ชื่อโครงการ การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* โดยการใช้สารยับยั้ง

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดินคณะวิทยาศาสตร์ประจำปี 2559

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2560

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุหน่วยงานต้นสังกัด

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงแล้วได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และยังสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยใช้น้ำและแสงอาทิตย์ซึ่งมีอยู่จำนวนมากเป็นแหล่งวัตถุดิบ ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มเซลล์เดียว *Aphanothece halophytica* เป็นไซยาโนแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน โดยสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ทั้งจากกระบวนการสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะที่มีแสง และจากการย่อยสลายไกลโคเจนที่เก็บอยู่ภายในเซลล์ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศในที่มืด ไฮโดรเจนจะถูกผลิตมาจากการทำงานของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนใน *A. halophytica* โดยใช้สารยับยั้งหลายชนิด ได้แก่ สารยับยั้งระบบแสงสอง สารยับยั้งกระบวนการหายใจ สารยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน สารยับยั้งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และสารยับยั้งวัฏจักรเครบส์ และศึกษาผลของสารยับยั้งต่อจำนวนเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณไฮโดรเจน และปริมาณออกซิเจนใน *A. halophytica* จากการทดลองพบว่า อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ที่บ่มภายใต้สภาวะมืดสูงกว่าที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีแสง *A. halophytica* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น เมื่อบ่มด้วยสารยับยั้งชนิดต่างๆ ทั้งในที่มืดและที่มีแสง สารยับยั้งซิมาซีนจัดเป็นสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนโดย *A. halophytica* เซลล์ที่บ่มในซิมาซีนความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 5.260 $\pm$ 0.064 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง นอกจากนี้ เมื่อบ่มเซลล์ในสารยับยั้ง ทำให้จำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง อัตราการผลิตออกซิเจนของเซลล์ที่บ่มในสารยับยั้งภายใต้สภาวะที่มีแสงสูงกว่าในที่มืด นอกจากซิมาซีนที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนแล้ว ยังสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสอีกด้วย

คำสำคัญ: การผลิตไฮโดรเจน, สารยับยั้ง, ไซยาโนแบคทีเรีย

Research Title: Enhancement of H_2 Production Efficiency by Unicellular Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* Using Inhibitor

Researchers:

Asst.Prof.Dr.Saranya Phunpruch, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Prof.Dr.Aran Incharoensakdi, Faculty of Science, Chulalongkorn University

ABSTRACT

Cyanobacteria are capable of oxygenic photosynthesis and can produce H_2 via photosynthesis using unlimited raw materials; sunlight and water. The unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* is one of the high potential H_2 producers. *A. halophytica* can produce H_2 via photosynthesis in the light and via the catabolism of storage glycogen under dark anaerobic condition. H_2 is produced by the action of bidirectional hydrogenase activity. This work aimed to investigate the increasing efficiency of H_2 production by *A. halophytica* by using many kinds of inhibitors; photosystem II inhibitor, respiration inhibitor, uncoupling agent of oxidative phosphorylation, CO_2 fixation inhibitor and Krebs' cycle inhibitor. The effects of inhibitors on cell number, chlorophyll content, H_2 production and O_2 production of *A. halophytica* were investigated. The result showed that H_2 production rate of *A. halophytica* incubated under dark condition was higher than that under light condition. *A. halophytica* could enhance H_2 production rate when incubated in many kinds of inhibitors under both dark and light conditions. Simazine was the highest efficient inhibitor for enhancing H_2 production by *A. halophytica.* Cells incubated in 25 μM simazine gave the highest H_2 production rate with 5.260 ± 0.064 μmolH_2 mg chl^{-1} h^{-1} under dark condition. In addition, cell concentration and chlorophyll a content of *A. halophytica* were decreased when *A. halophytica* cells were treated with inhibitors. O_2 production rate of *A. halophytica* cells incubated in inhibitors under light condition was higher than that under darkness. Besides simazine with a concentration of 25 μM could increase H_2 production rate, it could also increase bidirectional hydrogenase activity.

Keywords: Hydrogen production, Inhibitor, Cyanobacteria

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* โดยการใช้สารยับยั้ง ดำเนินงานจนสามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๙ คณะผู้ร่วมวิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัยที่ได้ทุ่มเมกำลังกายและกำลังใจในการทำการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II
กิตติกรรมประกาศ..... III
สารบัญ..... IV
สารบัญตาราง..... VII
สารบัญรูป..... VIII
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
2.1 พลังงาไฮโดรเจน..... 4
2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน 6
2.3 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว..... 12
2.4 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย..... 13
2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย..... 16
2.6 ไซยาโนแบคทีเรีย..... 19
2.7 ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*..... 22
2.8 สารยับยั้ง..... 22
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 34
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย..... 36
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 36
3.2 สารเคมี..... 36
3.3 อุปกรณ์..... 37
3.4 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* 38

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.5 วิธีการหาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ..... 38
3.6 วิธีการนับจำนวนเซลล์..... 38
3.7 วิธีการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*.... 39
3.8 วิธีการคัดเลือกชนิดของสารยับยั้งเพื่อใช้ในการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*..... 39
3.9 วิธีการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งต่อจำนวนเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณไฮโดรเจน และปริมาณออกซิเจน..... 40
3.10 วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส..... 40
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 41
4.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*..... 41
4.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*..... 50
4.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งต่อการปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*..... 58
4.4 ผลของสารยับยั้งซิมาซีนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* 68
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... 68
บรรณานุกรม 70
ภาคผนวก..... 74

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ [Gas Chromatograph–Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)]..... 39

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ค่าพลังงานความร้อนของก๊าซไฮโดรเจนและแหล่งพลังงานอื่นๆ..... 5
2.2 ไอโซโทปของไฮโดรเจน..... 5
2.3 กระบวนการอิเล็กโตรไลซิสของน้ำ..... 8
2.4 กระบวนการโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอล..... 9
2.5 กระบวนการไบโอโฟโตไลซิส..... 11
2.6 การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว..... 13
2.7 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย..... 15
2.8 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยของไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน..... 16
2.9 การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส..... 17
2.10 การผลิตไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสและการสลายไฮโดรเจนของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส 18
2.11 การทำงานของเอนไซม์ไบไดเรคชันนาลไฮโดรจีเนส..... 19
2.12 ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีที่ไม่เป็นเส้นสาย..... 20
2.13 ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์รูปร่างเป็นเส้นสาย..... 21
2.14 ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*..... 22
2.15 การขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย.... 23
2.16 โครงสร้างของ DCMU..... 24
2.17 การยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนของ DCMU จากระบบแสงสองสู่พลาสโตควิโนนในกระบวนการ
สังเคราะห์ด้วยแสง..... 25
2.18 โครงสร้างของ CCCP..... 25
2.19 การขนส่งอิเล็กตรอนโดยการแตกตัวของน้ำ..... 26
2.20 โครงสร้างของ water splitting enzyme system Y เป็นโปรตีนเชิงซ้อนที่มีองค์ประกอบ
ของแมงกานีส..... 26
2.21 โครงสร้างของอะทราซีน..... 26
2.22 ปฏิกิริยาระหว่างอะทราซีนและโปรตีน D1 ในระบบแสงสอง..... 27
2.23 โครงสร้างของซิมาซีน..... 27
2.24 องค์ประกอบของโปรตีน D1 และ D2 และบริเวณที่ซิมาซีนเข้ามาจับ..... 28

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

2.25 การยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของโพแทสเซียมไซยาไนด์ และโซเดียมเอไซด์ในกระบวนการในไซยาโนแบคทีเรีย..... 29
2.26 โครงสร้างและปฏิกิริยาของเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส..... 30
2.27 การทำงานของเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส..... 30
2.28 การขัดขวางการส่งอิเล็กตรอนของโรทีโนนจาก NAD(P)H สู่พลาสโตควิโนน..... 31
2.29 การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน..... 31
2.30 โครงสร้างของไดไนโตรฟีนอล..... 32
2.31 การนำโปรตอนผ่านเข้าออกเมมแบรนของไดไนโตรฟีนอล..... 32
2.32 กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์..... 33
2.33 การจับกันของสารประกอบอาร์ซีเนตกับเอนไซม์ไพรูเวทดีไฮโดรจิเนส..... 34
4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงสองที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง..... 43
4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารที่ยับยั้งกระบวนการหายใจที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง..... 46
4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชันไดไนโตรฟีนอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง..... 47
4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ดีแอลกลีเซอรอลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง..... 48
4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งวัฏจักรเครบส์โซเดียมอาร์ซิเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง..... 49
4.6 ผลของความเข้มข้นของ CCCP ต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ..... 50
4.7 ผลของความเข้มข้นของ DCMU ต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ..... 52
4.8 ผลของความเข้มข้นของอะทราซีนต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ..... 53

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.9 ผลของความเข้มข้นของซิมาซีนต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ..... 55
4.10 ผลของความเข้มข้นของไกลโฟเสตต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ..... 56
4.11 ผลของความเข้มข้นของโรทีโนนต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ..... 57
4.12 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้ง CCCP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด..... 59
4.13 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้ง DCMU ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด..... 60
4.14 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งอะทราซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด..... 61
4.15 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งซิมาซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด..... 63
4.16 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งไกลโฟเสตที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด..... 64
4.17 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งโรทีโนนที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด..... 65
4.18 กิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งซิมาซีนที่มีความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด..... 67