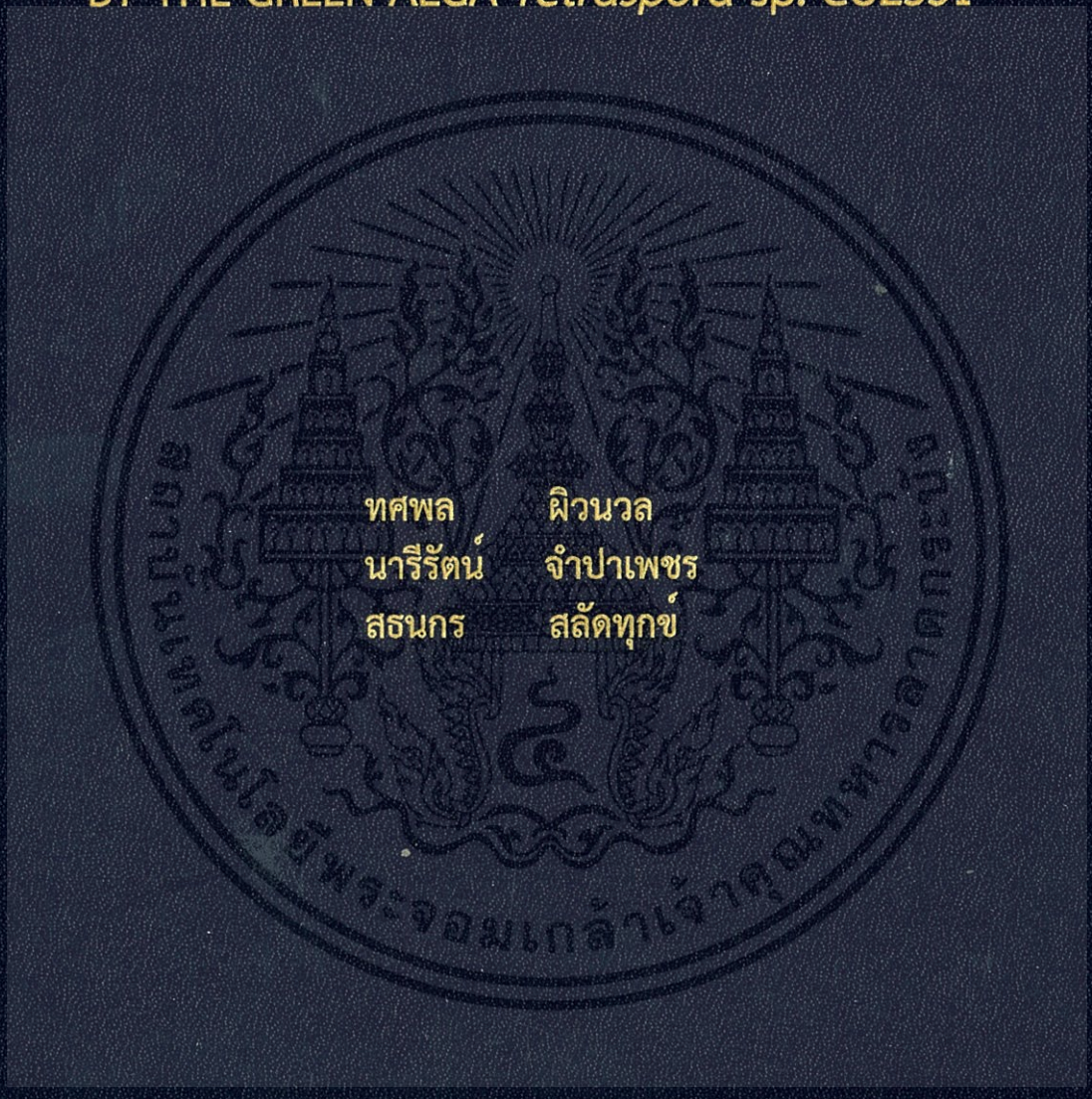
ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

NUTRIENT DEFICIENCY ON HYDROGEN PRODUCTION BY THE GREEN ALGA *Tetraspora* sp. CU2551



ทศพล ผิวนวล
นารีรัตน์ จำปาเพชร
สธนกร สลัดทุกข์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

NUTRIENT DEFICIENCY ON HYDROGEN PRODUCTION BY THE GREEN ALGA *Tetraspora* sp. CU2551

T149328

ทศพล ผิวนวล
นารีรัตน์ จำปาเพชร
สธนกร สลัดทุกข์

เลขหมู่ 149328
เลขทะเบียน
วัน. เดือน. ปี 12 ก.พ. 2561
.b 12881983
.I

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NUTRIENT DEFICIENCY ON HYDROGEN PRODUCTION BY THE GREEN ALGA *Tetraspora* sp. CU2551

TOTSAPON PEWNUAL
NARIRAT JAMPAPETCH
SATHONKORN SALADTOOK

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	ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551		
	Nutrient Deficiency on Hydrogen Production by The Green alga *Tetraspora* sp. CU2551		
ชื่อนักศึกษา	นายทศพล	ผิวนวล	รหัสนักศึกษา 56050697
	นางสาวนารีรัตน์	จำปาเพชร	รหัสนักศึกษา 56050710
	นางสาวสธนกร	สลัดทุกข์	รหัสนักศึกษา 56050764
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)		
ภาควิชา	เคมี		
ปีการศึกษา	2559		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์		

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

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.เอกรัฐ เดชศรี ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน กรรมการ	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551
ชื่อนักศึกษา	นายทศพล ผิวนวล รหัสนักศึกษา 56050697
	นางสาวนารีรัตน์ จำปาเพชร รหัสนักศึกษา 56050710
	นางสาวสธนกร สลัดทุกข์ รหัสนักศึกษา 56050764
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา	เคมี
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

ก๊าซไฮโดรเจนได้ถูกพิจารณาให้เป็นแหล่งพลังงานทางเลือกในอนาคตที่เหมาะสม และยังถูกคาดว่าจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเศรษฐกิจโลกด้วยคุณสมบัติที่ดีของพลังงานนี้ มีการพบว่าสาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยสาหร่ายสีเขียวจะนำเอาพลังงานแสงอาทิตย์มาเปลี่ยนให้เป็นพลังงานไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง โครงงานพิเศษนี้ศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ในการศึกษานี้ได้เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ปราศจากธาตุอาหารจำนวน 7 ชนิด พบว่าการขาดโพแทสเซียมและแมกนีเซียมส่งผลให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น คิดเป็น 9.18 และ 4.41 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ (3.5 และ 1.7 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับอาหาร TAP) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการขาดโพแทสเซียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงนั้น ทำให้เกิดผลผลิตของก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุด คิดเป็น 14.45 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง คิดเป็น 1.5 เท่าของอาหาร TAP การศึกษาได้ชี้ให้เห็นว่าปริมาณไฮโดรเจนที่สูงขึ้นนั้นเกิดจากปริมาณแป้งในเซลล์ลดลงเหลือ 0.0671 มิลลิกรัมแป้งต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง หรือน้อยกว่าแป้งในเซลล์จากอาหาร TAP 89.16% และเกิดจากการผลิตออกซิเจนเท่ากับ 0 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง เอ็นไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณไฮโดรเจนที่สูงขึ้น

คำสำคัญ: สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551, การขาดธาตุอาหาร, โพแทสเซียม, ก๊าซไฮโดรเจน, ระบบแสงสอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Nutrient Deficiency on Hydrogen Production by The Green alga *Tetraspora* sp. CU2551			
Students	Mr. Totsapon	Pewnual	Student ID	56050697
	Miss. Narirat	Jampapetch	Student ID	56050710
	Miss. Sathonkorn	Saladtook	Student ID	56050764
Degree	Bachelor of Science (Environmental Chemistry)			
Department	Chemistry			
Faculty	Science			
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)			
Academic Year	2016			
Advisor	Dr.Cherdsak Maneeruttanarungroj			

Abstract

Hydrogen is considered to be a suitable alternativel energy source in the future, and is expected to contribute to a growth of the world's economy by some remarkable charcteristics of this energy. Green algae are discovered in capable with hydrogen production using sunlight to hydrogen energy transformation through photosynthetic reaction. This study focused on the nutrient deprivation to hydrogen production in green alga *Tetraspora* sp. CU2551. Deprivation in 7 nutrients revealed that potassium and magnesium increased the production yielding 9.18 and 4.41 umol/mgDW, respectively (or 3.5 and 1.7 folds compared to TAP medium). Moreover, potassium deprivation for 24 hr was also maximized the production yielding 14.45 umol/mgDW. (1.5 folds compared to TAP medium) The study also indicated that the increasing production was resulted from starch accumulation decresing to 0.0671 mg starch/ mgDW (or 89.16% of starch in TAP-growing cells) Oxygen production rate was remained at 0 nmol/min/mgDW. Hydrogenase enzyme could be effectively function resulting in more hydrogen production.

Keywords: *Tetraspora* sp. CU2551, Deficiency, Potassium, Hydrogen, Photosystem II

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของทุกๆ ท่าน ขอขอบพระคุณ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ที่คอยให้คำปรึกษาดูแลอย่างใกล้ชิด และให้ความช่วยเหลือแนะนำที่ดีในการปรับปรุงข้อบกพร่องในการทำโครงงานพิเศษ และขอขอบพระคุณกรรมการสอบโครงงานพิเศษ คือ ผศ.ดร.เอกรัฐ เดชศรี และ ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน ที่ให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี คุณชัชชัย ลัทธิลักขณา คุณสาคร สอนพงษ์ คุณณัฐพล ไกรธรรม คุณปราณี บุญวัฒน์ และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดหาอุปกรณ์ในการดำเนินโครงงานพิเศษและอำนวยความสะดวก ในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่อาคารจุฬาภรณ์ 1 และอาคารพระจอมเกล้า ที่อำนวยความสะดวก และให้ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือ

ขอขอบพระคุณ คุณอภิรดี โพธิพงศา เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวก ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำในการใช้เครื่องวัดปริมาณออกซิเจน

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เสาวรัตน์ จันทโร อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือวัดปริมาณออกซิเจน ในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ให้ได้รับการศึกษา ตลอดจนคอยเลี้ยงดูและอบรมสั่งสอน และเป็นกำลังใจเป็นแรงผลักดันในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงเพื่อนๆ และบุคคลอื่นๆ ที่ไม่ได้กล่าวมา ผู้จัดทำโครงงานขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ทศพล ผิวนวล
นารีรัตน์ จำปาเพชร
สธนกร สลัดทุกข์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูป ..... ฌ
คำย่อ/สัญลักษณ์ (ถ้ามี) ..... ญ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ไฮโดรเจน 3
2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน 4
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี 4
2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า 5
2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตไลซิส 6
2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย 7
2.4 สาหร่ายสีเขียว 8
2.4.1 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว 9
2.4.2 สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์ 9
2.5 แหล่งที่อยู่ของสาหร่าย 9
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย 9
2.7 การขาดองค์ประกอบของธาตุอาหาร 10
2.8 การวัดค่าการทำงานของระบบแสงสอง (PSII) 11
2.8.1 การวัดด้วยสารเคมี 11
2.8.2 การวัดด้วยเครื่องวัดฟลูออเรสเซนต์ 12
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.9.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว 12
2.9.2 การขาดธาตุอาหารของสาหร่าย 13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 14
3.1 สาหร่ายสีเขียว 14
3.2 สารเคมีและอุปกรณ์ 14
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย 14
3.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจน 14
3.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับกระบวนการตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง 14
3.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับกระบวนการตรวจสอบหาปริมาณแป้ง 14
อุปกรณ์ 15
3.3 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 และวิธีการวัดปริมาณเซลล์ 15
3.4 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP เพื่อวัดค่าการเจริญเติบโต 16
3.4.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ 16
3.5 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน 16
3.5.1 การหาปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อขาดธาตุอาหารทันที 16
3.5.2 การหาปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อขาดธาตุอาหารเป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนการผลิต 16
3.6 วิธีการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 17
3.7 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP สำหรับกระบวนการตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง 18
3.8 วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้สำหรับตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสองของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 18
3.8.1 Indophenol dye 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.8.2 สาร 2, 6-Dichloroindophenol (DCPIP) 18
3.8.3 Grinding buffer 18
3.9 วิธีตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์ 19
Tetraspora sp. CU2551
3.9.1 ตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์ 19
Tetraspora sp. CU2551 โดยใช้ Indophenol dye
3.9.2 ตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์ 19
Tetraspora sp. CU2551 โดยใช้ 2, 6-Dichloroindophenol (DCPIP)
3.9.3 ตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์ 19
Tetraspora sp. CU2551 ด้วยวิธี Oxygen electrode
3.9.3.1 วิธีการเตรียมเซลล์ 19
3.9.3.2 วิธีการวัดปริมาณออกซิเจน 20
3.10 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 20
ในอาหาร TAP สำหรับกระบวนการตรวจสอบหาปริมาณแป้ง
3.11 วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้สำหรับตรวจสอบปริมาณแป้งของสาหร่าย 20
สายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551
3.11.1 Anthrone 20
3.12 วิธีการตรวจสอบปริมาณแป้งของสาหร่ายสายพันธุ์ 21
Tetraspora sp. CU2551
3.12.1 การตรวจสอบปริมาณแป้งด้วยวิธีไอโอดีน 21
3.12.2 การตรวจสอบปริมาณแป้งด้วยวิธี Anthrone 21
3.12.2.1 การทำกราฟมาตรฐาน 21
3.12.2.2 การนำเซลล์มาใช้เพื่อหาปริมาณแป้ง 22
3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 23
4.1 การวัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 23
เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP 7 ชนิด
4.2 การวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ 24
Tetraspora sp. CU2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.2.1 ค่าไฮโดรเจนจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 24
เมื่อขาดธาตุอาหารทันทีก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน
4.2.2 ค่าไฮโดรเจนจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 25
เมื่อขาดธาตุอาหารเป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน
4.3 การวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์..... 26
Tetraspora sp. CU2551 ในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียมตามเวลาที่กำหนด
4.4 การวัดการทำงานของระบบแสงสองที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง..... 27
ของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP
และ TAP-K
4.4.1 ตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์..... 28
Tetraspora sp. CU2551 โดยใช้ Indophenol dye
4.4.2 ตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์..... 28
Tetraspora sp. CU2551 โดยใช้ 2, 6-Dichloroindophenol (DCPIP)
4.4.3 ตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์..... 29
Tetraspora sp. CU2551 โดยใช้ Oxygen Electrode
4.5 การหาปริมาณแป้งจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551..... 30
ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP 7 ชนิด
4.5.1 วิธีไอโอดีน (I_2)..... 30
4.5.2 วัดด้วยวิธี Anthrone..... 31
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 33
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 33
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 35
เอกสารอ้างอิง..... 36
ภาคผนวก..... 38
ภาคผนวก ก..... 39
ภาคผนวก ข..... 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ..... 17

3.2 ตารางแสดงอัตราส่วนการเตรียมสารละลายการทำกราฟมาตรฐานแป้ง 21

ก.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร Tris-Acetate-Phosphate 39
(TAP-medium)

ก.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-K (TAP ที่ปราศจากโพแทสเซียม) 40

ก.3 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-S (TAP ที่ปราศจากกำมะถัน)..... 41

ก.4 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-Mg (TAP ที่ปราศจากแมกนีเซียม) 42

ก.5 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-Cu (TAP ที่ปราศจากทองแดง) 43

ก.6 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-Cu (TAP ที่ปราศจากทองแดง) 44

ก.7 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-Fe (TAP ที่ปราศจากเหล็ก) 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ประโยชน์ของพลังงานไฮโดรเจน	4
2.2 การสลายตัวด้วยความร้อน (Thermal Decomposition,Thermolysis)	5
2.3 การเกิดปฏิกริยาในการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า	6
2.4 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง	7
2.5 การผลิตไฮโดรเจนแบบทางตรงและทางอ้อม	8
2.6 โครงสร้างรีดิวซ์และออกซิไดซ์ของ DCPIP	11
2.7 การเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนในไทลาคอยด์ จาก PSII ไปยัง DCPIP	11
2.8 เครื่องมือ pulse amplitude modulation fluorometer	12
4.1 กราฟค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP 7 ชนิด	24
4.2 กราฟแสดงความสัมพันธุ์ระหว่างปริมาณไฮโดรเจนและเวลา เมื่อขาดธาตุอาหารทันทีก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน	25
4.3 กราฟแสดงความสัมพันธุ์ระหว่างปริมาณไฮโดรเจนและเวลา เมื่อขาดธาตุอาหารเป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน	26
4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฮโดรเจนและเวลา เมื่อขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมเป็นเวลา 6,12,18 และ 24 ชั่วโมงก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน	27
4.5 กราฟแสดงระหว่างปริมาณออกซิเจนและเวลาของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP	29
4.6 กราฟแสดงระหว่างปริมาณออกซิเจนและเวลาของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียม	30
4.7 ผลสีของสารละลายไอโอดีน	31
4.8 กราฟแสดงปริมาณแป้งในอาหาร TAP ต่างๆ	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
e^-	อนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าเป็นลบ (electron)
PSI	ระบบแสงที่หนึ่ง (photosystem I)
PSII	ระบบแสงสอง (photosystem II)
F_0	ปริมาณแสงที่น้อยที่สุดที่ปลดปล่อยออกมา
F_m	ปริมาณของแสงที่รังสีจะสามารถวัดได้
GC	เครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ
mmol	มิลลิโมล
umol	ไมโครโมล
m^2	ตารางเมตร
mg	มิลลิกรัม
s	วินาที
uE	หน่วยของความเข้มแสง (micro Einstein)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พลังงานเป็นสิ่งสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดบนโลก ไม่ว่าจะเป็นการเจริญเติบโตของสิ่งต่างๆ การใช้ชีวิตประจำวันและยิ่งทวีความสำคัญมากขึ้นเมื่อโลกมีความพัฒนามากยิ่งขึ้น แต่เนื่องจากจำนวนประชากรโลกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและพลังงานถูกนำมาใช้มากขึ้นอย่างไม่มีที่สิ้นสุดเพื่อตอบสนองความต้องการที่มากขึ้นในปัจจุบัน โดยพลังงานที่นำมาใช้นั้นเป็นพลังงานสิ้นเปลืองซึ่งอาจจะไม่เพียงพอต่อความต้องการของมนุษย์หรืออาจจะหมดลงไปในที่สุด ดังนั้นจึงมีการหันมาใช้พลังงานทดแทน ได้แก่ พลังงานธรรมชาติ (แสงอาทิตย์ ลม และไอน้ำ) พลังงานชีวมวล และพลังงานไฮโดรเจน

ไฮโดรเจน (Hydrogen, H_2) ถือได้ว่าเป็นพลังงานสะอาดที่ทั่วโลกยอมรับสามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ ไม่เป็นพิษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยในอนาคตก๊าซไฮโดรเจนได้ถูกพิจารณาให้เป็นตัวนำพาพลังงานที่เหมาะสม และยังถูกคาดว่าจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเศรษฐกิจโลกด้วยสภาพที่คงรูปของพลังงานนี้ รวมไปถึงเมื่อใช้กับเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) จะไม่ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ออกมาสู่บรรยากาศ จึงไม่ก่อให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก (Greenhouse effect) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของสภาวะโลกร้อน

ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้สิ่งมีชีวิต ได้แก่ สาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) และสาหร่ายสีเขียว (Green algae) ซึ่งสาหร่ายสีเขียวนั้นมีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและมีความว่องไวต่อการสังเคราะห์แสง และได้มีความพยายามหลายๆ วิธีที่จะเพิ่มผลการผลิตของก๊าซไฮโดรเจน โดยวิธีที่รู้จักกันเป็นอย่างดีคือ การเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ปราศจากกำมะถัน อย่างไรก็ตามการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ปราศจากธาตุอาหารบางชนิดจะส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเช่นกันและผลที่ได้คือ ได้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จากการศึกษานั้นได้พบว่า สาหร่ายสีเขียวที่พบในประเทศไทยที่ชื่อว่า *Tetraspora* sp. CU2551 เป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจน (Maneeruttanarungroj, 2010) และ พบว่าการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ปราศจากโพแทสเซียมนั้น ทำให้เกิดผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญผ่านทางระบบแสงสอง (PSII) โดยที่ระบบแสงสองจะถูกยับยั้ง ทำให้ไม่เกิดก๊าซออกซิเจนในขณะเดียวระบบแสงหนึ่ง (PSI) ถูกกระตุ้นมากยิ่งขึ้น ทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพิ่มขึ้นอีกด้วย จึงส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Papazi, *et al.*, *2014*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ปราศจากธาตุอาหารจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โครงการวิจัยนี้ได้มีความสนใจในการศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 โดยเชื่อว่าการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ปราศจากธาตุอาหารบางชนิดนั้นจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งยังได้มีการศึกษาการติดตามสภาวะการทำงานของระบบแสงสอง (PSII Activity) ในสภาวะที่สาหร่ายขาดธาตุอาหารอีกด้วย และก๊าซไฮโดรเจนที่ได้นั้นเป็นพลังงานสะอาด มีความบริสุทธิ์ และไม่ก่อปัญหาสภาวะโลกร้อนอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสามารถการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากธาตุอาหาร

2. เพื่อเปรียบเทียบผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อขาดธาตุอาหาร

3. เพื่อศึกษาการทำงานของระบบแสงสอง (PSII) ของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อขาดธาตุอาหาร

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ทำการเพาะเลี้ยงและติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP, TAP-K, TAP-S, TAP-Mg, TAP-Cu, TAP-Ca, TAP-Fe

2. ติดตามปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นจากสภาวะขาดธาตุอาหาร

3. ติดตามกิจกรรมระบบแสงสอง (PSII Activity) ของสาหร่ายในอาหาร TAP-K

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารที่คลาดแคลนธาตุอาหาร

2. ก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้สามารถลดสภาวะโลกร้อนได้เนื่องจากเป็นพลังงานสะอาดและมีความบริสุทธิ์

3. องค์ความรู้เกี่ยวกับการทำงานของระบบแสงสอง (PSII) ในสภาวะการขาดธาตุอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

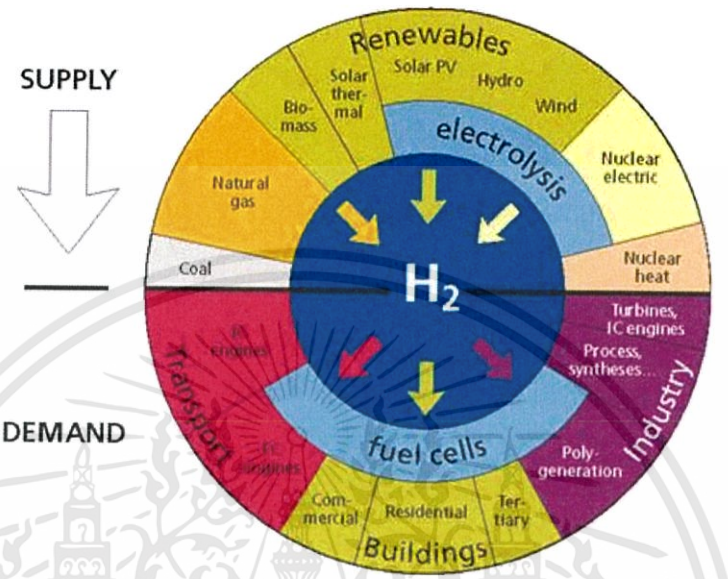
2.1 ไฮโดรเจน

พลังงานเป็นสิ่งสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดบนโลก ไม่ว่าจะเป็นการเจริญเติบโตของสิ่งต่างๆ การใช้ชีวิตประจำวันและยิ่งทวีความสำคัญมากขึ้นเมื่อโลกมีความพัฒนามากยิ่งขึ้น แต่เนื่องจากจำนวนประชากรโลกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและพลังงานถูกนำมาใช้มากขึ้นอย่างไม่มีที่สิ้นสุดเพื่อตอบสนองความต้องการที่มากขึ้น โดยพลังงานเชื้อเพลิงที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เมื่อเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลนี้ จะก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณมาก ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสาเหตุหลักของสภาวะโลกร้อนหรือปรากฏการณ์เรือนกระจก เชื้อเพลิงส่วนใหญ่ที่ใช้ในปัจจุบันมาจากปิโตรเลียมและถ่านหิน ซึ่งมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องและกำลังจะหมดไปในไม่ช้า วิกฤตการณ์เช่นนี้ทำให้ทุกประเทศมีความตื่นตัวเป็นอย่างมากในการเสาะแสวงหาพลังงานแหล่งใหม่ๆ เพื่อทดแทนการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม ดังนั้นจึงมีการหันมาใช้พลังงานทดแทนหลายชนิด เช่น พลังงานธรรมชาติ (แสงอาทิตย์ และลม) พลังงานชีวมวล และที่น่าสนใจมากอีกพลังงานหนึ่งก็คือพลังงานไฮโดรเจน ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงบริสุทธิ์ที่แยกได้จากน้ำ ให้พลังงานสูง ต้นทุนต่ำ สามารถนำมาใช้กับรถยนต์ หรือยานพาหนะอื่นๆ ได้ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงจากน้ำมันในปริมาณที่เท่ากัน

พลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen, H_2) ได้รับการคาดหมายและยอมรับว่าจะเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญอย่างมากในอนาคต (ธรรมนูญ, 2549) เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นสสารที่ให้พลังงานสูงและผลผลิตจากการเผาผลาญไฮโดรเจน ไม่ว่าจะจากการเผาไหม้โดยตรงหรือจากปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีในเซลล์เชื้อเพลิงจะได้ไอน้ำและก๊าซออกซิเจน ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จึงถือว่าเป็นการเผาไหม้เชื้อเพลิงที่สะอาดมาก โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิล ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นธาตุที่พบมากที่สุดในเอกภพ โดยในบรรยากาศโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ส่วนในล้านส่วน คุณสมบัติทั่วไปของก๊าซไฮโดรเจน (H_2) คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย ไม่มีเปลวไฟเวลาเผา การเผาไหม้สะอาด ไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่เนื่องจาก ก๊าซไฮโดรเจนนั้นมีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลค่อนข้างสูง (104 กิโลแคลอรีต่อโมล) ดังนั้นเมื่อต้องการให้ไฮโดรเจนโมเลกุลทำปฏิกิริยา จึงต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลดังกล่าว ไฮโดรเจนมีอุณหภูมิการเผาไหม้สูงถึง 3,000 องศาเซลเซียส ให้พลังงานความร้อน 2,870 กิโลแคลอรีต่อกิโลกรัม ซึ่งค่าพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากไฮโดรเจนจะมากกว่าค่าพลังงานเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอน และเชื้อเพลิงจากแอลกอฮอล์ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมทานอลและเอทานอล ถึง 2.5 และ 5 เท่า ตามลำดับ ไฮโดรเจนมีค่าความร้อนสูงถึง 122 กิโลจูลต่อกรัม (Madawar *et al.*, 2000) มีคุณสมบัติเป็นเชื้อเพลิงที่ดีและสามารถพัฒนาให้เป็นเชื้อเพลิงหลักได้



รูปที่ 2.1 ประโยชน์ของพลังงานไฮโดรเจน

ที่มา : http://www.internetdict.com/th/answers/what-is-hydrogen-energy.html

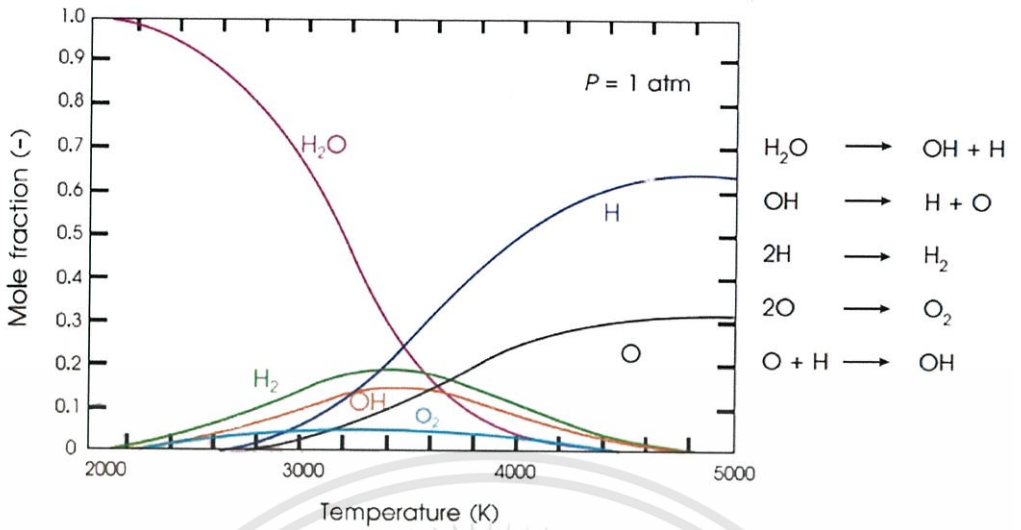
2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

โดยทั่วไปก๊าซไฮโดรเจนไม่พบอิสระในธรรมชาติ จึงต้องมีกระบวนการในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ๆ ดังนี้

2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี

การสลายตัวด้วยความร้อน (Thermal Decomposition หรือ Thermolysis) เป็นการสลายตัวของสารตั้งต้นด้วยความร้อนที่ให้ผลผลิตอย่างน้อย 2 ชนิด สำหรับการสลายตัวของน้ำด้วยความร้อนเกิดได้น้อยแม้ที่อุณหภูมิสูงมาก เช่น ที่อุณหภูมิ 2,200 เคลวิน แตกตัวเพียงร้อยละ 3 และที่อุณหภูมิ 3,200 เคลวิน แตกตัวประมาณร้อยละ 50 ได้ไอออน อนุมูล อะตอม และโมเลกุลของไฮโดรเจน และออกซิเจนหลายชนิด เช่น ไฮโดรเจนไอออน (Hydrogen ion, H^+) ออกซิเจนไอออน (Oxygen ion, O_2^-) ไฮโดรเจน (Hydrogen, H_2) ออกซิเจน (Oxygen, O_2) ไฮดรอกไซด์ไอออน (Hydroxide ion, OH^-) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide, H_2O_2) และไฮโดรเพอรอกซิล หรืออนุมูลเพอรอกซิล (Hydroperoxyl, Peroxyl Radical, HO_2) (รูปที่2.2) ข้อจำกัดของปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยความร้อนในการประยุกต์ใช้งานจริงเชิงอุตสาหกรรมหรือเชิงพาณิชย์ คือ ความคงทนของอุปกรณ์หรือวัสดุในกระบวนการที่ต้องทำงานที่อุณหภูมิสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

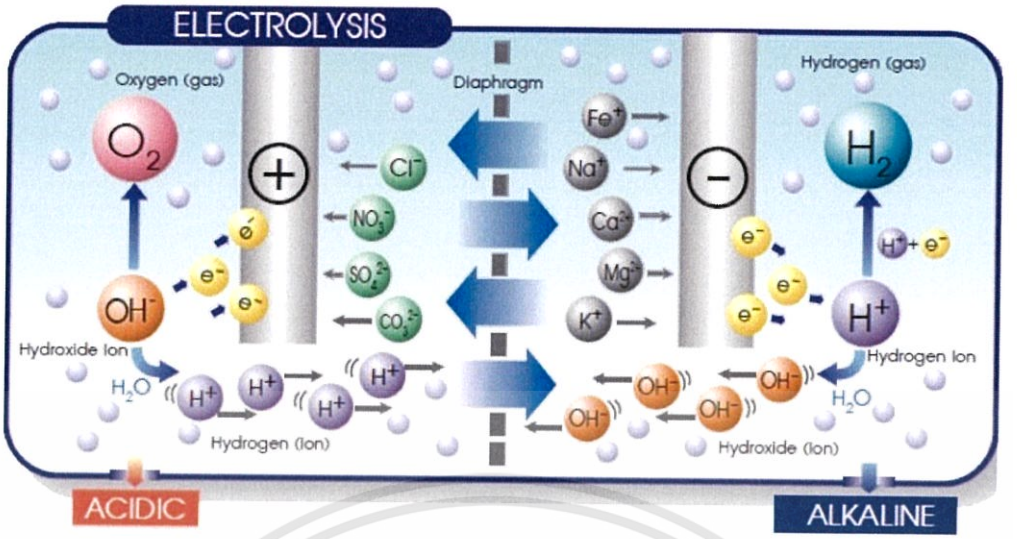


รูปที่ 2.2 การสลายตัวด้วยความร้อน (Thermal Decomposition,Thermolysis)
ที่มา : http://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production/

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า

การให้ไฟฟ้ากระแสตรงที่ขั้วไฟฟ้าของเซลล์เคมีไฟฟ้าเพื่อให้ไอออนในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เคลื่อนที่ไปเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วไฟฟ้า ปฏิกิริยาเคมีเกิดเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation Reaction) หรือ รีดักชัน (Reduction Reaction) ในทิศทางที่ไม่สามารถเกิดเองได้ถ้าไม่ให้กระแสไฟฟ้า (รูปที่2.3) โดยกระแสไฟฟ้าที่ให้จะต้องให้มากกว่าค่าโวลต์มาตรฐานที่ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้น เช่น การแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้าจะต้องใช้ค่าโวลต์ที่สูงกว่า 1.229 โวลต์ ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้าที่ขั้วแคโทดเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction Reaction) ของโปรตอน (ไฮโดรเจนไอออน) ในภาวะกรด ($2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$) ส่วนในภาวะเบสจะเกิดปฏิกิริยารีดักชันของน้ำ ($2H_2O + 2e^- \longrightarrow H_2 + 2OH^-$) ที่ขั้วแอโนดเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้แก๊สออกซิเจน ($H_2O \longrightarrow 1/2O_2 + 2H^+ + 2e^-$) ข้อดีของการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากวิธีนี้จะมีความบริสุทธิ์สูง ข้อเสีย คือ ค่าใช้จ่ายด้านกระแสไฟฟ้าสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การเกิดปฏิกิริยาในการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า

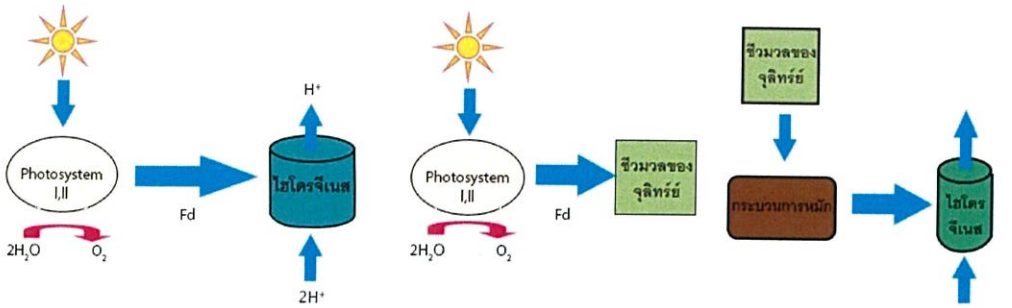
ที่มา : http://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production/

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตไลซิส

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตไลซิส (Photobiological process) เป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแตกโมเลกุลของน้ำโดยอาศัยพลังงานแสง ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเร็วมากและสามารถที่จะนำมาใช้ทำการผลิตในระยะยาวได้ นอกจากนี้กระบวนการผลิตยังไม่ก่อให้ เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

การสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthesis) เป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่สิ่งมีชีวิตสีเขียวเปลี่ยนรูปพลังงานแสงไปเป็นพลังงานเคมี โดยแสงถูกดูดจับไว้ และทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาระหว่างน้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ ได้คาร์โบไฮเดรต การสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อผลิตไฮโดรเจนจำแนกได้เป็น 2 วิธีการ ได้แก่ การแยกสลายด้วยแสงทางตรง และการแยกสลายด้วยแสงทางอ้อม การแยกสลายด้วยแสงทางตรงพบมากในสาหร่ายสีเขียว (Green Algae) ที่แสงกระตุ้นโมเลกุลของน้ำให้แยกออกเป็นไฮโดรเจนไอออน แก๊สออกซิเจน และอิเล็กตรอน (Electron, e^-) จากนั้น เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) จะรวมไฮโดรเจนไอออนและอิเล็กตรอนได้แก๊สไฮโดรเจน ส่วนการแยกสลายด้วยแสงทางอ้อมพบมากในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue Green Algae) หรือไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) ที่ใช้ปฏิกิริยาสังเคราะห์ด้วยแสงร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อผลิตคาร์โบไฮเดรตซึ่งจะถูกนำไปผลิตแก๊สไฮโดรเจนต่อไป (รูปที่2.4) ข้อจำกัดหลักของการผลิตไฮโดรเจนผ่านการสังเคราะห์ด้วยแสงในการใช้งานเชิงอุตสาหกรรม ได้แก่ ค่าใช้จ่ายในการผลิตสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

ที่มา : http://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production/

2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย

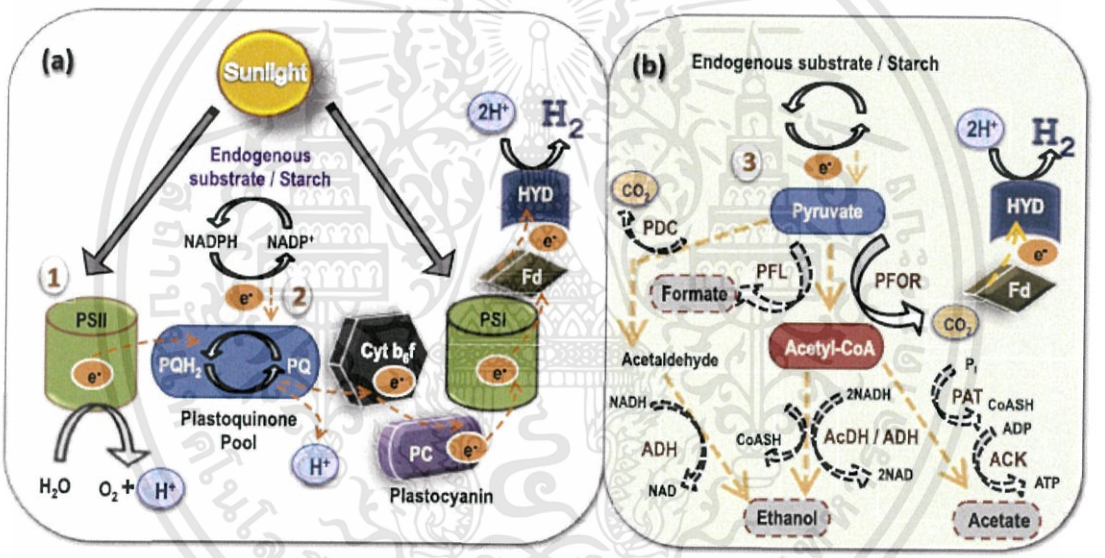
การผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ยูคาริโอตที่สังเคราะห์ด้วยแสง ได้แก่ สาหร่ายสีแดง สาหร่ายสีเขียว และสาหร่ายสีน้ำตาล

สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการบ่มที่ปราศจากออกซิเจนทั้งในที่มืดและที่มีแสง สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Codium* sp., *Chlamydomonas* sp. และ *Chlorella* sp. เป็นต้น ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสงต่ำ เซลล์จะเกิดการกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้น กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยออกซิเจนที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยใช้เพียงแสงและน้ำในการผลิตไฮโดรเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิด คือ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง จากนั้นจึงส่งต่อพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center) ซึ่งอยู่ภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ เมื่อโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ได้รับพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้นและพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เมื่อมีพลังงานในรูปของแสงตกกระทบในบริเวณระบบแสงสอง (PSII) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ระบบแสงสองจะถูกกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ควิโนน ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Q: Primary electron acceptor of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PSII) อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (PQ: Plastoquinone) ต่อมาเมื่อน้ำมีการแตกตัวออกได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงสองไปแทนที่อิเล็กตรอนในคลอโรฟิลล์ที่มีการสูญเสียไปในระบบ จากนั้นอิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนนจะถูกส่งต่อไปยังไซโตโครม บี (Cytochrome b) ไซโตโครม เอฟ (Cytochrome f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) และเข้าไปยังระบบแสงหนึ่ง (PSI) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อระบบแสงหนึ่งถูกกระตุ้นจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนหรือแสงมากระตุ้นคลอโรฟิลล์ภายในระบบแสงหนึ่ง คลอโรฟิลล์จะปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin: Fd) อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินจะไปรวมกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนขึ้น (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 การผลิตไฮโดรเจนแบบทางตรงและทางอ้อม

ที่มา : Eroglu, E. and Melis, 2016

2.4 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) จัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (Eukaryote) อยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Chlorophyta) พบทั้งในน้ำจืด น้ำทะเล น้ำกร่อย และที่ชื้นแฉะ สาหร่ายสีเขียวบางชนิดเป็นอิสระลอยอยู่ตามผิวน้ำ มีรูปร่างลักษณะมากมาย มีทั้งเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ต่อกันเป็นสายยาว หรือรวมกันเป็นกลุ่ม มีทั้งเคลื่อนที่ได้ และเคลื่อนที่ไม่ได้ สาหร่ายสีเขียวมีรงควัตถุที่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่นเดียวกับรงควัตถุที่พบในพืชชั้นสูง คือ มีคลอโรฟิลล์ เอ และ บี แคโรทีน และ แซนโทฟิลล์ รงควัตถุทั้งหมดนี้จะรวมกันอยู่ในเม็ดสีหรือพลาสติด (Plastid) ที่อยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่าคลอโร-พลาสต์ โดยอาจจะมี 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 อัน ซึ่งทำให้สามารถสังเคราะห์แสงได้ เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง สาหร่ายสีเขียวมีการสืบพันธุ์ได้ทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีการรวมกันของแกมีตซึ่งมีทั้งแบบ Isogamy, Anisogamy และ Oogamy ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีทั้งการแบ่งเซลล์ การสร้างสปอร์ และการสร้าง Akinete สาหร่ายสีเขียวสามารถจัดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

2.4.1 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว

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

2.4.2 สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์

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

2.5 แหล่งที่อยู่ของสาหร่าย

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบได้ทุกหนทุกแห่งที่มีความชื้น แต่แหล่งที่สาหร่ายเจริญได้ดีที่สุดคือแหล่งน้ำ ซึ่งจะมีคุณสมบัติทางเคมีหรือกายภาพที่เหมาะสมกับสาหร่ายชนิดนั้นๆ โดยสาหร่ายสามารถเจริญในแหล่งน้ำที่แตกต่างกัน

สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ถูกพบจากแหล่งน้ำจืดในธรรมชาติของประเทศไทย โดยผลการยืนยันจากการหาลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน *18S* rDNA พบว่าสาหร่ายนี้มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย

การผลิตไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงหลายประการ ดังนี้

1. ชนิดของจุลสาหร่าย ประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนจะแตกต่างและมีความเฉพาะตัวตามชนิดของสาหร่าย เนื่องจากสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีเมตาบอลิซึมของการตรึงไนโตรเจนและการสังเคราะห์แสงแตกต่างกันไป

2. ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น องค์ประกอบของธาตุอาหาร, แร่ธาตุ, ความเข้มแสง และ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ฯลฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 การขาดองค์ประกอบของธาตุอาหาร

ชนิดของแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายซึ่งเป็นพืชชั้นต่ำนั้น เป็นชนิดเดียวกันกับแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืชชั้นสูง ได้กล่าวถึง แร่ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามปริมาณของแร่ธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการ แร่ธาตุอาหารแต่ละกลุ่ม มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชเท่าๆ กัน ในสาหร่ายก็น่าจะเป็นเช่นนั้น แร่ธาตุอาหารทั้ง 2 กลุ่ม ได้แก่

1. แร่ธาตุที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณมาก (macronutrients หรือ major elements) เป็นแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุล ซึ่งเป็นโครงสร้างของสาหร่าย ดังนั้นจึงเป็นแร่ธาตุที่ต้องการเป็นปริมาณมาก ได้แก่ ธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน ไฮโดรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม กำมะถัน และโพแทสเซียม แหล่งของธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ได้มาจากคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และก๊าซออกซิเจน ตามลำดับ ทั้งคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสารหลักภายในพืช ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน

2. แร่ธาตุที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณน้อย (micronutrients หรือ minor elements) คือ ต้องการเป็นปริมาณมิลลิกรัมต่อลิตรหรือต่ำกว่านี้ แร่ธาตุเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของโมเลกุลที่สำคัญ เช่น growth factors หรือเอนไซม์ หรือเป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์ แร่ธาตุเหล่านี้มีอยู่ 7 ชนิด ได้แก่ คลอรีน เหล็ก แมงกานีส โบรอน สังกะสี ทองแดง และโมลิบดินัม

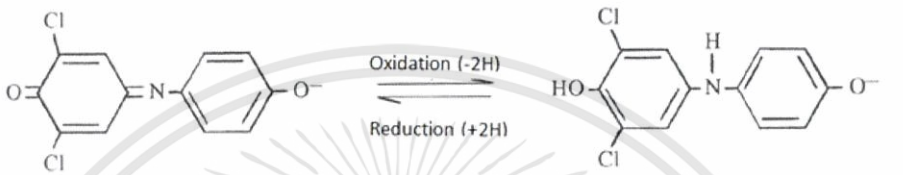
เนื่องจากการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายนั้น เป็นที่รู้จักกันมานานกว่า 74 ปีก่อนนี้แล้ว (Papazi, *et al*., 2014) ดังนั้นจึงมีการทดลองเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะต่างๆ เพื่อที่จะเพิ่มผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนให้มากขึ้นและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นด้วย ซึ่งสภาวะที่นิยมกันมากก็คือ การให้สาหร่ายอยู่ในสภาวะที่ขาดแร่ธาตุอาหารหลักบางชนิด ที่รู้จักกันดีก็คือ การขาดแร่ธาตุซัลเฟอร์ โดยได้ค้นพบว่า เมื่อทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardii* ในอาหารที่ขาดแร่ธาตุซัลเฟอร์ (Melis, *et al*., 2000) จะส่งผลต่อปริมาณผลผลิตของก๊าซไฮโดรเจน เนื่องจากเมื่อขาดแร่ธาตุซัลเฟอร์แล้ว จะทำให้มี O_2 ในระบบน้อยลง ระบบแสงสอง (PSII) เกิดการเปลี่ยนแปลงคือ plastoquinone B เปลี่ยนจาก Q_B-reducing ไปเป็น Q_B-non-reducing กระบวนการหายใจของสาหร่ายยังคงสูงอยู่ แต่ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนนี้จะน้อยลง และสาหร่ายก็จะกลับเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบปกติในที่สุด จากเหตุการณ์นี้จึงทำให้มีการทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* ในสภาวะที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ (Papazi. *et al*., 2014) โดยมีการเลี้ยงแบบ mixotrophic และจากผลการทดลองพบว่าเมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะที่ขาดโพแทสเซียม ทำให้การทำงานของระบบแสงสอง (PSII) ลดลง การทำงานของระบบแสงหนึ่ง (PSI) เพิ่มมากขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับ [FeFe]-hydrogenase ส่งผลให้ได้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่สุด มีประสิทธิภาพ และยังมากกว่าเมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะขาดซัลเฟอร์อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 การวัดค่าการทำงานของระบบแสงสอง (PSII)

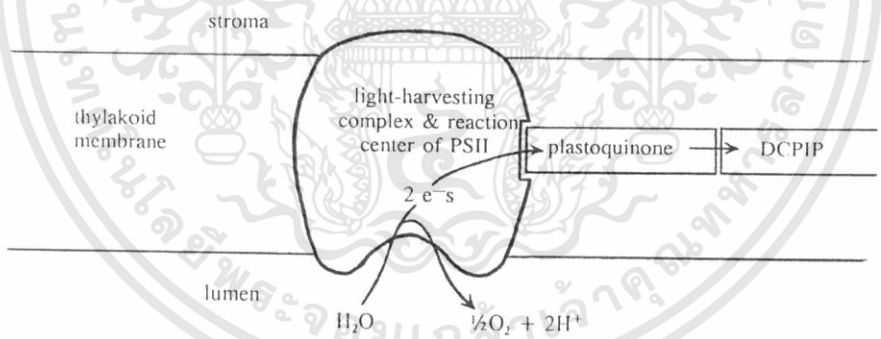
2.8.1 การวัดด้วยสารเคมี

การวัดระบบแสงสอง (PSII) ด้วยการใช้ 2,6-Dichlorophenolindophenol(DCPIP) โดย DCPIP นี้ เป็นรีดอกซ์อินดิเคเตอร์ แต่ละโมเลกุลจะถูกรีดิวซ์ด้วยอิเล็กตรอน 2 ตัวและ 2 ไฮโดรเจนไอออน ซึ่งจะทำให้โครงสร้างของ DCPIP มีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสารตัวนี้มีความเป็นไฮโดรโฟบิก จึงทำให้สามารถแทรกเข้าสู่เซลล์เมมเบรนของสิ่งมีชีวิตได้ และสามารถเข้าไปรับอิเล็กตรอนและไฮโดรเจนไอออนที่เยื่อไทลาคอยด์ของคลอโรพลาต์สจากพลาสโตควิโนนได้



รูปที่ 2.6 โครงสร้างรีดิวซ์และออกซิไดซ์ของ DCPIP

ที่มา : Norm Scott and Bruce Greenberg page6, 2017



รูปที่ 2.7 การเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนในไทลาคอยด์ จาก PSII ไปยัง DCPIP

ที่มา : Norm Scott and Bruce Greenberg page6, 2017

$$DCPIP_{oxi} \text{ (Blue)} \xrightarrow{2e^-} DCPIP_{red} \text{ (Colorless)}$$

ในการใช้ DCPIP นั้น ใส่เซลล์จำนวน 30 g วัดที่ความยาวคลื่น 590 nm ที่อุณหภูมิ (ทำให้เย็น) 4 °C จากนั้นดูอัตราการลดลงของสีน้ำเงิน (DCPIP) เพื่อติดตามกิจกรรมของระบบแสงสอง เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DCPIP อยู่ในรูปออกซิไดซ์จะเป็นสีน้ำเงิน และเมื่ออยู่ในรูปรีดิวซ์จะไม่มีสี นั่นคือ เมื่ออยู่ในสารละลายที่ไม่มีออกซิเจน DCPIP จะไม่มีสี และจะกลับมามีสีอีกครั้งเมื่อสารละลายมีออกซิเจน ดังนั้นการใช้ DCPIP จึงสามารถติดตามการทำงานของระบบแสงสองได้ ซึ่งสามารถดูได้จากอัตราการลดลงของสีน้ำเงินของ DCPIP หากอัตราสูงแสดงว่าระบบแสงสอง ทำงานได้ไม่ดี และหากอัตราต่ำระบบแสงสองทำงานได้ดี

2.8.2 การวัดด้วยเครื่องวัดฟลูออเรสเซนต์

เครื่องมือ pulse amplitude modulation fluorometer เป็นวิธีการวัดฟลูออเรสเซนต์ สามารถที่จะวัดการทำงานของฟลูออเรสเซนต์ได้ด้วยการวัดแสงที่มากขึ้นหรือน้อยลงของตัวรับแสงของเยื่อไทลาคอยด์ ซึ่งจะบ่งบอกถึงการทำงานของระบบแสงได้ แสงน้อยที่สุด (0.15 mmol photons m^{-2} s^{-1}) ที่สามารถวัดได้ ไม่ใช่แสงจากฟลูออเรสเซนต์ จะเป็นแสงที่น้อยสุด (F_0) ที่ปลดปล่อยออกมา แสงที่มากที่สุด (>10,000 mmol photons m^{-2} s^{-1}) จะได้แสงในรูปแบบของ (F_m) รังสีที่สามารถวัดได้ จะอยู่ในช่วง 2,000 mmol photons m^{-2} s^{-1} ขึ้นไป ดีเทคเตอร์ที่ใช้ในการวัดการปลดปล่อยของฟลูออเรสเซนต์จะวัดที่ความยาวคลื่น 650-660nm

รูปที่ 2.8 เครื่องมือ pulse amplitude modulation fluorometer

ที่มา : http://soki.aq/display/StandMeth/Pulse+Amplitude+Modulated+(PAM)+Fluorometry

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.9.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

(Maneeruttanarungroj *et al*., 2010) จากงานวิจัยนี้ได้พบสาหร่าย สีเขียวสายพันธุ์ใหม่ซึ่งจัดอยู่ในตระกูล *Tetraspora* ที่บ่อน้ำจืดในจังหวัดปทุมธานีของประเทศไทย เมื่อนำมาเพาะใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร TAP ภายใต้ความเข้มแสง 48-92 uE/m^2/s, อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และค่า pH อยู่ในช่วง 5.75-9.30 จะมีการเพิ่มขึ้นของอัตราการผลิตไฮโดรเจนเป็นสองเท่า แต่การผลิตไฮโดรเจนจะเริ่มน้อยลงเมื่อมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.75-9.30 และหากใส่ β-mercaptoethanol 0.5 mM ลงในอาหาร TAP จะเกิดการกระตุ้นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนขึ้นเป็นสองเท่า แต่ถ้าเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากไนโตรเจนและซัลเฟอร์ จะส่งผลให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 50% สูงขึ้น จากการคำนวณการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เท่ากับ 17.3-61.7 umol/mg Chl a/h เป็นอัตราการผลิตสูงมากเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ ดังนั้น *Tetraspora* sp. CU2551 จึงเป็นสาหร่ายที่น่าสนใจในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจน

สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* มีความสามารถในการสังเคราะห์แสงและผลิตโมเลกุลของไฮโดรเจนภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน โดยมีการเสนอแนวทางชีวภาพมาเป็นพลังงานทดแทนในการผลิตไฮโดรเจนจากแสงแดดและน้ำ ซึ่งการควบคุมพารามิเตอร์มีความสำคัญมากในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ทั้งค่า pH, ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ, แสง, ความหนาแน่น, อุณหภูมิ, การรบกวน, และความเข้มแสง เพื่อให้สาหร่ายใช้ในการเจริญเติบโต (Bojan Tamburic, *et al.*, 2010) และใช้ในทางเศรษฐกิจได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเพื่อให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ที่จำเป็นสำหรับการผลิตไฮโดรเจน

2.9.2 การขาดธาตุอาหารของสาหร่าย

สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* จะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากธาตุอาหารต่างๆ ในระบบปิด และบริเวณดังกล่าวต้องทำให้เกิดสภาวะขาดก๊าซออกซิเจนและต้องมีอิเล็กตรอนอยู่อย่างต่อเนื่อง โดยงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า ในอาหารที่ปราศจากโพแทสเซียมนั้น ทำให้เกิดผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญผ่านทางระบบแสง (PSII) ซึ่งระบบแสงที่สองนี้จะถูกยับยั้ง (Aikaterini Papazi, *et al.*, 2014) ทำให้ไม่เกิดก๊าซออกซิเจน ในขณะเดียวกันระบบแสงที่หนึ่งถูกกระตุ้นมากขึ้น ทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั่นเอง

วิธีการเปรียบเทียบผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นนิยมใช้วิธีทางเคมีและทางกายภาพ โดยในที่นี้จะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้แสงและอุณหภูมิเดียวกัน แต่ปราศจากธาตุอาหารต่างๆ ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่าการปราศจากโพแทสเซียมนั้นเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ทำให้เกิดผลผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยจะทำให้การทำงานของระบบแสง (PSII) ลดลง (Ela Eroglu and Anastasios Melis, 2016) และสิ่งที่เกิดขึ้นพร้อมกันก็คือการที่ระบบแสง (PSI) ทำงานมากขึ้น ส่งผลให้เกิดเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่ายสีเขียว

Tetraspora sp. CU2551

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

1. อาหาร TAP เหลว (Tris Acetate Phosphate medium) ทั้งหมด 7 ชนิด (ภาคผนวก ก)
    - 1.1 TAP
    - 1.2 TAP–K (TAP ที่ปราศจากโพแทสเซียม)
    - 1.3 TAP–S (TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์)
    - 1.4 TAP–Mg (TAP ที่ปราศจากแมกนีเซียม)
    - 1.5 TAP–Fe (TAP ที่ปราศจากเหล็ก)
    - 1.6 TAP–Ca (TAP ที่ปราศจากแคลเซียม)
    - 1.7 TAP–Cu (TAP ที่ปราศจากทองแดง)
2. แอมพิซิลิน (AMPICILLIN SODIUM SALT) จาก VWR ชนิด Analytical reagent grade

3.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจน

1. ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4% ในอาร์กอน (TIG, Thailand)
2. ก๊าซอาร์กอน (ความบริสุทธิ์ 99.999%) (TIG, Thailand)

3.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับกระบวนการตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง

1. Grinding buffer
2. สาร 2, 6-Dichloroindophenol (DCPIP)
3. Indophenol dye

3.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับกระบวนการตรวจสอบหาปริมาณแป้ง

1. เอทานอล เข้มข้น 80%
2. กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 30%
3. กรดซัลฟิวริก เข้มข้น 72%
4. Anthrone
5. ไอโอดีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)

3.3.2 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

3.3.3 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Balance)

3.3.4 เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง (Balance)

3.3.5 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)

3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.3.7 เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer)

3.3.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.3.9 เครื่องวิเคราะห์องค์ประกอบของสาร (Gas Chromatrograph)

3.3.10 ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet)

3.3.11 หลอดฉีดยา (Syringe)

3.3.12 เข็มฉีดยา ยี่ห้อ Needle nippro No.18 ขนาด 1.2 x 25 มิลลิเมตร

3.3.13 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.14 หลอดเซ็นติฟิวส์ (Centrifuge tube)

3.3.15 หลอดแอพเพ็นดรอฟ (Eppendorf tube)

3.3.16 หลอดฝาเกลียว (Screw cap tube)

3.3 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 และวิธีการวัดปริมาณเซลล์

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เพื่อทำเป็น starter เริ่มจากการเตรียมอาหาร TAP แล้วนำอาหาร TAP ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นใส่สาหร่ายประมาณ 1 loop และปิดจุก นำฟลาสก์ที่มีสาหร่ายและอาหารไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมานำสารละลายใส่หลอดเซ็นติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำหลอดที่ปั่นเหวี่ยงแล้วเทส่วนที่ใสทิ้ง 45 มิลลิลิตร และเก็บส่วนที่เหลือไว้ นำเซลล์จากส่วนที่เหลือไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยมีปริมาณน้ำ 990 ไมโครลิตร และเซลล์ 10 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อบันทึกค่าความขุ่นสำหรับการใช้งานต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP เพื่อวัดค่าการเจริญเติบโต

3.4.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ (starter) มาใส่อาหาร TAP ทั้ง 7 ชนิด ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ชนิดละ 3 ฟลาส์ก โดยคำนวณให้มีปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยมีปริมาณน้ำ 500 ไมโครลิตร และเซลล์ 500 ไมโครลิตร โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 24 ชั่วโมง

3.5 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน

3.5.1 การหาปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อขาดธาตุอาหารทันที

นำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ (starter) มาใส่อาหาร TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 4 ฟลาส์ก กำหนดให้มีค่าปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 นำไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมานำสารละลายใส่หลอดเซ็นติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำหลอดที่ปั่นเหวี่ยงแล้วเทส่วนที่ใสทิ้ง 45 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้งและนำสารละลายทั้ง 4 หลอดเทรวมกันเป็น 1 หลอด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยมีปริมาณน้ำ 990 ไมโครลิตร และเซลล์ 10 ไมโครลิตร โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ต่อมานำเซลล์มาใส่อาหาร TAP ทั้ง 7 ชนิด ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซ็นติฟิวส์ ชนิดละ 1 หลอด และแบ่งใส่ขวดไวแอลขนาด 13 มิลลิลิตร ขวดละ 5 มิลลิลิตร ชนิดละ 5 ขวด รวมทั้งหมดจำนวน 35 ขวด จากนั้นนำไปพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่ก๊าซออกซิเจน

3.5.2 การหาปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อขาดธาตุอาหารเป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนการผลิต

นำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ (starter) ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้งมาใส่อาหาร TAP ทั้ง 7 ชนิด ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ชนิดละ 1 ฟลาส์ก โดยคำนวณให้มีปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 นำไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ต่อมานำสารละลายใส่หลอดเซ็นติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำหลอดที่ปั่นเหวี่ยงแล้วเทส่วนที่ใสทิ้ง 45 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอาหาร TAP แต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และเติมเซลล์เพิ่มเพื่อให้ปริมาณความขุ่นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยมีปริมาณน้ำ 500 ไมโครลิตร และเซลล์ 500 ไมโครลิตร เมื่อได้ค่าปริมาณความขุ่นเท่ากับ 0.2 แล้ว แบ่งเซลล์ที่อยู่ในหลอดเซ็นติฟิวส์ทั้ง 7 หลอดใส่ขวดไวแอลขนาด 13 มิลลิลิตร ขวดละ 5 มิลลิลิตร ชนิดละ 5 ขวด รวมทั้งหมดจำนวน 35 ขวด จากนั้นนำไปพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่ก๊าซออกซิเจน

3.6 วิธีการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551

นำสาหร่ายจากข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ที่ผ่านการพ่นก๊าซอาร์กอน ไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ นำก๊าซบริเวณส่วนบนของขวดไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ (GC) ทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 24 ชั่วโมงและวิเคราะห์ครั้งสุดท้ายที่ชั่วโมงที่ 32 โดยการทดลองนี้จะใช้ก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ในก๊าซอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐาน ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ

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 : 120°C
Carrier gas	Argon 99.999% purity (flow rate 70-80 ml/min)
Standard gas	4% H_2 in Argon

149328
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP สำหรับกระบวนการตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง

นำอาหาร TAP และอาหาร TAP –K ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร ชนิดละ 1 ฟลาสก์จากนั้นใส่สาหร่ายประมาณ 1 loop และปิดจุก นำฟลาสก์ที่มีสาหร่ายและอาหารไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมานำสารละลายใส่หลอดเซ็นติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำหลอดที่ปั่นเหวี่ยงแล้วเทส่วนที่ใสทิ้ง 45 มิลลิลิตร และเก็บส่วนที่เหลือไว้ใช้งาน

3.8 วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้สำหรับตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสองของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551

3.8.1 Indophenol dye

ชั่ง Indophenol dye 2 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย Indophenol dye เข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อ10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 990 ไมโครลิตรใส่หลอดแอพเพ็นดรอฟเพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นเตรียมสารละลาย Indophenol dye ความเข้มข้น 1 2 3 4 5 และ 6 ไมโครกรัมในน้ำ 995 990 985 980 975 และ 970 ไมโครลิตร ตามลำดับ เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

3.8.2 สาร 2, 6-Dichloroindophenol (DCPIP)

ชั่ง DCPIP 14.5035 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลเข้มข้น 95 % และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย DCPIP เข้มข้น 5.80 มิลลิกรัมต่อ 4 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 996 ไมโครลิตรใส่หลอดแอพเพ็นดรอฟเพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นเตรียมสารละลาย Indophenol dye ความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 ไมโครกรัมในน้ำ 998 996 994 992 และ 990 ไมโครลิตร ตามลำดับ เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

3.8.3 Grinding buffer

- ชั่ง $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5.0770 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร
- ชั่ง EDTA $\cdot 2H_2O$ 9.3045 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร
- ชั่ง Tris buffer 3.025 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

นำสารละลายข้างต้นปริมาตร 4 มิลลิลิตร 400 ไมโครลิตรและ 20 มิลลิลิตรตามลำดับใส่ขวด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 40 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและปรับ pH เป็น 7.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 วิธีตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551

3.9.1 ตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 โดยใช้ Indophenol dye

นำ Grinding buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ Indophenol dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เซลล์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและเติมน้ำปริมาตร 840 ไมโครลิตร วัดการทำงานของระบบแสงสอง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 602 นาโนเมตร จากนั้นเปลี่ยนปริมาตรของเซลล์เป็น 100 150 200 250 และ 300 ไมโครลิตรและเติมน้ำ 790 740 690 640 และ 590 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.9.2 ตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 โดยใช้ 2, 6-Dichloroindophenol (DCPIP)

นำ Grinding buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ DCPIP ปริมาตร 4 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เซลล์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและเติมน้ำปริมาตร 846 ไมโครลิตร วัดการทำงานของระบบแสงสอง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร จากนั้นเปลี่ยนปริมาตรของเซลล์เป็น 100 150 200 250 และ 300 ไมโครลิตรและเติมน้ำ 796 746 696 646 และ596 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.9.3 ตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ด้วยวิธี Oxygen electrode

3.9.3.1 วิธีการเตรียมเซลล์

นำเซลล์สาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ (starter) มาใส่อาหาร TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ฟลาส์กขนาด 100 มิลลิลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จำนวน 3 ฟลาส์ก โดยคำนวณให้มีปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 นำไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ต่อมานำสารละลายใส่หลอดเซ็นติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำหลอดที่ปั่นเหวี่ยงแล้วเทส่วนที่ใสทิ้ง 45 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้งและนำสารละลายทั้ง 4 หลอดเทรวมกันเป็น 1 หลอด ต่อมานำเซลล์ที่ล้างน้ำกลั่นแล้วมาใส่อาหาร TAP แบบปกติและ TAP -K ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ฟลาส์กขนาด 100 มิลลิลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ชนิดละ 2 ฟลาส์ก โดยคำนวณให้มีปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 นำไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับปริมาณความขุ่นจาก 0.1 เป็น 0.2 และนำสารละลายสาหร่ายใส่ขวดไวแอลขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ชนิดละ 3 ขวด จากนั้นนำไปพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่ก๊าซออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.3.2 วิธีการวัดปริมาณออกซิเจน

นำสาหร่ายจากข้อ 3.9.3.1 ที่ผ่านการพ่นก๊าซอาร์กอน ไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยใช้เครื่อง Oxygen clark type electrode ซึ่งภายในเครื่องจะมีช่องที่ใส่สารจะแยกกับส่วนอิเล็กโทรดด้วย Teflon membrane เป็นเมมเบรนที่ให้โมเลกุลของออกซิเจนผ่านได้เท่านั้นและให้อิเล็กตรอนไปที่ขั้วแคโทด อิเล็กตรอนที่ขั้วแคโทดนั้นจะขึ้นอยู่กับอัตราของออกซิเจน การเพิ่มขึ้นของความต่างศักย์ระหว่างขั้วแคโทดและขั้นแอโนดจะไปเพิ่มอัตราelectrocatalysis โดยออกซิเจนนั้นจะผ่านเมมเบรนไปยังขั้วแคโทด

3.10 วิธีการเตรียมเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP สำหรับกระบวนการตรวจสอบหาปริมาณแป้ง

นำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ (starter) มาใส่อาหาร TAP ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ฟลาส์กขนาด 100 มิลลิลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จำนวน 3 ฟลาส์ก โดยคำนวณให้มีปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 นำไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมานำสารละลายใส่หลอดเซ็นติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำหลอดที่ปั่นเหวี่ยงแล้วเทส่วนที่ใสทิ้ง 45 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้งและนำสารละลายทั้ง 4 หลอดเทรวมกันเป็น 1 หลอด ต่อมานำเซลล์ที่ล้างน้ำกลั่นแล้วมาใส่อาหาร TAP ทั้ง 7 ชนิด ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ฟลาส์กขนาด 100 มิลลิลิตร ชนิดละ 1 ฟลาส์ก ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน โดยคำนวณให้มีปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.2 และนำเซลล์ที่ล้างน้ำกลั่นแล้วมาใส่อาหาร TAP ปกติ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ฟลาส์กขนาด 100 มิลลิลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน โดยคำนวณให้มีปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 จากนั้นนำสารละลายทั้ง 8 ฟลาส์ก ไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.11 วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้สำหรับตรวจสอบปริมาณแป้งของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551

3.11.1 Anthrone

ชั่ง Anthrone จำนวน 2 กรัม และละลายด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 72% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.12 วิธีการตรวจสอบปริมาณแป้งของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551

3.12.1 การตรวจสอบปริมาณแป้งด้วยวิธีไอโอดีน

นำสารละลายสาหร่ายปริมาตร 2 มิลลิลิตรใส่หลอดฝาเกลียว นำไปปั่นเหวี่ยงและเทส่วนใสทิ้ง เติมเอทานอล เข้มข้น 80% ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งและเทส่วนสีเขียวทิ้ง จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายใสปริมาตร 990 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดแอพเพ็นดรอฟและเติมสารละลายไอโอดีนปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.12.2 การตรวจสอบปริมาณแป้งด้วยวิธี Anthrone

3.12.2.1 การทำกราฟมาตรฐาน

ชั่งแป้งจำนวน 10 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียว ละลายด้วยกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 30% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 15 นาที ต่อมาใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดฝาเกลียวจำนวน 3 หลอด และเติมกรดเปอร์คลอริกปริมาตร 900 ไมโครลิตร ทั้ง 3 หลอด นำสารละลายแป้งในกรดเปอร์คลอริกใส่หลอดทดลองขนาด 12 มิลลิลิตรและเติมสารอื่นๆ ดังตาราง ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ

ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงอัตราส่วนการเตรียมสารละลายการทำกราฟมาตรฐานแป้ง

หลอดที่ / สารละลาย	1	2	3	4	5	6
น้ำแป้ง (µl)	0	50	100	200	300	350
กรดเปอร์คลอริก (µl)	500	450	400	300	200	150
Anthrone (ml)	2	2	2	2	2	2

จากนั้นนำหลอดทดลองทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.12.2.2 การนำเซลล์มาใช้เพื่อหาปริมาณแป้ง

นำสารละลายสาหร่ายปริมาตร 2 มิลลิลิตรใส่หลอดฝาเกลียว นำไปปั่นเหวี่ยงและเทส่วนใสทิ้ง เติมเอทานอลเข้มข้น 80% ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งและเทส่วนสีเขียวทิ้ง จำนวน 3 ครั้ง ต่อมาเติมกรดเปอร์คลอริกปริมาตร 600 ไมโครลิตร และนำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นกลับหลอดไปมา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงเซลล์อีกครั้ง และนำส่วนใสไปใช้ โดยใช้ส่วนใสปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ Anthrone ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 12 มิลลิลิตร ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้วิธีนี้หาปริมาณแป้งกับสารละลายสาหร่ายในอาหาร TAP อื่นๆ เช่นกัน (Fernandes, B. *et al.*, 2011)

3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลองการวัดค่าการเจริญเติบโต การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน และการตรวจสอบปริมาณแป้งของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ไปทดสอบค่าทางสถิติ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี one way ANOVA และใช้ค่าการเปรียบเทียบสถิติ Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 23 (SPSS software, New York, USA) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างชุดข้อมูล โดยตั้งสมมติฐาน คือ ยอมรับสมมติฐาน H_0 เมื่อ p-value > 0.05 และจะปฏิเสธสมมติฐาน H_0 และยอมรับสมมติฐาน H_1 เมื่อค่า p-value < 0.05 ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และใช้ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 (ระดับความเชื่อมั่น 95%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

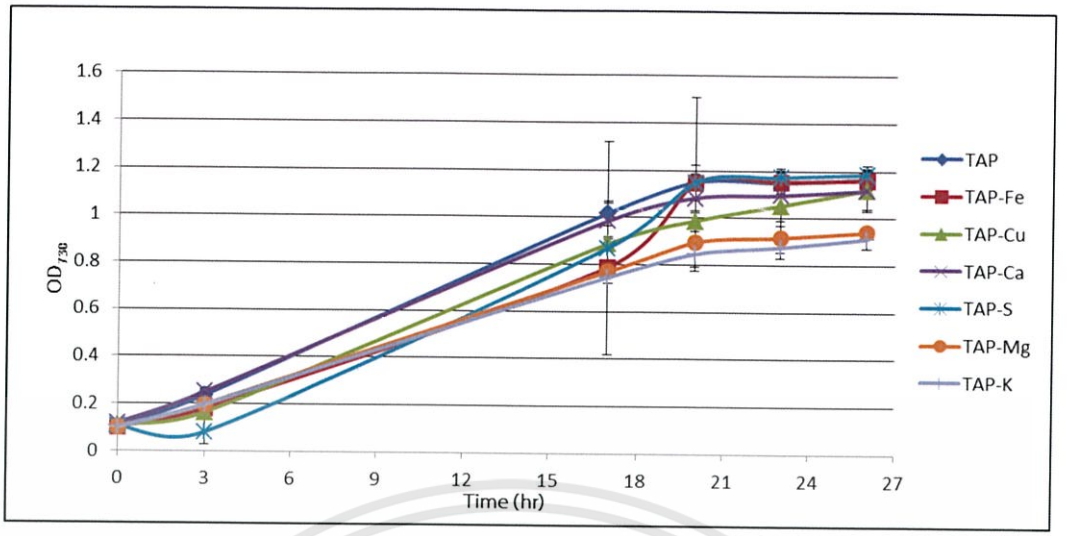
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาดูผลของการขาดธาตุอาหารต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจน โดยมุ่งเน้นอธิบายถึงในระดับการเปลี่ยนแปลงชีวโมเลกุล และวิถีของการเผาผลาญอาหาร (metabolism) ของเซลล์ เพื่อความเข้าใจในการตอบสนองของเซลล์ต่อการขาดธาตุอาหารนั้นๆ

4.1 การวัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP 7 ชนิด

นำสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ไปเพาะเลี้ยงในอาหารปริมาณ 50 มิลลิลิตร ของ TAP และ TAP ที่ขาดธาตุอาหาร 6 ชนิด ดังต่อไปนี้ เหล็ก (TAP-Fe), ทองแดง (TAP-Cu), แคลเซียม (TAP-Ca), กำมะถัน (TAP-S), แมกนีเซียม (TAP-Mg), โพแทสเซียม (TAP-K) โดยให้มีความขุ่นเริ่มต้นเป็น 0.1 (ทำ 3 ซ้ำ) จากนั้นนำฟลาส์กไปเขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ตามช่วงเวลาที่เหมาะสมเป็นเวลาทั้งสิ้น 26 ชั่วโมง ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.1 พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 สามารถเจริญเติบโตในอาหาร TAP ได้ดีที่สุด ส่วนในอาหารที่ขาดธาตุอาหารจะพบการเจริญเติบโตที่ลดหลั่นกันลงมาดังนี้คือ เหล็ก (TAP-Fe), ทองแดง (TAP-Cu), แคลเซียม (TAP-Ca), กำมะถัน (TAP-S), แมกนีเซียม (TAP-Mg), โพแทสเซียม (TAP-K) แสดงว่าสาหร่ายต้องการธาตุอาหารที่สมบูรณ์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตที่รวดเร็วอย่างไรก็ตาม ที่การเจริญเติบโตน้อยที่สุด (TAP-K) ยังคงคิดเป็น 78.69% ของ TAP นั่นแสดงว่าเซลล์ยังคงสามารถเจริญเติบโตได้แม้จะขาดธาตุอาหารบางชนิดออกไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 กราฟค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP 7 ชนิด

จากผลของค่าการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้แม้ขาดธาตุอาหารบางชนิด แต่เนื่องจากผู้ทำการทดลองได้พบงานวิจัยที่ทำการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Scenedesmus obliquus* (Papazi, *et al.*, 2014) ในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียมแล้วพบว่า สามารถเพิ่มผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ ผู้ทดลองจึงสนใจที่จะทำการทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียมเป็นไปตามงานวิจัยดังกล่าว

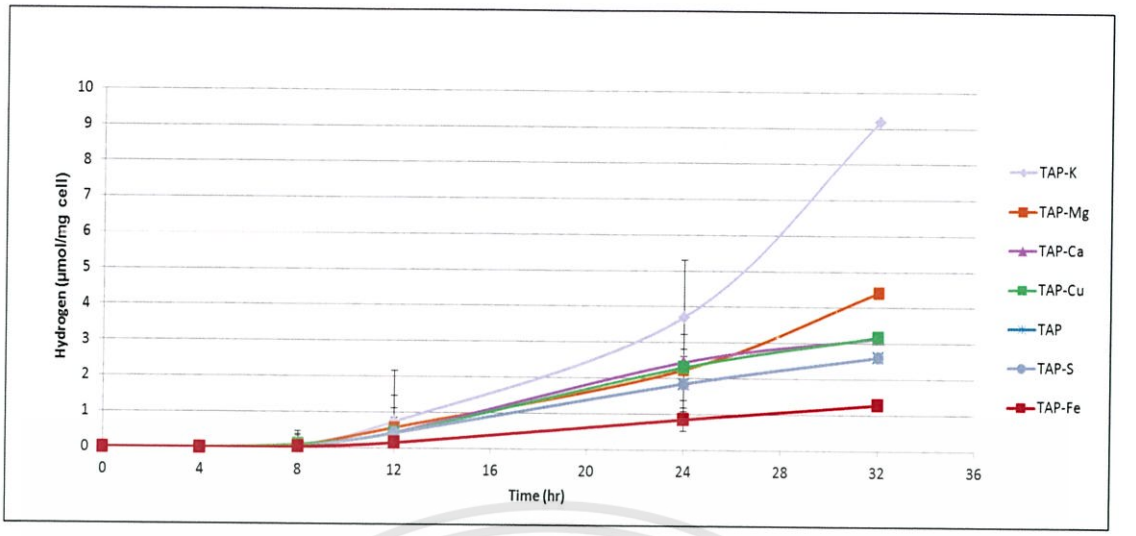
ดังนั้นจึงสนใจลองวัดค่าของไฮโดรเจนจากเซลล์ดู 2 แบบ ได้แก่ เซลล์ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมทันที และเซลล์ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมมาแล้ว 6 ชั่วโมง

4.2 การวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551

4.2.1 ค่าไฮโดรเจนจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อขาดธาตุอาหารทันทีก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์ที่เจริญในอาหาร TAP มากระจายในอาหารสูตรขาดธาตุอาหารทั้ง 7 สูตรโดยให้มีความขุ่นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 จากนั้นทำการบรรจุน้ำสาหร่ายลงในขวด vial ปิดฝา นำไปเป่าด้วยอาร์กอนเพื่อไล่ออกซิเจนทำการบ่มขวด vial ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ และวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ (GC) ทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ครั้งสุดท้ายที่ชั่วโมงที่ 32 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



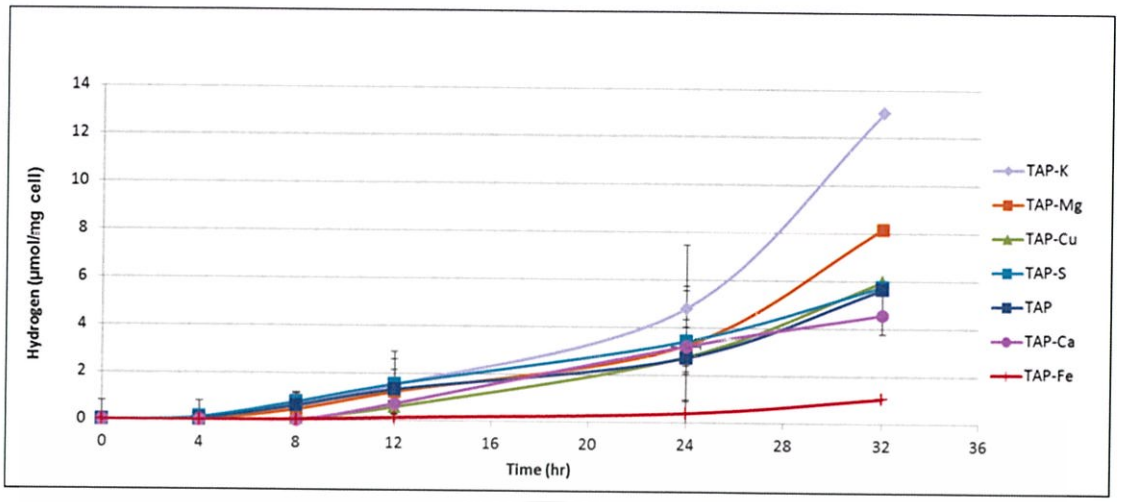
รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฮโดรเจนและเวลา เมื่อขาดธาตุอาหารทันทีก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน

จะเห็นได้ว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ 32 ชั่วโมงสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุดจากทุกอาหาร โดยอาหาร TAP (control) ผลิตได้ 2.61 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง ส่วนในอาหาร TAP-K ผลิตได้ปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 9.18 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง คิดเป็น 3.5 เท่าของอาหาร TAP หรือสูงกว่าอาหาร TAP 71.57% รองลงมาคือ อาหาร TAP-Mg ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 4.41 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง คิดเป็น 1.7 เท่า หรือสูงกว่าอาหาร TAP 40.82% และเมื่ออยู่ในอาหาร TAP-S และ TAP-Fe สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้น้อยกว่าอาหาร TAP ตามลำดับ

4.2.2 ค่าไฮโดรเจนจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อขาดธาตุอาหารเป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP ทั้ง 7 ชนิด โดยคำนวณให้มีปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 นำไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมงหลัง ก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน ทำการปรับขุ่นสุดท้ายให้เป็น 0.2 ไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ (GC) ทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 24 ชั่วโมงและวิเคราะห์ครั้งสุดท้ายที่ชั่วโมงที่ 32 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฮโดรเจนและเวลา เมื่อขาดธาตุอาหารเป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน

จะเห็นได้ว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ 32 ชั่วโมง สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุดจากทุกอาหาร โดยอาหาร TAP (control) ผลิตได้ 5.63 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง ส่วนในอาหาร TAP-K ผลิตได้ปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 13.02 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง คิดเป็น 2.3 เท่าของอาหาร TAP หรือสูงกว่าอาหาร TAP 56.75% รองลงมาคือ อาหาร TAP-Mg ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 8.17 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง คิดเป็น 1.5 เท่า หรือสูงกว่าอาหาร TAP 31.08%

ดังนั้นการขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมเป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนการผลิตไฮโดรเจนนั้นดีกว่าการขาดธาตุอาหารทันทีถึง 41.83% หรือคิดเป็น 1.4 เท่า

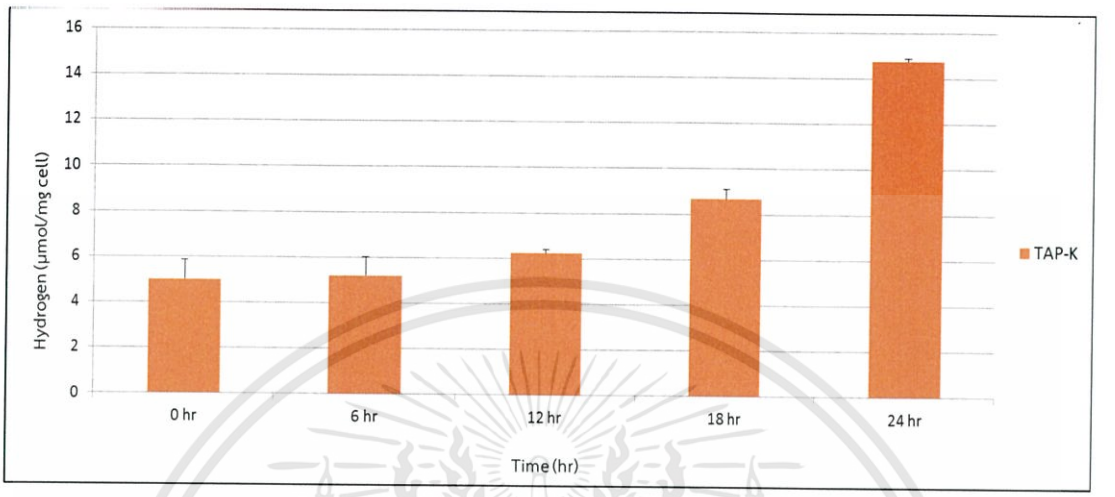
4.3 การวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียมตามเวลาที่กำหนด

เมื่อเห็นว่าการขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมเป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนการผลิตไฮโดรเจนดีกว่าการขาดธาตุอาหารทันที จึงลองทดสอบแปรค่าเวลาการขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมเป็นเวลา 0 – 24 ชั่วโมงก่อนการผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์ที่เจริญในอาหาร TAP มาลงเลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) โดยคำนวณให้มีปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 นำไปบ่มที่ตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 6,12,18 และ 24 ชั่วโมง โดยปริมาณความขุ่นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 ก่อนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ (GC)



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฮโดรเจนและเวลา เมื่อขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมเป็นเวลา 6,12,18 และ 24 ชั่วโมงก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน

จากผลการทดลองพบว่าหากสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียมทันที จะสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 9.18 ไมโครโมล/มิลลิกรัมเซลล์แห้ง แต่หากให้สาหร่ายอยู่ในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการผลิตไฮโดรเจนนั้น จะสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ถึง 14.45 ไมโครโมล/มิลลิกรัมเซลล์แห้ง คิดเป็น 1.5 เท่าของการขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมทันที หรือสูงขึ้น 36.47% ดังนั้นเมื่อเซลล์ขาดโพแทสเซียมเป็นเวลานาน จะทำให้ยิ่งได้ไฮโดรเจนเพิ่มมากขึ้น จึงเกิดความสนใจศึกษาการตอบสนองของเซลล์ว่ามีความเปลี่ยนแปลงอย่างไร โดยจะทำการศึกษาจุดที่มีผลต่อการผลิตอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งก็คือ ระบบแสงสอง (PSII)

4.4 การวัดการทำงานของระบบแสงสองที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP และ TAP-K

ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำงานของระบบแสงสอง โดยที่น้ำจะเกิดการแตกตัวได้ อิเล็กตรอน โปรตอน และออกซิเจนดังสมการ $2H_2O \xrightarrow{PSII} 4e^- + 4H^+ + O_2$ ดังนั้นปริมาณออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับการทำงานของระบบแสงสองด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.1 ตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 โดยใช้ Indophenol dye

นำ Grinding buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ Indophenol dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เซลล์ความขุ่นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและเติมน้ำปริมาตร 840 ไมโครลิตร วัดการทำงานของระบบแสงสอง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 602 นาโนเมตร จากนั้นเปลี่ยนปริมาตรของเซลล์เป็น 100 150 200 250 และ 300 ไมโครลิตรและเติมน้ำ 790 740 690 640 และ 590 มิลลิลิตรตามลำดับ โดยเมื่อ Indophenol dye (Oxidized forms) จะมีสีน้ำเงิน และเมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากพลาสควิโนนแล้วจะอยู่ในรูปรีดิวซ์ซึ่งไม่มีสี นั่นคือ ระบบการที่จะมีสีน้ำเงินซีดลง แต่เมื่อทำการทดลองแล้ว ผลที่ได้ไม่เป็นไปตามที่ต้องการ นั่นคือในอาหาร TAP เซลล์จะต้องมีการทำงานของระบบแสงสองเป็นปกติ ทำให้มีอิเล็กตรอนส่งไปให้พลาสโตควิโนน และส่งอิเล็กตรอนต่อไปให้ Indophenol dye ดังนั้น สีน้ำเงินจึงควรซีดลงแต่ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือได้บอกว่า ไม่มีการซีดจางลงของ Indophenol dye ซึ่งอาจเป็นเพราะว่า Indophenol dye อาจมีความจำเพาะที่ไม่เพียงต่อการรับอิเล็กตรอนจากระบบแสงสองของสาหร่าย จึงได้ลองเปลี่ยนตัวรับอิเล็กตรอนใหม่จาก Indophenol dye เป็น 2,6-Dichloroindophenol (DCPIP)

4.4.2 ตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 โดยใช้ 2, 6-Dichloroindophenol (DCPIP)

ในการใช้ DCPIP นั้น เพื่อติดตามกิจกรรมของระบบแสงสอง เมื่อ DCPIP อยู่ในรูปออกซิไดซ์จะเป็นสีน้ำเงิน และเมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากพลาสควิโนนแล้วจะอยู่ในรูปรีดิวซ์ซึ่งไม่มีสี ดังนั้นการใช้ DCPIP จึงสามารถติดตามการทำงานของระบบแสงสอง ได้ ซึ่งสามารถดูได้จากอัตราการลดลงของสีน้ำเงินของ DCPIP หากอัตราสูงแสดงว่าระบบแสงสอง ทำงานได้ดีจึงมีอิเล็กตรอนส่งไปยังพลาสโตควิโนนมาก สีของ DCPIP จึงซีดเร็ว และหากอัตราต่ำระบบแสงสอง ทำงานได้ไม่ดี เนื่องจากมีอิเล็กตรอนส่งไปยังพลาสโตควิโนนน้อย ดังสมการ

$$DCPIP_{oxi} \xrightarrow{2e^-} DCPIP_{red}$$

(Blue) (Colorless)

ในการทดลองนำ Grinding buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ DCPIP ปริมาตร 4 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เซลล์ความขุ่นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและเติมน้ำปริมาตร 846 ไมโครลิตร วัดการทำงานของระบบแสงสอง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโต-มิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร จากนั้นเปลี่ยนปริมาตรของเซลล์เป็น 100 150 200 250 และ 300 ไมโครลิตรและเติมน้ำ 796 746 696 646 และ 596 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเมื่อ DCPIP (Oxidized forms) จะมีสีน้ำเงิน และเมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากพลาสควิโนนแล้วจะอยู่ในรูปรีดิวซ์ซึ่ง

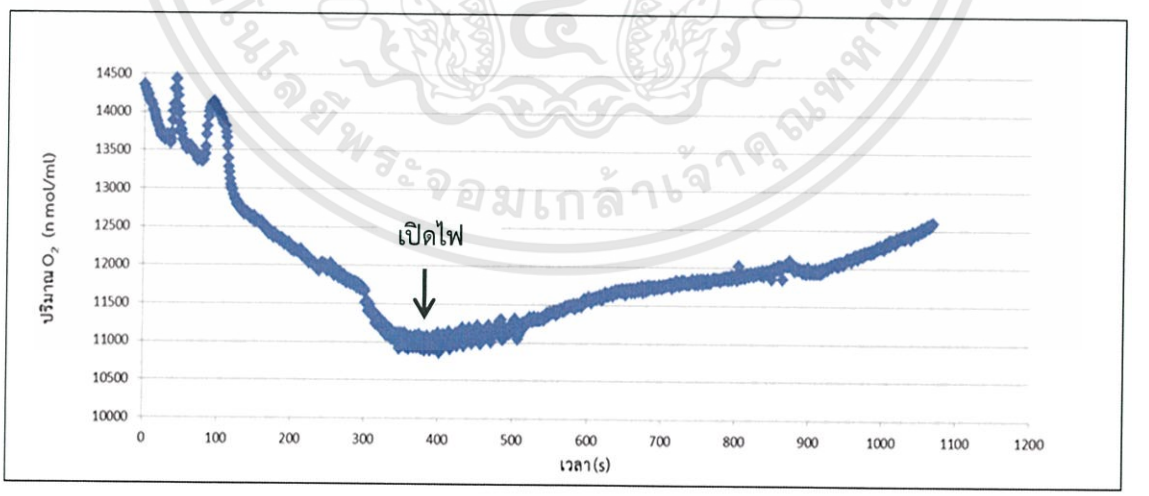
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่มีสี นั่นคือ ระบบการที่จะมีสีน้ำเงินซีดลง แต่เมื่อทำการทดลองแล้ว ผลที่ได้ไม่เป็นไปตามที่ต้องการ นั่นคือในอาหาร TAP เซลล์จะต้องมีการทำงานของระบบแสงสองเป็นปกติ ทำให้มีอิเล็กตรอนส่งไปให้พลาสโตควิโนน และส่งอิเล็กตรอนต่อไปให้ DCPIP ดังนั้น สีน้ำเงินจึงควรซีดถงแต่ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือได้บอกว่า ไม่มีการซีดจางลงของ DCPIP ซึ่งอาจเป็นเพราะว่า DCPIP อาจมีความจำเพาะที่ไม่เพียงต่อการรับอิเล็กตรอนจากระบบแสงสองของสาหร่าย

เมื่อ Indophenol dye และ 2, 6-Dichloroindophenol (DCPIP) ไม่สามารถติดตามการทำงานของระบบแสงสองได้ จึงจะลองเปลี่ยนมาวัดปริมาณออกซิเจนที่ผลิตจากเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีแสง

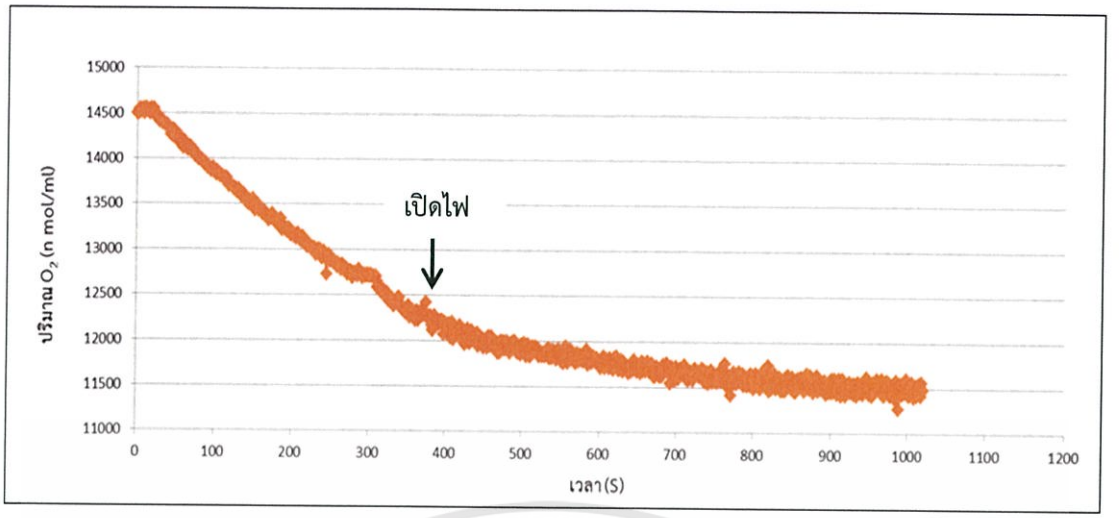
4.4.3 ตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 โดยใช้ Oxygen Electrode

การทดลองได้นำสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP และอาหารที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K) ที่ผ่านการพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปวัดออกซิเจนด้วยเครื่อง Oxygraph Plus oxygen electrode จะเห็นได้ชัดว่าในอาหาร TAP จะมีปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนช่วงเวลาการให้แสงที่ประมาณ 400-1,050 วินาที อัตราการผลิตออกซิเจนเฉลี่ยที่ได้ เท่ากับ 1,391.82 นาโนโมลต่อวินาทีต่อมิลลิกรัม (รูปที่ 4.5) ในขณะที่ในTAP-K นั้น ปริมาณออกซิเจนน้อยลงจนอัตราการผลิตออกซิเจนเฉลี่ยเป็นศูนย์ (รูปที่ 4.6) แสดงว่าระบบแสงสองสามารถทำงานได้อย่างปกติในอาหาร TAP แต่จะการทำงานจะถูกยับยั้งเมื่อสาหร่ายอยู่ในอาหารที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K)



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงระหว่างปริมาณออกซิเจนและเวลาของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงระหว่างปริมาณออกซิเจนและเวลาของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K)

หากอาหารที่ขาดโพแทสเซียมส่งผลต่อระบบแสงสองที่น้อยลง นั่นคือ ออกซิเจนที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสก็จะน้อยลงด้วยส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนที่มากกว่าอาหาร TAP นั่นเอง อย่างไรก็ตามมีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า โพแทสเซียมมีผลต่อการสะสมแป้ง (Papazi, *et al.*, 2014) ดังนั้นการขาดโพแทสเซียมจะทำให้การสะสมแป้งลดลง คาร์โบไฮเดรตจึงเกิดการสลายตัวผ่าน Indirect Photolysis ซึ่งทำให้มีอิเล็กตรอนที่มากขึ้นไหลมาสู่พลาสโตควิโนน (PQ) ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงศึกษาปริมาณแป้งที่มีอยู่ในเซลล์ในสภาวะ TAP เทียบกับ อาหารที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K)

4.5 การหาปริมาณแป้งจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP 7 ชนิด

สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ไม่เคยถูกสกัดแป้งจึงทดสอบหาปริมาณแป้ง 2 วิธีนี้

4.5.1 วิธีไอโอดีน (I_2)

โมเลกุลของไอโอดีน จะสอดแทรกเข้าไปในเกลียวของสารละลายแป้ง เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีสี จากสีเหลืองไปเป็นสีน้ำเงิน ดังสมการ $I_2 + H_2O \xrightarrow{\text{แป้ง}}$ สารละลายสีน้ำเงิน เราจึงทดลองด้วยการนำสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ที่มีปริมาณความขุ่นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มาสกัดสีของคลอโรฟิลล์ด้วยเอทานอล ทำให้เซลล์แตก แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาใช้ได้การทดสอบแป้งด้วยไอโอดีน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ผลที่ได้คือ ไม่มีความแตกต่างกันของสีไอโอดีน คาดว่าความว่องไว (sensitivity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของวิธีนี้อาจไม่เพียงพอ ปริมาณแป้งอาจมีปริมาณน้อยเกินกว่าที่จะสามารถเกิดสีกับไอโอดีนได้ จึงต้องลองหาวิธีใหม่

(a)

น้ำกลั่น + สารละลาย I_2 (control)

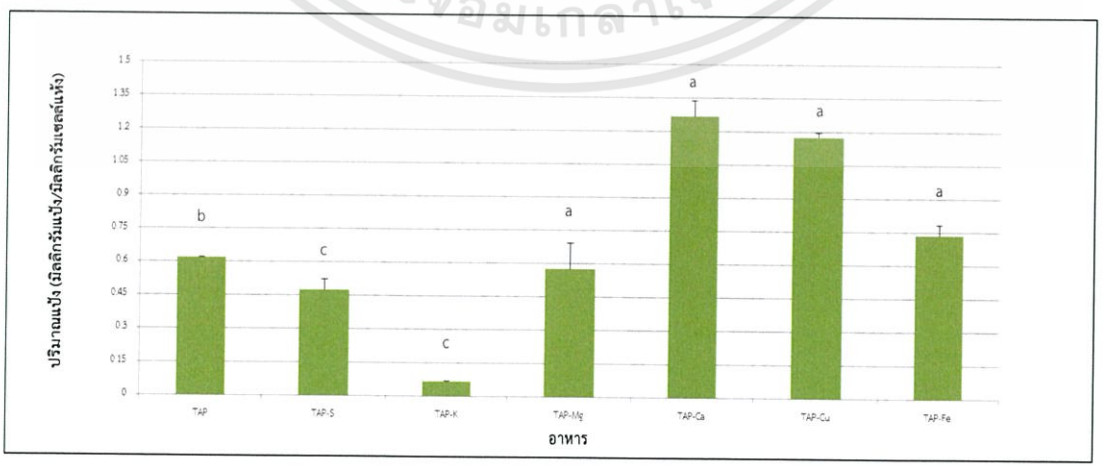
(b)

สารละลายน้ำสาหร่าย + สารละลาย I_2

รูปที่ 4.7 แสดงผลสีของสารละลายไอโอดีนที่ไม่แตกต่างกันเมื่ออยู่ในน้ำกลั่น (a) และเมื่ออยู่ในสารละลายกลูโคสจากสาหร่าย (b)

4.5.2 วัดด้วยวิธี Anthrone

หลังจากนำสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ที่มีปริมาณความขุ่นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP 7 ชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วมาผ่านกระบวนการ การสกัดแป้งด้วย Anthrone (Fernandes, *et al*., 2011) พบว่า ปริมาณแป้งในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียม มีปริมาณน้อยที่สุดคือ 0.0671 มิลลิกรัมแป้งต่อมิลลิกรัมเซลล์ ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับปริมาณแป้งของสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP อื่นๆ ดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงปริมาณแป้งในเซลล์จากอาหาร TAP ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า เมื่อสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 อยู่ในอาหารที่ขาดโพแทสเซียมนั้น จะทำให้ระบบแสงสองถูกยับยั้ง ส่งผลให้มีปริมาณออกซิเจนซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสน้อยลง แต่เนื่องจากมีการสลายของแป้งที่ถูกสะสมไว้ทำให้ยังคงมีอิเล็กตรอนไหลเวียนอยู่ในกระบวนการส่งไปให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อไปผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่มากขึ้นนั่นเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของการธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 สรุปได้ดังนี้

1. การวัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP 7 ชนิด โดยให้มีปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP มีการเจริญเติบโตดีที่สุด และพบการเจริญเติบโตลดหลั่นลงมา คือ อาหารสูตร TAP ที่ขาดเหล็ก (TAP-Fe), TAP ที่ขาดทองแดง (TAP-Cu), TAP ที่ขาดแคลเซียม (TAP-Ca), TAP ที่ขาดกำมะถัน (TAP-S), TAP ที่ขาดแมกนีเซียม (TAP-Mg), และ TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K) แสดงว่าสาหร่ายต้องการธาตุอาหารที่สมบูรณ์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตที่รวดเร็วอย่างไรก็ดีที่การเจริญเติบโตน้อยที่สุด (TAP-K) ยังคงคิดเป็น 78.69% ของ TAP

2. การวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551

เมื่อขาดธาตุอาหารทันทีก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน โดยใช้เซลล์ที่มีปริมาณความขุ่นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 ใส่อาหาร TAP ทั้ง 7 ชนิด นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ (GC) ทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ครั้งสุดท้ายในชั่วโมงที่ 32 พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด โดยมีอัตราการผลิตเท่ากับ 9.18 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์ ซึ่งมีค่าอัตราของการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าอาหารสูตร TAP ถึง 71.57%

เมื่อขาดธาตุอาหารเป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ทั้ง 7 ชนิด โดยให้มีปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 และให้มีปริมาณความขุ่นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ (GC) ทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ครั้งสุดท้ายในชั่วโมงที่ 32 พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด โดยมีอัตราการผลิตเท่ากับ 13.02 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์ ซึ่งมีค่าอัตราของการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าอาหาร TAP ถึง 56.75%

จึงสรุปได้ว่าการผลิตไฮโดรเจนสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมมีค่าอัตราของการผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP และสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดอื่นๆ

3. จากการศึกษาการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารที่ขาดโพแทสเซียมตามเวลาที่กำหนด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเซลล์ที่เจริญในอาหาร TAP เลี้ยงในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K) โดยให้มีปริมาณความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 และให้มีปริมาณความขุ่นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 ก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ (GC) พบว่าเมื่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดโพแทสเซียมเป็นเวลายิ่งนาน ยิ่งจะทำให้ได้ค่าอัตราของการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มมากขึ้น

4. จากการศึกษาตรวจสอบการทำงานของระบบแสงสอง ของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 โดยใช้ Oxygen Electrode

การวัดปริมาณออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP และ ในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียม จากนั้นผ่านการพ่นก๊าซอาร์กอนก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดปริมาณออกซิเจนใช้เครื่อง Oxygraph Plus Oxygen electrode พบอย่างชัดเจนว่าในอาหาร TAP มีปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ช่วงเวลาการให้แสงที่ประมาณ 400-1,050 วินาที จนคงที่ โดยมีอัตราของการผลิตออกซิเจนเฉลี่ยได้เท่ากับ 1,391.82 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัม ในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมนั้น (TAP-K) อัตราของการผลิตออกซิเจนลดลงจนสุดท้ายมีค่าเป็นศูนย์ แสดงให้เห็นว่าระบบแสงสองจะทำงานได้อย่างปกติในอาหาร TAP และการทำงานจะถูกยับยั้งเมื่อสาหร่ายเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K)

5. จากการศึกษาการสกัดแป้งจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 นำเซลล์สาหร่ายที่มีปริมาณความขุ่นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ทั้ง 7 ชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นไปผ่านกระบวนการ การสกัดแป้ง พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมมีปริมาณแป้งที่น้อย โดยมีปริมาณเท่ากับ 0.0671 มิลลิกรัมแป้งต่อมิลลิกรัมเซลล์ จึงทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนมีมากขึ้น ซึ่งเหตุที่พบแป้งในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมมีปริมาณน้อย เป็นผลมาจากการการทำงานของ Indirect photolysis สลายแป้งเพื่อให้ได้อิเล็กตรอนและส่งไปให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจนนั่นเอง และในอาหาร TAP มีปริมาณแป้งที่มาก โดยมีปริมาณเท่ากับ 0.6188 มิลลิกรัมแป้งต่อมิลลิกรัมเซลล์ เนื่องจากระบบแสงสองมีการทำงานที่ปกติ ไม่ได้มีการสลายแป้งที่สะสมไว้ภายในเซลล์แต่อย่างใด จึงสามารถสรุปได้ว่าเมื่อสาหร่ายอยู่ในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียม จะมีการสลายแป้งที่สะสมไว้เพื่อให้ได้อิเล็กตรอนส่งผ่านไปในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจริง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการทำการเก็บข้อมูลค่าการเจริญเติบโตให้นานขึ้นกว่าเดิม เพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 และช่วงระยะเวลาที่หยุดการเจริญเติบโต

2. ควรมีการศึกษาให้สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 มีการขาดธาตุอาหารโพแทสเซียม ที่เวลานานยิ่งขึ้น เพื่อพิสูจน์ว่าการขาดธาตุโพแทสเซียมเป็นเวลานาน จะทำให้ได้ค่าไฮโดรเจนที่มากขึ้น

3. ควรมีการศึกษาการบ่มสาหร่ายเพื่อผลิตไฮโดรให้นานกว่าเวลาเพื่อทำให้เห็นว่า หากบ่มนานขึ้น จะทำให้ได้ค่าไฮโดรเจนมากขึ้นอีก

4. ควรมีการศึกษาการเลี้ยงสาหร่ายที่สภาวะอุณภูมิ ที่มากขึ้น หรือน้อยลง เพื่อตรวจสอบหากสาหร่ายขาดธาตุโพแทสเซียมแล้ว จะผลิตไฮโดรเจนมากขึ้นหรือน้อยลง เมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

5. ควรมีการศึกษาการเลี้ยงสาหร่ายที่สภาวะความเข้มแสง ที่มากขึ้น หรือน้อยลง เพื่อตรวจสอบ เมื่อสาหร่ายขาดธาตุโพแทสเซียมแล้ว จะผลิตไฮโดรเจนมากขึ้นหรือน้อยลง เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มแสง

6. ควรมีการศึกษาการเพิ่มปริมาณความขุ่นของสาหร่ายให้มากขึ้นหรือน้อยลง เพื่อติดตามผลการผลิตไฮโดรเจน

7. ควรมีการศึกษาการเพิ่มหรือลดปริมาตรอาหารในการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อติดตามผลการผลิตไฮโดรเจน

8. ควรมีการศึกษากระบวนการตรึงสาหร่าย และเพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียมเพื่อการผลิตไฮโดรเจนที่มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2557. สืบค้นเมื่อ 18 กุมภาพันธ์ 2560. จาก http://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production/

ธรรมนูญ ศรีทะวงศ์. 2549. **พลังงานไฮโดรเจน.** สืบค้นเมื่อ 18 กุมภาพันธ์ 2560. จาก http://www.vcharkarn.com/varticle/420

สุมาลี ดุลยอนุกิจ. 2535. **แร่ธาตุอาหารของสาหร่าย.** สืบค้นเมื่อ 20 กุมภาพันธ์ 2560. จาก https://web.ku.ac.th/nk40/nk/data/11/fact4.htm

เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์, อรัญ อินเจริญศักดิ์, และ Peter Lindblad. 2010. "การคัดกรองสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนและการปรับภาวะให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Eroglu, E. and Melis, A. 2016. **Microalgal hydrogen production research.** International Journal of Hydrogen Energy. (41) : 12772-12798.

Fernandes, B. Dragone, G. Abreu, P. Ana Geada, P. Teixeira J. and Vicente A. 2011. "Starch determination in *Chlorella vulgaris* a comparison between acid and enzymatic methods" J Appl Phycol (2012) : 24 : 1203-1208.

Maneeruttanarungroj, C. Incharoensakdi, A. and Lindblad, P. 2010. "A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production." International Journal of Hydrogen Energy. (35) : 13193-13199.

Papazi, A. Gjindali, A. Kastanaki, E. Assimakopoulos, K. Stamatakis, K. and Kotzabasis, K. 2014. "Potassium deficiency, a "smart" cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus.*" International Journal of Hydrogen Energy. (39) : 19452-19464.

Phunpruch, S. and Incharoensakdi, A. 2014. "Biohydrogen Production by Microalgae Isolated from the Rice Paddle Field in Thailand." Thesis of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Scott, N. and B. Greenberg 1995. **Measurement of Photosynthetic Activity in Plant Cell Fractions.** Page 71-80, in Tested studies for laboratory teaching, Volume 16 (C.A.Goldman, Editor). Proceedings of the 16th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 273 pages.

Tamburic, B. Fessehaye W. Zemichael, Geoffrey C. Maitland, and Hellgardt, K. 2010. "Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii.*" International Journal of Hydrogen Energy. (36) : 7872-7876.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ตารางที่ ก.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร Tris-Acetate-Phosphate (TAP-medium)

ลำดับที่	สารเคมี		จำนวน (กรัม)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตร 1 ลิตร / TAP
1	Tris		24.2	100	10
2	TAP-Salt	NH_4Cl	7.50	500	25
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.00		
		$CaCl \cdot 2H_2O$	1.00		
3	Phosphate Solution	K_2HPO_4	2.88	10	1
		KH_2PO_4	1.44		
4	Trace element	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.500	10	1
		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.220		
		H_3BO_3	0.114		
		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.05		
		$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05		
		$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.016		
		$CuSo_4 \cdot 5H_2O$	0.016		
		$(NH_4)_6MoO_3$	0.011		
5	CH_3COOH , conc.				1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-K (TAP ที่ปราศจากโพแทสเซียม)

ตารางอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-K (TAP ที่ปราศจากโพแทสเซียม) ต้องเปลี่ยนสารเคมี ดังนี้

เปลี่ยนสารเคมี Phosphate solution จาก K_2HPO_4 เป็น Na_2HPO_4

เปลี่ยนสารเคมี Phosphate solution จาก KH_2PO_4 เป็น $Na_2H_2PO_4 \cdot 2H_2O$

ลำดับที่	สารเคมี		จำนวน (กรัม)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตร 1 ลิตร / TAP
1	Tris		24.2	100	10
2	TAP-Salt	NH_4Cl	7.50	500	25
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.00		
		$CaCl \cdot 2H_2O$	1.00		
3	Phosphate Solution	Na_2HPO_4	1.7892	10	1
		$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	1.6381		
4	Trace element	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.500	10	1
		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.220		
		H_3BO_3	0.114		
		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.05		
		$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05		
		$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.016		
		$CuSo_4 \cdot 5H_2O$	0.016		
		$(NH_4)_6MoO_3$	0.011		
5	CH_3COOH , conc.				1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.3 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-S (TAP ที่ปราศจากกำมะถัน)

ตารางอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-S (TAP ที่ปราศจากกำมะถัน) ต้องเปลี่ยนสารเคมี ดังนี้

เปลี่ยนสารเคมี TAP-Salt จาก $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เป็น $MgCl_2$

เปลี่ยนสารเคมี Trace element solution จาก $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ เป็น $ZnCl_2$

เปลี่ยนสารเคมี Trace element solution จาก $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ เป็น $FeCl_2 \cdot 4H_2O$

เปลี่ยนสารเคมี Trace element solution จาก $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ เป็น $CuCl_2 \cdot 2H_2O$

ลำดับที่	สารเคมี		จำนวน (กรัม)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตร 1 ลิตร / TAP
1	Tris		24.2	100	10
2	TAP-Salt	NH_4Cl	7.50	500	25
		$MgCl_2$	7.7235		
		$CaCl \cdot 2H_2O$	1.00		
3	Phosphate Solution	K_2HPO_4	2.88	10	1
		KH_2PO_4	1.44		
4	Trace element	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.500	10	1
		$ZnCl_2$	0.1050		
		H_3BO_3	0.114		
		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.05		
		$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	0.0394		
		$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.016		
		$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.0098		
		$(NH_4)_6MoO_3$	0.011		
5	CH_3COOH , conc.				1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.4 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-Mg (TAP ที่ปราศจากแมกนีเซียม)

ตารางอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-Mg (TAP ที่ปราศจากแมกนีเซียม) ต้องไม่ใส่สารเคมี ดังนี้

สารเคมี TAP-Salt ไม่ใส่ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

ลำดับที่	สารเคมี		จำนวน (กรัม)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตร 1 ลิตร / TAP
1	Tris		24.2	100	10
2	TAP-Salt	NH_4Cl	7.50	500	25
		$CaCl \cdot 2H_2O$	1.00		
3	Phosphate Solution	K_2HPO_4	2.88	10	1
		KH_2PO_4	1.44		
4	Trace element	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.500	10	1
		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.220		
		H_3BO_3	0.114		
		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.05		
		$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05		
		$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.016		
		$CuSo_4 \cdot 5H_2O$	0.016		
		$(NH_4)_6MoO_3$	0.011		
5	CH_3COOH , conc.				1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.5 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-Cu (TAP ที่ปราศจากทองแดง)

ตารางอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-Cu (TAP ที่ปราศจากทองแดง) ต้องไม่ใส่สารเคมี ดังนี้

สารเคมี Trace element solution ไม่ใส่ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

ลำดับที่	สารเคมี		จำนวน (กรัม)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตร 1 ลิตร / TAP
1	Tris		24.2	100	10
2	TAP-Salt	NH_4Cl	7.50	500	25
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.00		
		$CaCl \cdot 2H_2O$	1.00		
3	Phosphate Solution	K_2HPO_4	2.88	10	1
		KH_2PO_4	1.44		
4	Trace element	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.500	10	1
		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.220		
		H_3BO_3	0.114		
		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.05		
		$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05		
		$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.016		
		$(NH_4)_6MoO_3$	0.011		
5	CH_3COOH , conc.				1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.6 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-Ca (TAP ที่ปราศจากแคลเซียม)

ตารางอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-Ca (TAP ที่ปราศจากแคลเซียม) ต้องไม่ใส่สารเคมี ดังนี้

สารเคมี TAP-Salt ไม่ใส่ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

ลำดับที่	สารเคมี		จำนวน (กรัม)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตร 1 ลิตร / TAP
1	Tris		24.2	100	10
2	TAP-Salt	NH_4Cl	7.50	500	25
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.00		
3	Phosphate Solution	K_2HPO_4	2.88	10	1
		KH_2PO_4	1.44		
4	Trace element	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.500	10	1
		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.220		
		H_3BO_3	0.114		
		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.05		
		$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05		
		$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.016		
		$CuSo_4 \cdot 5H_2O$	0.016		
		$(NH_4)_6MoO_3$	0.011		
5	CH_3COOH , conc.				1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.7 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-Fe (TAP ที่ปราศจากเหล็ก)

ตารางอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP-Ca (TAP ที่ปราศจากแคลเซียม) ต้องไม่ใส่สารเคมี ดังนี้

สารเคมี Trace element solution ไม่ใส่ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

ลำดับที่	สารเคมี		จำนวน (กรัม)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตร 1 ลิตร / TAP
1	Tris		24.2	100	10
2	TAP-Salt	NH_4Cl	7.50	500	25
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.00		
		$CaCl \cdot 2H_2O$	1.00		
3	Phosphate Solution	K_2HPO_4	2.88	10	1
		KH_2PO_4	1.44		
4	Trace element	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.500	10	1
		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.220		
		H_3BO_3	0.114		
		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.05		
		$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.016		
		$CuSo_4 \cdot 5H_2O$	0.016		
		$(NH_4)_6MoO_3$	0.011		
5	CH_3COOH , conc.				1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การคำนวณอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

ตัวอย่างการคำนวณค่าอัตราของการผลิตไฮโดรเจน ชนิดอาหาร TAP เมื่อขาดธาตุอาหารโพแทสเซียม เป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนการบ่มเพื่อผลิตไฮโดรเจน

1. การหา head space ของไฮโดรเจน

STD 0.4 ml ได้ Area เท่ากับ 1,936.98363 mV.S

1.1 ได้ Area 1,936.98363 mV.S จะเข้มข้น 4%

ถ้า Area 952.5949 mV.S จะเข้มข้น $\frac{952.5949X4}{1,936.98363}$

= 1.96717173%

1.2 ถ้า ปริมาตร 100 ml จะมี H_2 1.96717173 ml

ถ้า ปริมาตร 8.4 ml จะมี H_2 $\frac{8.4X1.96717173}{100}$ = 0.165242425 ml

1.3 Gas 22.4 L (22,400 ml) มีปริมาณ 1 mol

Gas 0.165242425 ml มีปริมาณ $\frac{0.165242425 \text{ ml X } 1 \text{ mol}}{22,400\ ml}$

= 7.37689399 µmol

2. การหาปริมาณเซลล์ว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dried Weight) จำนวนเท่าไหร่

จากสมการ y = 1.7915X

สมมติวัด OD_{730} = 0.23089

ดังนั้น น้ำหนักเซลล์แห้ง = $\frac{0.20293 \text{ X } 5\ ml}{1.7915}$ = 0.566368965 mg

3. ทำการคำนวณอัตราการผลิตไฮโดรเจนในหน่วย µmol H_2/ mg DW

จะได้ว่า $\frac{7.37689399}{0.566368965}$ = 13.02489093 µmol H_2/ mg DW

หรือ = 13,024.89093 nmol H_2/ mg DW

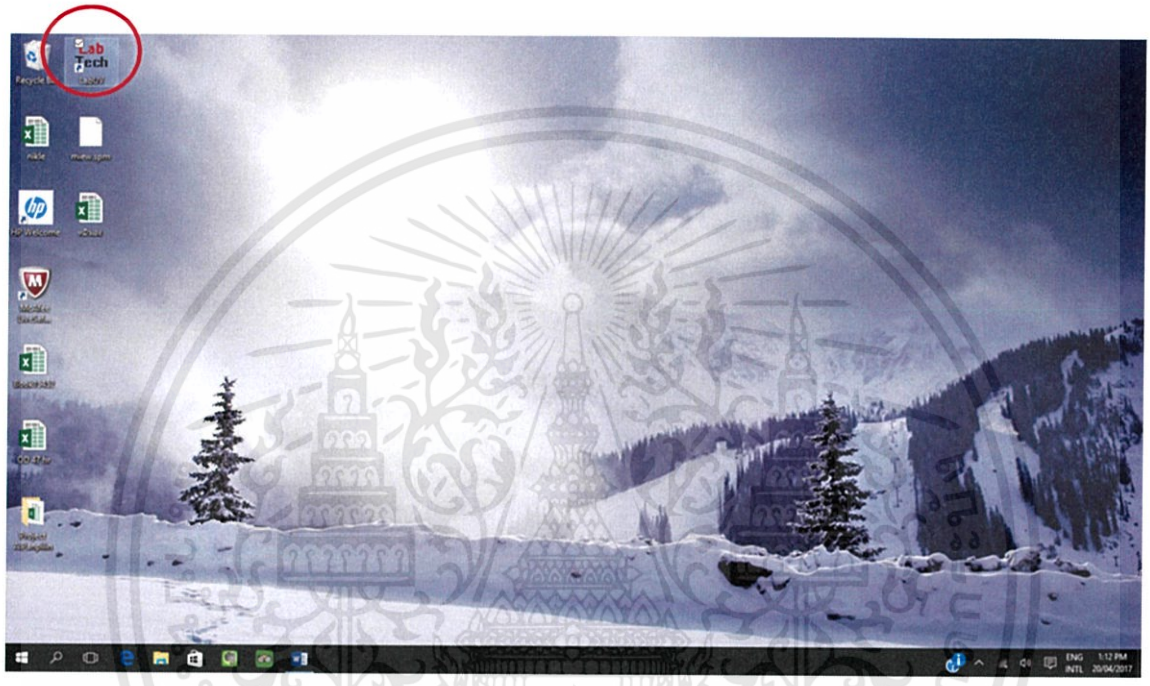
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้โปรแกรมเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer)

เครื่อง LabTech UV1499

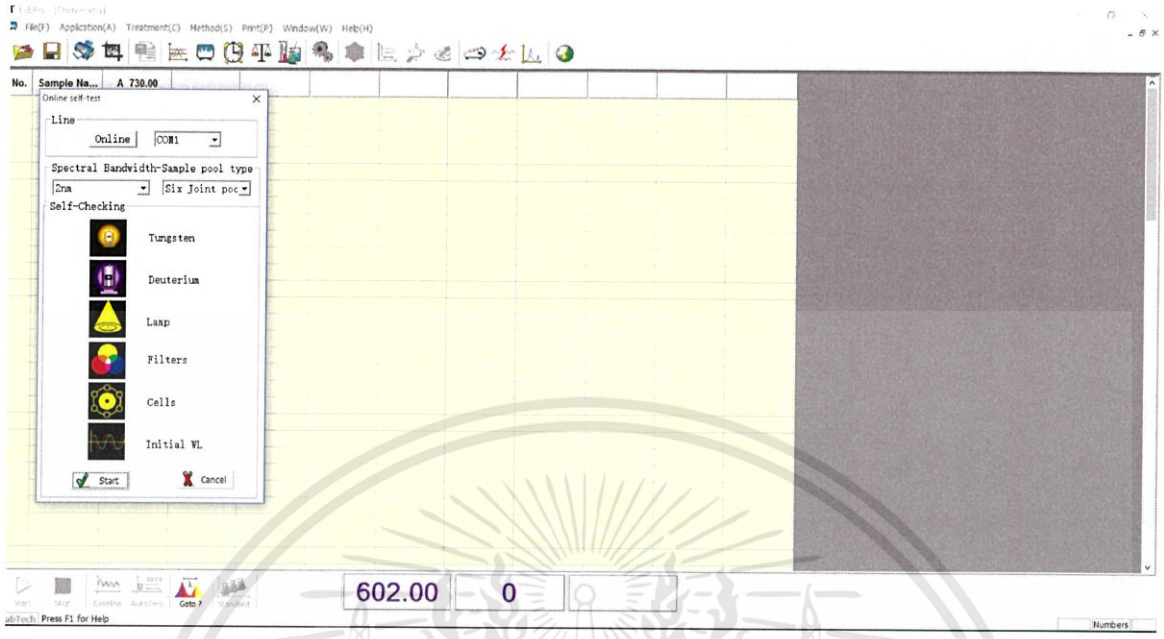
ขั้นตอนการดำเนินงานบนคอมพิวเตอร์ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. เปิดโปรแกรม LabTech พอหน้าจอเปิดออกมา โปรแกรมจะทำการตรวจเช็คสภาพการใช้งานต่างๆ

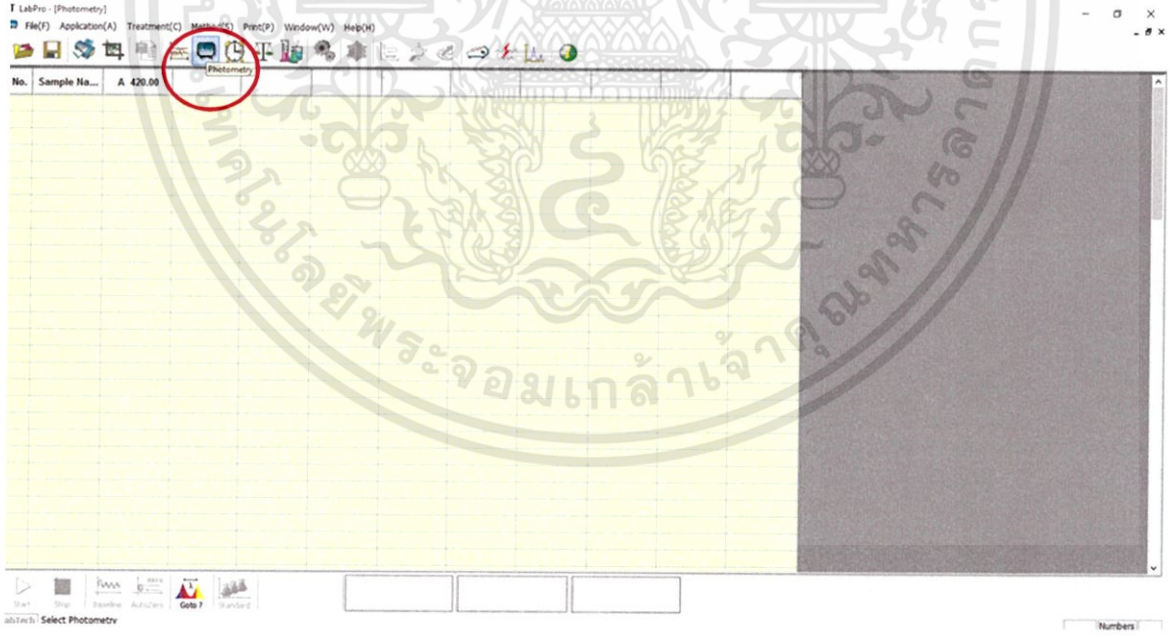


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เมื่อเข้าโปรแกรมเรียบร้อยแล้วให้ทำการวอร์มเครื่องก่อนจะใช้งาน เป็นเวลา 15 นาที

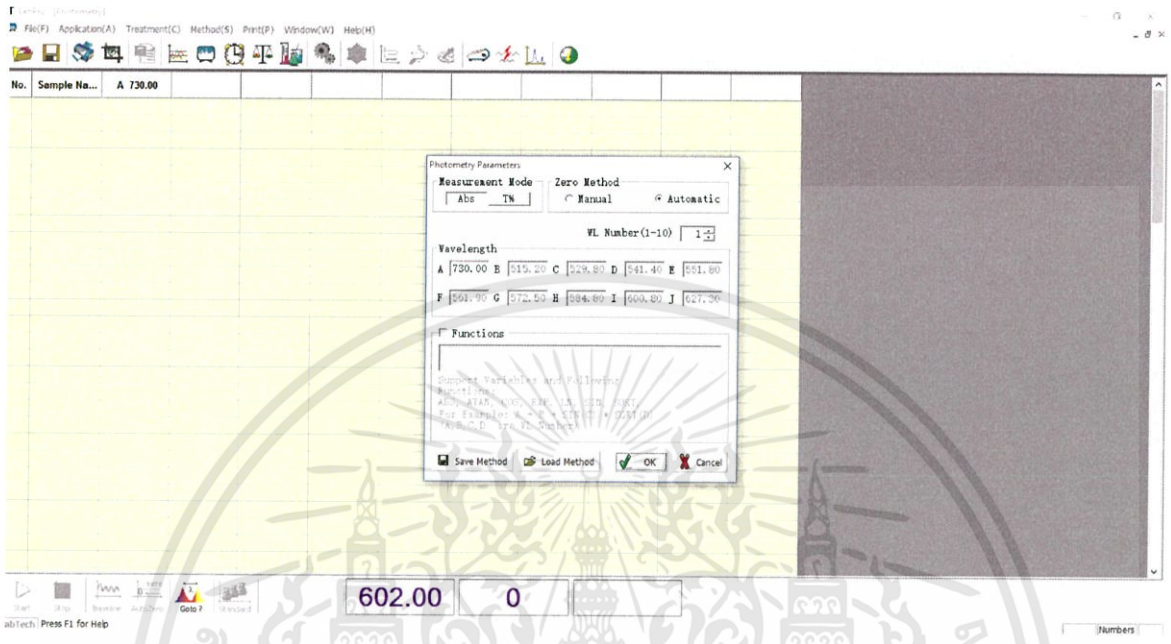


3. จากนั้นเลือกที่หน้าโปรแกรม Photometry จะมีหน้าต่าง Photometry Parameters ปรากฏขึ้นมา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เมื่อหน้าต่าง Photometry Parameters ปรากฏขึ้น ให้กำหนดค่าความยาวคลื่น (Wavelength) ตามที่ต้องการจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่างนั้นๆ ก่อนที่จะทำการวัดค่าตัวอย่าง ให้ทำการทดสอบแบลงค์ (Blank Solution) ก่อนทุกครั้ง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้