีความเข้มข้น 10 mM, ขวดที่ 3 กรดแอสคอร์บิก ให้มีความเข้มข้น 0.10 mM, ขวดที่ 4 กรดออกซาลิก ให้มีความเข้มข้น 0.03 mM และขวดที่ 5 ไม่ต้องใส่สารรีดิวซ์ใช้ TAP ปกติ เป็น control
3. นำขวดรูปชมพู่แต่ละขวดมาเทแบ่งใส่ขวดไวแอลขนาด 120 mL ขวดละ 20 mL โดยสารรีดิวซ์ 1 สารจะแบ่งใส่ขวดไวแอลได้ 3 ขวด
4. จากนั้นนำสารที่เหลือจากการแบ่งมาวัด OD_{730} เพื่อใช้ในการคำนวณการผลิตไฮโดรเจนต่อไป
5. นำขวดไวแอลที่ได้ไปเป่าด้วยก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่ก๊าซออกซิเจน แล้วจึงนำไปบ่มในตู้บ่มต่อ
6. นำไปหาปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ หลังจากบ่มครบทุก 4, 8, 16, 32 และ 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการเลือกชนิดสารรีดิวซ์

การศึกษาครั้งนี้ต้องการดูผลของสารรีดิวซ์ (สารที่ให้อิเล็กตรอน) ต่อการเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจน โดยอยู่บนสมมติฐานว่า หากจำนวนอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นด้วย ดังสมการที่ 1

$$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2 \qquad (1)$$

ดังนั้นการเพิ่มปริมาณอิเล็กตรอนผ่านการใช้สารรีดิวซ์จะสามารถเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนได้เช่นกัน จึงพิจารณาที่ค่าศักย์ไฟฟ้ารีดักชันมาตรฐาน (ค่า E°) ที่ 25 °C โดยทำการเทียบกับค่า E° ของไฮโดรเจนซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.00 โวลต์ (V) จากสมมติฐาน สารรีดิวซ์ที่ต้องการควรจะมีค่าที่น้อยกว่าหรือใกล้เคียง 0.00 V โดยยึดจากหลักการที่ว่าค่า E° reduction ยิ่งต่ำสารนั้นยิ่งให้อิเล็กตรอนได้ดี ดังนั้นจึงเลือกสารรีดิวซ์มาทั้งหมด 7 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ สารรีดิวซ์ทางเคมี (Chemical reducing agent) มี 5 ชนิด คือ โซเดียมไทโอซัลเฟต, ทิน(II)คลอไรด์, โพแทสเซียมไอโอไดด์, เบตาเมอร์แคปโทเอทานอล และ ทริส(2-คาร์บอกซีเอทิล)ฟอสฟีน ไฮโดรคลอไรด์ (TCEP) และสารรีดิวซ์ทางชีวภาพ (Biological reducing agent) มี 2 ชนิด คือ กรดออกซาลิก และ กรดแอสคอร์บิก ผลการศึกษาดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้ารีดักชันมาตรฐาน (ค่า E °) ของสารรีดิวซ์ 7 ชนิด

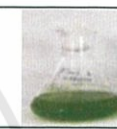
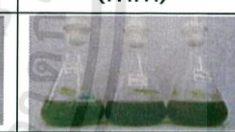
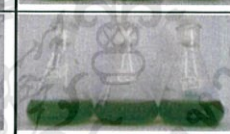
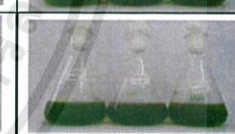
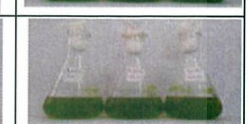
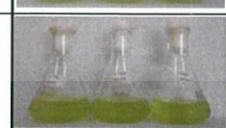
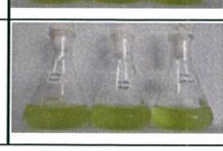
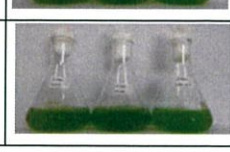
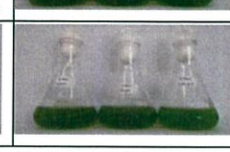
สารรีดิวซ์	ครึ่งปฏิกิริยารีดอกซ์	ค่า E° (V)
โพแทสเซียมไอโอไดด์	$K^+_{(aq)} + e^- \rightarrow K_{(s)}$	-2.92
กรดออกซาลิก	$2CO_{2\,(g)} + 2H^+_{(aq)} + 2e^- \rightarrow (COOH)_{2\,(aq)}$	-0.49
ทิน(II)คลอไรด์	$Sn^{2+}_{(aq)} + 2e^- \rightarrow Sn_{(s)}$	-0.14
ไฮโดรเจน	$2H^+_{(aq)} + 2e^- \rightarrow H_{2\,(g)}$	0.00
โซเดียมไทโอซัลเฟต	$(S_2O_3)_2^{2-}{}_{(aq)} + 2e^- \rightarrow 2S_2O_3^{2-}{}_{(aq)}$	0.08
เบตาเมอร์แคปโทเอทานอล	$S_{(s)} + 2H^+_{(aq)} + 2e^- \rightarrow H_2S_{(aq)}$	0.14
กรดแอสคอร์บิก	$C_6H_6O_{6\,(s)} + 2H^+_{(aq)} + 2e^- \rightarrow C_6H_8O_{6\,(s)}$	0.35
ทริส(2-คาร์บอกซีเอทิล)ฟอสฟีน ไฮโดรคลอไรด์ (TCEP)	$Cl_{2\,(g)} + 2e^- \rightarrow 2Cl^-_{(aq)}$	1.36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการคัดกรองความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ของสารรีดิวซ์ 7 ชนิด

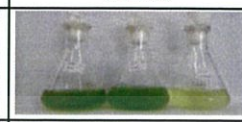
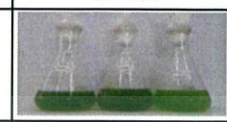
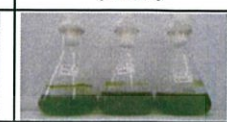
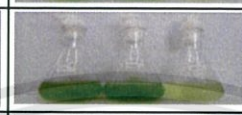
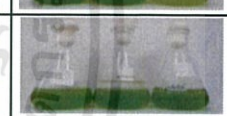
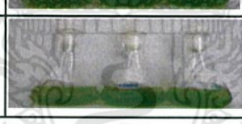
จากหัวข้อก่อนหน้าจึงลองทดสอบว่าสาหร่ายเจริญเติบโตได้หรือไม่ โดยเลือกความเข้มข้นที่ 0.01, 0.1 และ 1 mM ทำการทดลองได้ดังนี้ เลี้ยงสาหร่าย (สภาวะในตู้บ่มดังแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 2.7) มีปริมาณอาหาร TAP อยู่ 50 mL และเติมสารรีดิวซ์ 7 ชนิด ชนิดละ 3 ความเข้มข้นข้างต้น โดยมีสาหร่ายเริ่มต้น OD_{730} เท่ากับ 0.1 จากนั้นทำการวัดการเจริญเติบโตโดยบันทึกภาพสาหร่ายทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน โดยพิจารณาจากสีของอาหาร TAP ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.2 และปริมาณตะกอนของสาหร่ายได้ผลการทดลองดังตารางที่ ค-1 (ภาคผนวก)

ตารางที่ 4.2 ผลการคัดกรองความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ของสารรีดิวซ์ 7 ชนิด โดยพิจารณาจากสีของอาหาร TAP

	ซ้ำ	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
อาหาร TAP ปกติ	1				
	2				
สารรีดิวซ์	ซ้ำ	0.01 0.1 1 (mM)	0.01 0.1 1 (mM)	0.01 0.1 1 (mM)	0.01 0.1 1 (mM)
กรดออกซาลิก	1				
	2				
กรดแอสคอร์บิก	1				
	2				
เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล	1				
	2				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

สารรีดิวซ์	ซ้ำ	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
		0.01 0.1 1 (mM)	0.01 0.1 1 (mM)	0.01 0.1 1 (mM)	0.01 0.1 1 (mM)
TCEP	1				
	2				
โพแทสเซียมไอโอไดด์	1				
	2				
ทิน(II) คลอไรด์	1				
	2				
โซเดียมไทโอซัลเฟต	1				
	2				

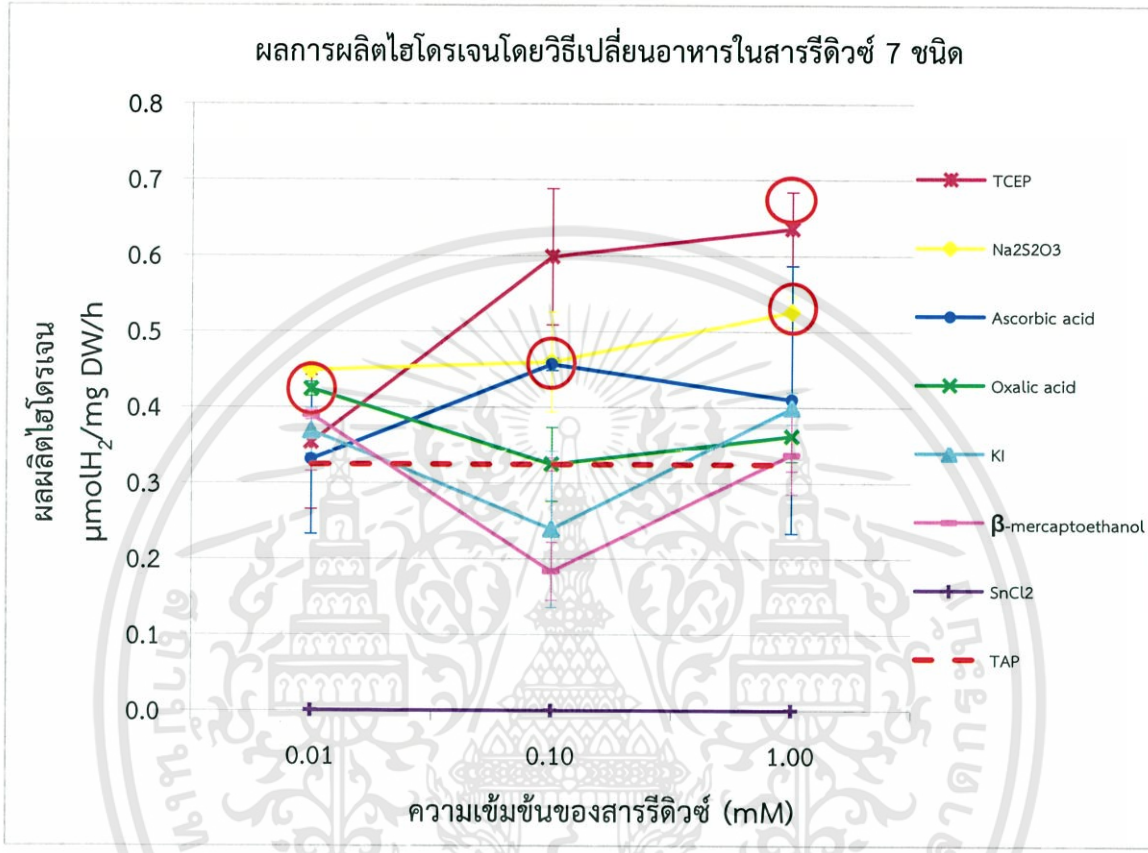
เมื่อพิจารณาจากสีของอาหาร TAP และปริมาณตะกอนของสาหร่ายที่เติมสารรีดิวซ์ 7 ชนิด อย่างละ 3 ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน พบว่าสาหร่ายเจริญเติบโตได้ในทุกสภาวะ จึงต้องการทราบผลของสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.3 ผลการวัดปริมาณไฮโดรเจน

ทำการเลี้ยงสาหร่าย (สภาวะในตู้บ่มดังแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 2.7) ในอาหาร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาเติมสารรีดิวซ์ 7 ชนิด อย่างละ 3 ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM จากการศึกษาผลของสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีเปลี่ยนอาหารเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง มีสารรีดิวซ์ที่น่าสนใจอยู่ 4 ชนิดคือ ทริส(2-คาร์บอกซีเอทิล)ฟอสฟีน ไฮโดรคลอไรด์ (TCEP), โซเดียมไทโอซัลเฟต, กรดแอสคอร์บิก และกรดออกซาลิก เนื่องจากสารทั้ง 4 ชนิดนี้สามารถทำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าอาหาร TAP ที่ไม่ได้เติมสารรีดิวซ์ โดยพบว่า TCEP และโซเดียมไทโอซัลเฟต ให้การผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดที่ความเข้มข้น 1 mM โดยมีแนวโน้มให้การผลิตไฮโดรเจนมากขึ้นหากเพิ่มความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดแอสคอร์บิกให้การผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดที่ความเข้มข้น 0.10 mM และกรดออกซาลิกให้การผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดที่ความเข้มข้น 0.01 mM โดยมีแนวโน้มให้การผลิตไฮโดรเจนมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นน้อยลง ดังรูปที่ 4.2 จึงต้องการแปรความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ทั้ง 4 ชนิดนี้



รูปที่ 4.1 ผลการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีเปลี่ยนอาหารในสารรีดิวซ์ 7 ชนิด

4.4 ผลของความเข้มข้นต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากผลของความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีเปลี่ยนอาหารเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงพบว่า TCEP และโซเดียมไทโอซัลเฟตให้การผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดที่ความเข้มข้น 1.0 mM โดยมีแนวโน้มให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากขึ้นหากเพิ่มความเข้มข้นจึงทำการทดลองเพิ่มโดยเพิ่มช่วงความเข้มข้นให้ละเอียดขึ้นเป็น 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 mM จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของ TCEP ที่ส่งผลให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดคือ 1.0 mM มีผลผลิตเท่ากับ 0.31 µmolH_2/mg DW/h ดังแสดงในรูปที่ 4.2

ส่วนโซเดียมไทโอซัลเฟตให้การผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดที่ความเข้มข้น 5.0 mM เนื่องจากมีแนวโน้มให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากขึ้นหากเพิ่มความเข้มข้นจึงทำการเพิ่มความเข้มข้นให้มากขึ้นเป็น 2.5, 5.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 mM ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ส่งผลให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดคือ 10.0 mM มีผลผลิตเท่ากับ 0.41 μmolH_2/mg DW/h ผลการทดลองก็ยังมีแนวโน้มให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากขึ้นอีกจึงเพิ่มความเข้มข้นให้มากขึ้นเป็น 10, 30, 50 และ 80 mM สุดท้ายได้ข้อสรุปว่าความเข้มข้นของโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ทำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดคือ 10.0 mM ซึ่งมีผลผลิตเท่ากับ 0.41 μmolH_2/mg DW/h ดังแสดงในรูปที่ 4.3

กรดแอสคอร์บิกให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดที่ความเข้มข้น 0.1 mM จึงทำการทดลองซ้ำโดยแปรความเข้มข้นให้ละเอียดขึ้นเป็น 0.05, 0.10, 0.25 และ 0.50 mM ก็ยังได้ผลการทดลองเช่นเดิมจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดคือ 0.1 mM ซึ่งมีผลผลิตเท่ากับ 0.58 μmolH_2/mg DW/h ดังแสดงในรูปที่ 4.4

กรดออกซาลิกให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดที่ความเข้มข้น 0.01 mM โดยมีแนวโน้มให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นน้อยลง จึงทำการแปรความเข้มข้นให้ละเอียดขึ้นดังนี้ 0.01, 0.03, 0.05 และ 0.07 mM พบว่าความเข้มข้นของกรดออกซาลิกที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดคือ 0.03 mM โดยให้ผลผลิตเท่ากับ 0.24 μmolH_2/mg DW/h ดังรูปที่ 4.5

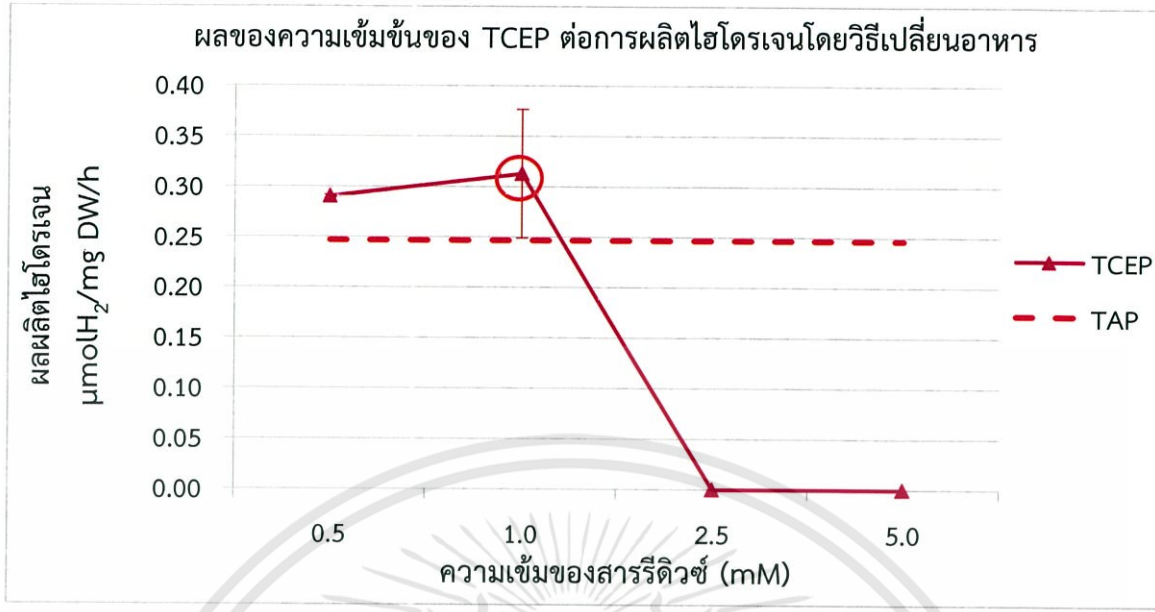
ดังนั้น สรุปความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด

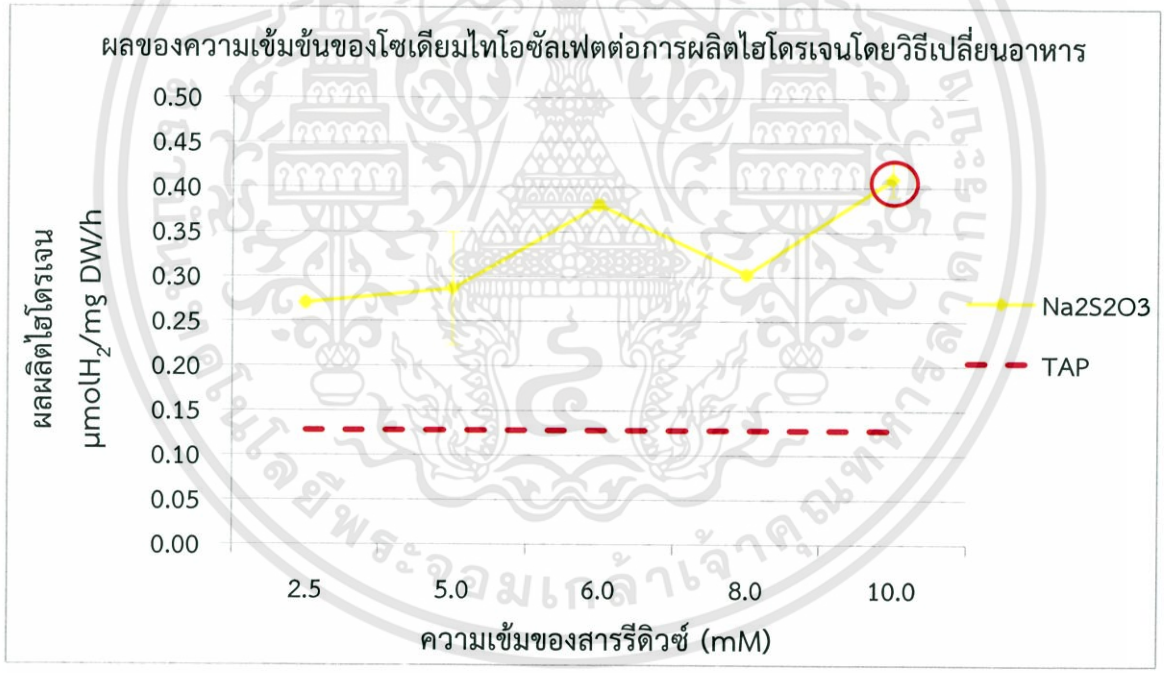
สารรีดิวซ์	ความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ (mM)	ผลผลิตไฮโดรเจน (μmolH_2/mg DW/h)
ทริส(2-คาร์บอกซีเอทิล)ฟอสฟีน ไฮโดรคลอไรด์ (TCEP)	1.00	0.31
โซเดียมไทโอซัลเฟต	10.0	0.41
กรดแอสคอร์บิก	0.10	0.58
กรดออกซาลิก	0.03	0.24

อยากทราบว่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายในสารรีดิวซ์ 4 ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นอย่างไรจึงศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในสารรีดิวซ์ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

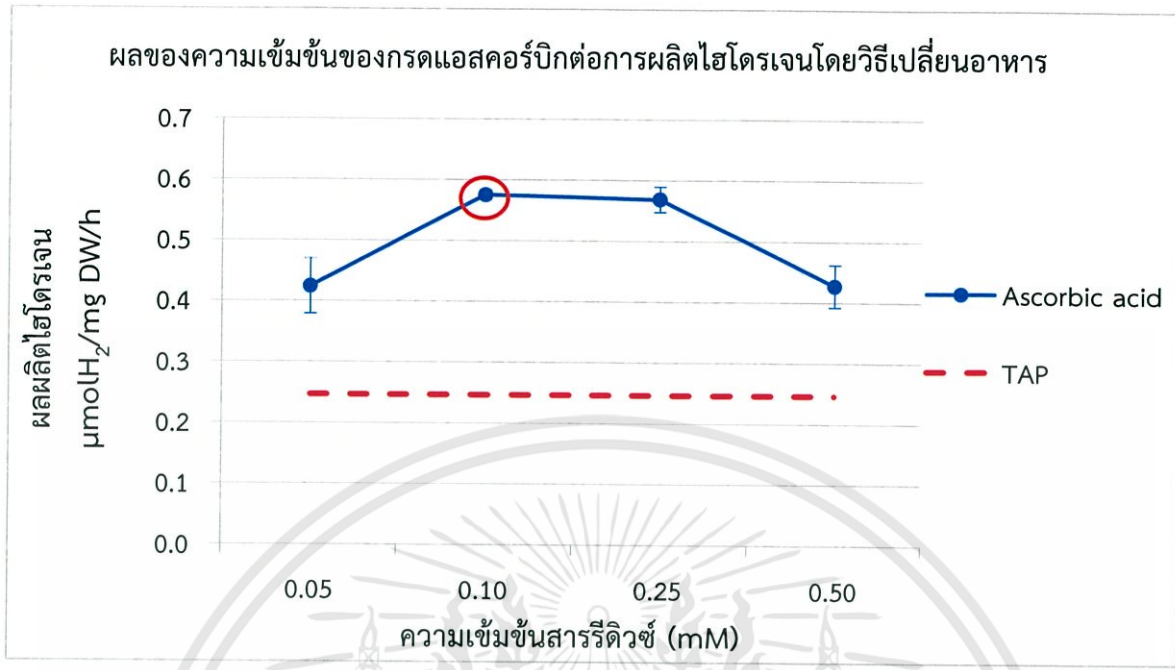


รูปที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นของ TCEP ต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีเปลี่ยนอาหาร

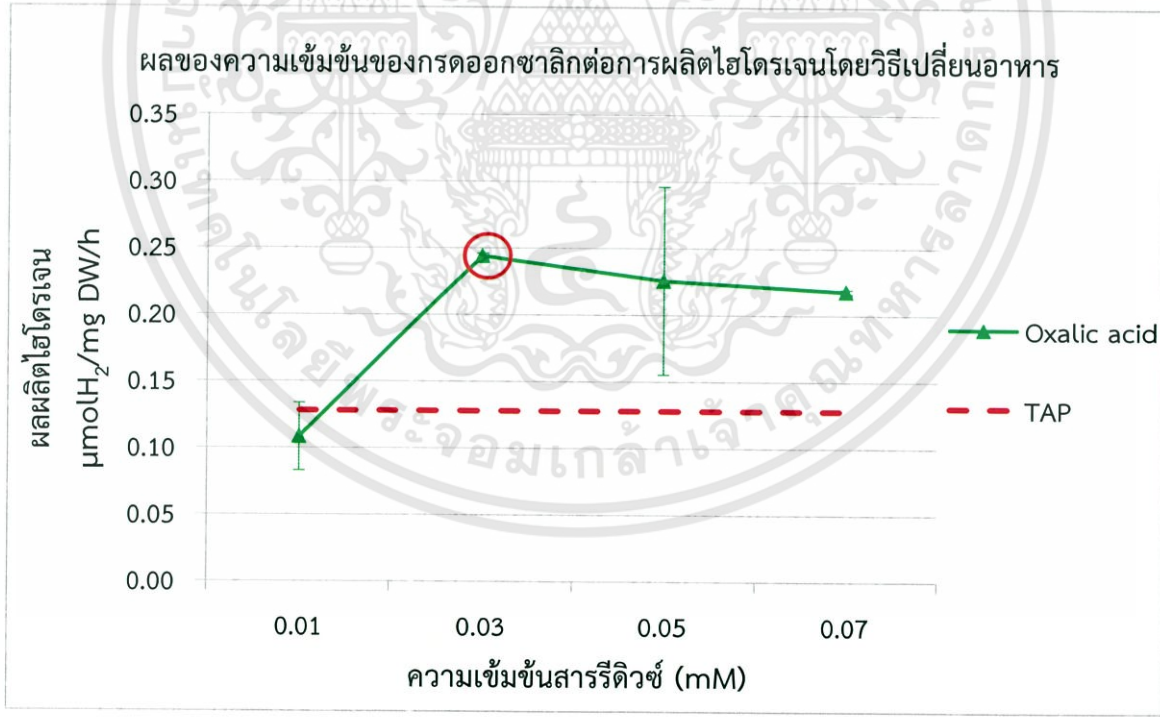


รูปที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไทโอซัลเฟตต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีเปลี่ยนอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีเปลี่ยนอาหาร



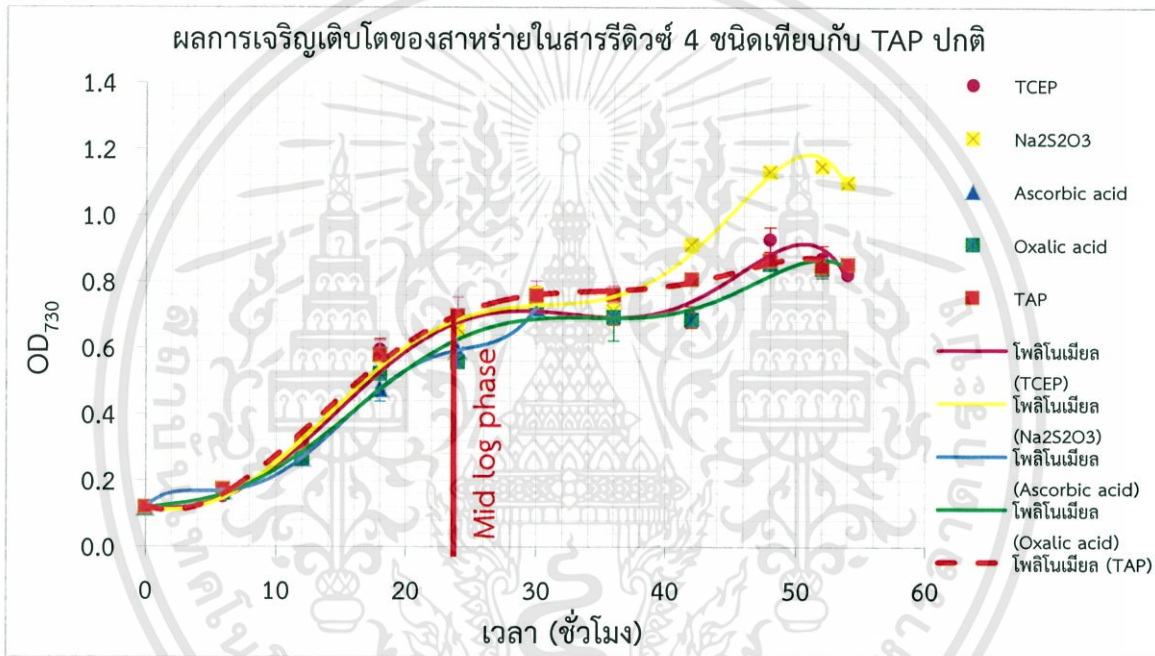
รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของกรดออกซาลิกต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีเปลี่ยนอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายในสารรีดิวซ์ต่างๆ

การเจริญเติบโตของสาหร่ายในสารรีดิวซ์ต่างๆ ทำได้โดยเพาะเลี้ยงสาหร่าย (สภาวะในตู้บ่มดังแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 2.7) มีอาหารเหลวปริมาตร 20 mL เติมสารรีดิวซ์ทั้ง 4 ชนิด ความเข้มข้นตามตารางที่ 4.3 โดยสาหร่ายมีความขุ่นเริ่มต้น (OD_{730} = 0.1) เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน (48 ชั่วโมง) วัดความขุ่นทุก 6 ชั่วโมง โดยเทียบกับตัวควบคุม (control) คือ TAP ซึ่งเป็นอาหารปกติที่นิยมใช้

ผลการทดลองพบว่า เวลาที่เซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด (mid log phase) ในสารรีดิวซ์ต่างๆ คือ เลี้ยงครบ 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับตัวควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายในสารรีดิวซ์ 4 ชนิดเทียบกับ TAP ปกติ

หลังจากนั้นจึงทำการทดลองต่อโดยวัดการผลิตไฮโดรเจนใน 2 ระบบ คือ แบบต่อเนื่องจากการเลี้ยง และแบบเปลี่ยนอาหารเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง

4.6 ผลการผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลา

เนื่องจากต้องการศึกษาว่าหากผลิตไฮโดรเจนในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น ปริมาณไฮโดรเจนจะเป็นอย่างไร จึงได้ออกแบบการทดลองเป็น 2 แบบ

4.6.1 ผลการผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องจากการเลี้ยง (non-adaptation)

ทำได้โดยเลี้ยงสาหร่าย (สภาวะในตู้บ่มดังแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 2.7) ในอาหารเหลวสูตร TAP แล้วใส่สารรีดิวซ์ TCEP 1.0 mM, โซเดียมไทโอซัลเฟต 10 mM, กรดแอสคอร์บิก 0.10 mM และกรด

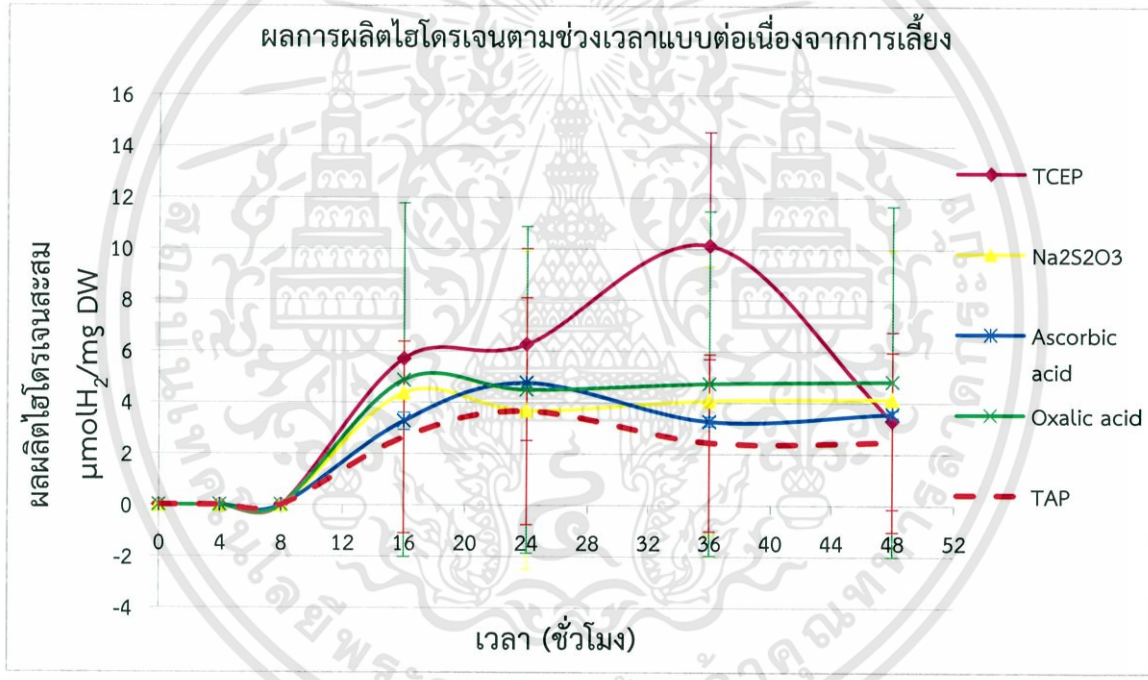
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซาลิก 0.03 mM เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งมาวัดค่าความขุ่น (OD_{730}) แล้วบ่มต่อเนื่องเป็นเวลา 48 ชั่งโมง โดยนำมาวัดผลผลิตไฮโดรเจนทุก 4, 8, 16, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่า 8 ชั่วโมงแรกไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น หลังจากนั้นพบว่า กรดออกซาลิกและโซเดียมไทโอซัลเฟตจะเริ่มให้ผลการผลิตไฮโดรเจนสะสมคงที่ที่ 16 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณ 4.88 และ 4.38 $\mu molH_2/mg$ DW ตามลำดับ

สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP และในกรดแอสคอร์บิกจะเริ่มให้ผลการผลิตไฮโดรเจนสะสมคงที่ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณ 3.67 และ 4.77 $\mu molH_2/mg$ DW ตามลำดับ

และสาหร่ายที่เลี้ยงใน TCEP จะเริ่มให้ผลการผลิตไฮโดรเจนสะสมคงที่ที่ 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะให้ผลการผลิตไฮโดรเจนสะสมเพิ่มสูงขึ้นเป็นปริมาณ 10.13 $\mu molH_2/mg$ DW เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ดังนั้นจากผลการทดลองสรุปได้ว่า TCEP 1.0 mM ให้ผลการผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงที่สุดโดยใช้วิธีแบบต่อเนื่องจากการเลี้ยงเมื่อบ่มสาหร่ายเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.7



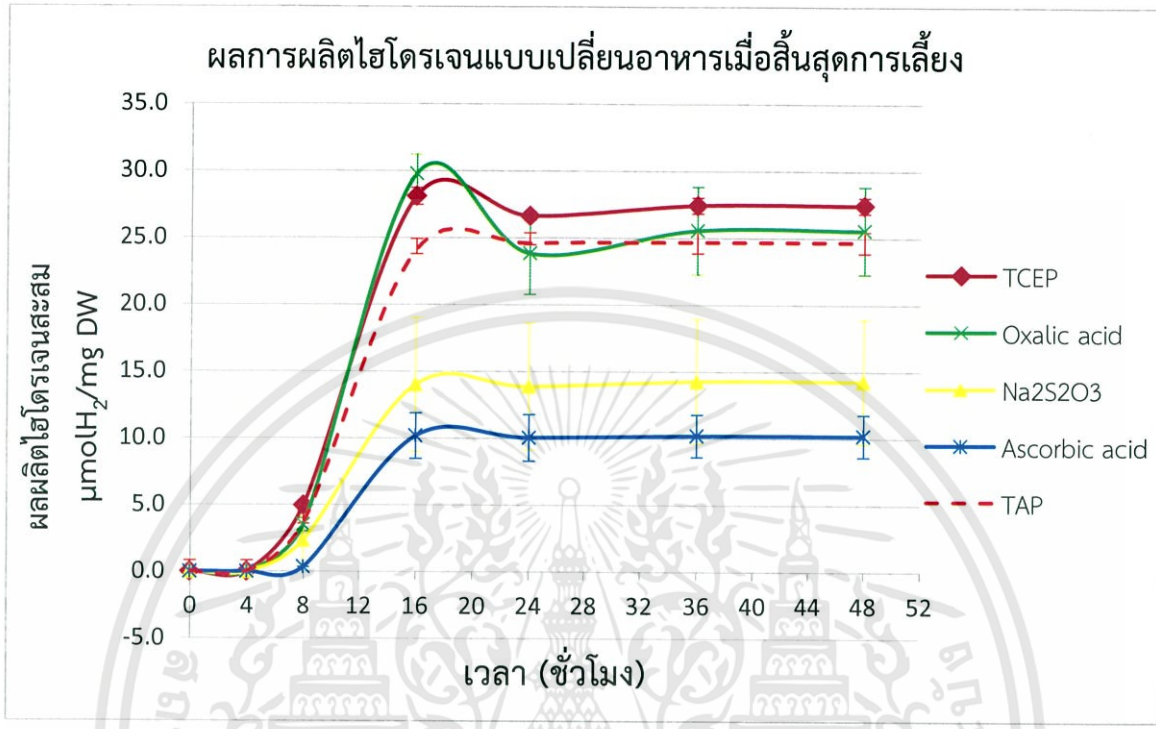
รูปที่ 4.7 ผลการผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลาแบบต่อเนื่องจากการเลี้ยง

4.6.2 ผลการผลิตไฮโดรเจนแบบเปลี่ยนอาหารเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง (adaptation)

ทำการทดลองเหมือนข้อ 4.6.1 ต่างกันตรงที่การเลี้ยงเริ่มต้นไม่ใส่สารรีดิวซ์แต่เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการปั่นเก็บเซลล์ไปกระจายใน TAP ใหม่พร้อมกับเติมสารรีดิวซ์ชนิดต่างๆ จากผลการทดลองพบว่า 8 ชั่วโมงแรกไม่มีการผลิตไฮโดรเจน หลังจากนั้นพบว่าสารรีดิวซ์ทุกตัวรวมถึงอาหาร TAP ปกติจะเริ่มให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมคงที่ที่ 16 ชั่วโมง โดยพบว่ากรดออกซาลิก 0.03 mM และ TCEP 1.00 mM ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงที่สุดปริมาณ 29.78 $\mu molH_2/mg$ DW และ 28.13 $\mu molH_2/mg$ DW

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมมากกว่าวิธีการผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องจากการเลี้ยงในช่วง 3-10 เท่า ผลแสดงดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 ผลการผลิตไฮโดรเจนแบบเปลี่ยนอาหารเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 ผลของการเลือกชนิดสารรีดิวซ์

จากการเลือกชนิดของสารรีดิวซ์ได้สารรีดิวซ์ 7 ชนิด คือ โซเดียมไทโอซัลเฟต, ทิน(II)คลอไรด์, โพแทสเซียมไอโอไดด์, เบตาเมอร์แคปโทเอทานอล, ทริส(2-คาร์บอกซีเอทิล)ฟอสฟีน ไฮโดรคลอไรด์ (TCEP), กรดออกซาลิก และ กรดแอสคอร์บิก

5.1.2 ผลของการคัดกรองความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ของสารรีดิวซ์ 7 ชนิด

จากการคัดกรองความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ของสารรีดิวซ์ พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งหมด จึงสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM เหมาะที่จะใช้ในการทดลอง เพราะสาหร่ายเจริญเติบโตได้ดี

5.1.3 ผลของความเข้มข้นต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากการวัดปริมาณไฮโดรเจน พบว่าสารรีดิวซ์ต่อไปนี้ให้ผลผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าอาหาร TAP ปกติ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 0.10 mM, โซเดียมไทโอซัลเฟต ความเข้มข้น 10.0 mM, ทริส(2-คาร์บอกซีเอทิล)ฟอสฟีน ไฮโดรคลอไรด์ (TCEP) ความเข้มข้น 1.00 mM, และกรดออกซาลิก ความเข้มข้น 0.03 mM ตามลำดับ

5.1.4 ผลของการผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลา

จากการผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลาทั้ง 2 วิธี คือ การผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องจากการเลี้ยง (non-adaptation) และการผลิตไฮโดรเจนแบบเปลี่ยนอาหารเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง (adaptation) พบว่า TCEP 1.00 mM และ กรดออกซาลิก 0.03 mM ให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดในแต่ละวิธี โดยให้ผลผลิตเท่ากับ 10.13 และ 29.78 $\mu molH_2/mg$ DW ตามลำดับ เมื่อเทียบกับอาหาร TAP ที่ไม่ได้เติมสารรีดิวซ์

5.1.5 ผลของการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ดีที่สุด

จากข้อสมมติฐานว่า หากจำนวนอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นด้วย จึงใช้สารรีดิวซ์ที่มีค่ารีดักชั่นมาตรฐานต่ำ (สารนั้นยิ่งให้อิเล็กตรอนได้ดี) เป็นตัวให้อิเล็กตรอนโดยส่งผลให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น จากผลการทดลองพบว่า กรดออกซาลิกให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด โดยมีค่ารีดักชั่นมาตรฐานเท่ากับ -0.49 ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในช่วงของระบบแสง II และ I สารรีดิวซ์จึงให้อิเล็กตรอนแก่ระบบได้ซึ่งส่งผลให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าอาหาร TAP ปกติ

อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ในสภาวะที่ดีที่สุดจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้ 123.49% เมื่อเทียบกับอาหาร TAP ที่ไม่ได้เติมสารรีดิวซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทำโครงงานพิเศษซึ่งเป็นการศึกษาผลของสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 สามารถสรุปของเสนอแนะเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปได้ดังนี้

1. สารรีดิวซ์มีความไวต่อสภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น แสง และอุณหภูมิ จึงควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้งาน หากมีความจำเป็นไม่สามารถเตรียมใหม่ได้ ควรเก็บรักษาในสภาวะที่เหมาะสมและไม่ควรเก็บไว้เป็นเวลานานเพื่อประสิทธิภาพที่ดีในการใช้งาน เนื่องจาก TCEP ที่สั่งซื้อมีปริมาณไม่เพียงพอในการทดลองซึ่งไม่สามารถเตรียมใหม่ได้ทุกครั้ง จึงเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นทำให้สารมีประสิทธิภาพลดลง

2. การเลือกสารรีดิว์ควรเลือกสารที่เมื่อละลายแล้วไม่เป็นสีขาวขุ่น เนื่องจากมีผลต่อการบดบังแสงทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้น้อยลง

3. ควรขีด plate และทำ starter ใหม่ทุก 1 อาทิตย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของสาหร่ายซึ่งส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

สรัญญา พันธุ์พฤกษ์, อรัญ อินเจริญศักดิ์. 2557. **การผลิตไบโอไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่แยกได้จากนาข้าวของประเทศไทย.** [online]. Available : file:///C:/Users/Administrator/Downloads/Abstract_185514%20(1).pdf เข้าถึงเมื่อวันที่ 11 กันยายน 2559

วัชระ เวียงแก้ว. 2554. **รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่องการสกัดไขมันจากจุลสาหร่าย.** [online]. Available : file:///C:/Users/Administrator/Downloads/Fulltext%233_55639%20(1).pdf เข้าถึงเมื่อวันที่ 11 กันยายน 2559

ขนิษฐา หมู่โสภิญ. 2553. **ไบโอไฮโดรเจน พลังงานทางเลือกใหม่**. [online]. Available : http://home.kku.ac.th/uac/journal/year_18_3-4_2553/3.pdf เข้าถึงเมื่อวันที่ 11 กันยายน 2559

Ripoll N. , Silvestre C. , Paredes E. , Toledo M. Hydrogen production from algae biomass in rich natural gas-air filtration combustion. Int Hydrogen Energy 2016. p.1-9

Yin Y. , Hu J. , Wanga J. Gamma irradiation as a pretreatment method for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. Int Hydrogen Energy 2016;39:13543-49.

Gabrielyan L. , Sargsyan H. , Hakobyan L. , Trchounian A. Regulation of hydrogen photoproduction in Rhodobacter sphaeroides batch culture by external oxidizers and reducers. Int Appl Energy 2014;131:20-25

Laurinavichene T. , Laurinavichius K. , Belokopytov B. , Laurinavichyute D. , Tsygankov A. Influence of sulfate-reducing bacteria, sulfide and molybdate. Int Hydrogen Energy 2013;38:5545-54.

Tamburic B. , Zemichael F. , Maitland G. , Hellgardt K. A novel nutrient control method to deprive green algae of sulphur and initiate spontaneous hydrogen production. Int Hydrogen Energy 2012;37:8988-9001.

Dubini A. Biofuel production from Chlamydomonas reinhardtii Green energy. The Biochemical Society; 2011. p. 20-22.

Srirangan K. , Pyne M. , Chou P. Biochemical and genetic engineering strategies to enhance hydrogen production in photosynthetic algae and cyanobacteria. Bioresource Technology 2011;102: 8589–8604.

Maneeruttanarungroj C., Lindblad P., Incharoensakdi A. A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. Int Hydrogen Energy 2010;35:13193-99.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Villano M. , De Bonis L. , Rossetti S. , Aulenta F., Majone M. Bioelectrochemical hydrogen production with hydrogenophilic dechlorinating bacteria as electrocatalytic agents. Bioresource Technology 2011;102:3193-99.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีการเลี้ยงสาหร่าย

1. การเตรียมอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) แบบเหลว (ที่มา : Culture Collection of Cryophilic Algae)

1.1 ชั่งสาร Tris ปริมาณ 24.2 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL คนสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ให้เป็นสารละลาย ขวดที่ 1

1.2 ชั่งสาร NH_4CL ปริมาณ 3.75 g $Mg.SO_4 \cdot 7H_2O$ ปริมาณ 1.00 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ปริมาณ 0.05 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 250 mL คนสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL ให้เป็นสารละลาย ขวดที่ 2

1.3 ชั่งสาร K_2HPO_4 ปริมาณ 2.88 g KH_2PO_4 ปริมาณ 1.44 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL คนสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ให้เป็นสารละลาย ขวดที่ 3

1.4 ชั่ง $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ ปริมาณ 0.50 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ปริมาณ 0.22 g H_3BO_3 ปริมาณ 0.114 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ปริมาณ 0.05 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ปริมาณ 0.05 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ปริมาณ 0.016 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ปริมาณ 0.016 g $(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ปริมาณ 0.007 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL คนสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ให้เป็นสารละลาย ขวดที่ 4

1.5 CH_3COOH con. 100% ให้เป็น ขวดที่ 5

1.6 นำสารละลายที่ได้ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 mL โดยปิเปตสารละลายขนาด ต่างๆ ดังนี้

สารละลายขวดที่ 1 ปิเปตปริมาตร 10 mL

สารละลายขวดที่ 2 ปิเปตปริมาตร 25 mL

สารละลายขวดที่ 3 ปิเปตปริมาตร 1 mL

สารละลายขวดที่ 4 ปิเปตปริมาตร 1 mL

สารละลายขวดที่ 5 ปิเปตปริมาตร 1 mL

จากนั้นเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 mL จะได้อาหาร TAP แบบเหลวขนาด 1,000 mL นำไปแช่ในตู้แช่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) แบบวุ้น (ที่มา : Culture Collection of Cryophilic Algae)

2.1 การเตรียม Ampicillin

นำผง Ampicillin ปริมาณ 200 mg ใส่ในหลอด Eppendorf เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

2.2 การผสม TAP วุ้น

เติมอาหาร TAP ปริมาตร 500 mL ในโหลแก้ว 1,000 mL เติมผงวุ้นปริมาณ 7.5 g (1.5%) ลงในโหลแก้ว คนสารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็นแล้วนำอาหาร TAP มาเติมสาร Ampicillin ปริมาณ 20 mg/ml โดยใช้ไมโครปิเปต จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำสารละลายที่ได้มาเทใส่จานเพาะเชื้อ

2.3 การเตรียมจุกปิด flask

นำผ้าก็อตหรือผ้าขาวบาง มาห่อสำลี แล้วลองนำมาปิด flask ให้มีขนาดพอดี ไม่หลวมและไม่แน่นจนเกินไป

2.4 Plate Streaking

ขูดสาหร่ายจากหัวเชื้อประมาณ 1 loop แล้วนำมาขีดในเพลทที่มี TAP วุ้น นำสาหร่ายไปบ่มในเครื่องบ่ม รอให้สาหร่ายเจริญเติบโตประมาณ 5 วัน (ขั้นตอนทุกอย่างทำในตู้ปลอดเชื้อ โดยเปิดแสง UV เพื่อฆ่าเชื้อก่อนทำ 15 นาที)

2.5 การเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่าย

นำสาหร่ายจากข้อ 3.3.4 มาประมาณ 1 loop ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 mL ที่มีอาหาร TAP แบบเหลวอยู่ปริมาตร 50 mL ใช้จุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปิด แล้วนำเข้าเครื่องบ่มเป็นเวลา 2 วัน เพื่อเพิ่มจำนวนสาหร่าย

2.6 การทำ Starter

นำสาหร่ายจากข้อ 1.5 ปริมาตร 50 mL ใส่ในหลอดเซ็นติฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่ใสทิ้งปริมาตร 45 mL ที่เหลือ 5 mL นำมาใช้เป็น Starter ปิเปต Starter ปริมาตร10 µL (โดยใช้ไมโครปิเปต) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 990 µL นำไปวัดค่าความขุ่น OD_{730} เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณสาหร่ายที่ต้องปิเปต โดยต้องการให้มีความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1

2.7 สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย

เลี้ยงสาหร่ายในตู้บ่มเชื้อภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 36 °C ความเข้มแสง 1,500 lux และความเร็วรอบ 3,000 rpm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการคำนวณ

1. การคำนวณหาความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่ต้องใช้

ใช้สูตร $g = Mw \times C \times V$

g = น้ำหนักของสารที่ต้องชั่ง

Mw = มวลโมเลกุลของสารรีดิวซ์

C = ความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่ต้องการ

V = ปริมาตรที่ต้องการใช้

ตัวอย่าง คำนวณหาความเข้มข้นของ $Na_2S_2O_3$ ที่ต้องใช้ในขวดปรับปริมาตร 10 mL

Mw = 158.11 g/mol

V = 0.01 L

C = 0.1 M

g = 158.11 g/mol × 0.1 mol/L × 0.01 = 0.1581 g

ดังนั้น ต้อง $Na_2S_2O_3$ เท่ากับ 0.1581 g

2. การคำนวณการใช้ Stock สารรีดิวซ์ในแต่ละครั้ง

ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

C_1 = ความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่ต้องการใช้

V_1 = ปริมาตรของอาหารTAP

C_2 = ความเข้มข้นของ Stock สารรีดิวซ์

V_2 = ปริมาณของสารรีดิวซ์ที่ต้องการใช้

ตัวอย่าง หาปริมาณของ $Na_2S_2O_3$ ความเข้ม 10 mM ที่ต้องใช้ในอาหาร TAP ปริมาตร 60 mL ความเข้มข้นของ Stock เท่ากับ 10^3 mM

ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

จะได้ $(10\ mM) \times (60\ mL) = (10^3\ mM) \times V_2$

$$V_2 = \frac{(10\ \cancel{mM}) \times (60\ mL)}{(10^3\ \cancel{mM})}$$

V_2 = 0.6 mL หรือ 600 µL

ดังนั้น ปริมาณของ $Na_2S_2O_3$ ที่ต้องใช้คือ 600 µL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของสาหร่ายที่ต้องการใช้

วัด OD ของสาหร่ายโดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 730 nm

สมมติ วัด UV_{730} = 0.150 nm

= 0.150 nm × 100

= 15nm

ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

C_1 = ความเข้มแสงของสาหร่ายที่วัดได้

V_1 = ปริมาณของสาหร่ายที่ต้องการใช้

C_2 = ความเข้มแสงของสาหร่ายที่ต้องการใช้

V_2 = ปริมาตรอาหารTAP

ตัวอย่าง หาปริมาณของสาหร่ายที่ต้องใช้ในอาหาร TAP 500 mL

จะได้ $(15\ nm) \times V_1 = (0.01\ nm) \times (500\ mL)$

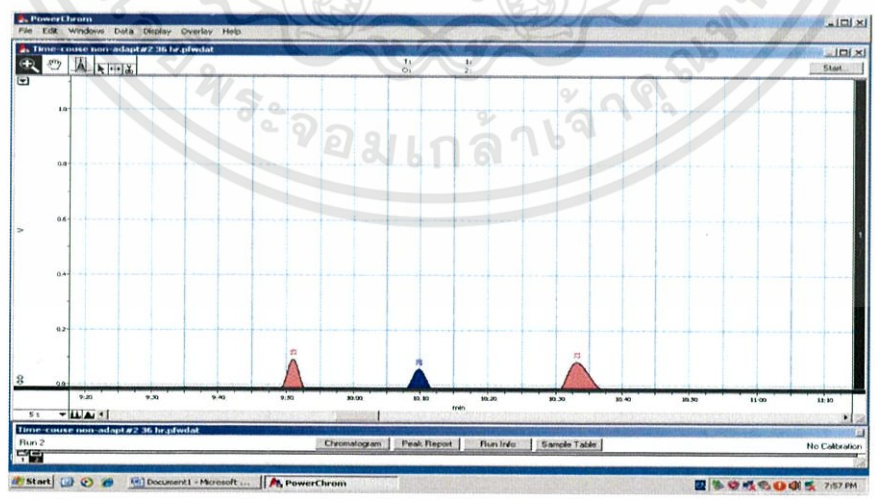
$$V_1 = \frac{(0.01\ \cancel{nm}) \times (500\ mL)}{(15\ \cancel{nm})}$$

= 0.333 mL หรือ 333 µL

ดังนั้น ปริมาณของสาหร่ายที่ต้องใช้คือ 333 µL

4. วิธีการคำนวณหาปริมาณไฮโดรเจนที่วัดได้

การแสดงผลพีคจากการฉีดตัวอย่างด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีโดยใช้โปรแกรม eDAQ Power chrom พีคไฮโดรเจนจะขึ้นหลังจากฉีดเป็นเวลา 30 วินาที หลังจากพีคไฮโดรเจนขึ้น 20 วินาที จะเป็นพีคออกซิเจน และหลังจากพีคออกซิเจนขึ้น 20 วินาที จะเป็นพีคไนโตรเจน



รูปที่ ข-1 ตัวอย่างการแสดงผลพีคไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณ

Standard (4%H_2) มีพื้นที่ = 1,500 mV.S

ตัวอย่างพีคไฮโดรเจน มีพื้นที่ = 100 mV.S

4.1 หา Head Space ว่ามีไฮโดรเจนกี่โมล

ฉีดตัวอย่าง 0.4 mL ได้ area = 100 mV.S (4%H_2 Standard = 1,500 mV.S)

4.1.1 ถ้าพื้นที่ 1,500 จะเข้มข้น 4%

ถ้าพื้นที่ 100 จะเข้มข้น $\frac{100\times4\%}{1,500}$ = 0.267%

4.1.2 ถ้าปริมาตร 100 mL จะมีไฮโดรเจน 0.267 mL

ถ้าปริมาตร 8.4 mL จะมีไฮโดรเจน $\frac{8.4\times0.267}{100}$ = 0.022428 mL

8.4 เกิดจาก $V_{headspace} + V_{กระบอกฉีด}$

(8 mL) + (0.4 mL) = 8.4 mL

4.1.3 ก๊าซ 22.4 L มีปริมาณ 1 mol

ก๊าซ 0.022428 mL มีปริมาณ $\frac{0.022428\ mL \times 1\ mol}{22.4\ L}$

$= 1.00125 \times 10^{-3}$

= 1.00125 µmol

4.2 หาว่าเซลล์มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่าไหร่

จากสมการ y = 1.7915x

y = ค่า OD_{730} ที่วัดได้

x = น้ำหนักของเซลล์แห้ง

สมมติว่าวัด OD_{730} = 0.128

จะได้ 0.128 = 1.7915x

$x = \frac{0.128}{1.7915} \times 5$ mL

= 0.3572 mg

4.3 เวลาในการบ่มเพื่อฉีด GC

สมมติว่าบ่ม 4 ชั่วโมง

4.4 คำนวณหาอัตราการผลิตไฮโดรเจนในหน่วย µmolH_2/mgDW/hr

จะคำนวณได้จาก 4.1.3/4.2/4.3

แทนค่าได้ 1 µmolH_2/0.3572 mgDW/4 hr

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

= 0.7 μmolH_2/mgDW/hr

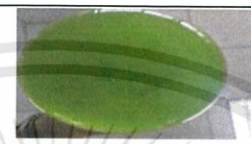
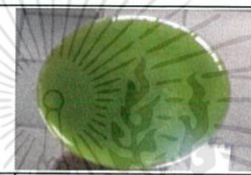
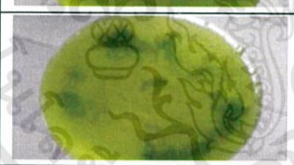
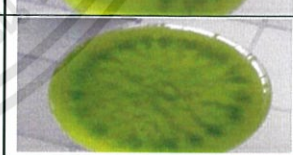
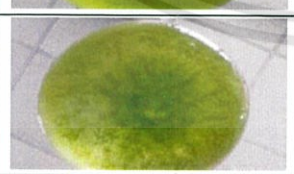
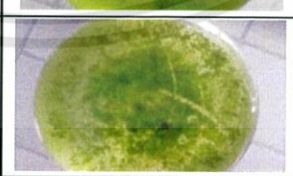
= 700 mmolH_2/mgDW/hr

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

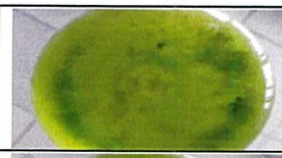
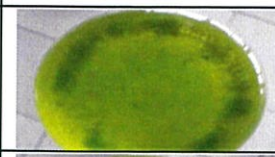
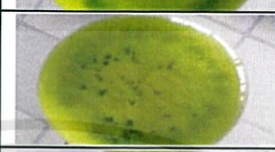
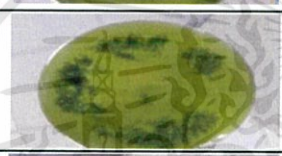
ผลการคัดกรองความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ของสารรีดิวซ์ 7 ชนิด

ตารางที่ ค-1 ผลการคัดกรองความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mM ของสารรีดิวซ์ 7 ชนิด โดยพิจารณาจากปริมาณตะกอนของสาหร่ายหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน

	ซ้ำ	3 วัน (72 ชั่วโมง)		
อาหาร TAP ปกติ	1			
	2			
สารรีดิวซ์	**ซ้ำ**	**0.01 mM**	**0.1 mM**	**1 mM**
กรดออกซาลิก	1			
	2			
กรดแอสคอร์บิก	1			
	2			
เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล	1			
	2			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-1 (ต่อ)

สารรีดิวซ์	ซ้ำ	3 วัน (72 ชั่วโมง)		
		0.01 mM	0.1 mM	1 mM
TCEP	1			
	2			
โพแทสเซียมไอโอไดด์	1			
	2			
ทิน(II) คลอไรด์	1			
	2			
โซเดียมไทโอซัลเฟต	1			
	2			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้