

การคัดแยกสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน
และการปรับสภาวะเพื่อเพิ่มการผลิต

ISOLATION OF HYDROGEN PRODUCING GREEN ALGAE
AND OPTIMIZATION FOR ENHANCED PRODUCTION



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2564

KMITL-2021-SC-M-020-014

ISOLATION OF HYDROGEN PRODUCING GREEN ALGAE
AND OPTIMIZATION FOR ENHANCED PRODUCTION



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2021

KMITL-2021-SC-M-020-014



COPYRIGHT 2021

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนและการปรับสภาวะเพื่อเพิ่มการผลิต
ชื่อนักศึกษา	ณัฐวิภา เหล่าเกื้อ
รหัสประจำตัว	62605069
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2564
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียวเป็นหนึ่งในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่สามารถเปลี่ยนพลังงานแสงไปเป็นพลังงานทางเคมี โดยใช้โปรตอนและอิเล็กตรอนเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน งานวิจัยนี้ศึกษาอัตราการเจริญและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้งหมด 17 สายพันธุ์ พบว่าสาหร่าย SR สามารถเจริญและผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุด จึงนำมาระบุสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานและการวิเคราะห์ยีน 18S rDNA ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าสาหร่าย SR มีความคล้ายคลึงสูงกับกลุ่ม *Chorella* จึงให้ชื่อว่า *Chlorella* sp. KLSc61 การปรับสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ด้วยอาหาร TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (ค่ากรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 9) และมีการเติมเอทานอลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสอัตราผลิตก๊าซไฮโดรเจนและปริมาณสะสมก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 9,158.1 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ภายในระยะเวลา 7 วัน และ 10,247.5 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ภายในระยะเวลา 20 วัน ตามลำดับ ภายหลังจากการปรับสภาวะ สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากกว่าสาหร่ายที่เคยมีรายงานมา ดังนั้นสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 จึงน่าสนใจสำหรับการใช้งานในการผลิตไบโอไฮโดรเจนต่อไป

คำสำคัญ: 18s rDNA การปรับสภาวะการผลิต การผลิตไฮโดรเจน การแสดงลักษณะ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61

Thesis Title	ISOLATION OF HYDROGEN PRODUCING GREEN ALGAE AND OPTIMIZATION FOR ENHANCED PRODUCTION
Student Name	NATWIKAR LAOKUA
Student ID	62605069
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2021
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Cherdasak Maneeruttanarungroj

Abstract

Green algae can convert solar energy into chemical energy in the forms of proton and electron which are substrates of hydrogenase enzyme to form molecular hydrogen. In this study, growth rate and H₂ production of 17 isolates of algae were investigated. The SR alga showed the high growth rate and H₂ production rate which the highest rate among those all reported strains. The SR alga was further identified and characterized using morphological and 18S rDNA sequence analysis. The SR alga had high similarity to the genus *Chlorella*, labeled as *Chlorella* sp. KLSc61. Under optimal conditions, H₂ production rate of *Chlorella* sp. KLSc61 was obtained when adapted cell in TAP-K medium (initial pH at 9) containing 50 mM ethanol, light intensity of 4,000 lux and incubation temperature at 35 °C. The maximum yield was 9,158.1 μmol H₂ mg⁻¹Chl within 7 days and 10,268.1 μmol H₂ mg⁻¹Chl within 20 days. After adaptation, the *Chlorella* sp. KLSc61 showed very high efficiency of hydrogen production, which was the highest rate compared to previous reported strains. Thus, the *Chlorella* sp. KLSc61 makes an interesting strain for applications biohydrogen production

Keywords: 18S rDNA, H₂ production, Characterization, Green algae, *Chlorella* sp KLSc

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยการให้ความช่วยเหลือแนะนำของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำข้อคิดเห็น ตรวจสอบและแก้ไขร่างวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด คอยให้คำปรึกษา ดูแลในเรื่องต่างๆ พร้อมเอาใจใส่และให้กำลังใจเสมอ ผู้เขียนจึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวรัตน์ จันทะโร ที่กรุณาให้เกียรติเป็นประธาน และมี รองศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์ เป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และให้คำปรึกษาแนะนำในทุก ๆ ด้าน

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่สาว ที่คอยสนับสนุนการตัดสินใจทางการเรียนครั้งนี้ ทั้งด้านกำลังใจและกำลังทรัพย์ด้วยดีตลอดมา

ผู้เขียนขอขอบคุณ นายประภษุณี จันฮวบ และ นางสาวสุวิชญา จันทรสาขา ที่คอยดูแลและช่วยเหลือ เป็นกำลังใจ สนับสนุน พร้อมทั้งให้คำปรึกษาและคำแนะนำ

ผู้เขียนขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาคชีววิทยา และเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษาวิทยาศาสตร์ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกท่านที่ให้ความสะดวกด้านอำนวยความสะดวกและประสานงาน ในการทำวิทยานิพนธ์ให้ผู้เขียนตลอดมาจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้เขียนขอขอบคุณ นางสาวณัฐมน คำคม นายธนพล บุญศรี และนางสาวปิยะวรรณ อยู่พวง ที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือในการค้นคว้าวิทยานิพนธ์ รวมถึงสมาชิกภายในห้องปฏิบัติการสาขา ซึ่งผู้เขียนไม่สามารถกล่าวนามในที่นี้ได้หมด จึงขอขอบคุณทุกท่านเหล่านั้นไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ท้ายนี้ผู้เขียนขอโน้มรำลึกถึงอำนาจบารมีของคุณพระศรีรัตนตรัย และสิ่งศักดิ์สิทธิ์ทั้งหลายที่อยู่ในสากลโลก อันเป็นที่พึ่งให้ผู้เขียนมีสติปัญญาในการจัดทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจนผู้เขียนหนังสือ และบทความต่าง ๆ ที่ให้ความรู้แก่ผู้เขียนจนสามารถให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ณัฐวิภา เหล่าเกื้อ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ฅ
บทที่ 1	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	4
2.1 พลังงานไฮโดรเจน	5
2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน	7
2.2.1) การผลิตจากเชื้อเพลิงฟอสซิล.....	7
2.2.2) กระบวนการผลิตจากการแยกน้ำ (Water splitting).....	8
2.2.3) กระบวนการผลิตทางชีวภาพ (Biological processes).....	9
2.3 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)	13
2.3.1) รูปร่าง	13
2.3.2) รงควัตถุสำหรับสังเคราะห์แสง (pigment).....	13
2.3.3) คลอโรพลาสต์ (Chloroplast).....	14
2.3.4) การสืบพันธุ์.....	14

สารบัญ (ต่อ)

2.3.5) แหล่งที่อยู่อาศัย	15
2.4 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว.....	15
2.4.1) กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางตรง.....	15
2.4.2) กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางอ้อม.....	16
2.4.3) กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark fermentation).....	17
2.5 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส.....	18
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณก๊าซไฮโดรเจน	20
2.6.1) สายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว.....	20
2.6.2) ความเข้มแสง	22
2.6.3) อิทธิพลของการขาดธาตุอาหารต่างๆ.....	22
2.6.4) ค่าความเป็นกรดเบส	24
2.6.5) สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน	24
2.7 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	25
บทที่ 3	31
3.1 สาหร่าย.....	31
3.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย	31
3.3 สารเคมี.....	31
3.3.1) สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	31
3.3.2) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์.....	32
3.3.3) สารเคมีสำหรับใช้ในการวิเคราะห์หินในปฏิกิริยาลูโก้พอลิเมอเรส.....	32
3.3.4) สารเคมีสำหรับการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า.....	32
3.3.5) ชุดทดสอบ (Kit)	33
3.3.6) สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส.....	33
3.3.7) ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน.....	33

สารบัญ (ต่อ)

3.3.8) ยาปฏิชีวนะที่ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย	33
3.4 อุปกรณ์	33
3.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว	34
3.5.1) การเตรียมหัวเชื้อของสาหร่ายสีเขียว	34
3.5.2) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว	35
3.6 การวัดความสามารถในการผลิตก๊าซผลิตไฮโดรเจน	35
3.7 การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ดีที่สุด	36
3.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	37
3.8.1) การศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	37
3.8.2) การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	37
3.8.3) การศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของเซลล์	37
3.8.4) การศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรดเบสที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	38
3.8.5) การศึกษาอิทธิพลของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน	38
3.8.6) การศึกษาการรวมปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	39
3.9 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส	40
3.10 การศึกษาสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ดีที่สุด	40
3.10.1) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	40
3.10.2) ค้นหายีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)	40
3.10.3) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA	42
3.10.4) การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว	42
3.11 การติดตามหายีนไฮโดรจีเนส	43
3.11.3) ค้นหายีนไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส	44

สารบัญ (ต่อ)

3.11.4) การเชื่อมต่อยีนเป้าหมายกับพลาสมิดพาหะ pGEM®-T Easy.....	46
3.11.5) ทรานสฟอร์มเมชัน (transformation).....	47
3.12.6) การสกัดพลาสมิด (FavorPrep™ GEL/ Plasmid Extraction Mini Kit).....	47
บทที่ 4	49
4.1 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว.....	49
4.3 การศึกษาสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ดีที่สุด.....	56
4.3.1) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	56
4.3.2) ค้นหายีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	57
4.3.3) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA.....	59
4.3.4) การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว.....	61
4.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว.....	73
4.5.1) การศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.....	73
4.5.2) การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.....	75
4.5.3) การศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของเซลล์.....	76
4.5.5) การศึกษาอิทธิพลของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน.....	80
4.6 การศึกษาการรวมปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.....	83
บทที่ 5	87
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	87
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	88

สารบัญ (ต่อ)

เอกสารอ้างอิง	89
ภาคผนวก	102
ภาคผนวก ก.....	103
ภาคผนวก ข.....	109
ภาคผนวก ค.....	110
ภาคผนวก ง.....	111
ภาคผนวก จ.....	112
ประวัติผู้เขียน	117



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจน.....	6
ตารางที่ 2.2 แสดงการเปรียบเทียบกระบวนการผลิตไฮโดรเจน.....	12
ตารางที่ 2.3 การเปรียบเทียบผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว	21
ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ เทอร์มอลคอนดักทีวิตีดีเทคเตอร์	36
ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว	41
ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	42
ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบในปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน	44
ตารางที่ 3.5 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริป.....	44
ตารางที่ 3.6 แสดงชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการค้นหายีน.....	45
ตารางที่ 3.7 แสดงการเข้าคู่กันเพื่อจับกับเบสคู่สมในดีเอ็นเอต้นแบบทั้งหมด 9 แบบ.....	45
ตารางที่ 3.8 แสดงองค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว	46
ตารางที่ 3.9 แสดงสภาวะที่ใช้ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนส ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก.....	46
ตารางที่ 3.10 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัดต่อยีนที่สนใจเข้ากับพลาสมิด	47
ตารางที่ 4.1 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (t_d) ของสาหร่ายสีเขียว	51
ตารางที่ 4.2 รายชื่อสาหร่ายสีเขียวและสิ่งมีชีวิตชนิดๆ อื่นที่ใช้ในการเปรียบเทียบ 18S rDNA กับสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLS61	63
ตารางที่ 4.3 หมายเลขหลุมบนเจลอะกาโรสของชนิดไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน.....	67
ตารางที่ 4.4 แสดงการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจากไพรเมอร์คู่ที่ 5 (HvF1/HvR1)	72
ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLS61 กับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นและไซยาโนแบคทีเรีย	86
ตารางที่ ก-1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP).....	103
ตารางที่ ก-2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N)	104

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ ก-3	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P).....	105
ตารางที่ ก-4	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ขาดธาตุซัลเฟอร์ (TAP-S).....	106
ตารางที่ ก-5	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K).....	107
ตารางที่ จ-1	การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผล ของสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.5).....	112
ตารางที่ จ-2	การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผล การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะ ที่ไร้อากาศ ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.6)	113
ตารางที่ จ-3	การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลการ ผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> KLScSR ภายใต้สภาวะที่ไร้ อากาศและแปรผันความเข้มข้น ที่ระยะเวลา 32 ชั่วโมง (รูปที่ 4.18)	113
ตารางที่ จ-4	การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลการ ผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> KLScSR ภายใต้สภาวะที่ไร้ อากาศและแปรผันความเข้มข้น ที่ระยะเวลา 32 ชั่วโมง (รูปที่ 4.19)	114
ตารางที่ จ-5	การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลการ ผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> KLSc61 ภายใต้สภาวะที่ไร้ อากาศและแปรผันความเข้มข้น ที่ระยะเวลา 32 ชั่วโมง (รูปที่ 4.20)	114
ตารางที่ จ-6	การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลการ ผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 ภายใต้สภาวะ ที่ไร้อากาศและชนิดของสารที่เป็นตัวให้เล็กตรอนต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ของสาหร่ายสีเขียว ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.23)	115
ตารางที่ จ-7	การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลการ ผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 ภายใต้สภาวะ ที่ไร้อากาศและ ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารที่เป็นตัวให้เล็กตรอน ต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว ที่ระยะเวลา 10 วัน (รูปที่ 4.24)	115

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ จ-8 การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลการผลิตก๊าซก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 ภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศและศึกษาปัจจัยร่วมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 ที่ระยะเวลา 20 วัน (รูปที่ 4.25).....	116
ตารางที่ จ-9 การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 ภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศ ที่ระยะเวลา 7 วัน (รูปที่ 4.26).....	116



สารบัญรูปลูกภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 อัตราการเปลี่ยนแปลงความต้องการพลังงานโลกปี 2443 ถึง 2563.....	4
รูปที่ 2.2 ความต้องการพลังงานที่เปลี่ยนแปลงจากปี 2562 ถึง 2563	5
รูปที่ 2.3 แผนภาพกระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ	8
รูปที่ 2.4 แผนภาพกระบวนการไพโรไลซิสไฮโดรคาร์บอน.....	8
รูปที่ 2.5 แผนภาพกระบวนการผลิตจากการแยกน้ำ.....	9
รูปที่ 2.6 แผนภาพกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบใช้แสง	10
รูปที่ 2.7 แผนภาพกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง.....	10
รูปที่ 2.8 แผนภาพกระบวนการหมักแบบใช้แสง.....	11
รูปที่ 2.9 <i>Chlorella vulgaris</i>	13
รูปที่ 2.10 วิธีการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	15
รูปที่ 2.11 โครงสร้างของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (A) [NiFe]-hydrogenase, (B) [FeFe]-hydrogenase และ (C) [Fe]-hydrogenase	19
รูปที่ 2.12 กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.....	26
รูปที่ 2.13 กระบวนการเมตาบอลิซึมของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus obliquus</i>	28
รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่สภาวะความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ 1).....	53
รูปที่ 4.2 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่สภาวะความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ 2).....	53
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่สภาวะความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ 3).....	53
รูปที่ 4.4 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของก๊าซไฮโดรเจนที่วิเคราะห์จากเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ	54
รูปที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 6 สายพันธุ์ ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติในสภาวะที่ไม่มีอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....	55

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ 4.6 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียวไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติ ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....	56
รูปที่ 4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย SR ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	57
รูปที่ 4.8 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 18S rDNA ด้วยเทคนิค PCR ของสาหร่ายสีเขียว SR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder หมายเลข 1 และ 2 : ผลิตภัณฑ์ PCR	58
รูปที่ 4.9 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 18S rDNA ด้วยเทคนิค PCR ของสาหร่ายสีเขียว SR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder	59
รูปที่ 4.10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว SR.....	60
รูปที่ 4.11 แผนภูมิทางวิวัฒนาการของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA	64
รูปที่ 4.12 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์บน cDNA ของยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella fusca</i>	66
รูปที่ 4.13 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิค PCR ด้วยเซลล์สาหร่ายสีเขียว.....	67
รูปที่ 4.14 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิค PCR ด้วย cDNA และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder.....	68
รูปที่ 4.15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนไฮโดรจีเนสของไพรเมอร์คู่ที่ 5 (HvF1/HvR1) ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder และหมายเลข 1 คือ ยีนเป้าหมายที่ผ่านการเพิ่มปริมาณ	69
รูปที่ 4.16 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGHy5 ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนไฮโดรจีเนสของไพรเมอร์คู่ที่ 5 (HvF1/HvR1) โดยใช้ cDNA เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ	70
รูปที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์ blastp ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc61.....	71
รูปที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์ tblastx ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc61.....	71

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

- รูปที่ 4.19 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติ ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสงแตกต่างกัน 74
- รูปที่ 4.20 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติ ในสภาวะที่ไม่มีอากาศเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 76
- รูปที่ 4.21 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติและอาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหาร ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 77
- รูปที่ 4.22 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติและอาหารสูตร TAP ขาดธาตุอาหารที่มีการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 โดยปรับพีเอชด้วยกรด-เบส ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 79
- รูปที่ 4.23 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติเติมสารตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะที่ไม่มีอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 81
- รูปที่ 4.24 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติบ่มในอาหาร TAP สูตรปกติเติมเอทานอล 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 82
- รูปที่ 4.25 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติและอาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 9.0 และเติมเอทานอล 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 84

สารบัญรูปร่างภาพ (ต่อ)

รูปที่ 4.26	กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสภาวะแปรผันความเข้มข้นของเอทานอลในอาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc61.....	84
รูปที่ ค.1	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์	110
รูปที่ ค.2	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์	110



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาความต้องการพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เพื่อตอบสนองความต้องการด้านพลังงาน โดยความต้องการด้านพลังงานเชื่อมโยงกับความมั่นคงของโลก ความเจริญทางเศรษฐกิจ และคุณภาพชีวิตในการคมนาคมหรือที่อยู่อาศัย ปัจจุบันมีสัญญาณเตือนจากวิกฤตทางด้านพลังงาน (Hiemstra-van der Horst and Hovorka 2009; Youm *et al.* 2000) โดยแหล่งพลังงานแบบดั้งเดิมที่ใช้ คือ น้ำมันดิบ (crude oil) ถ่านหิน (coal) และก๊าซธรรมชาติ (natural gas) ซึ่งเป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไปและกระบวนการเผาไหม้ส่งผลให้ระดับก๊าซเรือนกระจกเพิ่มขึ้นโดยการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) (Hall *et al.* 1991) เป็นสาเหตุสำคัญของภาวะโลกร้อน (global warming) ส่งผลให้อุณหภูมิบนโลกสูงขึ้น (Parmar *et al.* 2011) จึงเกิดความสนใจในการส่งเสริมพลังงานทางเลือก เพื่อตอบสนองความต้องการด้านพลังงานที่กำลังเติบโตของโลก โดยแหล่งพลังงานหมุนเวียน (renewable energy) เป็นทางเลือกที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นพลังงานสะอาด เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังงานน้ำ พลังงานไฮโดรเจน พลังงานชีวมวล เป็นต้น (Ellabban *et al.* 2014)

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานหมุนเวียนชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเมื่อเผาไหม้แล้วจะเกิดการปล่อยน้ำ (H₂O) ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียว จึงเป็นพลังงานที่สะอาดและไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ในการผลิตพลังงานไฮโดรเจนด้วยกระบวนการสลายตัวของน้ำด้วยไฟฟ้า (electrolysis of water) ไฮโดรเจนที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูงแต่มีมูลค่าการผลิตที่สูงเช่นกัน ส่งผลให้ราคาก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้สูงตามไปด้วย ผู้วิจัยมีความสนใจนำความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์และพัฒนากระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง (photosynthetic microorganisms) เช่น ไชยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก (Xu *et al.* 2017)

ปัจจุบันหน่วยวิจัยพลังงานชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังมีการเก็บรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวหลายชนิด (culture collection) ในเบื้องต้นเราพบว่ามีสาหร่ายบางสายพันธุ์ให้ผลผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าสายพันธุ์ที่เคยทำการทดลองมา

ก่อนหน้านี้ ดังนั้นเพื่อเป็นการต่อยอดการศึกษาและสร้างความเป็นไปได้ในการผลักดันให้มีการผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมได้จริง ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจน พร้อมทั้งศึกษาการตอบสนองระดับเซลล์เพื่อสร้างองค์ความรู้ ความเข้าใจสำหรับการศึกษาต่อยอดที่สูงขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตไฮโดรเจนดีที่สุด
- 2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว
- 3) วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน
- 4) ศึกษาลักษณะสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนดีที่สุด
- 5) การติดตามยีนเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายที่มีประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนดีที่สุด

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) การเพาะเลี้ยงและติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 17 สายพันธุ์
- 2) ศึกษาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว
- 3) ศึกษาลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว
 - 3.1) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
 - 3.2) ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)
 - 3.3) สร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน 18S rDNA
- 4) ศึกษาการตามหายีนเอนไซม์ไฮโดรจีเนส
 - 4.1) ติดตามหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส
 - 4.2) ศึกษาวิวัฒนาการของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ
- 5) ศึกษาการปรับสภาวะที่เหมาะสม โดยศึกษาปัจจัยต่างๆดังนี้
 - 5.1) ศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงในช่วง 0-12,000 ลักซ์
 - 5.2) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในช่วง 25 - 45 องศาเซลเซียส
 - 5.3) ศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรดเบสในช่วง 5 ถึง 9
 - 5.4) ศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของเซลล์ ในอาหารสูตร TAP ดังนี้

5.4.1) อาหารสูตร TAP (สูตรอาหารอ้างอิงที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์)

5.4.2) อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุฟอสเฟส (TAP-P)

5.4.3) อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N)

5.4.4) อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ (TAP-S)

5.4.5) อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K)

5.5) ศึกษาอิทธิพลของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้แก่ เอทานอล (Ethanol) และโซเดียมไดไทโอไนท์ (Sodium dithionite)

6) วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในเซลล์จากสภาวะที่มีการเพิ่มขึ้นของไฮโดรเจน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ค้นพบสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตไฮโดรเจน
- 2) ทราบถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสปีชีส์ของสาหร่ายสีเขียว
- 3) ได้สภาวะเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่ทำการศึกษา
- 4) ค้นพบยีนเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว
- 5) เป็นองค์ความรู้เริ่มต้นสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับที่ใหญ่ขึ้น



บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สำนักงานพลังงานสากล (IEA : International Energy Agency) พบว่าความต้องการของมนุษย์ทั่วโลกผลิตและใช้พลังงานมากเพิ่มขึ้นในทุกปี ปัจจุบันการแพร่ระบาดของไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพแล้วยังมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจโลกทางด้านการใช้พลังงานและการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ การใช้พลังงานจากมาตรการกักกันเพื่อชะลอการแพร่กระจายของไวรัสโคโรนา 2019 ส่งผลให้การใช้งานของพลังงานทั่วโลกลดลง 3.8 เปอร์เซ็นต์ในไตรมาสแรกของปี 2563 (รูปที่ 2.1) แสดงให้เห็นว่าการใช้พลังงานทั่วโลกลดลงขึ้นอยู่กับระยะเวลาและความเข้มงวดของมาตรการกักกัน ซึ่งคาดการณ์ว่าผลกระทบของไวรัสโคโรนา 2019 ต่อความต้องการพลังงานในปี 2563 จะมากกว่าผลกระทบของวิกฤตการเงินปี 2551 ถึง 7 เท่า (Global Energy Review 2020)



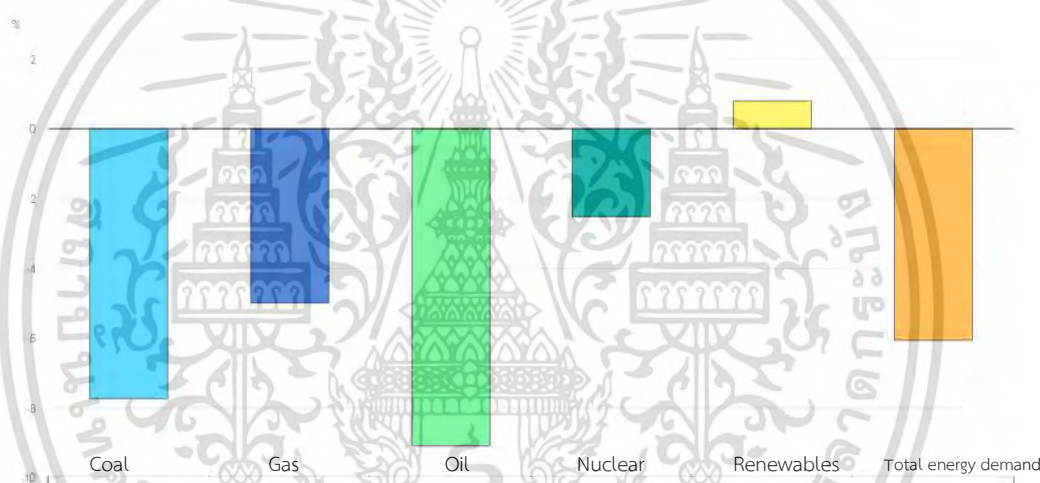
รูปที่ 2.1 อัตราการเปลี่ยนแปลงความต้องการพลังงานโลกปี 2443 ถึง 2563

ที่มา : IEA (2020), Global Energy Review 2020

แต่ที่น่าสนใจคือการใช้งานของพลังงานเชื้อเพลิงแต่ละชนิดในระหว่างที่พลังงานทั่วโลกลดลง (รูปที่ 2.2) โดยความต้องการถ่านหินทั่วโลกได้รับผลกระทบหนักที่สุดโดยลดลงเกือบ 8 เปอร์เซ็นต์ ความต้องการน้ำมันได้รับผลกระทบอย่างรุนแรงเช่นกันโดยลดลงเกือบ 5 เปอร์เซ็นต์ ความต้องการก๊าซอยู่ในระดับปานกลางโดยอยู่ที่ประมาณ 4.5 เปอร์เซ็นต์ และความต้องการพลังงานนิวเคลียร์ก็จะ

ลดลงตามความต้องการไฟฟ้าที่ลดลงเช่นกัน แต่พลังงานหมุนเวียนเป็นพลังงานแหล่งเดียวที่มีความต้องการมากขึ้น โดยการใช้พลังงานหมุนเวียนทั่วโลกในทุกภาคส่วนเพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นแหล่งพลังงานการผลิตไฟฟ้าแทนการใช้ถ่านหิน เนื่องจากเหมืองถ่านหินและการขุดเจาะน้ำมันปิโตรเลียมไม่สามารถนำมาใช้ในการผลิตไฟฟ้าได้จากมาตรการกักกันเพื่อชะลอการแพร่กระจายของไวรัสโคโรนา 2019

เมื่อพิจารณาสถานการณ์ของผลกระทบด้านพลังงานของภาวะเศรษฐกิจทั่วโลก เกิดจากข้อจำกัดด้านการเคลื่อนไหวกิจกรรมทางสังคมและเศรษฐกิจเป็นเวลานานหลายเดือนจากมาตรการกักกัน อย่างไรก็ตาม คาดว่าหลังจากวิกฤตการแพร่ระบาดของไวรัสโคโรนา 2019 จะมีการฟื้นตัวด้านพลังงานทั่วโลก โดยมีการลงทุนเพื่อเริ่มต้นเศรษฐกิจที่มีโครงสร้างพื้นฐานด้านพลังงานสะอาดมากขึ้น



รูปที่ 2.2 ความต้องการพลังงานที่เปลี่ยนแปลงจากปี 2562 ถึง 2563

ที่มา : IEA (2020), Global Energy Review 2020

2.1 พลังงานไฮโดรเจน

ก๊าซไฮโดรเจน (Hydrogen : H_2) ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น เป็นสารไวไฟส่งผลให้ไฮโดรเจนติดไฟง่าย และเบากว่าอากาศถึง 14 เท่าและกระจายเร็วกว่าก๊าซอื่นๆ อะตอมไฮโดรเจน (H) ประกอบด้วยนิวเคลียสของประจุบวกของโปรตอนและอิเล็กตรอนประจุลบ นอกจากนี้จำนวนโปรตอน และจำนวนนิวตรอนที่ต่างกัน ทำให้อะตอมไฮโดรเจนมี 3 ไอโซโทป ดังนี้

1. ไฮโดรเจน (Hydrogen : H หรือ $1H$) มีจำนวนโปรตอน 1 โปรตอน จำนวน 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 1.0078

2. ดิวเทอเรียม (Deuterium : D หรือ $2H$) มีจำนวนโปรตอน 2 โปรตอน จำนวน 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 2.0141

3. ทริเทียม (Tritium : T หรือ $3H$) มีจำนวนโปรตอน 3 โปรตอน จำนวน 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 3.0161

เนื่องจากคุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในปริมาณมหาศาล ถูกนำมาใช้เป็นเวลาหลายปีอย่างปลอดภัยทางด้านเคมีและโครงการอวกาศ ดังนั้นปัจจุบันพลังงานไฮโดรเจนเริ่มมีบทบาทด้านเชื้อเพลิงมากขึ้นในการตอบสนองความต้องการพลังงานของโลก (Keçebaş and Kayfeci 2019) ด้วยคุณสมบัติทางเคมี (ตารางที่ 2.1) ที่สำคัญที่สุดของก๊าซไฮโดรเจนคือ การเผาไหม้ด้วยออกซิเจนกลายเป็นน้ำ (H_2O) (Lee 2020) ดังนั้นก๊าซไฮโดรเจนจึงเป็นพลังงานที่สะอาดที่สุดและให้และให้ค่าพลังงานสูงถึง 122 กิโลจูลต่อกรัม (kJ/g) (Kapdan and Kargi 2006) ซึ่งมากกว่าการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิลถึง 2.75 เท่า (Kovalev *et al.* 2020; Hosseini and Wahid 2016)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจน

คุณสมบัติทางกายภาพ	
สถานะ	แก๊ส
ความหนาแน่น	$0.09 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-3}$
ความหนาแน่นของเหลวที่จุดหลอมเหลว	$0.0763 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$
ความหนาแน่นของเหลวที่จุดเดือด	$0.0709 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$
จุดหลอมเหลว	$-259.16 \text{ }^{\circ}\text{C}$
จุดเดือด	$-252.879 \text{ }^{\circ}\text{C}$
จุดวิกฤต	32.938 K, 1.2858 MPa
ความร้อนของการหลอมเหลว	$(H_2) 0.117 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
ความร้อนของการกลายเป็นไอ	$(H_2) 0.904 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
ความจุความร้อน	$436 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน

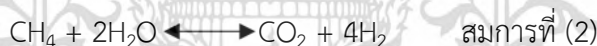
เทคโนโลยีกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือ การผลิตจากเชื้อเพลิงฟอสซิล การแยกจากน้ำ และการผลิตทางชีวภาพ สามารถแบ่งกระบวนการหลักๆ ได้ดังนี้

2.2.1) การผลิตจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

มีเทคโนโลยีหลายอย่างในการผลิตไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งส่วนใหญ่ ซึ่งมีแหล่งวัตถุดิบหลักเป็นสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ ถ่านหิน เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย ไฮโดรเจน คาร์บอนมอนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และมีเทน จากนั้นจะทำให้ไฮโดรเจนที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการเพิ่มเติม

2.2.1.1) กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (Steam reforming method)

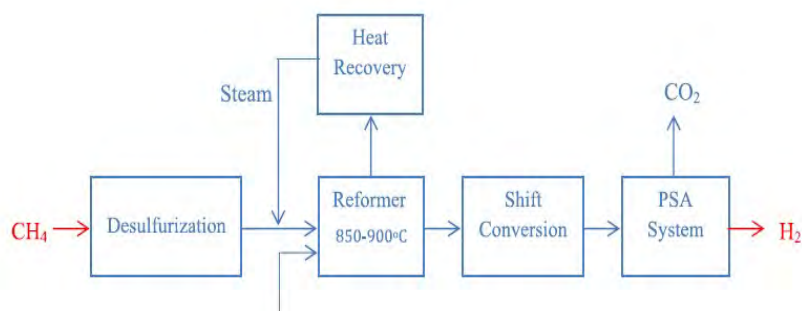
กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำโดยทั่วไปเกี่ยวข้องกับตัวเร่งปฏิกิริยา (Balthasar 1984) เป็นการเปลี่ยนไฮโดรคาร์บอนและไอน้ำไปเป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนออกไซด์ เนื่องจากใช้ก๊าซธรรมชาติซึ่งส่วนประกอบหลักเป็นมีเทน ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนที่สำคัญ คือ นำก๊าซธรรมชาติทำปฏิกิริยารีฟอร์มมิ่งกับไอน้ำในสภาวะอุณหภูมิสูง ประมาณ 850–900 องศาเซลเซียส และอาจจะมีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน (ดังสมการที่ 1 และ 2 ในขั้นที่ 1)



จากขั้นตอนที่ 1 จะเห็นว่ามีคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นร่วมด้วย ดังนั้นจะมีการนำไอน้ำเข้ามาทำปฏิกิริยากับคาร์บอนมอนอกไซด์อีกครั้งเพื่อให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น ดังแสดงในขั้นที่ 2



อย่างไรก็ตามกระบวนการเหล่านี้มีข้อเสียบางประการ เช่น การใช้แหล่งพลังงานที่สิ้นเปลือง เกิดการปล่อย CO₂ จำนวนมาก (รูปที่ 2.3) และเป็นกระบวนการที่มีราคาแพง (Navarro *et al.*, 2009)

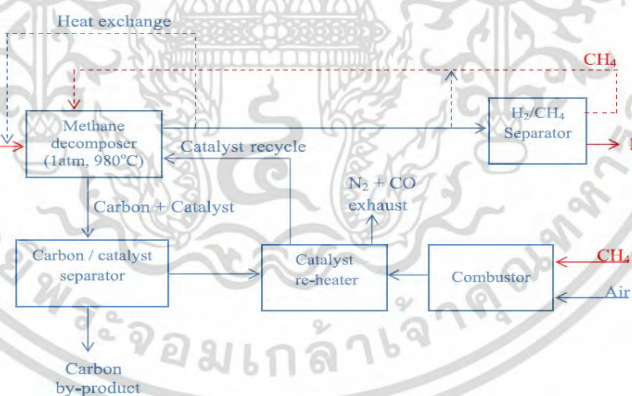


รูปที่ 2.3 แผนภาพกระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ

ที่มา : Nikolaidis and Poullikkas, 2017

2.2.1.2) การไพโรไลซิสไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon pyrolysis)

เป็นกระบวนการที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมปิโตรเคมีขั้นต้น เพื่อแตกตัวสารตั้งต้นซึ่งเป็นสารไฮโดรคาร์บอนโมเลกุลหนักให้เป็นให้เป็นสารผลิตภัณฑ์ไฮโดรคาร์บอน โดยวิธีที่นิยมใช้ คือวิธีเคมีความร้อน (Thermochemical process) เป็นการแปรรูปชีวมวลให้เป็นพลังงานโดยใช้ความร้อนจนเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (รูปที่ 2.4) โดยการเผาไหม้แบบไม่ใช้ออกซิเจนหรือไพโรไลซิส (Pyrolysis) และการทำให้เกิดก๊าซ (Gasification) กระบวนการเหล่านี้ปล่อยก๊าซเรือนกระจกเป็นจำนวนมาก (Fremaux *et al.* 2015) (Muradov 1993)



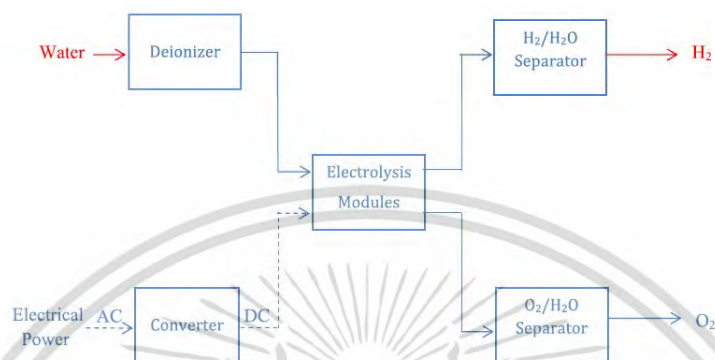
รูปที่ 2.4 แผนภาพกระบวนการไพโรไลซิสไฮโดรคาร์บอน

ที่มา : Nikolaidis and Poullikkas, 2017

2.2.2) กระบวนการผลิตจากการแยกน้ำ (Water splitting)

น้ำเป็นหนึ่งในวัตถุดิบที่มีอยู่มากที่สุดและไม่มียวันหมดไปจากโลก สามารถใช้สำหรับการผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการแยกน้ำด้วยไฟฟ้า (Electrolysis of water) (Steinfeld 2005) ซึ่งเป็นกระบวนการผลิตที่สะอาดที่สุดในการผลิตไฮโดรเจน เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสำหรับการแยกน้ำโดยผ่านกระแสไฟฟ้าลงไปในน้ำ (รูปที่ 2.5) (Bamberger and Richardson 1976) ประกอบด้วย

แคโทดและแอโนดแช่อยู่ในสารอิเล็กโทรไลต์ กระแสไฟฟ้าจะทำให้เกิดการแตกตัวของไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอมออกจากกัน อะตอมที่เหมือนกันจะเกิดการรวมตัวกัน ส่งผลให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซออกซิเจน แสดงสมการที่ 7 ดังนี้ (Levene *et al.* 2007)



รูปที่ 2.5 แผนภาพกระบวนการผลิตจากการแยกน้ำ

ที่มา : Nikolaidis and Poullikkas, 2017

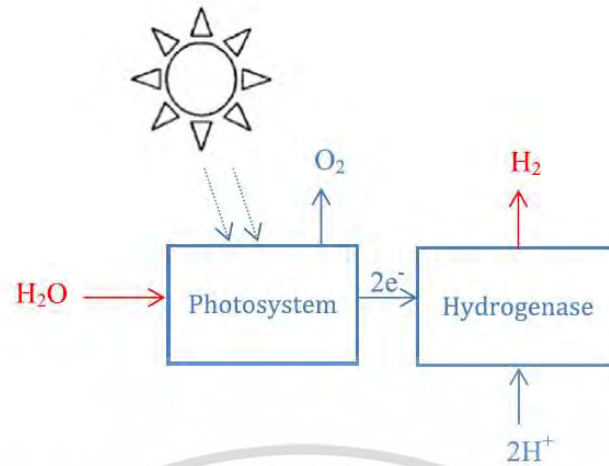
2.2.3) กระบวนการผลิตทางชีวภาพ (Biological processes)

แม้ว่าในปัจจุบันในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไฮโดรคาร์บอน ซึ่งหลีกเลี่ยงการปล่อยก๊าซเรือนกระจกจากกระบวนการผลิตไม่ได้ จึงมีนำเทคโนโลยีต่างๆ มาพัฒนาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากพลังงานหมุนเวียน (Nikolaidis and Poullikkas 2017) การผลิตไฮโดรเจนในแบบนี้ว่า ไฮโดรเจนชีวภาพ (Biohydrogen) ซึ่งจุลินทรีย์เกือบทุกชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยจุลินทรีย์เหล่านี้มีความแตกต่างกันทางสรีรวิทยา (Physiology) และกระบวนการทางเมตาบอลิซึม (Metabolism) ส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน (Kapdan and Kargi 2006)

2.2.3.1) กระบวนการใช้แสง (Biophotolysis)

สิ่งมีชีวิตโฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic organism) เช่น สาหร่ายขนาดเล็กและไซยาโนแบคทีเรีย มีกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อแยกน้ำออกเป็นไฮโดรเจน (รูปที่ 2.6) (Ghirardi *et al.* 2000) กระบวนการใช้แสงมี 2 ประเภทคือ กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis) และ กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis) (Das *et al.* 2014)

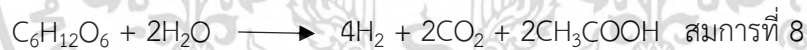




รูปที่ 2.6 แผนภาพกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบใช้แสง
ที่มา : Nikolaidis and Poullikkas, 2017

2.2.3.2) กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark fermentation)

แบคทีเรียที่ใช้คาร์บอนจากอินทรีย์ (Heterotrophic bacteria) ทำการสลายคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 2.7) ภายใต้สภาวะไม่มีแสงและไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งช่วยขจัดปัญหาความไวของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสต่อออกซิเจนและให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Rahman *et al.* 2016) โดยปริมาณและประสิทธิภาพของก๊าซไฮโดรเจนขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการหมัก กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงกว่ากระบวนการหมักแบบใช้แสง แต่ให้ก๊าซไฮโดรเจนปริมาณน้อยกว่า เนื่องจากการเกิดผลพลอยได้เป็นกรดอะซิติก ดังสมการที่ 8

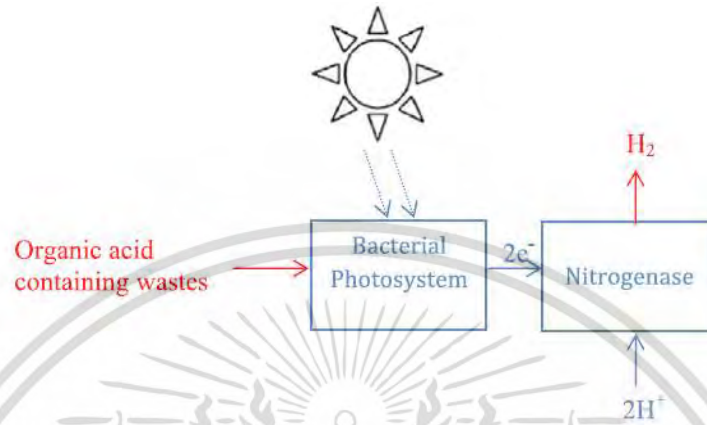
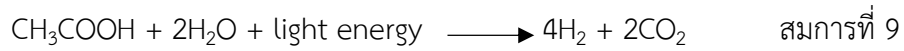


รูปที่ 2.7 แผนภาพกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง
ที่มา : Nikolaidis and Poullikkas, 2017

2.2.3.3) กระบวนการหมักแบบใช้แสง (Photofermentation)

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่มีความแตกต่างจากการหมักแบบไม่ใช้แสง แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (photosynthetic bacteria) ในกระบวนการนี้มีพลังงานไม่เพียงพอที่จะแยกน้ำ เนื่องจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเหล่านี้ขาดระบบแสงสอง (Photosystem : PSII) และระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I : PSI) เนื่องจากการหมักแสงจะใช้แสงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาควบคู่กับการใช้

แอนไซม์ไนโตรจีเนส (รูปที่ 2.8) (Das and Veziroglu 2008) ดังนั้นกระบวนการนี้จึงใช้กรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติกเป็นผู้ให้อิเล็กตรอนเพื่อสร้างไฮโดรเจน ดังสมการที่ 9



รูปที่ 2.8 แผนภาพกระบวนการหมักแบบใช้แสง

ที่มา : Nikolaidis and Poullikas, 2017

ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากทางชีวภาพจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีจุดแข็งหรือจุดอ่อนแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 2.2 จากข้อมูลดังกล่าว การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการใช้แสงนั้นมีความน่าสนใจ เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวมีประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงสูงกว่าพืชถึง 10 เท่าและอัตราการเจริญเติบโตและผลผลิตชีวมวลสูง โดยบางสายพันธุ์สามารถเพิ่มชีวมวลเป็นสองเท่าภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมง (Santos *et al.* 2019) อีกทั้งวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการเจริญเติบโตนั้นยังเป็นสิ่งที่มีในธรรมชาติมากมาย คือ พลังงานจากแสงอาทิตย์ และน้ำ นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นยังไม่มีกระบวนการปล่อยก๊าซเรือนกระจกออกสู่บรรยากาศ และยังสามารถตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากชั้นบรรยากาศมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโต ดังนั้นในรายละเอียดต่อไปจะกล่าวเฉพาะการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากสาหร่ายสีเขียว

ตารางที่ 2.2 แสดงการเปรียบเทียบกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

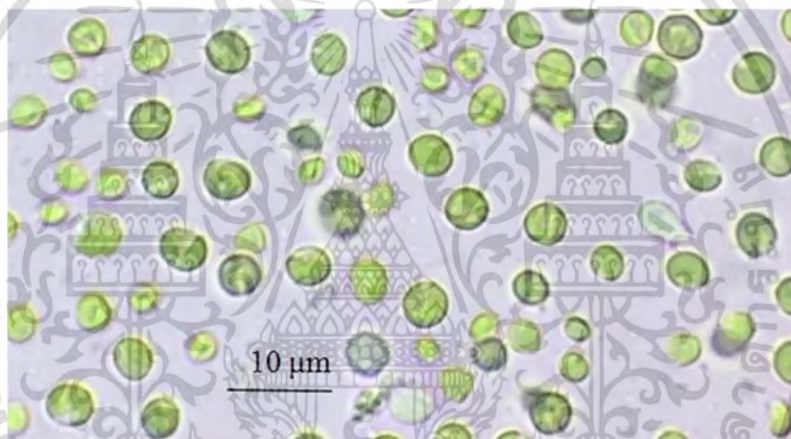
ประเภทการผลิต	กระบวนการผลิต	จุดแข็ง	จุดอ่อน
๒๒๒๒๒๒๒๒๒๒๒๒	Steam reforming method	<ul style="list-style-type: none"> — เป็นเทคโนโลยีที่พัฒนาที่สุด ประสิทธิภาพสูง 	<ul style="list-style-type: none"> — ผลพลอยได้ คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ — ต้องมีเชื้อเพลิงฟอสซิลในกระบวนการ
	Hydrocarbon pyrolysis	<ul style="list-style-type: none"> — ไม่มีการปล่อยของเสีย (Emission-free) 	<ul style="list-style-type: none"> — ผลพลอยได้ คือ คาร์บอน — ต้องมีเชื้อเพลิงฟอสซิลในกระบวนการ
	Water splitting	<ul style="list-style-type: none"> — ไม่มีมลพิษ ผลพลอยได้คือ ก๊าซออกซิเจน — เทคโนโลยีได้รับการยอมรับ — ใช้พลังงานไฟฟ้าแทนเชื้อเพลิงฟอสซิล 	<ul style="list-style-type: none"> — ประสิทธิภาพต่ำ — ต้นทุนสูง
๒๒๒๒๒๒๒๒๒๒๒๒	Photofermentation (Photosynthetic bacteria)	<ul style="list-style-type: none"> — มีการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ปานกลาง — สามารถใช้น้ำเสียในการผลิตได้ 	<ul style="list-style-type: none"> — ต้องการแสงในการผลิตและเครื่องปฏิกรณ์ขนาดใหญ่ — อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนประสิทธิภาพต่ำ
	Dark fermentation (Fermentative bacteria)	<ul style="list-style-type: none"> — มีการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ปานกลาง — ผลิตไฮโดรเจนได้ตลอดเนื่องจากไม่ใช้แสง — ใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย (แป้ง เซลโลสไบโอเอส) 	<ul style="list-style-type: none"> — ต้องการเครื่องปฏิกรณ์ขนาดใหญ่ — อัตราผลพลอยได้ คือ การสะสมขี้ดัก — การผลิตก๊าซไฮโดรเจนประสิทธิภาพต่ำ
	Biophotolysis (Green algae, Cyanobacteria)	<ul style="list-style-type: none"> — ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้จากน้ำและแสง — ตรึงก๊าซไนโตรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน 	<ul style="list-style-type: none"> — มีแนวโน้มการผลิตที่ไวต่อออกซิเจน — อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนประสิทธิภาพต่ำ — ต้องการแสงในการผลิตและเครื่องปฏิกรณ์ขนาดใหญ่

2.3 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

สาหร่ายสีเขียวจัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Chlorophyta) เป็นยูคาริโอต (Eukaryote) (Khan *et al.* 2020) มีทั้งหมดประมาณ 7500 สปีชีส์ (Bold 1985) โดยแต่ละจิ้นจะมีความแตกต่างกันไปทางด้านรูปร่าง โครงสร้าง และการสืบพันธุ์ ซึ่งลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวมีดังนี้

2.3.1) รูปร่าง

สาหร่ายสีเขียวมีหลายรูปแบบตั้งแต่เซลล์เดี่ยว (unicellular) โคโลนี (colonial) หรือหลายเซลล์ (multicellular) ไม่มีราก ลำต้น และใบที่แท้จริง (Bajpai 2019) ผนังเซลล์ ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น ชั้นในเป็นพวกเซลลูโลส ชั้นนอกเป็นพวกเพคติน บางชนิดพบแฟลกเจลลา (flagella) ใช้สำหรับการเคลื่อนที่ของเซลล์ ปกติจะมีแฟลกเจลลาจำนวนสองถึงสามเส้น สะสมคาร์โบไฮเดรตในรูปของแป้งในพริโนอยด์ที่อยู่ภายในคลอโรพลาสต์



รูปที่ 2.9 *Chlorella vulgaris*

ที่มา : Ramaraj *et al.* 2016

2.3.2) รงควัตถุสำหรับสังเคราะห์แสง (pigment)

มีลักษณะเด่น คือ คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophylls a) และ คลอโรฟิลล์ บี (chlorophylls b) จึงทำให้มีสีเขียวเด่นชัด เมื่อเทียบกับสาหร่ายกลุ่มอื่น เช่น สาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) สาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta) สาหร่ายสีทอง (Chrysophyta) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanophyta) (Tanaka and Tanaka 2019) นอกจากนี้ยังพบแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ประกอบด้วย แอลฟาแคโรทีน (α -carotene) เบต้าแคโรทีน (β -carotene) แกมมาแคโรทีน (γ -carotene) และแซนโทฟิลล์ (Xanthophyll)

2.3.3) คลอโรพลาสต์ (Chloroplast)

คลอโรพลาสต์เป็นพลาสติด (Plastid) ชนิดหนึ่ง เป็นออร์แกเนลล์ภายในไซโทพลาสซึม เมื่อศึกษารูปร่างของคลอโรพลาสต์จะพบว่า คลอโรพลาสต์มีเยื่อหุ้มสองชั้น ชั้น ภายในคลอโรพลาสต์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นของเหลว เรียกว่า สโตรมา (stroma) โครงสร้างภายในเป็นถุงล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มชั้นเดียวเรียกว่า ไธลาคอยด์ (thylakoids) ซึ่งเป็นถุงแบนๆ เกิดจากการขดตัวของเยื่อหุ้มชั้นใน (Invagination) แล้วหลุดออกไป ไธลาคอยด์ซ้อนกันจนเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า กรานา (Grana) ซึ่งลักษณะการเรียงตัวของไธลาคอยด์จะแตกต่างกันกับพืชชั้นสูง คือ มีการเรียงตัวเป็นชั้นของไธลาคอยด์ที่ไม่สม่ำเสมอ รงควัตถุจะอยู่ในคลอโรพลาสต์รูปร่างแตกต่างกัน (Solymosi 2012) ดังนี้

- 1) คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นรูปถ้วย (cup-shape chloroplast)
- 2) คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นรูปเกือกม้า (girdle-shape chloroplast)
- 3) คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นแบบร่างแห (reticulate chloroplast)
- 4) คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นแบบเกลียว (spiral chloroplast)
- 5) คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นรูปดาว (Stellat chloroplast)
- 6) คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นแบบแผ่น (Lamella chloroplast)

2.3.4) การสืบพันธุ์

สาหร่ายสีเขียวมีความหลากหลายเกี่ยวกับการสืบพันธุ์ ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) หรือแบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) หรือทั้งสองระบบ

2.3.4.1) การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

สาหร่ายขนาดเล็กจำนวนมากสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแบ่งเซลล์จากเซลล์เดิม (cell division) การหักหรือขาดเป็นท่อน ๆ จากส่วนเดิมแล้วแต่ละส่วนจะเจริญเป็นเซลล์ใหม่ (fragmentation) หรือสร้างสปอร์ (sporulation) บางสายพันธุ์สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนไหว (aplanospores) ในขณะที่สาหร่ายสีเขียวบางชนิดสร้างสปอร์ที่เคลื่อนไหวได้ (zoospores)

2.3.4.2) การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

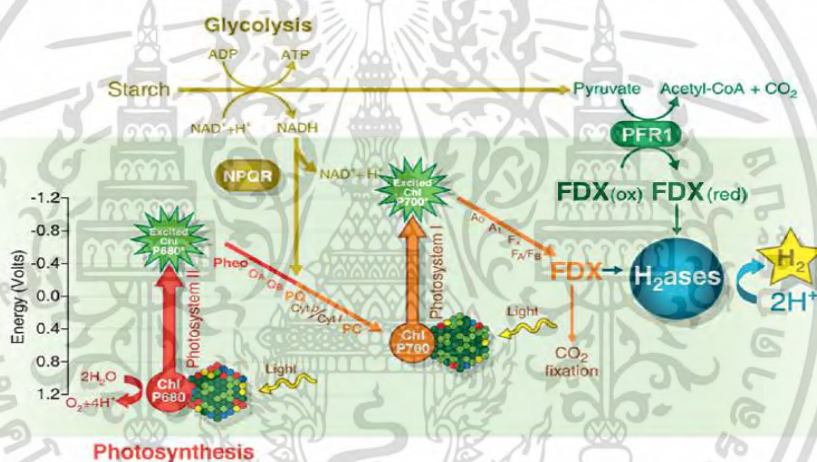
เกิดจากการรวมตัวกันของเซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่า แกมีต (Gamete) และพัฒนา กลายเป็นไซโกต (Zygote) ซึ่งมี 3 ประเภท คือ เซลล์สืบพันธุ์ของเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะเหมือนกันและขนาดเท่ากัน (isogamy) เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะเหมือนกัน แต่มีขนาดต่างกัน (anisogamy) และการรวมของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งขนาดและรูปร่างต่างกัน (oogamy)

2.3.5) แหล่งที่อยู่อาศัย

สาหร่ายสีเขียวมีแหล่งที่อยู่อาศัยที่หลากหลาย สามารถพบได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมน้ำจืดบนบกบริเวณที่ชื้น และส่วนน้อยพบในน้ำเค็ม นอกจากนี้ยังพบที่บริเวณที่มีสภาพแวดล้อมที่รุนแรง เช่น ทะเลทราย ลำธารน้ำแข็ง (Nozaki 2003)

2.4 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยการแยกโมเลกุลของน้ำให้เป็นไอออนไฮโดรเจนและออกซิเจน (Das and Veziroğlu 2001) ผ่านกระบวนการใช้แสง ซึ่งมี 2 ประเภท คือ กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางตรงและกระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางอ้อม อย่างไรก็ตามหัวข้อเรื่องกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบที่ไม่ใช้แสง คือ กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dubini 2011) ดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 วิธีการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*
ที่มา : Dubini, 2011

2.4.1) กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางตรง

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางตรง โดยใช้พลังงานแสงและระบบการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว เพื่อเปลี่ยนแปลงน้ำไปเป็นพลังงานทางเคมี แสงจะถูกดูดซับผ่านระบบแสงที่ 2 (Photosystem II, PSII) และระบบแสงที่ 1 (Photosystem I, PSI) (Manish and Banerjee 2008) ซึ่งภายในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานที่ได้จากแสงอาทิตย์ ซึ่งก็คือ Antenna complex จะประกอบไปด้วยรงควัตถุหลายชนิดที่ทำงานร่วมกัน ได้แก่ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี แล้วทำการส่งพลังงานแสงที่ได้เข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center) ซึ่งอยู่ภายในของคลอโรฟิลล์ เอ จนกระทั่งคลอโรฟิลล์ เอ นั้นได้รับพลังงานที่ความยาวคลื่น

ที่เหมาะสม ส่งผลให้อิเล็กตรอนภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ถูกกระตุ้นให้มีพลังงานที่สูงขึ้นและพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนสู่ตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป

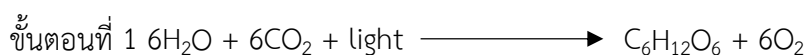
เริ่มจากระบบแสงที่ 2 ถูกกระตุ้นให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนเข้าสู่พลาสโตควิโนน เมื่อได้รับพลังงานในช่วง 680 นาโนเมตร และจะเกิดการโฟโตไลซิส (photolysis) ของน้ำ ส่งผลให้โมเลกุลของน้ำมีการแตกตัว ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนที่ได้นั้นจะเข้าสู่ระบบแสงที่ 2 เพื่อไปแทนที่อิเล็กตรอนภายในคลอโรฟิลล์ที่มีการสูญเสียไปในระบบ โดยระบบจะทำการเปลี่ยนพลังงานแสงที่ได้ไปเป็นพลังงานเคมี และใช้พลังงานที่ได้ขับเคลื่อนอิเล็กตรอนผ่านตัวรับอิเล็กตรอนตัวต่างๆ ได้แก่ พลาสโตควิโนน (PQ, Plastoquinone) ไซโตโครม บี (Cytochrome b) ไซโตโครม เอฟ (Cytochrome f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) เข้าสู่ระบบแสงที่ 1 ที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อระบบแสงที่ 1 ถูกแสงมากระตุ้น คลอโรฟิลล์ภายในระบบแสงที่ 1 จะปลดปล่อยอิเล็กตรอน จนมาถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ชื่อเฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin, FDX) อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินจะไปรวมตัวกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Dubini 2011; Kapdan and Kargi 2006) ดังแสดงในรูปที่ 2.10 และสมการที่ 10 และ 11



แต่อย่างไรก็ตาม ความต่อเนื่องของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้ก็ยังคงถูกจำกัดด้วยปริมาณออกซิเจนที่สะสมจากการแยกโมเลกุลของน้ำที่ระบบแสงที่ 2 โดยออกซิเจนที่ถูกปลดปล่อยเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้ระบบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนยุติลง

2.4.2) กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางอ้อม

สำหรับสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย จะเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานเคมี ซึ่งการผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางอ้อม มี 2 ขั้นตอนต่อเนื่องกัน ขั้นตอนแรกคือการเพิ่มผลิตชีวมวลด้วยระบบสังเคราะห์แสงและตามด้วยขั้นตอนที่สองซึ่งใช้คาร์โบไฮเดรตในการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจน



กระบวนการนี้จะขึ้นอยู่กับเอนไซม์ NADP-plastoquinone oxidoreductase (NPQR) และระบบแสงที่ 1 เท่านั้น ซึ่งสาหร่ายสีเขียวสามารถตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและเปลี่ยนไปเป็นคาร์โบไฮเดรตได้ เช่น แป้งหรือน้ำตาลกลูโคส เป็นผลิตภัณฑ์ที่สะสมอยู่ในเซลล์ ดังนั้นในกระบวนการนี้จะเริ่มจากโมเลกุลของแป้งจะถูกย่อยสลายผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis) ได้เป็นไพรูเวต ส่งผลให้มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนจากกระบวนการย่อยสลายนี้ออกมาในรูป NADH โดย NPQR ทำหน้าที่เป็นตัวพาอิเล็กตรอนส่งต่อให้กับพลาสโตควิโนน (PQ) และส่งผ่านไปที่ตัวรับอิเล็กตรอนตัวอื่นๆ จนถูกส่งต่อไปยังระบบแสงที่ 1 เพื่อรับพลังงานอีกครั้ง ก่อนที่ใช้พลังงานที่ได้ส่งต่ออิเล็กตรอนที่ถูกกระตุ้นไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน ประโยชน์ของการสังเคราะห์แสงแบบทางอ้อม คือ สามารถใช้คาร์บอนจากแหล่งคาร์บอนแหล่งอื่นเพื่อให้ได้โปรตอนและอิเล็กตรอนในการสร้างไฮโดรเจน ซึ่งส่วนมากจะพบในไซยาโนแบคทีเรีย

วิธีนี้สามารถหลีกเลี่ยงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสต่อออกซิเจนที่ผลิตในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ด้วยระบบแสงสองได้ แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการนี้ต้องการความเข้มแสงระหว่างกระบวนการและต้องใช้เซลล์จำนวนมาก ทำให้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลงเนื่องจากเซลล์ไม่ได้รับแสงที่เพียงพอ (Nikolaidis and Poullikkas 2017)

2.4.3) กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark fermentation)

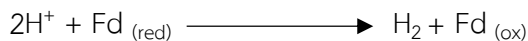
กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงจะเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงและไร้ออกซิเจน และต้องการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ในช่วงเริ่มต้นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งส่วนใหญ่คือน้ำตาลกลูโคสถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง จะแตกตัวเป็นไพรูเวตและเอ็นเอดีเอช (NADH) สามารถเรียกว่า กระบวนการไกลโคไลซิส



จากนั้นไพรูเวตจะถูกออกซิไดซ์ผ่านเอนไซม์ไพรูเวต เฟอร์รีดอกซิน ออกซิโดรีดักเทส (pyruvate-ferredoxin-oxidoreductase : PFR) กลายเป็นผลิตภัณฑ์ 3 ชนิด ดังนี้ อะซีติล โค เอนไซม์ เอ (Acetyl CoA) คาร์บอนไดออกไซด์ และอิเล็กตรอน (Meuser *et al.* 2012; Hallenbeck and Benemann 2002)

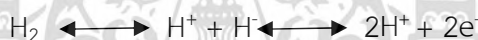


ซึ่งเฟอร์ริดอกซินจะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนที่ถูกปลดปล่อยออกมา และส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เพื่อใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่วิธีนี้ยังคงให้ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่น้อยเมื่อเทียบกับอีก 2 วิธีที่กล่าวในข้างต้น (Dubini 2011)



2.5 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

ในปี ค.ศ. 1931 ได้มีการบัญญัติศัพท์คำว่า “ไฮโดรจีเนส” ขึ้นโดย Stephenson และ Stickland ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ได้ถูกพบทั้งในจุลินทรีย์ที่เป็นยูคาริโอตและโพรคาริโอต (Stephenson and Stickland 1931) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ผันกลับได้ตามสมการ โดยที่สามารถจำแนกเอนไซม์ไฮโดรจีเนสตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้



1. อัฟเทคไฮโดรจีเนสหรือเอนไซม์เร่งแบบทิศทางเดียว (Uptake hydrogenase) โดยสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน
2. รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหรือเอนไซม์เร่งแบบย้อนกลับได้ (Reversible hydrogenase) สามารถเร่งได้ทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนให้เป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

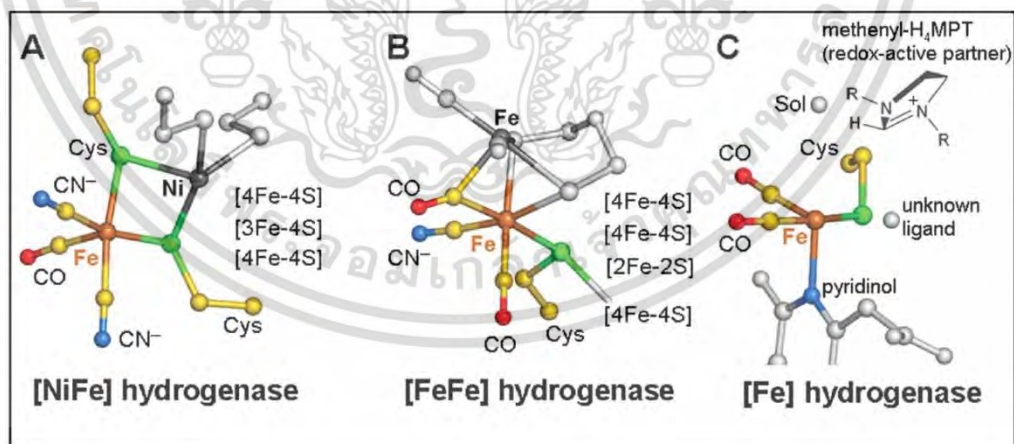
เอนไซม์ไฮโดรจีเนสพบได้ในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น อาร์เคีย (archaea) แบคทีเรีย และยูคาริโอตบางชนิด สิ่งมีชีวิตเหล่านี้มักอาศัยในสภาพแวดล้อมที่ไม่มีอากาศ เช่น บ่อน้ำจืด ตะกอน ทะเลหนองน้ำ พื้นที่ชุ่มน้ำ และในบ่อน้ำพุร้อน หรือแม้แต่ในลำไส้ของสัตว์เคี้ยวเอื้องและปลวก เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสส่วนใหญ่มีความไวต่อออกซิเจน (Lubitz and Ogata 2013) นอกจากนี้แล้วเอนไซม์ชนิดนี้ยังสามารถจำแนกได้ตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้เป็น 3 ชนิด (รูปที่ 2.11) ดังนี้

1. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็ก ([NiFe]-hydrogenase) ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาดเล็ก (S) และขนาดใหญ่ (L) หน่วยย่อยขนาดเล็กประกอบด้วย กลุ่มเหล็ก - กำมะถัน 3 กลุ่ม (iron-sulfur clusters) ในขณะที่หน่วยย่อยขนาดใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มนิกเกิล - เหล็ก ([NiFe] active center)

2. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยเหล็กและเหล็ก ([FeFe]-hydrogenase) ประกอบด้วยหน่วยย่อย 1 หรือ 2 หน่วยและจะต้องมีกลุ่มของเหล็ก - กำมะถัน อย่างน้อย 1 กลุ่ม และกลุ่มของเหล็ก (diiron metal center) จะเชื่อมต่อกับหมู่ไทออลของซิสเทอีน (Cysteine) หรือเรียกว่า H-cluster)

3. ไฮโดรจีเนสที่ภายในมีเหล็กอยู่โมเลกุลเดียวเท่านั้น ([Fe]-hydrogenase) ไม่มีทั้งนิกเกิลหรือเหล็ก - กลุ่มกำมะถัน แต่มี iron-guanlylpyridinol cofactor (FeGP)

เอนไซม์ [FeFe]-hydrogenase เป็นเอนไซม์ที่มักพบในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียว มีบริเวณเร่ง (active center; H cluster) ที่มีความพิเศษซึ่งก่อให้เกิดกิจกรรมที่มากกว่าไฮโดรจีเนสชนิดอื่นๆ กว่า 100 เท่า (Vogt *et al.* 2008) โดยเอนไซม์ชนิดนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ทั้งการผลิตไฮโดรเจน และเร่งปฏิกิริยาการเกิดโปรตอนที่ถูกปล่อยออกจากไฮโดรเจน อย่างไรก็ตามบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากเฟอร์ริดอกซิน นั้นมีความไวต่อออกซิเจนสูงมากซึ่งจะทำให้ยากต่อการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจน



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (A) [NiFe]-hydrogenase, (B) [FeFe]-hydrogenase และ (C) [Fe]-hydrogenase

ที่มา : Shima *et al.* 2008

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

2.6.1) สายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะให้ผลผลิตและการเร่งปฏิกิริยาได้แตกต่างกัน โดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสส่วนใหญ่มีความไวต่อออกซิเจน ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยารีดอกซ์ ตำแหน่งภายในเซลล์ (membrane-bound) หรือหน้าที่ (ตัวเร่งปฏิกิริยาหรือตัวควบคุม) (Lubitz and Ogata 2013) จากตารางที่ 2.3 แสดงถึงความสามารถสาหร่ายสีเขียวในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 (Sirawattanamongkol *et al.* 2020), *Tetraspora* sp. CU2551 (Maneeruttanarungroj *et al.* 2010; Maswana *et al.* 2018; Maswana *et al.* 2020), *Chlamydomonas reinhardtii* (Kosourov *et al.* 2007), *Chlorella* sp. NIER-10003 (Song *et al.* 2011) *Scenedesmus obliquus* (Papazi *et al.* 2014) ซึ่งสาหร่ายทั้ง 5 สายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ต่างกันอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ รวมด้วยนอกจากทางด้านสายพันธุ์



ตารางที่ 2.3 การเปรียบเทียบผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

สายพันธุ์	สภาวะการเพาะเลี้ยง	อัตราการผลิตไฮโดรเจน			อ้างอิง
		mL/L	mL H ₂	μmol/h/mg Chl a	
<i>Chlorella</i> sp. KLSc59	Normal TAP with 1 mM ethanol	724 (36 h)		850 (36 h)	Sirawattanamongkol <i>et al.</i> 2020
	N-S-deprived			17-62	Maneeruttanarungroj <i>et al.</i> 2010
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	S-deprived, immobilized in alginate beads	307(108 h)	7.68	34.37-123.17	Maswanna <i>et al.</i> 2018
<i>Chlorella</i> sp. NIER-10003	S-deprived, immobilized in agar beads	300(250 h)			Song <i>et al.</i> 2011
<i>Scenedesmus obliquus</i>	K-deprived		1.9		Papazi <i>et al.</i> 2014
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	S-deprived	120 (60 h)			Kosourov <i>et al.</i> 2007

2.6.2) ความเข้มแสง

แสงคือสิ่งที่จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตสังเคราะห์แสง เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและกระบวนการสังเคราะห์แสง (Singh and Singh 2015) สาหร่ายสีเขียวใช้ระบบแสงที่สองและรับแสงที่หนึ่งในกระบวนการสังเคราะห์แสง (Melis 2002) กระบวนการสังเคราะห์แสงเป็นกระบวนการหายใจด้วยออกซิเจน โดยแบบไมโทคอนเดรียจะการเผาผลาญของแหล่งคาร์บอนและการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Melis 2007) ความเข้มแสงเป็นทั้งปัจจัยภายนอกและภายในที่ส่งผลต่อการเติบโตของสาหร่ายสีเขียว ซึ่งความเข้มแสงที่เพียงพอจะทำให้เกิดเอทีพี (ATP) ผ่านการส่งผ่านอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Gabrielyan *et al.* 2017; Sargsyan *et al.* 2015) แสดงให้เห็นว่าความเข้มแสงยิ่งมากจะมีการเกิดอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้น และอิเล็กตรอนเคลื่อนที่ไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากขึ้น อย่างไรก็ตามในสภาวะที่มีความเข้มแสงมากขึ้นนั้น ก่อให้เกิดการผลิตโมเลกุลของออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งออกซิเจนเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการปรับสภาวะให้เหมาะสมในสาหร่ายสีเขียวแต่ละสายพันธุ์

2.6.3) อิทธิพลของการขาดธาตุอาหารต่างๆ

2.6.3.1) การขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ (Sulfur deprivation)

อิทธิพลการขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ในสาหร่ายสีเขียว ส่งผลให้เกิดการยับยั้งของระบบการสังเคราะห์แสงและออกซิเจนที่เกิดขึ้นมีอัตราที่ต่ำกว่าอัตราการที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์ เนื่องจากธาตุซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ กรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) และกรดอะมิโนเมไทโอนีน (Methionine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่กล่าวมีความสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน (Protein biosynthesis) โดยเฉพาะในการสังเคราะห์โปรตีน D1 ซึ่งเป็นโปรตีนศูนย์กลาง (Reaction center protein) ของระบบการสังเคราะห์แสง และยังมีผลต่อวัฏจักรของการซ่อมแซมระบบการสังเคราะห์แสง (PSII repair cycle) (McKinlay and Harwood 2010) ดังนั้นทำให้การเพาะเลี้ยงของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* กลายเป็นการเพาะเลี้ยงแบบไม่ใช้อากาศภายใต้สภาวะให้แสง และยังมีผลชักนำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานได้ปกติภายใต้การสังเคราะห์แสง ส่งผลให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากขึ้นกว่าในสภาวะปกติ แต่อย่างไรก็ตามในกระบวนการนี้จะใช้แบง์และโปรตีนภายในจำนวนมากภายในเซลล์ (Zhang *et al.* 2002)

2.6.3.2) การขาดธาตุอาหารไนโตรเจน (Nitrogen deprivation)

อิทธิพลการขาดธาตุอาหารไนโตรเจนในสาหร่ายสีเขียว ส่งผลให้เกิดความเครียดอย่างรุนแรงภายในเซลล์ เนื่องจากธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน การแบ่งเซลล์ และวัฏจักรในการซ่อมแซมระบบแสงที่ 2

ในกระบวนการสังเคราะห์แสง (PSII Repair cycle) (Philipps *et al.* 2012) ส่งผลให้มีการยับยั้งการทำงานของระบบแสงที่ 2 และส่งผลให้ปริมาณก๊าซออกซิเจนลดลงและเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้น (Wykoff *et al.* 1998)

นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายมีการสะสมแป้งมากขึ้นเมื่อขาดธาตุอาหารไนโตรเจน ซึ่งแป้งที่สะสมจำนวนมากจึงสามารถนำมาสลายเป็นแหล่งอิเล็กตรอนที่สำคัญในการสังเคราะห์แสงสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ส่งเสริมให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากขึ้นกว่าในสภาวะปกติ (Hicks *et al.* 2001; Swanny *et al.* 2005)

2.6.3.3) การขาดธาตุอาหารฟอสฟอรัส (phosphorus deprivation)

อิทธิพลการขาดธาตุอาหารฟอสฟอรัสในสาหร่ายสีเขียวสามารถยับยั้งการสร้างก๊าซออกซิเจนได้เช่นเดียวกับการขาดธาตุซัลเฟอร์และไนโตรเจน เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ส่งผลให้การแบ่งเซลล์สาหร่ายสีเขียวนั้นหยุดลงและระบบเมตาบอลิซึมเปลี่ยนแปลงไป พร้อมทั้งอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์นั้นหยุดลง เนื่องจากระดับสารตัวกลางของวัฏจักรรีดักทีฟเพนโทสเฟสลดลง (Pentose phosphate pathway) เกิดการลดลงของตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ส่งผลให้การถ่ายโอนอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง

นอกจากนี้การขาดธาตุฟอสฟอรัสยังส่งผลให้ระบบแสงที่ 2 มีพลังงานไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นในปฏิกิริยาการออกซิเดชันของน้ำและการถ่ายโอนอิเล็กตรอนลดลง เนื่องจากโปรตีนภายในระบบแสงที่ 2 ลดลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานกระตุ้นน้อยลง (Quantum efficiency) จึงการยับยั้งระบบแสงบางส่วนและกลายเป็นการเพาะเลี้ยงแบบไม่ใช้อากาศ ซึ่งจะเกิดซ้ำๆ ในการขาดธาตุซัลเฟอร์ (Wykoff *et al.* 1998) นอกจากนี้เมื่อกระบวนการสังเคราะห์แสงเกิดปฏิกิริยาได้น้อยลง จึงเกิดปฏิกิริยาการหายใจระดับเซลล์มากขึ้น ส่งเสริมให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากขึ้นกว่าในสภาวะปกติ (Batyrova *et al.* 2012)

2.6.3.4) การขาดธาตุอาหารโพแทสเซียม (Nitrogen deprivation)

อิทธิพลการขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมเกี่ยวข้องกับชีวเคมี เนื่องจากธาตุโพแทสเซียมสามารถถูกแทนที่ด้วยธาตุโซเดียมได้บางส่วน ในกระบวนการทางชีวเคมีและส่งผลให้ระบบต่างๆยังคงทำงานปกติ อย่างไรก็ตามโซเดียมไม่สามารถแทนที่โพแทสเซียมในกระบวนการเปลี่ยนแปลงกลูโคสเป็นแป้ง (Gattward *et al.* 2012) ซึ่งเหตุผลสำคัญที่ส่งผลให้เพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ขาดธาตุโพแทสเซียม เนื่องจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคสถูกนำไปใช้ในการให้อิเล็กตรอนไปยังช่องพลาสโตควิโนน (Plastoquinone-pool) ซึ่งโดยปกติจะผ่านวิถีในระบบแสงที่ 2 ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้นของระบบแสงที่ 1 ส่งผลให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดธาตุโพแทสเซียมจะเกิดการยับยั้งการทำงานของระบบแสงที่ 2 อย่างรุนแรง เนื่องจากโปรตีน D1 ลดน้อยลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งระบบการสังเคราะห์แสง ออกซิเจนที่เกิดขึ้นมีอัตราที่ต่ำกว่าอัตรา

การใช้ในการหายใจระดับเซลล์และเกิดสภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งเกิดการกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน

นอกจากนี้เซลล์ที่ขาดธาตุโพแทสเซียมไม่สามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นแป้ง ส่งผลให้การไหลของอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นในระบบแสงที่ 2 เนื่องจากระดับของกลูโคสที่สูงขึ้น ส่งผลให้อิเล็กตรอนในช่องพลาสโตควิโนนเพิ่มขึ้น ซึ่งมีอิเล็กตรอนส่วนเกินที่มาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคส จึงเกิดการกระตุ้นที่มากขึ้นในระบบแสงที่ 1 และเกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่มากขึ้น (Papazi *et al.* 2014)

2.6.4) ค่าความเป็นกรดเบส

อิทธิพลของค่าความเป็นกรดเบสในสาหร่ายสีเขียว เกี่ยวข้องกับการรีดอกซ์ของการขนส่งอิเล็กตรอนในเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ (Tikhonov 2013) และการนำคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่เซลล์ ซึ่งค่าความเป็นกรดเบสจะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการละลายของคาร์บอนไดออกไซด์ รวมถึงการดูดซึมสารอาหารต่างๆ และไอออนอื่นๆ หรือการทำงานของเอนไซม์ในการสังเคราะห์แสงที่มีความเกี่ยวข้องกับภายในเซลล์และผนังเซลล์จะได้รับผลกระทบจากการแปรผันของค่าความเป็นกรดเบสภายนอกเซลล์ (Juneja *et al.* 2013) ที่สภาวะเป็นกรดจะรบกวนกระบวนการทำงานและการดูดซึมสารอาหารของเซลล์ ในขณะที่สภาวะเป็นเบสจะลดการจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และวัฏจักรของเซลล์ทำงานช้า แต่อย่างไรก็ตาม ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว (Chia *et al.* 2018)

2.6.5) สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

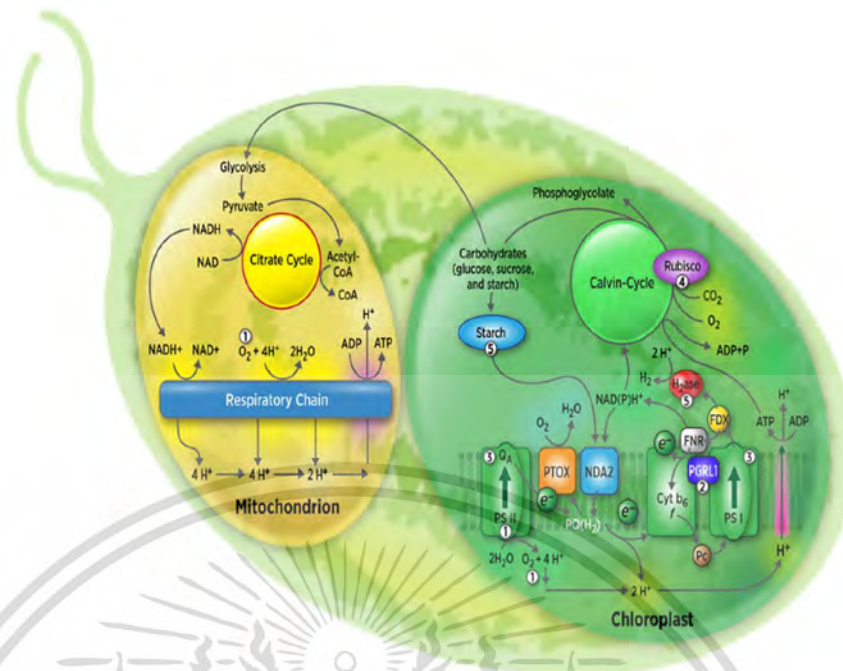
เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสนั้นเกี่ยวเนื่องกับความสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox balancing) เป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่ช่วยให้สิ่งมีชีวิตรับมือกับโมเลกุลที่โดนทำลายโดยแสงอาทิตย์ (Photoprotection) ภายในสิ่งมีชีวิต เอนไซม์ไฮโดรจีเนสหน้าที่เป็นแอ่งอิเล็กตรอน (electron sink) ของปฏิกิริยารีดอกซ์ต่างๆ ในเซลล์ (Kruse and Hankamer 2010) ดังนั้นสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนถือว่าเป็นแหล่งอิเล็กตรอนที่เหมาะสมต่อตัวรับอิเล็กตรอนใดๆ และอิเล็กตรอนเหล่านี้สามารถถูกถ่ายโอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอนต่างๆ ภายในกระบวนการสังเคราะห์แสง ส่งผลให้มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปที่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสและเกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจน อย่างไรก็ตาม สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนบางชนิดไม่สามารถเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่ดีได้ เนื่องจากก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Maneeruttanarungroj *et al.* 2010) เช่น ไตโทอิลทริทอลและเบต้า-เมอแคปโทเอทานอล (Sirawattanamongkol *et al.* 2020)

2.7 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โลกมีความต้องการพลังงานไม่มีที่สิ้นสุด ซึ่งความต้องการด้านพลังงานเชื่อมโยงกับความมั่นคงของโลก ความเจริญทางเศรษฐกิจ และคุณภาพชีวิตในการคมนาคมหรือที่อยู่อาศัย ปัจจุบันความต้องการพลังงานมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามความก้าวหน้าทางเศรษฐกิจ โดยแหล่งพลังงานแบบดั้งเดิมที่ใช้ คือ น้ำมันดิบ (crude oil) ถ่านหิน (coal) และก๊าซธรรมชาติ (natural gas) จะเกิดการใช้งานหมดไปอย่างรวดเร็วเนื่องจากการเป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป นอกจากนี้กระบวนการเผาไหม้ยังก่อให้เกิดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ซึ่งก่อให้เกิดความผันผวนทางธรรมชาติ เพราะ คาร์บอนไดออกไซด์เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดภาวะเรือนกระจก (global warming) ส่งผลให้อุณหภูมิบนโลกสูงขึ้น

การผลิตไฮโดรเจนผ่านการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว นั้น มีศักยภาพที่ดีและเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทน เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด ผลิตจากทรัพยากรธรรมชาติคือแสงและน้ำ พลังงานไฮโดรเจนจากสาหร่ายจึงเหมาะกับการนำมาใช้ชดเชยทางด้านพลังงานรูปแบบเดิมคือการใช้ถ่านหินและฟอสซิล (Parmar *et al.* 2011) ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวค้นพบครั้งแรกโดย Harns Gaffron (Gaffron and Rubin 1942) ซึ่งในการค้นพบครั้งนี้ส่งผลให้ได้รับความสนใจจากนักวิจัยมากมาย โดยที่สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กนั้นมีรงควัตถุคลอโรฟิลล์ซึ่งสามารถดูดซับพลังงานแสงเพื่อใช้เปลี่ยนเป็นพลังงานเคมี โดยเริ่มต้นจากการแตกตัวของน้ำได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอนและอิเล็กตรอน (Yilmaz *et al.* 2016) จากนั้นอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นเหล่านั้นสามารถนำมาใช้สร้างโมเลกุลของก๊าซไฮโดรเจนได้

ในปัจจุบันได้มีการนำสาหร่ายสีเขียวหลายสายพันธุ์มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจน เช่น สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งเป็นต้นแบบในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในปัจจุบัน (Khetkorn *et al.* 2017; Dubini and Ghirardi 2015) (รูปที่ 2.12) เซลล์มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะความเข้มแสงต่ำ แต่เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้น กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยออกซิเจนที่เกิดขึ้นจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลง (Ruhle *et al.* 2008) ดังนั้นจึงมีการคิดค้นและพัฒนาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวโดยการปรับปรุงสภาวะการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม



รูปที่ 2.12 กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ที่มา : Dubini and Ghirardi, 2015

Maneeruttanarungroj และคณะ (2010) คัดแยกสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำจืดตามธรรมชาติที่จังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ของยีน 18S rRNA บ่งชี้ว่าสาหร่ายดังกล่าวถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *Tetraspora* sp. จึงให้ชื่อว่า *Tetraspora* sp. CU2551 ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 นั้นมีปริมาณคลอโรฟิลล์ คือ 0.96 – 3.43 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์นี้สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองได้เป็นสองเท่าเมื่อเจริญเติบโตในอาหารเหลว TAP (Tris-acetate-phosphate) ภายใต้ความเข้มแสง 48–92 ไมโครไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส นอกจากนี้สาหร่ายสีเขียวยังมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มค่ากรดเบสจาก 5.75 ไปยัง 9.30 เมื่อทำการเติม 0.5 mM β -mercaptoethanol ในอาหารเหลว TAP สามารถกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มเป็น 2 เท่า ในขั้นการผลิตไฮโดรเจนนั้นเมื่อทำการบ่มภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดทั้งธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์พบว่าเพิ่มการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในอัตราที่สูงถึง 17.3–61.7 ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ($\mu\text{mol/mg Chl A/h}$) หรือ 423–1511 ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัม ซึ่งเป็นอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ

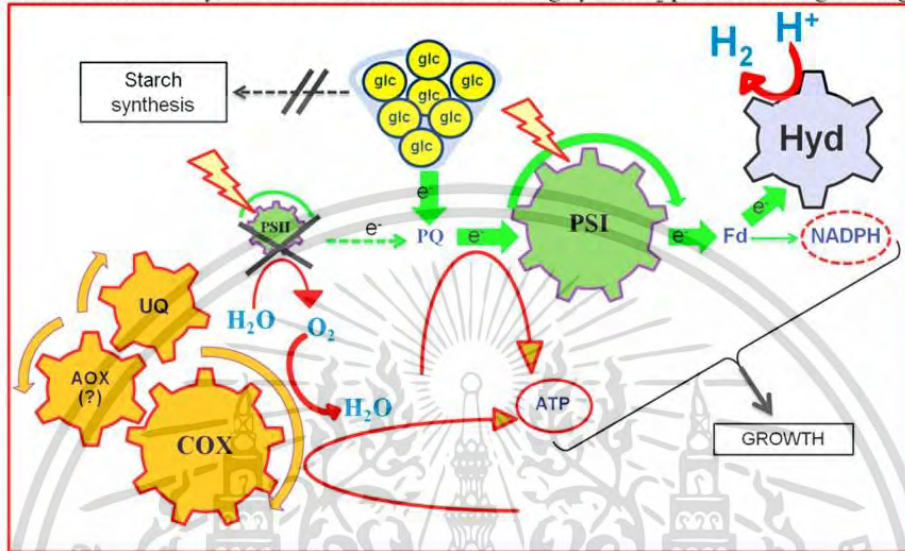
Sirawattanamongkol และคณะ (2020) ทำการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำจืดภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเทศไทย และการศึกษาแผนภูมิต้นไม้ของยีน 18S rDNA บ่งชี้ว่าสาหร่ายดังกล่าวถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *Chorella sp.* จึงให้ชื่อว่า *Chlorella sp.* KLS59 ทำการศึกษาการปรับสภาวะการผลิตไฮโดรเจนด้วยการปรับสภาวะเซลล์สาหร่ายภายใต้ปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นเซลล์ การบดบังของเซลล์ ปัจจัยของอากาศ ความเข้มแสง ชนิดของแหล่งคาร์บอน การขาดธาตุอาหาร ค่ากรดเบสและอิทธิพลของสารรีดิวซ์ ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* KLS59 ที่มีค่าความความชุ่มของเซลล์ที่ 0.1 ในอาหาร TAP สูตรปกติ ที่มีค่ากรดเบสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนอยู่ที่ 7.0-7.2 โดยทำการพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่ออกซิเจน ในสภาวะการบ่มแบบเขย่าที่ความเข้มแสง 3,800 ลักซ์ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด นอกจากนี้เมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายในอาหารเหลวโดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ หรือบ่มเซลล์ภายใต้อาหารเหลวที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ พบว่าไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้ อย่างไรก็ตามเมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายให้อยู่ในอาหารเหลวที่เติม เอทานอล ไตโทไอน์ หรือไนโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนได้ สภาวะที่ดีที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ทำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้ 255.21 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ($\mu\text{mol}/\text{mg Chl}$) ซึ่งคิดเป็นการเพิ่มผลผลิตได้ประมาณ 43 เปอร์เซ็นต์จากสภาวะปกติ

Melis และคณะ (2002) พบว่าสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *C. reinhardtii* เมื่อมีการบ่มเซลล์ในอาหารที่ปราศจากซัลเฟอร์ (Sulfur-deprivation) นานกว่า 24 ชั่วโมง เซลล์จะถูกเหนี่ยวนำให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากธาตุซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบสำคัญของกรดอะมิโนซิสเทอีนและเมไทโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (protein biosynthesis) โดยเฉพาะโปรตีน D1 ซึ่งเป็นโปรตีนศูนย์กลาง (reaction center protein) ของระบบการสังเคราะห์แสง อีกทั้งส่งผลต่อวัฏจักรการซ่อมแซมระบบการสังเคราะห์แสง (PSII repair cycle) (Melis 2002; McKinlay and Harwood 2010) ดังนั้นแล้วเมื่อระบบการสังเคราะห์แสงทำงานช้าลง ปริมาณของออกซิเจนก็ลดลงเช่นกัน ส่งผลให้ตัวยับยั้งเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนสน้อยลง เมื่อเอ็นไซม์ทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ จึงได้ผลผลิตไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้น

Papazi และคณะ (2014) กล่าวว่าไฮโดรเจนถูกพิจารณาว่าเป็นพลังงานที่เหมาะสมในอนาคต และคาดว่าจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจทั่วโลก ความสามารถของสาหร่ายสีเขียวในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนถูกค้นพบเมื่อ 74 ปีก่อน ได้ทำการทดลองอยู่หลายครั้งเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งวิธีที่เพิ่มความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เป็นที่รู้จักกันดี คือ ทำการบ่มในสภาวะที่ขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ แต่วิธีการนี้มีการเพิ่มอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ไม่ยั่งยืน ซึ่งใน

งานวิจัยนี้ได้ทำการบ่มสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (รูปที่ 2.13) ซึ่งโพแทสเซียมนั้นสามารถใช้แทนที่โซเดียมได้บางส่วนในกระบวนการหลักทางชีวเคมี ส่งผลให้ระบบยังคงทำงานได้ อย่างไรก็ตาม โซเดียมไม่สามารถใช้แทนที่โพแทสเซียมในกระบวนการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นแป้งได้ ซึ่งนี่เป็นข้อเท็จจริงที่ทำให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นผ่านวิถีใน

Potassium deficiency, a "smart" cellular switch for high yield H_2 production in green algae



รูปที่ 2.13 กระบวนการเมตาบอลิซึมของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus*

ที่มา : Papazi *et al.*, 2014

ระบบแสงที่ 2 (PSII) และจากอีเล็กตรอนที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคสซึ่งจะถูกนำมาใช้ในการขนส่งอีเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้ยังมีการยับยั้งการผลิตออกซิเจน เนื่องจากไม่เกิดการกระตุ้นในระบบแสงที่ 2 จึงทำให้ระบบเริ่มเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจน ส่งผลให้มีการกระตุ้นในระบบแสงที่ 1 (PSI) เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการถ่ายโอนอีเล็กตรอนไปที่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมากขึ้นและเกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน

Batyrova และคณะ (2015) การเพาะเลี้ยง *Chlamydomonas reinhardtii* และ *Chlorella* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากฟอสฟอรัส (Phosphorus - deprivation) พบว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะถูกเหนี่ยวนำให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ โดย *C. reinhardtii* จะเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มเป็นเวลามากกว่า 100 ชั่วโมง ส่วน *Chlorella* sp. จะเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มเป็นเวลา มากกว่า 300 ชั่วโมง เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดนิวคลีอิก อันจะไปมีผลทำให้การแบ่งเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวหยุดลง และยังพบว่าอัตราการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกจำกัด เนื่องจากระดับตัวกลางในวัฏจักรรีดักทีฟเพนโทสเฟตมีระดับที่ลดลง ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอีเล็กตรอนที่ได้ในรูปนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate : NADPH) จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่า

นำมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจน จึงนำไปสู่การลดลงของระดับตัวรับพลังงานตัวสุดท้ายส่งผลให้การถ่ายโอนอิเล็กตรอนของระบบการสังเคราะห์แสง (photosynthetic electron-transport activity) เกิดขึ้นได้น้อยลง (Batyrova *et al.* 2015; Brooks 1986)

Maswana และคณะ (2018) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora sp.* CU2551 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจินเตตและเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน (Nitrogen-deprivation) พบว่าได้ด้วยอัตราการผลิตที่สูงกว่าในอาหารสูตรดั้งเดิม (TAP) เนื่องจากธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของดีเอ็นเอ และกรดอะมิโนทุกชนิด โดยกรดอะมิโนจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน การแบ่งเซลล์ และวัฏจักรการซ่อมแซมระบบการสังเคราะห์แสง ดังนั้นเมื่อถูกจำกัดจะทำให้ระบบแสงที่ 2 ถูกยับยั้ง และเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีขึ้น (Wykoff *et al.* 1998)

Deng และคณะ (2018) สาหร่ายขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ซึ่งมีปัจจัยภายนอกและภายในส่งผลต่อการเจริญเติบโต พบว่าแสงมีบทบาทสำคัญในการสะสมคลอโรฟิลล์เอ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella kessleri* ในการเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน ดังนี้ 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 $\mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ การเจริญที่ดีที่สุดคือภายใต้ความเข้มแสงที่ 90 $\mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ เนื่องจากการได้รับแสงมากเกินไปจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งของระบบแสงที่ 2 เรียกอีกอย่างว่า photoinhibition ซึ่งเป็นการยับยั้งด้วยแสง (Deng *et al.* 2018)

Yu และคณะ (2017) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella kessleri* ภายใต้ค่าความเป็นกรดเบสที่แตกต่างกันตั้งแต่ 7-11.5 ผลการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมที่สุดของการแพร่กระจายของแสงการเจริญเติบโตของ *Chlorella kessleri* อยู่ในช่วง 6-10 เนื่องจากอนินทรีย์คาร์บอน ส่วนใหญ่ในรูปแบบของ HCO_3^- ในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำ การเพิ่มขึ้นของค่าความเป็นกรดเบสส่งผลต่อการตรึงอนินทรีย์คาร์บอนในการสังเคราะห์แสง โดยการส่งออกของ OH^- ภายในเซลล์ และนำ H^+ จากสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ (Yu *et al.* 2017) ไปรบกวนการทำงานของเซลล์ ขณะที่ค่าความเป็นกรดเบสที่มีความเป็นเบสนั้นจะลดความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์และวัฏจักรของเซลล์เกิดได้ช้าลง เนื่องจากค่าความเป็นกรดเบสที่มีความเป็นเบสจะเพิ่มความยืดหยุ่นของผนังเซลล์ในเซลล์แม่ (mother cells) ซึ่งไปขัดขวางการแบ่งเซลล์ (Chia *et al.* 2018)

Ördög และคณะ (2016) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. MACC-438, *Chlorella minutissima* MACC-452 และ *Chlorella* sp. MACC-728 โดยแปรผันอุณหภูมิ ดังนี้ 20 °C, 25 °C และ 30 °C ผลการทดลองพบว่าที่ 30 °C ให้การเจริญเติบโตดีที่สุดทั้ง 3 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโดยทั่วไปอุณหภูมิสูงจะมีอัตราการเติบโตที่เร็วขึ้น แต่ปริมาณโปรตีนลดลงในขณะที่ปริมาณไขมันและคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น (Renaud *et al.* 2002)



บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่าย

- 1) *Chlorella* sp. KLSc59 คัดแยกโดย วัชรภรณ์ เสมาชัยและคณะ (2559)
- 2) *Tetraspora* sp. CU2551 คัดแยกโดย เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์และคณะ (2554)
- 3) สาหร่ายสีเขียวรหัส G2, G4, G6, G15 และ G16 คัดแยกโดย ญัฐวิภา เหล่าเกื้อและคณะ (2561)
- 4) สาหร่ายสีเขียวรหัส BN1, BN2, SR, PK, SK, U2, U3, 82 และ 12 ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์

3.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย

- 1) อาหารสูตร TAP (Tris-acetate phosphate medium) pH 7.2
- 2) อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียม (TAP-K)
- 3) อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหารไนโตรเจน (TAP-N)
- 4) อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ (TAP-S)
- 5) อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหารฟอสฟอรัส (TAP-P)

3.3 สารเคมี

3.3.1) สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน (Tris-base) (CARLO ERBA, India)
- 2) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (LOBALO Chemie, India)
- 3) แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
- 4) แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Ajax Finechem Pty, Australia)
- 5) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (LOBALO Chemie, India)
- 6) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (LOBALO Chemie, India)
- 7) เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
- 8) ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
- 9) กรดบอริก (H_3BO_3) (LOBALO Chemie, India)
- 10) แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
- 11) เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
- 12) โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (CARLO ERBA, India)

- 13) คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
- 14) แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
- 15) กรดอะซิติก (CH_3COOH) (CARLO ERBA, India)
- 16) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (LOBALO Chemie, India)
- 17) ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
- 18) โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) LOBALO Chemie, India)
- 19) โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) LOBALO Chemie, India)
- 20) แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (LOBALO Chemie, India)
- 21) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (CARLO ERBA, India)
- 22) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) (LOBALO Chemie, India)
- 23) อะการ์ (Agar Bacto) (S D fine-chem limited: SDFCL, India)
- 24) โซเดียมไดไทโอไนท์ ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (LOBALO Chemie, India)
- 25) เบต้า-เมอแคปโทเอทานอล ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)
- 26) เอทานอล ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

3.3.2) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

- เมทานอล (CH_3OH)

3.3.3) สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

- 1) ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotide triphosphate, dNTP)
- 2) เอนไซม์ DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific, USA)
- 3) บัฟเฟอร์ 10X DreamTaq Green (Thermo Scientific, USA)
- 4) ไพรเมอร์ (18S Forward primer, 18S Reverse primer, HydAF primer, HvF1 primer, HvF2 primer, HydAR primer, HVR1 primer and HVR2 primer)
(Maneeruttanarungroj. *et al.*, 2010)

3.3.4) สารเคมีสำหรับการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า

- 1) อะกาโรส (Agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
- 2) สารละลาย 6X Loading buffer
- 3) สารละลาย 50X Tris-acetate-EDTA

- 4) ดีเอ็นเอมาตรฐาน (KAPA DNA Ladder) (KAPA Biosystems, USA)

3.3.5) ชุดทดสอบ (Kit)

- 1) ชุดทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR (FavorPrep™ GEL/ PCR Purification Kit) (FAVORGEN biotech corp., Taiwan)
- 2) ชุดสกัด RNA บริสุทธิ์ (FavorPrep™ Plant Total RNA Purification Mini Kit) (FAVORGEN biotech corp., Taiwan)
- 3) ชุดสังเคราะห์ cDNA (cDNA Synthesis Kit, biotechrabbit™)
- 4) ชุด PCR Cloning (pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega Corporation)
- 5) ชุดสกัดพลาสมิด (FavorPrep™ GEL/ Plasmid Extraction Mini Kit) (FAVORGEN biotech corp., Taiwan)

3.3.6) สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

- 1) เมทิลไวโอโลเจนไฮเดรต 98 เปอร์เซ็นต์ (Methyl Violet : $C_{12}H_{14}Cl_2N_2 \cdot H_2O$) (ACROS ORGANICS, USA)
- 2) โซเดียมไดไฮโอไนต์ ($Na_2S_2O_4$) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3) ไทรทอน เอ็กซ์ 100 (Triton X-100) (ACROS ORGANICS, USA)

3.3.7) ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

- 1) ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาร์กอน (Linde, Thailand)
- 2) ก๊าซอาร์กอนที่มีความบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์ (Linde, Thailand)

3.3.8) ยาปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

- 1) แอมพิซิลลิน (Ampicillin, Sodium Salt) (VWR Life science, Strongsville USA)
- 2) กานามัยซิน (Kanamycin) (Thai Meiji Pharmaceutical, Thailand)

3.4 อุปกรณ์

- 1) เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glassware)
- 2) ไมโครปิเปตต์ (Pipet-lite xls, Rainin Mettler Toledo, Switzerland)
- 3) จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) และเข็มเขี่ยเชื้อแบบกลม (loop)
- 4) ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)

- 5) เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- 6) ขวดแก้ว (Gas-tight vial) ขนาด 13 และ 100 มิลลิลิตร พร้อมจุกยางและฝาล็อคอะลูมิเนียม
- 7) เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph)
- 8) ตู้บ่มแบบเขย่าและควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
- 9) เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer)
- 10) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow)
- 11) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) (JS Research INC, Korea)
- 12) ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
- 13) ชุดกรองสำหรับเครื่อง HPLC และแผ่นเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน
- 14) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
- 15) เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Micro centrifuge) (Thermo Fisher, Germany)
- 16) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge) (Thermo Fisher, Germany)
- 17) เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Thailand)
- 18) เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter)
- 19) คิวเวต (Semi-micro cuvette, path length 10 mm)
- 20) กระบอกฉีดยา (Syringe) และเข็มฉีดยา (Hypodermic needle) (Nipro)
- 21) ตัวล็อคเข็มฉีดยา (Syringe valve push button, luer lock) (Sigma-Aldrich)
- 22) หลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 มิลลิลิตร (Centrifuge tube with screw cap)
- 23) หลอดพีซีอาร์ (PCR Tube)
- 24) หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Eppendorf) ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
- 25) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Thermal Cycler) (Biometra)
- 26) ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (BIO-RAD, USA)
- 27) ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (Gel documentation)

3.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

3.5.1) การเตรียมหัวเชื้อของสาหร่ายสีเขียว

นำสาหร่ายที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง Tris acetate phosphate (TAP) จำนวน 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรในฟลาสก์ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว (TAP) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำฟลาสก์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.2) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว

นำหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวทั้ง 17 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามสภาวะที่ได้แสดงในหัวข้อที่ 3.5.1 มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำใส่หลอดเซ็นทริฟิวจ์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ล้างเซลล์สาหร่ายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงและกระจายเซลล์ลงไป ในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีอาหารสูตร TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 จากนั้น นำไปเพาะเลี้ยง 3 สภาวะ พร้อมกับเขย่าขวดเป็นวงกลมด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของ สาหร่ายสีเขียว ดังนี้

- 1) สภาวะที่ 1 บ่มในสภาวะความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
- 2) สภาวะที่ 2 บ่มในสภาวะความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
- 3) สภาวะที่ 3 บ่มในสภาวะความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยนำเซลล์สาหร่ายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้อาหารสูตร TAP เป็นแบลนด์ (Blank) และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate, μ) และระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time, t_d)

3.6 การวัดความสามารถในการผลิตก๊าซผลิตไฮโดรเจน

เมื่อศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแล้ว จะคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด 6 สายพันธุ์ มาวัดอัตราการผลิตก๊าซผลิตไฮโดรเจน โดยนำหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว ทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามสภาวะที่ได้แสดงในหัวข้อที่ 3.5.1 มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย โดยนำใส่หลอดเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์สาหร่ายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง และกระจายเซลล์สาหร่ายลงในอาหารสูตร TAP โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในขวด Vial ขนาด 13 มิลลิลิตรและปิดฝา พร้อมพ่นก๊าซอาร์กอนที่ความดัน 0.1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) ลงในขวด Vial เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนออกจากระบบ นำขวด Vial ไปบ่มภายใต้สภาวะความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อทำการบ่มครบ 24 ชั่วโมง นำมาตรวจวัดก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นด้วยการใช้เข็ม (Syringe) ดึงก๊าซที่อยู่บริเวณช่องว่างด้านบนของสารละลายเซลล์ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์

มาลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal conductivity detector; GC-TCD) โดยสถานะของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนแสดงในตารางที่ 3.1 และคำนวณอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนตามวิธีการในภาคผนวก ข

ตารางที่ 3.1 สถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์

พารามิเตอร์	สถานะในการเดินระบบ
Column	Pack column 2 m; Molecular sieve 5 Å
Detector	Thermal conductivity detector (TCD)
Temperature program	Injector temperature: 100 °C Oven temperature: 50 °C Detector temperature: 120 °C
Carrier gas	Argon flow rate 30 ml/min (99.999% purity)

3.7 การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนดีที่สุด

เมื่อศึกษาความสามารถของสาหร่ายสีเขียวในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแล้ว จะคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนดีที่สุด 3 สายพันธุ์ มาวัดอัตราการผลิตก๊าซผลิตไฮโดรเจนโดยนำหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามสถานะที่ได้แสดงในหัวข้อที่ 3.5.1 มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย โดยนำใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์สาหร่ายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง และกระจายเซลล์สาหร่ายลงในอาหารสูตร TAP โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใส่ลงในขวด Vial ขนาด 100 มิลลิลิตรและปิดฝาพร้อมพ่นก๊าซอาร์กอนที่ความดัน 0.1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ลงในขวด Vial เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนออกจากระบบ นำขวด Vial ไปบ่มภายใต้สถานะความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นำมาตรวจวัดก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นด้วยการใช้เข็มตักก๊าซที่อยู่บริเวณช่องว่างด้านบนของสารละลายเซลล์ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์

มาลดคอนดักตีวิตีดีเทคเตอร์ โดยสถานะของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนแสดงในตารางที่ 3.1 และคำนวณอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนตามวิธีการในภาคผนวก ข จะตรวจวัดก๊าซไฮโดรเจนจนกว่าจะพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระบบ

3.8 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

ในการศึกษาการหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ทุกสถานะจะเตรียมหัวเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน โดยเตรียมหัวเชื้อตามสถานะที่ได้แสดงในหัวข้อที่ 3.5.1 มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์สาหร่ายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง และกระจายเซลล์สาหร่ายลงในอาหารโดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 จากนั้นนำไปทดสอบการปรับสถานะด้วยปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.8.1) การศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ปิเปตสารละลายเซลล์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใส่ลงในขวด Vial ขนาด 100 มิลลิลิตรและปิดฝา พร้อมพ่นก๊าซอาร์กอนที่ความดัน 0.1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนออกจากระบบ นำขวด Vial ไปบ่มภายใต้สภาวะแปรผันความเข้มแสง ตั้งแต่ 0, 2,000, 4,000, 6,000, 8,000, 10,000 และ 12,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าขวดเป็นวงกลมที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นำก๊าซที่อยู่บริเวณช่องว่างด้านบนของสารแขวนลอยเซลล์มาวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟดังแสดงในหัวข้อที่ 3.6 จนกว่าจะพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระบบ

3.8.2) การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ปิเปตสารละลายเซลล์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในขวด Vial ขนาด 13 มิลลิลิตรและปิดฝา พร้อมพ่นก๊าซอาร์กอนที่ความดัน 0.1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนออกจากระบบ นำขวด Vial ไปบ่มภายใต้สภาวะแปรผันอุณหภูมิ ดังนี้ 25, 30, 35 และ 45 องศาเซลเซียส และใช้ความเข้มแสงที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากหัวข้อ 3.8.1) พร้อมกับเขย่าขวดเป็นวงกลมที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เมื่อบ่มครบ 4 ชั่วโมง นำก๊าซที่อยู่บริเวณช่องว่างด้านบนของสารแขวนลอยเซลล์มาวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟดังแสดงในหัวข้อที่ 3.6

3.8.3) การศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของเซลล์

ในหัวข้อนี้จะมีการปรับเปลี่ยนขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ในหัวข้อนี้จะเปลี่ยนเป็นกระจายเซลล์สาหร่ายลงในอาหารทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ อาหารสูตร TAP (เป็นตัวควบคุม) อาหาร

สูตร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N) อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ (TAP-S) อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P) และอาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) ปิเปตสารละลายเซลล์แต่ละชนิดของอาหารที่มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด Vial ขนาด 100 มิลลิลิตรและปิดฝา พร้อมพ่นก๊าซอาร์กอนที่ความดัน 0.1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนออกจากระบบ บ่มขวด Vial ที่สภาวะความเข้มแสงที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากหัวข้อ 3.8.1) และอุณหภูมิเหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากหัวข้อ 3.8.2) พร้อมกับเขย่าขวดเป็นวงกลมที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นำก๊าซที่อยู่บริเวณช่องว่างด้านบนของสารแขวนลอยเซลล์มาวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟดังแสดงในหัวข้อที่ 3.6 จนกว่าจะพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระบบ

3.8.4) การศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรดเบสที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ในหัวข้อนี้จะมีการปรับเปลี่ยนขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ในหัวข้อนี้จะเปลี่ยนเป็นกระจายเซลล์สำหรับลงในอาหารทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ อาหารสูตร TAP (เป็นตัวควบคุม) อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N) อาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P) และอาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) ที่มีการแปรผันค่าความเป็นกรดเบสหรือพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 โดยปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid : HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide : NaOH) ปิเปตสารละลายเซลล์แต่ละชนิดของอาหารที่มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใส่ลงในขวด Vial ขนาด 100 มิลลิลิตรและปิดฝา พร้อมพ่นก๊าซอาร์กอนที่ความดัน 0.1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนออกจากระบบ บ่มขวด Vial ที่สภาวะความเข้มแสงที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากหัวข้อ 3.8.1) และอุณหภูมิเหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากหัวข้อ 3.8.2) พร้อมกับเขย่าขวดเป็นวงกลมที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นำก๊าซที่อยู่บริเวณช่องว่างด้านบนของสารแขวนลอยเซลล์มาวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟดังแสดงในหัวข้อที่ 3.6 จนกว่าจะพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระบบ

3.8.5) การศึกษาอิทธิพลของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

3.8.5.1) คัดเลือกสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่ดีต่อสายรายีสีเขียว

กระจายเซลล์ในอาหารสูตร TAP ปกติ ที่มีการเติมสารเป็นตัวให้อิเล็กตรอน 3 ชนิด ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ ดังนี้

- 1) เอทานอล (Ethanol)
- 2) โซเดียมไดไทโอไนท์ (Sodium dithionite)

3) เบตา-เมอแคปโตเอทานอล (β -mercaptoethanol)

ปิเปตสารละลายเซลล์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในขวด Vial ขนาด 13 มิลลิลิตรและปิดฝา พร้อมพ่นก๊าซอาร์กอนที่ความดัน 0.1 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนออกจากระบบ บ่มขวด Vial ที่สภาวะความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากหัวข้อ 3.8.1) และอุณหภูมิเหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากหัวข้อ 3.8.2) พร้อมกับเขย่าขวดเป็นวงกลมที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง นำก๊าซที่อยู่บริเวณช่องว่างด้านบนของสารแขวนลอยเซลล์มาวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟดังแสดงในหัวข้อที่ 3.6

3.8.5.2) ศึกษาอิทธิพลของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

กระจายเซลล์สำหรับลงในอาหารทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ อาหารสูตร TAP (เป็นตัวควบคุม) และอาหารสูตร TAP ที่แปรผันให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใส่ลงในขวด Vial ขนาด 100 มิลลิลิตรและปิดฝา พร้อมพ่นก๊าซอาร์กอนที่ความดัน 0.1 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนออกจากระบบ บ่มขวด Vial ที่สภาวะความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากหัวข้อ 3.8.1) และอุณหภูมิเหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากหัวข้อ 3.8.2) พร้อมกับเขย่าขวดเป็นวงกลมที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นำก๊าซที่อยู่บริเวณช่องว่างด้านบนของสารแขวนลอยเซลล์มาวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟดังแสดงในหัวข้อที่ 3.6 จนกว่าจะพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระบบ

3.8.6) การศึกษาการรวมปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

นำทุกปัจจัยที่เหมาะสมของทุกการทดลองมารวมในการทดลองนี้ โดยเตรียมอาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหารและปรับค่าความเป็นกรดเบส พร้อมเติมสารเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ที่พบว่ามีประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ดีที่สุด โดยนำหัวเชื้อสำหรับสายสีเขียว ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามสภาวะที่ได้แสดงในหัวข้อที่ 3.5.1 กระจายเซลล์สำหรับลงในอาหารทดสอบโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใส่ลงในขวด Vial ขนาด 100 มิลลิลิตรและปิดฝา พร้อมพ่นก๊าซอาร์กอนที่ความดัน 0.1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ลงในขวด Vial เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนออกจากระบบ นำไปบ่มที่สภาวะความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากหัวข้อ 3.8.1) และอุณหภูมิเหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากหัวข้อ 3.8.2) พร้อมกับเขย่าขวดเป็นวงกลมที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นำก๊าซที่อยู่บริเวณช่องว่างด้านบนของสารแขวนลอย

เซลล์มาวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟดังแสดงในหัวข้อที่ 3.6 จนกว่าจะพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของการผลิตแก๊สไฮโดรเจนในระบบ

3.9 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสปรับปรุงวิธีการจากการศึกษาของ Batyrova และคณะ (2012) การทดลองทุกขั้นตอนจะทำภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ โดยผสมสารต่อไปนี้ลงในขวด vials ขนาด 13 มิลลิลิตร ที่เป่าด้วยก๊าซอาร์กอนแล้ว ดังนี้ สารละลายเมทิลไวโอลเจน ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร สารละลายบัพเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.9 ที่มีทรูทอน เอ็กซ์ 100 (Triton X-100) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร และ สารแขวนลอยเซลล์จากสภาวะที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สไฮโดรเจน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำของผสมในขวดเก็บแก๊สนี้ไปพ่นก๊าซอาร์กอนอีกครั้ง เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้แน่ใจว่าไล่ออกซิเจนออกจากระบบให้ได้มากที่สุด จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายโซเดียมไดไทโอไนท์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยา 10 นาทีในสภาวะที่มืดและอุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดปริมาณของแก๊สไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากนั้นคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ด้วยปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมลต่อคลอโรฟิลล์ต่อเวลา

3.10 การศึกษาสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีการผลิตแก๊สไฮโดรเจนที่ดีที่สุด

3.10.1) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จะศึกษาเกี่ยวกับการศึกษารูปร่างภายนอกและคุณสมบัติเฉพาะของโครงสร้างของสาหร่ายสีเขียว เช่น สี โครงสร้าง ขนาด รูปร่าง รูปแบบการเคลื่อนไหว โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กในอาหารเหลวสูตร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้มาเตรียมสไลด์สด โดยหยดสารแขวนลอย 1-2 หยด ลงบนแผ่นสไลด์ จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งบันทึกภาพลักษณะของเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.10.2) ค้นหา ยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

การจำแนกสายพันธุ์ครั้งนี้จะค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว ด้วยเอนไซม์

DreamTaq DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย Maneeruttanarungroj และคณะ (2010) ดังนี้

- 1) Forward Primer : 5'-CAGCAGCCGCGTAATT-3'
- 2) Reverse Primer : 5'-CATCTAAGGGCATCACAGACC-3'

มีองค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังที่แสดงในตารางที่ 3.2 และใช้โปรแกรมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดังแสดงในตารางที่ 3.3 จากนั้นตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Agarose Gel Electrophoresis) ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Acetate-EDTA (0.5XTAE) และส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล (Gel Doc EZ Imaging System)

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
แม่แบบดีเอ็นเอ (สารแขวนลอยเซลล์เชื้อจางในน้ำกลั่น OD ₇₅₀ ในช่วง 0.3-0.5)	1
Forward Primer (10 มิลลิโมลาร์)	1
Reverse Primer (10 มิลลิโมลาร์)	1
ดีออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (2 มิลลิโมลาร์)	2
<i>DreamTaq</i> DNA polymerase 5 U/ μ l	0.1
10X <i>DreamTaq</i> DNA polymerase buffer	2
น้ำกลั่น	12.9
ปริมาตรสุทธิ	20

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturation	95	1 นาที	1
Denaturation	95	30 วินาที	} 35
Annealing	52	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final Extension	72	5 นาที	1

3.10.3) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

ชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ในเจลจะถูกล้างออกจากเจลบริเวณที่พบและทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR ตามขั้นตอนดังนี้ (FavorPrep™ GEL/ PCR Purification Kit) นำแถบดีเอ็นเอใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำฟอสเฟต FADF ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (ต่อชิ้นเจลปริมาณ 300 มิลลิกรัม) จากนั้นนำหลอดเซนตริฟิวจ์ไปแช่น้ำที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนเจลในหลอดเซนตริฟิวจ์ทั้งหมดละลายเป็นสารละลายสีเหลืองและปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้เติมลงในคอลัมน์ FADF นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที ที่ส่วนของเหลว เติมน้ำฟอสเฟต (Wash Buffer) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที ที่ส่วนของเหลว และปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าที่ความเร็วรอบ 18,000 xg เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าของเหลวออกจากคอลัมน์ทั้งหมด ย้ายคอลัมน์ FADF ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำฟอสเฟต Elution ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงบริเวณกลางคอลัมน์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000 xg เป็นเวลา 1 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์แล้วนำสารละลายไปวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสอีกครั้ง เพื่อยืนยันว่าสารละลายที่ได้ยังคงมีดีเอ็นเอ ก่อนทำการส่งตรวจเพื่อวิเคราะห์หาของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท Ward Medic ประเทศไทย

3.10.4) การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA จะศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการเปรียบเทียบความคล้ายคลึง ด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้วิธี Maximum likelihood (ML) ในการเปรียบเทียบกับยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวชนิดต่างๆ ที่มีการรายงาน

ไว้ในฐานข้อมูล NCBI นำยีนทั้งหมดมาจัดลำดับความคล้ายคลึง (DNA alignment) ด้วยโปรแกรม Clusta W ในโปรแกรมชุด MEGA7 โดยให้ค่าการสุ่ม (Bootstrap) เท่ากับ 1,000 ครั้ง (Tamura and Nei 1993; Kumar *et al.* 2016)

3.11 การติดตามหายีนไฮโดรจีเนส

ในการศึกษาหายีนไฮโดรจีเนสจำเป็นต้องสกัดอาร์เอ็นเอ เพื่อเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นดีเอ็นเอคู่สม (Complementary DNA หรือ cDNA) ซึ่งนำไปใช้เป็นตัวเอ็นเอต้นแบบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซส เพื่อติดตามหายีนไฮโดรจีเนสต่อไป

3.11.1) วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอบริสุทธิ์

นำสาหร่ายสีเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนที่ใสทิ้งและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดอาร์เอ็นเอ ด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังนี้ (FavorPrep™ Plant Total RNA Purification Mini Kit)

นำเซลล์สาหร่ายประมาณ 100 มิลลิกรัม ผสมกับเม็ดปิดแก้ว (glass bead) และเติมบัฟเฟอร์ FARB 500 ไมโครลิตร ที่ผสมเบต้าเมอแคปโตเอทานอล บ่มในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Vortex อย่างรุนแรงเพื่อให้เซลล์แตก เป็นเวลา 30 วินาที ย้ายสารละลายที่ได้ลงคอลัมน์ใหม่ (Filter Column) และนำไปปั่นเหวี่ยง 18,000xg เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายสารละลายที่ได้ลงหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ และเติมเอทานอลในปริมาณที่เท่ากัน และย้ายสารละลายที่ได้ลงคอลัมน์ใหม่ (FARB mini column) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 18,000xg เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ (wash buffer) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 18,000xg เป็นเวลา 1 นาที และเทส่วนใสทิ้ง ขั้นตอนนี้ทำทั้งหมด 2 ครั้ง เติม RNase-free ddH₂O ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงบริเวณกลางคอลัมน์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 18,000xg เป็นเวลา 1 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์อาร์เอ็นเอ

3.11.2) การทำปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน (reverse transcription)

นำสารละลายผลิตภัณฑ์อาร์เอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน โดยการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซส เพื่อเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้กลายเป็น cDNA ทำการผสมองค์ประกอบของปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชันในตารางที่ 3.4 ระหว่างการเติมองค์ประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชันจะต้องทำบนน้ำแข็ง และใช้โปรแกรมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดังแสดงในตารางที่ 3.5 เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเสร็จแล้ว สามารถนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อแยกในวันอะกาโรสเจลต่อไป

ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบในปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
แม่แบบอาร์เอ็นเอ ความเข้มข้น 0.1-1 ug/ μ l	5
RNase Inhibitor (20 U/ μ l)	1
Oligo dT (10 ไมโครโมลาร์)	0.5
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (10 มิลลิโมลาร์)	4
เอนไซม์ M-MuLV Reverse transcriptase	1
10X buffer	5
น้ำ RNase free	Up to 20
ปริมาตรสุทธิ	20

ตารางที่ 3.5 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริป

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
42.0	60 นาที
85.0	10 นาที
4.0	hold

3.11.3) ค้นหาฮัยโดรจีเนส ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮัยโดรจีเนส โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเอนไซม์ *DreamTaq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและไพรเมอร์ที่เป็น degenerate primer โดยเป็น forward primer 3 ชนิดและ reverse primer 3 ชนิด ไพรเมอร์ทั้งหมดออกแบบโดย Maneeruttanarungroj และคณะ (2010) ดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 แสดงชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการค้นหาฮีน

ชนิดไพรเมอร์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
forward primer	HydAF	(5'-CRCTGCCCATGTTCCACCAG-3')
	HvF1	(5'-CTVACCATYATGGAGGAR-3')
	HvF2	(5'-TGCCCATGTTCCACCA-3')
reverse primer	HydAR	(5'-GCCACRTAGTGBGTGTGCAG-3')
	HvR1	(5'-CKSCTGSCGCTTCTG-3')
	HvR2	(5'-ACRTAGTGDGTGTGCAG-3')

นอกจากนี้ไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิดนี้ สามารถเข้าคู่กันเพื่อจับกับเบสคู่สมในดีเอ็นเอต้นแบบได้ทั้งหมด 9 แบบ ดังตารางที่ 3.7 และมีองค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังที่แสดงในตารางที่ 3.8 และใช้โปรแกรมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดังแสดงในตารางที่ 3.9 จากนั้นตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Acetate-EDTA (0.5XTAE) และส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล (Gel Doc EZ Imaging System)

ตารางที่ 3.7 แสดงการเข้าคู่กันเพื่อจับกับเบสคู่สมในดีเอ็นเอต้นแบบทั้งหมด 9 แบบ

รูปแบบที่	forward primer	reverse primer
1	HydAF	HydAR
2		HVR1
3		HVR2
4	HvF1	HydAR
5		HVR1
6		HVR2
7	HvF2	HydAR
8		HVR1
9		HVR2

ตารางที่ 3.8 แสดงองค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
แม่แบบดีเอ็นเอ (DNA template) (ใช้สารแขวนลอยเซลล์)	1
Forward Primer (10 มิลลิโมลาร์)	1
Reverse Primer (10 มิลลิโมลาร์)	1
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (2 มิลลิโมลาร์)	2
DreamTaq DNA polymerase 5 U/ μ l	0.1
10X DreamTaq DNA polymerase buffer	2
น้ำกลั่น	12.9
ปริมาตรสุทธิ	20

ตารางที่ 3.9 แสดงสถานะที่ใช้ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturation	95	2 นาที	1
Denaturation	95	30 วินาที	} 35
Annealing	41	30 วินาที	
Extension	72	2 นาที	
Final Extension	72	5 วินาที	1

3.11.4) การเชื่อมต่อยีนเป้าหมายกับพลาสมิดพาหะ pGEM[®]-T Easy

นำผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.10 ผสมให้เข้ากันในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.10 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัดต่อยีนที่สนใจเข้ากับพลาสมิด

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
ผลิตภัณฑ์ PCR	2
T4 DNA Ligation 2x Buffer	5
pGEM [®] -T Easy Vector (50ng/ul)	1
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/μl)	1
น้ำ	1
ปริมาตรสุทธิ	10

3.11.5) ทรานสฟอร์เมชัน (transformation)

ทรานสฟอร์เมชันเป็นกระบวนการนำดีเอ็นเอสายผสมใส่เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย เพื่อให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย มีขั้นตอนดังนี้ นำ competent cell (DH5α) จากตู้ -80 องศาเซลเซียส แช่ในน้ำแข็งเพื่อทำการละลาย หลังจากนั้นดูดปฏิกิริยาจากข้อ 3.11.4) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ competent cell 100 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ 1-2 ครั้ง แช่น้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปแช่ที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เมื่อเสร็จแล้วแช่ลงในน้ำแข็งทันที เป็นระยะเวลา 5 นาที เติมหาอาหารสูตร LB เหลว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มในตู้เขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อมากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเทคนิค Spread plate โดยใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อเพลท (อาหารสูตร LB ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของ แอมพิซิซิลิน 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร IPTG 0.1 มิลลิโมลาร์ และ x-gal 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกแบคทีเรียที่เป็นสีขาวมาเพิ่มจำนวนต่อไป เพื่อเตรียมสกัดพลาสมิด ชุดสังเคราะห์ cDNA (cDNA Synthesis Kit, biotechrabbit™)

3.12.6) การสกัดพลาสมิด (FavorPrep™ GEL/ Plasmid Extraction Mini Kit)

นำเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 1-3 มิลลิลิตร บั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 11,000xg เป็นระยะเวลา 1 นาที และเทส่วนใสทิ้ง เติมหัฟเฟอร์ FAPD1 (ผสม RNase แล้ว) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำให้เซลล์และบัฟเฟอร์ผสมเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมหัฟเฟอร์ FAPD2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดขึ้นลงอย่างเบาๆ 5-10 ครั้ง และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-5 นาที เพื่อแตกเซลล์ เติมหัฟเฟอร์ FAPD3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร พลิกหลอดขึ้นลงอย่างเบาๆ 5-10 ครั้ง ทิ้งที่ที่เติมหัฟเฟอร์ บั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 18,000xg เป็นระยะเวลา 5 นาที ย้ายส่วน

ของเหลวที่ได้ลงคอลัมน์ (FAPD Column) จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 11,000xg เป็นระยะเวลา 30 วินาที และทิ้งส่วนใส เติมน้ำล้าง W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 11,000 x g เป็นระยะเวลา 30 วินาที และทิ้งส่วนใส เติมน้ำล้าง Wash ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 11,000 x g เป็นระยะเวลา 30 วินาที และทิ้งส่วนใส ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 18,000 x g เป็นระยะเวลา 3 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง นำคอลัมน์ที่แห้งแล้ววางลงบนหลอดไมโครเซนติฟิวจ์อันใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำล้าง Elution Buffer หรือ ddH₂O ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บริเวณตรงกลางของเมมเบรน ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 18,000 xg เป็นระยะเวลา 1 นาที และเก็บสารละลายพลาสติกที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสไว้ใช้ในการทดลอง

3.13 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลความแปรปรวนวิธีทางสถิติของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว ด้วย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างของข้อมูล ด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ IBM SPSS Statistics version 25 (SPSS software, New York, USA)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

โครงการวิจัยก่อนหน้านี้ได้คัดแยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำจืดภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้ที่จะพบสายพันธุ์ใหม่จากกลุ่มตัวอย่างเหล่านั้น อาจนำไปสู่การใช้สาหร่ายต้นแบบสายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีกว่าสาหร่ายสายพันธุ์ที่เคยได้ทำการศึกษา มา โดยจะทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุด จากนั้นทำการศึกษาลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวและศึกษาผลของอิทธิพลต่างๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

4.1 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

จากการศึกษาการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว โดยเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1 ของสาหร่ายขนาดเล็ก 17 สายพันธุ์ และเก็บผลการเจริญเติบโตทุก 24 ชั่วโมง โดยการวัดความขุ่นของเซลล์จากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร จากการศึกษาความขุ่นของการเพาะเลี้ยง 3 สภาวะ พบว่า การเพาะเลี้ยงที่ 1 ในสภาวะความเข้มข้นแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.1) การเจริญสูงสุดเป็นของสาหร่ายสีเขียวรหัส BN2, *Tetraspora* sp. CU2551, G2, G6, *Chlorella* sp. K1Sc59 และ SR ตามลำดับ และการเพาะเลี้ยงที่ 2 ในสภาวะความเข้มข้นแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.2) พบว่าการเจริญสูงสุดเป็นของสาหร่ายสีเขียวรหัส BN2, *Tetraspora* sp. CU2551, G2, SR, G6 และ *Chlorella* sp. K1Sc59 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) แต่การเพาะเลี้ยงที่ 3 ในสภาวะความเข้มข้นแสง 1,300 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าการเจริญสูงสุดเป็นของสาหร่ายสีเขียวรหัส SR, PK, *Tetraspora* sp. CU2551, G2, G4 และ 12 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 สภาวะมีอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.1)

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้งการเพาะเลี้ยง 3 สภาวะ พบว่า การเพาะเลี้ยงที่ 1 ในสภาวะความเข้มข้นแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สาหร่ายสีเขียวมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าในสภาวะที่ 2 และ 3 (ตารางที่ 4.1) โดยเซลล์สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นเซลล์สาหร่ายจะมีการเจริญคงที่เข้าสู่ระยะ Stationary phase (รูปที่ 4.1) เนื่องจากการเจริญเติบโตและองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กถูกควบคุมด้วยสภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิและแสง (Oliveira *et al.* 1999) สอดคล้องกับการรายงานของ Ördög และคณะ (2016) รายงานว่า การ

แพะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. MACC-438, *Chlorella minutissima* MACC-452 และ *Chlorella* sp. MACC-728 โดยแปรผันอุณหภูมิ ดังนี้ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าที่ 30 องศาเซลเซียส ให้การเจริญเติบโตดีที่สุดทั้ง 3 สายพันธุ์ (Ördög *et al.* 2016) โดยอุณหภูมิมีอิทธิพลอย่างมากกับองค์ประกอบทางเคมีภายในเซลล์ เช่น การนำเข้าสู่สารอาหารและคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ Renaud และคณะ (2002) รายงานว่า เมื่อแพะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 25, 27, 30, 33 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นเมื่อแพะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง และจะมีการเจริญเติบโตที่ช้าลงเมื่อแพะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปอุณหภูมิสูงจะเพิ่มอัตราการเติบโตที่เร็วขึ้น แต่ปริมาณโปรตีนลดลงในขณะที่ปริมาณไขมันและคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น (Renaud *et al.* 2002) ส่วนอิทธิพลของแสง เช่น รอบความมืดความสว่าง (light-dark cycle) เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและเกิดการสะสมชีวมวล เนื่องจากความเข้มแสงมีอิทธิพลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยเมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงของเซลล์มากขึ้น

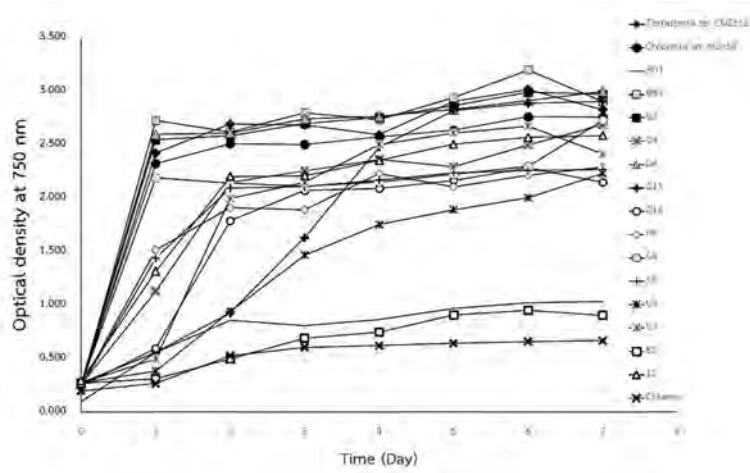
ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกสาหร่ายสีเขียวจำนวน 6 สายพันธุ์ ที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด คือ BN2, G2, G6, *Chlorella* sp. KLS59, *Tetraspora* sp. CU2551 และ SR โดยใช้สภาวะการแพะเลี้ยงเริ่มต้นที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไปทำการวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่อไป

ตารางที่ 4.1 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (t_d) ของสาหร่ายสีเขียว

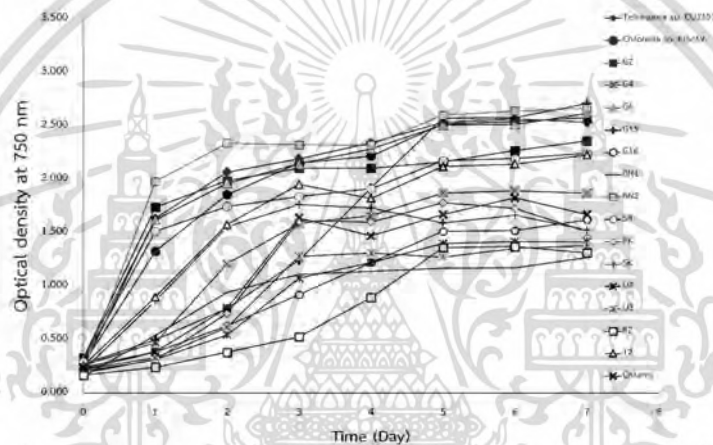
ลำดับ	3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส						3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส						1,300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส					
	รหัส	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	ระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (h)	รหัส	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	ระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (h)	รหัส	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	ระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (h)	รหัส	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	ระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (h)	รหัส	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	ระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (h)			
1	G2	0.096 ± 0.0006	7.20 ± 0.046	G2	0.069 ± 0.0055	9.96 ± 0.795	G2	0.040 ± 0.0004	17.39 ± 0.165	G2	0.040 ± 0.0006	17.24 ± 0.231	G2	0.040 ± 0.0004	17.39 ± 0.165			
2	G4	0.043 ± 0.0005	15.75 ± 0.169	G4	0.037 ± 0.0003	18.56 ± 0.161	G4	0.037 ± 0.0003	18.56 ± 0.161	G4	0.040 ± 0.0006	17.24 ± 0.231	G4	0.040 ± 0.0006	17.24 ± 0.231			
3	G6	0.094 ± 0.0006	7.32 ± 0.043	G6	0.067 ± 0.0012	10.20 ± 0.183	G6	0.067 ± 0.0012	10.20 ± 0.183	G6	0.022 ± 0.0009	31.41 ± 1.213	G6	0.022 ± 0.0009	31.41 ± 1.213			
4	G15	0.022 ± 0.0005	30.26 ± 0.015	G15	0.018 ± 0.0007	37.19 ± 1.431	G15	0.018 ± 0.0007	37.19 ± 1.431	G15	0.018 ± 0.0004	37.52 ± 0.806	G15	0.018 ± 0.0004	37.52 ± 0.806			
5	G16	0.041 ± 0.0014	16.73 ± 0.626	G16	0.015 ± 0.0005	43.64 ± 1.3975	G16	0.015 ± 0.0005	43.64 ± 1.3975	G16	0.021 ± 0.0009	33.68 ± 1.454	G16	0.021 ± 0.0009	33.68 ± 1.454			
6	<i>Chlorella</i> sp. K1Sc59	0.089 ± 0.0006	7.72 ± 0.051	<i>Chlorella</i> sp. K1Sc59	0.040 ± 0.0012	17.25 ± 0.509	<i>Chlorella</i> sp. K1Sc59	0.040 ± 0.0012	17.25 ± 0.509	<i>Chlorella</i> sp. K1Sc59	0.024 ± 0.0006	29.09 ± 0.729	<i>Chlorella</i> sp. K1Sc59	0.024 ± 0.0006	29.09 ± 0.729			
7	<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	0.096 ± 0.0003	7.16 ± 0.023	<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	0.080 ± 0.0007	8.62 ± 0.075	<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	0.080 ± 0.0007	8.62 ± 0.075	<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	0.047 ± 0.0007	14.65 ± 0.229	<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	0.047 ± 0.0007	14.65 ± 0.229			
8	BN1	0.044 ± 0.0011	15.48 ± 0.393	BN1	0.037 ± 0.0011	18.56 ± 0.527	BN1	0.037 ± 0.0011	18.56 ± 0.527	BN1	0.027 ± 0.0007	25.72 ± 0.696	BN1	0.027 ± 0.0007	25.72 ± 0.696			
9	BN2	0.098 ± 0.0017	7.02 ± 0.125	BN2	0.093 ± 0.0011	7.41 ± 0.085	BN2	0.093 ± 0.0011	7.41 ± 0.085	BN2	0.025 ± 0.0006	27.27 ± 0.641	BN2	0.025 ± 0.0006	27.27 ± 0.641			
10	PK	0.042 ± 0.0005	16.19 ± 0.199	PK	0.028 ± 0.0006	24.19 ± 0.498	PK	0.028 ± 0.0006	24.19 ± 0.498	PK	0.048 ± 0.0023	14.46 ± 0.785	PK	0.048 ± 0.0023	14.46 ± 0.785			

ตารางที่ 4.1 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (t_d) ของสาหร่ายสีเขียว (ต่อ)

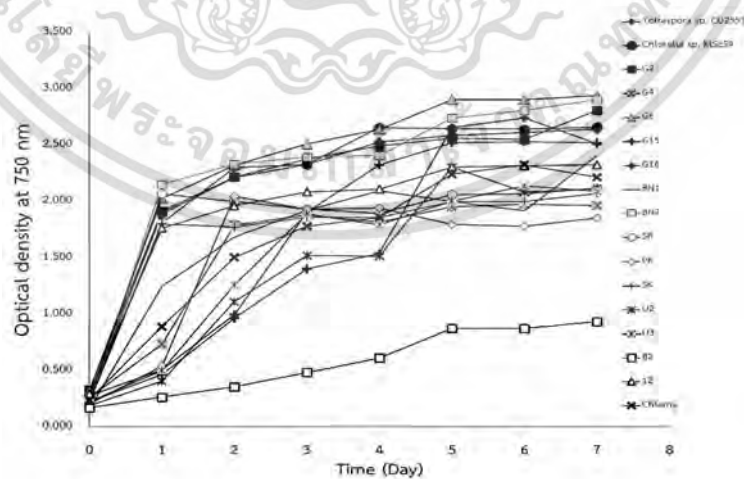
ลำดับ	สภาวะที่เพาะเลี้ยง					
	ความเข้มข้นแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส			ความเข้มข้นแสง 1,300 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส		
	รหัส	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	ระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (h)	รหัส	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	ระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (h)
11	SR	0.089 ± 0.0010	7.77 ± 0.087	SR	0.068 ± 0.0005	10.18 ± 0.071
12	SK	0.044 ± 0.0004	15.43 ± 0.153	SK	0.024 ± 0.0007	27.94 ± 0.734
13	U3	0.028 ± 0.0005	24.28 ± 0.451	U3	0.024 ± 0.0003	28.55 ± 0.295
14	U2	0.025 ± 0.0006	26.86 ± 0.591	U2	0.024 ± 0.0006	28.57 ± 0.638
15	Chlamy	0.020 ± 0.0018	34.30 ± 0.677	Chlamy	0.026 ± 0.0004	26.10 ± 0.380
16	12	0.041 ± 0.0007	16.55 ± 0.262	12	0.037 ± 0.0009	18.35 ± 0.440
17	82	0.010 ± 0.0012	68.44 ± 6.5845	82	0.017 ± 0.0002	39.96 ± 0.558



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่สภาวะความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ และ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ 1)

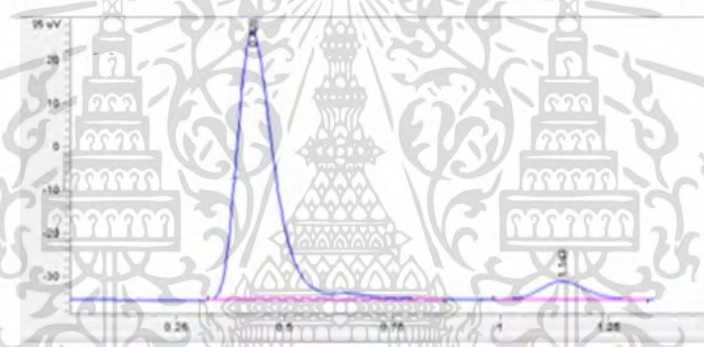


รูปที่ 4.2 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่สภาวะความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ และ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ 2)



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่สภาวะความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ และ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ 3)

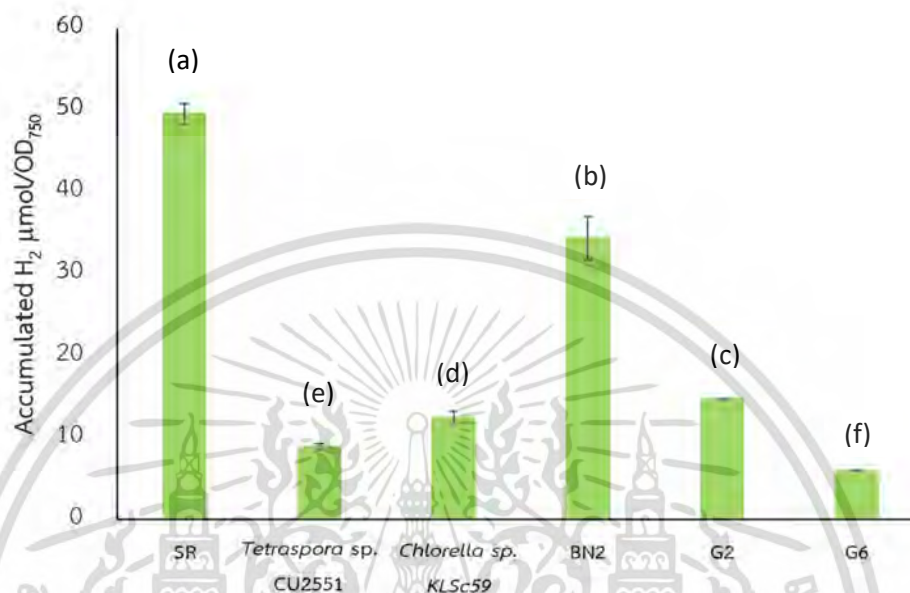
จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว พบสาหร่ายที่มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ BN2, G2, G6, *Chlorella* sp. KLS59, *Tetraspora* sp. CU2551 และ SR โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงนำสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 6 สายพันธุ์นี้ มาศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และวัดอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ในการทดสอบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว จะตรวจสอบจากผลโครมาโทแกรม (chromatogram) จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่าก๊าซที่มีระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time, RT) ช่วง 0.4, 0.6 และ 1.15 นาที คือ ก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซออกซิเจน และก๊าซไนโตรเจน ตามลำดับ (รูปที่ 4.4) และการวิเคราะห์ผลจะนำพื้นที่ใต้กราฟ (peak) ของก๊าซไฮโดรเจนที่ได้มาคำนวณผลเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข)



รูปที่ 4.4 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของก๊าซไฮโดรเจนที่วิเคราะห์จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียว SR มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ โดยมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 49.5 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{750}) ส่วนสาหร่ายสีเขียว BN2, G2, G6, *Chlorella* sp. KLS59 และ *Tetraspora* sp. CU2551 มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 34.3, 14.8, 12.5, 8.9 และ 6.0 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{750}) ตามลำดับ (รูปที่ 4.5) เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 6 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Sirawattanamongkol และคณะ (2020) พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59 มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 นอกจากนี้งานวิจัยของ Maneeruttanarungroj และคณะ (2010) และ Maswana. และคณะ (2018) พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ อีกทั้งยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน

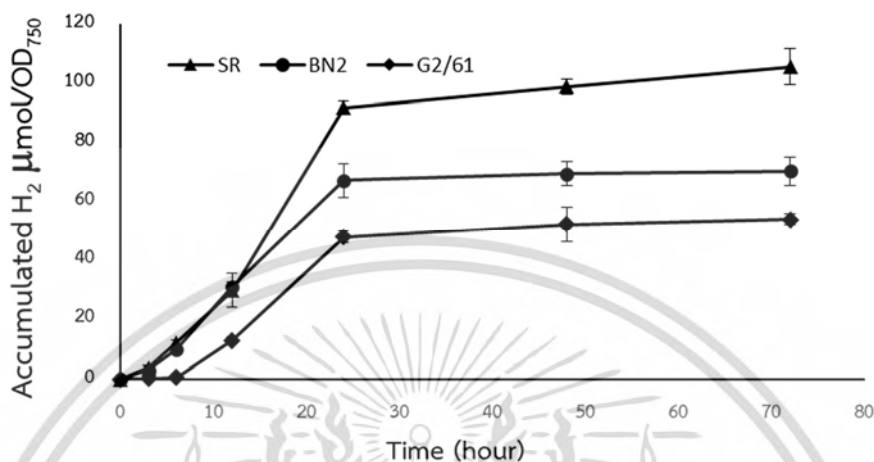
ได้มากกว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งเป็นโมเดลในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวอีกด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับในสถานะเดียวกัน ส่งผลให้สาหร่ายสีเขียว SR มีความน่าสนใจในการเลือกศึกษาต่อในลำดับต่อไป



รูปที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 6 สายพันธุ์ ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติ ในสถานะที่ไม่มีอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการวิเคราะห์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$))

เพื่อเป็นการยืนยันว่าสาหร่ายสีเขียว SR เป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ จึงทำการศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มเติมของสาหร่ายสีเขียวที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด 3 ลำดับแรก ในการทดลองก่อนหน้านี้นี้ คือ SR, BN2 และ G2 ผลการทดลองพบว่า ภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการบ่ม สาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์มีการอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและหลังจาก 24 ชั่วโมงจะเข้าสู่สภาวะคงที่ สาหร่ายสีเขียว SR มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุดจากสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 105.6 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{750}) ส่วนสาหร่ายสีเขียว BN2 และ G6 มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 70.4 และ 54.1 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{750}) ตามลำดับ (รูปที่ 4.6)

ดังนั้นสาหร่ายสีเขียว SR มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมมากที่สุดเมื่อทำการบ่มภายใต้สภาวะโล่อากาศ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกสาหร่ายสีเขียว SR มาศึกษาชนิดและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป



รูปที่ 4.6 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียวไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติ ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่มีความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

4.3 การศึกษาสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ดีที่สุด

การแสดงลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว SR จะศึกษาใน 2 ลักษณะ คือ การสังเกตสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และวิธีการติดตามลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

4.3.1) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

นำเซลล์สาหร่ายที่มีระยะการเจริญเติบโตคงที่ (Stationary phase) มาศึกษารูปร่างและลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่างโดยมีกำลังขยายภาพ 1,000 เท่า พบว่าสาหร่ายสีเขียว SR เป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างลักษณะกลม สีเขียว และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์เฉลี่ยประมาณ 5.9 ± 0.5 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.7) (จากการสุ่มวัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 20 เซลล์) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบรูปร่างเป็นทรงกลมถึงรูปไข่ (Bock *et al.* 2011; Safi *et al.* 2014) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์เฉลี่ยประมาณ 2–10 ไมโครเมตร (Illman *et al.* 2000; Yamamoto *et al.* 2005) นอกจากนี้ยังพบการรายงานลักษณะของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sorokiniana* มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์เฉลี่ยประมาณ 3 - 5 ไมโครเมตร (Azaman *et al.* 2017)

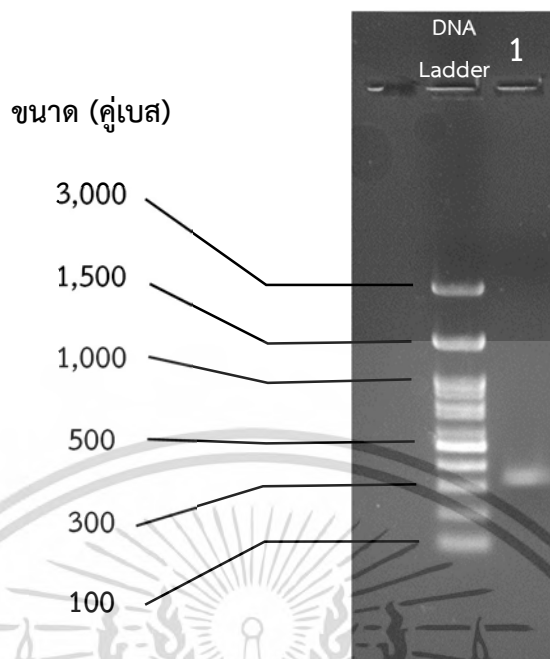


รูปที่ 4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย SR ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

4.3.2) ค้นหายีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

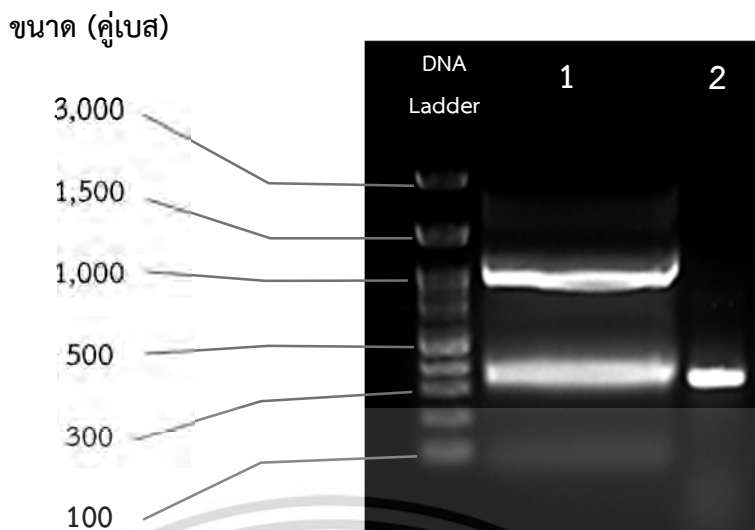
เซลล์สาหร่ายสีเขียว SR ถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยการเติมองค์ประกอบต่างๆ เพื่อใช้ในการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังแสดงในตารางที่ 3.2 ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ 18S rDNA F1 (5'-CAGCAGCCGCGTAATT-3') และ ไพรเมอร์ 18S rDNA R1 (5'-CATCTAAGGGCATCACAGACC-3') และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ rDNA F1 และ ไพรเมอร์ 18S rDNA R1 สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอเป้าหมายของเซลล์สาหร่ายสีเขียว SR โดยหลุมแรกคือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder) หมายเลข 1 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR (รูปที่ 4.8)

เมื่อเปรียบเทียบขนาดและปริมาณของ 18S rDNA กับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่ายีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว SR มีขนาดต่ำกว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 400 คู่เบสเล็กน้อย มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอประมาณ 30 นาโนกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร ซึ่งยีนที่ได้มีความยาวที่น้อยเกินไป อาจทำให้มีปัญหาเกิดขึ้นในขั้นตอนการจัดลำดับความคล้ายคลึงของยีน ดังนั้นจึงทำการสกัดอาร์เอ็นเอและสร้าง cDNA มาใช้ในการตามหายีน 18S rDNA อีกครั้ง



รูปที่ 4.8 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 18S rDNA ด้วยเทคนิค PCR ของสาหร่ายสีเขียว SR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder หมายเลข 1: ผลิตภัณฑ์ PCR

เมื่อนำ cDNA มาใช้เป็นตัวเอ็นเอต้นแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล ผลการทดลองพบว่า ไพรมเมอร์ rDNA F1 และ ไพรมเมอร์ 18S rDNA R1 สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอเป้าหมายของ cDNA ได้ แต่พบความแตกต่างกับยีน 18S rDNA ที่พบจากเซลล์สาหร่ายสีเขียว SR (รูปที่ 4.9) โดยหลุมแรก คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder) หมายเลข 1 คือ ยีน 18S rDNA ที่พบจาก cDNA และหมายเลข 2 คือ ยีน 18S rDNA ที่พบจากเซลล์สาหร่ายสีเขียว SR เมื่อเปรียบเทียบขนาดและปริมาณของยีน 18S rDNA กับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว SR มีขนาดประมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส



รูปที่ 4.9 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 18S rDNA ด้วยเทคนิค PCR ของสาหร่ายสีเขียว SR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder หมายเลข 1 : ผลลัพธ์ PCR จาก cDNA หมายเลข 2 : ผลลัพธ์ PCR จากเซลล์สาหร่าย

4.3.3) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

เมื่อทราบขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ที่ได้จากเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส และเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ขั้นต่อไป นำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำบริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำบริสุทธิ์ชั้น PCR ดังที่กล่าวในหัวข้อที่ 3.11.3) จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ และทำการตรวจสอบสารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ ก่อนทำการส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยเปรียบเทียบขนาดของชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ยังคงขนาดเดิมตามข้อ 4.3.2) จากนั้นจะส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ทั้ง 2 แบบ คือ ยีน 18S rDNA ที่พบจาก cDNA และยีน 18S rDNA ที่พบจากเซลล์สาหร่ายสีเขียว SR โดยจะเรียกลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนที่ได้ว่า ยีน 18SN และยีน 18S ตามลำดับ

ผลการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18SN และยีน 18S พบจำนวนคู่เบสของยีน 18S rDNA สาหร่ายสีเขียว SR จำนวน 884 คู่เบส และ 326 คู่เบส เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18SN และยีน 18S พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S เป็นส่วนหนึ่งในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18SN (รูปที่ 4.10) จึงคาดว่า cDNA จะมี genomic DNA (gDNA) ปนอยู่ เนื่องจากขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอไม่ได้เติมเอนไซม์ DNase ดังนั้น gDNA ที่พบจากการสกัดอาร์เอ็นเอจึงขาดเป็นท่อนสั้นๆ จากการแตกเซลล์ของสาหร่าย มีความเป็นไปได้ว่า ความซับซ้อนของโครงสร้าง gDNA ลดลงและโครงสร้างทุติยภูมิเสียสภาพ ส่งผลให้โอกาสในการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะสมบูรณ์ในการเกิดการคลายเกลียวของดีเอ็นเอแม่แบบเป็นไปได้ง่ายขึ้น ทำให้ได้ขนาดของชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ยาวกว่าการใช้จากเซลล์สาหร่ายสีเขียวโดยตรง

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5       15       25       35       45       55
18SN  CAGCAGCCGC GGTAATTCCA GCTCCAATAG CGTATATTTA AGTTGCTGCA GTTAAAAAGC
18S   CAGCAGCCGC GGTAATTCCA GCTCCAATAG CGTATATTTA AGTTGCTGCA GTTAAAAAGC
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      65       75       85       95       105      115
18SN  TCGTAGTTGG ATTTCCGGTG GGGCCTGCCG GTCGCCGTT TCGGTGTGCA CTGGCAGGGC
18S   TCGTAGTTGG ATTTCCGGTG GGGCCTGCCG GTCGCCGTT TCGGTGTGCA CTGGCAGGGC
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      125      135      145      155      165      175
18SN  CCACCTTGTT GCCGGGGACG GGCTCCTGGG CTTCACTGTC CGGGACTCGG AGTCGGCGCT
18S   CCACCTTGTT GCCGGGGACG GGCTCCTGGG CTTCACTGTC CGGGACTCGG AGTCGGCGCT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      185      195      205      215      225      235
18SN  GTTACTTTGA GTAAATTAGA GTGTTCAAAG CAGGCCTACG CTCTGAATAC ATTAGCATGG
18S   GTTACTTTGA GTAAATTAGA GTGTTCAAAG CAGGCCTACG CTCTGAATAC ATTAGCATGG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      245      255      265      275      285      295
18SN  AATAACACGA TAGGACTCTG GCCTATCCTG TTGGTCTGTA GGACCGGAGT AATGATTAAG
18S   AATAACACGA TAGGACTCTG GCCTATCCTG TTGGTCTGTA GGACCGGAGT AATGATTAAG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      305      315      325      335      345      355
18SN  AGGGACAGTC GGGGGCATTG GTATTTTATT GTCAGAGGTG AAATTCTTGG ATTTATGAAA
18S   AGGGACAGTT GGGGGCATTG GTATTT-----
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      365      375      385      395      405      415
18SN  GACGAACTAC TCGCAAAGCA TTGCCAAGG ATGTTTTCAT TAATCAAGAA CGAAAGTTGG
18S   -----
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      425      435      445      455      465      475
18SN  GGCTCGAAG ACGATTAGAT ACCGTCCTAG TCTCAACCAT AACGATGCC GACTAGGGAT
18S   -----
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      485      495      505      515      525      535
18SN  CGCGGATGT TTCTTCGATG ACTCCGCCGG CACCTTATGA GAAATCAAAG TTTTGGGTT
18S   -----
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      545      555      565      575      585      595
18SN  CCGGGGGGAG TATGGTCGCA AGGCTGAAAC TTAAAGGAAT TGACGGAAGG GCACCACCAG
18S   -----
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      605      615      625      635      645      655
18SN  GCGTGGAGCC TCGCGCTTAA TTGACTCAA CACGGGAAA CTTACCAGGT CCAGACATAG
18S   -----
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      665      675      685      695      705      715
18SN  TGAGGATTGA CAGATTGAGA GCTOTTTCTT GATTCTATGG GTGGTGGTGC ATGGCCGTTT
18S   -----
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      725      735      745      755      765      775
18SN  TTAGTTGGTG GGTTCCTTG TCAGTTGAT TCCGGTAACG AACGAGACCT CAGCCTGCTA
18S   -----
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      785      795      805      815      825      835
18SN  AATAGTCACG GTTGGTTCTC CAGCCGGCGG ACTTCTTAGA GGGACTATTG GCGACTAGCC
18S   -----
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      845      855      865      875
18SN  AATGGAAGCA TGAGGCAATA ACAGGTCTGT GATGCCCTTA GATG
18S   -----

```

รูปที่ 4.10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว SR

4.3.4) การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว

จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณตำแหน่งยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว SR โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย Maneeruttanarungroj และคณะ (2010) ดังนี้ Forward Primer : 18S rDNA F1 (5'-CAGCAGCCGCGGTAATT-3') และ Reverse Primer : 18S rDNA R1 (5'-CATCTAAGGGCATCACAGACC-3') และได้ผลิตผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (รูปที่ 4.11) เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงเปรียบเทียบ (BLAST search) กับฐานข้อมูลใน NCBI GenBank (Morgulis *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2000) ผลที่ได้สอดคล้องกับทั้งผลจากการศึกษาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าทั้งหมดเป็นสาหร่ายสกุล *Chlorella* sp. ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ Chlorellales ร้อยละความเหมือน (% identity) เท่ากับ 99.89% เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วในการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น จะยอมรับว่าสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษเป็นชนิดเดียวกันก็ต่อเมื่อมีค่าร้อยละความเหมือนตั้งแต่ 97 % ขึ้นไป (Portillo *et al.* 2009) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำยีน 18S rDNA ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นในฐานข้อมูล NCBI GenBank พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวได้ (ตารางที่ 4.2) ดังนั้น การศึกษาสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว SR และสาหร่ายสายพันธุ์อื่นๆ โดยการจัดเรียง ปรับแต่งและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bioedit v. 7.0.9 (Hall 1999) เมื่อนำไปสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA 7 และทำการหาค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) 1,000 ครั้ง เพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) พร้อมทั้งคำนวณระยะทางด้วยวิธี Maximum Likelihood method (ML)

จากแผนภูมิ (รูปที่ 4.11) ระยะห่างของสเกล คือ 0.02 และสาหร่ายทั้งหมดถูกแบ่งออกเป็นด้วยข้อมูลตามลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA พบว่าสาหร่ายสีเขียว SR ถูกจัดอยู่ใน *Chlorella* clade ซึ่งมีความใกล้ชิดกันสูงที่สุด และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็น outgroup โดยตัวเลขด้านหน้าของการแตกกิ่ง คือ ค่าความถี่หรือค่าความเชื่อมั่นในแต่ละรอบของการสร้างแผนภูมิต้นไม้ เมื่อมีค่าความถี่ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงการสร้างแผนภูมิต้นไม้แต่ละรอบมีความแม่นยำในการสร้างเหมือนเดิมทั้ง 1,000 รอบ

ดังนั้นสาหร่ายสีเขียว SR มีความเชื่อมั่นเท่ากับ 99% กับสาหร่ายสกุล *Chlorella* ผลที่ได้ดังกล่าวมีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามข้อที่ 4.3.1) จึงจัดสาหร่ายสีเขียว SR อยู่ในจีนัสของ *Chlorella* และทำการตั้งชื่อใหม่ เรียกว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ดังนั้นในการทดลองลำดับถัดไปผู้วิจัยจะใช้ชื่อสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 แทนการเรียกสาหร่ายสีเขียว SR

เมื่อจำแนกสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ตามหลักอนุกรมวิธานพบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 จัดอยู่ในไฟลัมคลอโรไฟตา (Chlorophyta) โดยสามารถแสดงอนุกรมวิธานของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ได้ดังนี้

Domain: Eukaryota

Kingdom: Plantae

Division: Chlorophyta

Class: Trebouxiophyceae

Order: Chlorellales

Family: *Chlorellaceae*

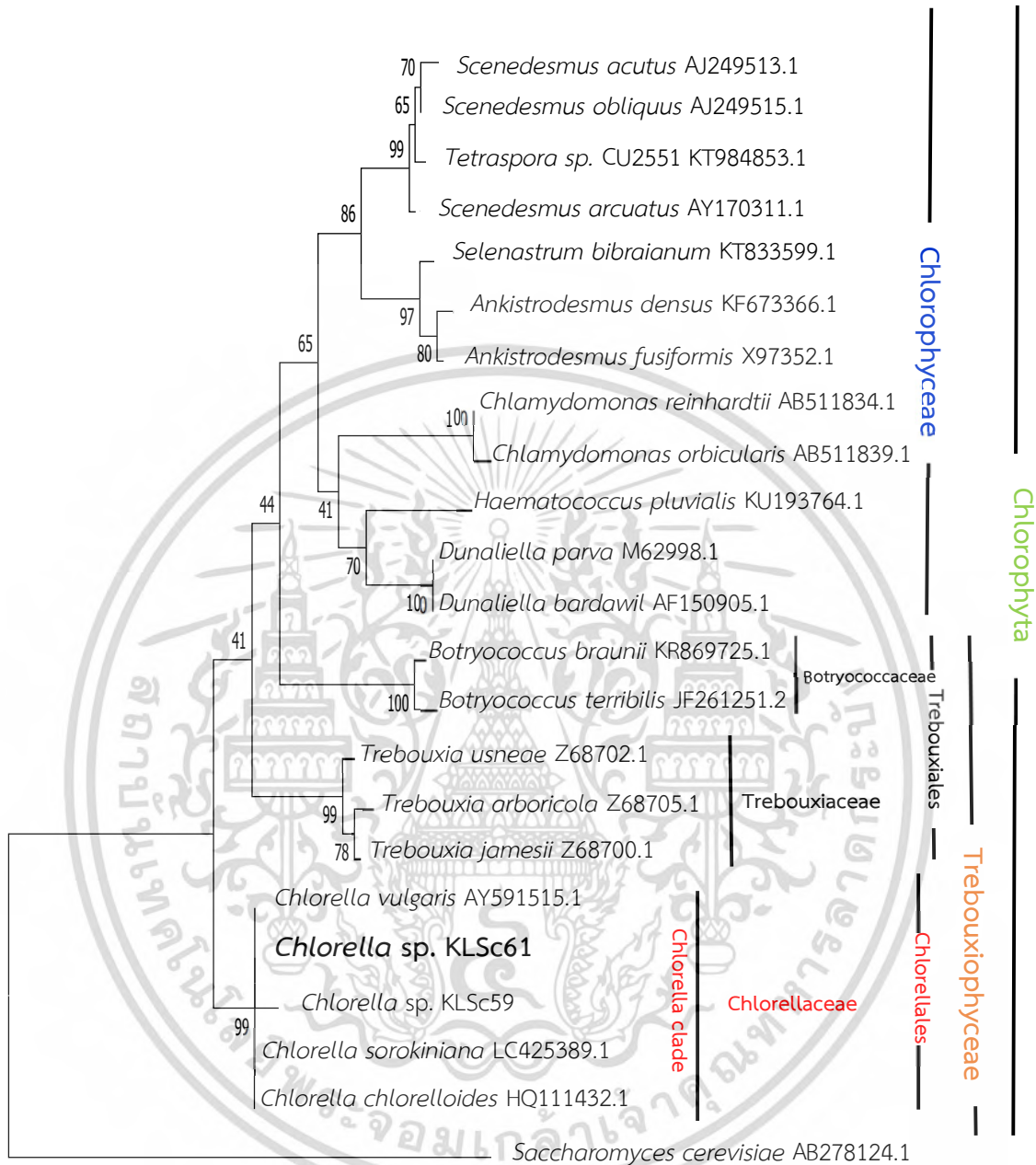
Genus: *Chlorella*



ตารางที่ 4.2 รายชื่อสาหร่ายสีเขียวและสิ่งมีชีวิตชนิดๆ อื่นที่ใช้ในการเปรียบเทียบ 18S rDNA กับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61

ลำดับ	สายพันธุ์	accession number
1	<i>Chlorella</i> sp. KLSc59	-
2	<i>Chlorella vulgaris</i>	AY591515.1
3	<i>Chlorella sorokiniana</i>	LC425389.1
4	<i>Chlorella chlorelloides</i>	HQ111432.1
5	<i>Trebouxia arboricola</i>	Z68705.1
6	<i>Trebouxia usneae</i>	Z68702.1
7	<i>Trebouxia jamesii</i>	Z68700.1
8	<i>Botryococcus braunii</i>	KR869725.1
9	<i>Botryococcus terribilis</i>	JF261251.2
10	<i>Scenedesmus arcuatus</i>	AY170311.1
11	<i>Scenedesmus acutus</i>	AJ249513.1
12	<i>Scenedesmus obliquus</i>	AJ249515.1
13	<i>Selenastrum bibraianum</i>	KT833599.1
14	<i>Ankistrodesmus densus</i>	KF673366.1
15	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	X97352.1
16	<i>Dunaliella parva</i>	M62998.1
17	<i>Dunaliella bardawil</i>	AF150905.1
18	<i>Haematococcus pluvialis</i>	KU193764.1
19	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AB511834.1
20	<i>Chlamydomonas orbicularis</i>	AB511839.1
21	<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	KT984853.1
22	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AB278124.1

หมายเหตุ *Saccharomyces cerevisiae* ทำหน้าที่เป็น out group



รูปที่ 4.11 แผนภูมิทางวิวัฒนาการของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp. KLSc61* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ด้วยวิธี Maximum Likelihood method (ML)

4.4 การติดตามหายีนไฮโดรจีเนส

4.4.1 ค้นหายีนไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยการเติมองค์ประกอบต่างๆ เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังแสดงในตารางที่ 3.8 และมีไพรเมอร์ทั้งหมด 6 เส้น โดยเป็น Forward primer 3 เส้น และ Reverse primer 3 เส้น ไพรเมอร์ทั้ง 6 เส้นสามารถจับคู่ไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 9 รูปแบบที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3.7) โดยสามารถยืนยันว่าตำแหน่งไพรเมอร์ทั้ง 6 เส้น อยู่บริเวณยีนไฮโดรจีเนส (Fe-hydrogenase : *hydA* gene) ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella fusca* AJ298228.1 ทั้งหมด (รูปที่ 4.12)

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล จากผลการทดลองพบว่า การจับคู่ไพรเมอร์ทั้ง 9 รูปแบบ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 โดยหลุมแรก คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder) หมายเลข 1 ถึง 9 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ 9 รูปแบบ (ตารางที่ 4.3) และหมายเลข 11 คือ ไพรเมอร์ 18S rDNA (รูปที่ 4.13) การที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ คาดว่ามีความเป็นไปได้ที่ยีนไฮโดรจีเนสอาจจะมีอินตรอนที่เป็นอุปสรรคต่อการติดตามหายีนดังกล่าว ดังนั้นจะติดตามหายีนไฮโดรจีเนสในระดับอาร์เอ็นเอแทน

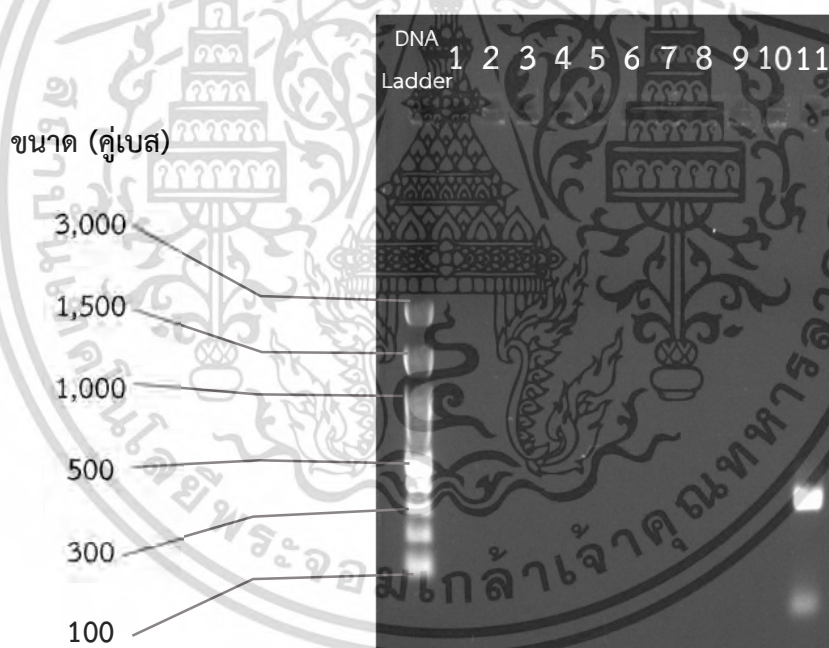
1 GCGGAATTAC TAGTGATAAG CAGTGGTAAC AACGCAGAGT CGCGGGCAGG GACTCGATCA
 61 GTTGTATATGT GTTGCCCCGT GGTGCAAGT AGGCACGCAG GCGGTGCAAG GCATGTTGCT
 121 GTCCGTGCAG CAGGGCCAAC ATCTGAGTGT GATTGTCCCT CAACACCTCA GGCCAAGCTG
 181 CCTCACTGGC AGCAGGCTCT GGATGAGCTC GCCAAGCCCA AGGAGAGCAG GAGGTTGATG
 241 ATCGCGCAAA TCGCCTCCGC TGTTCGTGTC GCTATTGCTG AGACCATTGG CTTGGCCCCA
 301 GGAGATGTCA CCATTGGGCA GCTCGTACT GGGCTGCGTA TGCTTGCTT TGATTATGTC
 361 TTTGACACCC TGTTTGGTGC TGACCTGACC ATTATGGAGG AGGGAACGGA GCTGCTGCAT
 421 CGCCTGCAGG ACCATCTGGA GCAGCACCCC AACAAGGAGG AGCCACTGCC CATGTTCCACC
 481 AGTTGCTGCC CAGGCTGGGT TGCCATGGTT GAAAAGAGCA ATCCTGAGCT CATCCCCTAC
 541 CTGTCACTCT GCAAGTCGCC TCAGATGATG CTTGGGGCCG TTATCAAGAA CTACTATGCA
 601 CAGCAGGTTG GAGTGCAGCC CAGTGACATC TGCAACGTGT CAGTCATGCC ATGCGTACGC
 661 AAGCAGGGAG AGGCTGACCG GGAGTGGTTC AACACCACAG GTGCAGGCCT TGCCCGTGAT
 721 GTTGATCATG TGGTACTAC TGCTGAGGTT GGTAAGATAT TCCTGGAGCG TGGCATCAAG
 781 CTGAATGAGC TGCCAGAGAG CAACTTTGAC AACCCCATTTG GCGAGGGCAC AGGTGGTGTCT
 841 CTGCTGTTTG GCACCACTGG AGGTGTCATG GAGGCAGCAC TTCGCACAGT CTATGAAGTG
 901 GTGACCCAGA AGCCCATGGG TCGTGTGATG TTTGAGGAGG TGCGAGAGCT TGAAGGAATC
 961 AAGGAGGCAG AGATCACACT CAAGCCAGGA GACGACAGCC CATTCAAGC CTTCCGAGGA
 1021 GCTGATGGGC AGGGCATCAC GCTCAAGATT GCAGTAGCCA ATGGGCTTGG CAATGCCAAG
 1081 AAGCTCATCA AGAGCCTGTC AGAGGGCAAG GCCAAGTATG ATTTCAATGA GGTCAATGCA
 1141 TGCCCTGGTG GCTGCATTGG CGGAGGCGGT CAGCCCCGCA GTACTGACAA GCAGATCCTG
 1201 CAGAAGCGCC/AGCA/GCTAT GTACAACCTG GATGAGCGCA GTACCATCCG CCGCAGCCAT
 1261 GATAACCCAT TCATCCAGGC GCTGTATGAC AAGTTCCTAG GCGCACCCAA CAGCCACAAG
 1321 GCACATGATC TGCTGCACAC/ACACTATGTC GCAGGTGGAA TTCCAGAGGA GAAGTGAGGG
 1381 ACCGAGGCCG GAGTGGTGT ATTAGTGTAG AGCTAGGCAG CAGGGATCTG GCCGCATTTG
 1441 GGTGCTGTTG TTTGGTTTGG CATCAAAGAT ATGATGAATG TACAATCTAT TGGGTTCTTT
 1501 GTATCTCATT CATGACTGCT GCTTGGTGAG GTATGGGCCA GGAAGAAGCC CGCATCAATG
 1561 CATGTGAACT AGGTGGCTCC ACATATGAAC CCTATCTGGA TGTTTAAAGT ACCTGAAACA
 1621 ATAGTGCATC GGCTCTGCAT GGCTCAACAA CCTGTCTTCA GAGCAGGTGT ATTCCACACC
 1681 ATCTTGATTT ACCTACCACT CTGTAGTTCA AGTGGTCAA TTGAATGCT ATGGCAGCTA
 1741 CGCCTGCAGT TCATAGTCTA TGAAGTPTTC ACCAGAGTCC ATGTCCCTCA TATTTTTTGT
 1801 TTTATATGCC TTGATTATGC CCCTTGAACC ATGCTCAATG CACACAAGTT GGTGCGAGGA
 1861 CAGGCGGCAT CGTACATCTC AATTTTCAGA ACTTGTGAGT GCGGCATTGC CTTATTTGTA
 1921 CTCTTGCAAT CCTGTTTAC CCTTGTACT GCCTTGCAATG CATCTTGT TTGCAAGCAA
 1981 CAGCTCATGC ATTGCAATCG ATCATCACGT ACATCCGTGC CATATTCACA TGTTTGTGAC
 2041 TTGCAATCA ACCACCAGGC AGTGGGTAAA TTGCCAGGCT GGGTGCCTN TGGGCCATTT
 2101 GGGCAGCCCT CTTGTGGCGA GCTNIGCTGC AGGGCCAAGC TGAGTGCATC AGACTCAGCA
 2161 GGCTGCTGCT GGCACCTGAG AATGCTGAAA AGGGCATTCA ACTACATGTC ATTATTAGGT
 2221 TGACCTGAGA CAGCCGTAAG AATATCATTTG TGTGCTGAAC TTAGTGTGCA ATGTCATGCC
 2281 ATGATGTGTG TTTGAGGAT GGATAAGGA GGTCTTCTCT CAATTACATG CCTTTCAAGA
 2341 GACTTCAATA TCTGTTGTCA GTGACTTGT TGTGTTTGT TAATCCAGG NTNCCAAAAA
 2401 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

HydAF (5'-CRCTGCCCATGTTCCACCAG-3') HydAR (5'-GCCACRTAGTGBGTGTGCAG-3')
 Hvf1 (5'-CTVACCATYATGGAGGAR-3') Hvr1 (5'-CKSCTGSCGCTTCTG-3')
 Hvf2 (5'-TGCCCATGTTCCACCA-3') Hvr2 (5'-ACRTAGTGDGTGTGCAG-3')

รูปที่ 4.12 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์บน cDNA ของยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella fusca*

ตารางที่ 4.3 หมายเลขหลุมบนเจลอะกาโรสของชนิดไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน

หมายเลข	forward primer	reverse primer
1	HydAF	HydAR
2		HVR1
3		HVR2
4	HVF1	HydAR
5		HVR1
6		HVR2
7	HVF2	HydAR
8		HVR1
9		HVR2



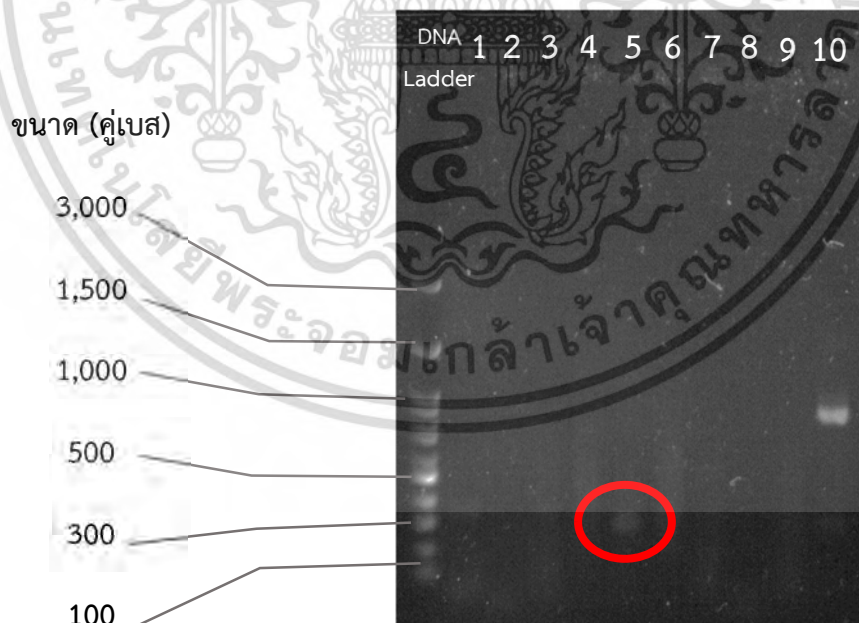
รูปที่ 4.13 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิค PCR ด้วยเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder
หมายเลข 1 ถึง 9 : ผลิตภัณฑ์ PCR จากยีนไฮโดรจีเนสทั้ง 9 คู่ไพรเมอร์
หมายเลข 11 : ผลิตภัณฑ์ PCR จากยีน 18S rDNA

เมื่อนำ cDNA มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจินเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 9 รูปแบบ (ตารางที่ 3.7) และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR จากการ ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิมมูโนโบลอตติ้งด้วยแอนติบอดีที่ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องถ่ายภาพ จากเจล จากผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์คู่ที่ 5 สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอเป้าหมายของ cDNA ได้ โดยหลุมแรก คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder) หมายเลข 1 ถึง 9 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR จาก ไพรเมอร์ 9 รูปแบบ (ตารางที่ 4.3) และหมายเลข 10 คือ ไพรเมอร์ 18S rDNA (รูปที่ 4.14) ซึ่ง ชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 350 คู่เบส และไพรเมอร์คู่ที่ 5 ไพรเมอร์ที่ใช้ คือ

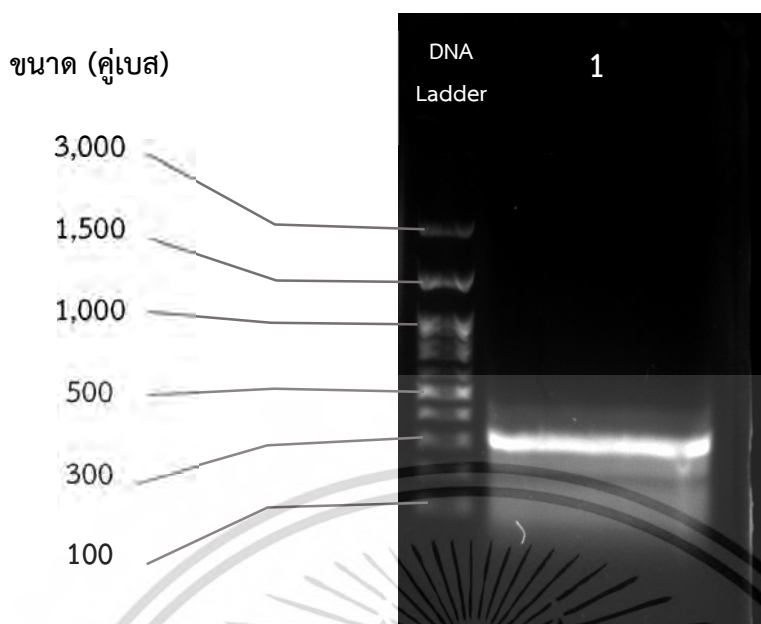
1) Forward primer: HvF1 (5'-CTVACCATYATGGAGGAR-3')

2) Reverse primer: HvR1 (5'-CKSCTGSCGCTTCTG-3')

ดังนั้น คู่ไพรเมอร์ HvF1/HvR1 ถูกนำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปริมาณที่สูงขึ้น (รูปที่ 4.15) และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิมมูโนโบลอตติ้งเพื่อดูขนาดและปริมาณ ของชิ้นยีน เมื่อทราบขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนเป้าหมาย จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำบริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำบริสุทธิ์ชิ้น PCR ดังที่กล่าวในหัวข้อที่ 3.10.3) จะได้สารละลายดีเอ็นเอ ที่บริสุทธิ์ และทำการตรวจสอบสารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์



รูปที่ 4.14 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนไฮโดรจินเนสด้วยเทคนิค PCR ด้วย cDNA และตรวจสอบ ผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder หมายเลข 1 ถึง 9 : ผลิตภัณฑ์ PCR จากยีนไฮโดรจินเนสทั้ง 9 คู่ไพรเมอร์ หมายเลข 10 : ผลิตภัณฑ์ PCR จากยีน 18S rDNA



รูปที่ 4.15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนไฮโดรจีเนสของไพรเมอร์คู่ที่ 5 (HvF1/HvR1) ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder และ หมายเลข 1 คือ ยีนเป้าหมายที่ผ่านการเพิ่มปริมาณ

4.4.2) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนส

สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ที่ได้จะถูกนำมาเชื่อมต่อในพลาสมิดพาหะ (pGEM®- T Easy Vector) (Promega) โดยใช้องค์ประกอบของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.10 เมื่อผสมแล้วจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย *Esherichia coli* DH5 α และตรวจสอบผลด้วยวิธี Blue- white colony screening โดยนำมาเลี้ยงให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของ แอมพิซิลิน 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร IPTG 0.1 มิลลิโมลาร์ และ x-gal 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นกลุ่มของแบคทีเรียที่เจริญขึ้นมา จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวไปเพิ่มจำนวน เพื่อนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และคัดเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอที่คาดว่าจะมีดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์นาน 50 นาที จากนั้นนำสารละลายพลาสมิดส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งหมด 20 ตัวอย่าง

หลังจากทำการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ทำให้ทราบลำดับและขนาดคู่เบสของยีน (รูปที่ 4.16) จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 20 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆ ที่มีการรายงานไว้ในธนาคารยีน โดยวิเคราะห์ 3 รูปแบบ คือ blastn, blastp และ tblastx (ตารางที่ 4.4)

```
CGGCTGCCGCTTCTGGCGAGACCCGTTGAGCAAGGAGAGGGG
AGCAACAGAGGTAGCGCGAGGTGAGGAGAAGAGAAACAGCAG
CCTGGGTCCAACACTTGGGCCGTCCTGCCCCCATGCCTGCGG
CCTGGCTGGGCGGAAAGCAGCGTGCCAGCCAGTACGTCGCG
GCCGTCCATCCATCCGGCCGGGTGGCCACCCGACTTGCGCCA
ACCAGCCGTCGCTGCTGCCGCTTCTGACCATTATGGAGGAGG
GAGGCAGAGCCC GCCGCGCTGCGGCTCAGCTTGGCCGTGGCG
GCAAGGTAAGCGCCCAGGCGGCTTGTGTGCCGGCATCGATGT
CAGATCGCTTGTAGCAGCCTTGCAAGCGGCCCAACCGATGCC
CCGCTTGCAGAAAGTCAAGTCCGCCCTTGAGGAACTGGCGGA
GCTTCGCAAGAGCGGTGCCAAGCGGGTCGACCGATTTGAGCT
AAAGGAGGAGGATGCCGTTTACGACGTCGTGGACGAGACCGA
GTATGTCAAGCTTGTGCAGAAGCGCCAGCAGA
```

HvF1 (5'-CTVACCATYATGGAGGAR-3') HvR1 (5'-CKSCTGSCGCTTCTG-3')

รูปที่ 4.16 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGHy5 ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนไฮโดรจีเนสของไพรเมอร์คู่ที่ 5 (HvF1/HvR1) โดยใช้ cDNA เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

ผลการวิเคราะห์ blastn เป็นการเปรียบเทียบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆ พบว่าไม่พบยีนที่มีความคล้ายคลึงกัน เมื่อวิเคราะห์ blastp ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบข้อมูลของโปรตีนจากฐานข้อมูลโดยใช้ข้อมูลของโปรตีนอื่นๆ ที่ต้องการเปรียบเทียบ พบว่าโปรตีนที่ได้เป็นกลุ่มของโปรตีน DNA polymerase alpha catalytic subunit ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sorokiniana* (Sequence ID : PRW60975.1) (รูปที่ 4.17)

[Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#)

DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]
 Sequence ID: [PRW60975.1](#) Length: 1576 Number of Matches: 1

Range 1: 22 to 68 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
79.7 bits(195)	7e-15	Compositional matrix adjust.	39/47(83%)	44/47(93%)	0/47(0%)	+2

Query 143 KSALEELAEELRKSAGKRVDRFELKEEDAVYDVVDETEYVKLVQKRQQ 283
 KSAL+ELAELRKSAG KRVDRFELKEE+AVYDVVD+ EY KLVQKR++
 Sbjct 22 KSALQELAELRKSAGKRVDRFELKEEAVYDVVDDAEYAKLVQKRRE 68

รูปที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์ blastp ของสายรหัสยีน *Chlorella* sp. KLSc61

การวิเคราะห์ tblastx เปรียบเทียบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์กับโปรตีนเพื่อเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนพบว่าโปรตีนที่ได้เป็นกลุ่มของโปรตีน hypothetical protein ของสายรหัสยีน *Chlorella variabilis* (Sequence ID :XM_005844322.1) (รูปที่ 4.18) ซึ่งถูกระบุว่าเป็นกลุ่มของโปรตีน DNA polymerase alpha catalytic subunit เช่นเดียวกัน

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Chlorella variabilis hypothetical protein (CHLNCDRAFT_139024) mRNA, complete cds
 Sequence ID: [XM_005844322.1](#) Length: 4029 Number of Matches: 1

Range 1: 49 to 195 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps	Frame
76.3 bits(161)	8e-11	31/49(63%)	41/49(83%)	0/49(0%)	+2/+1

Query 137 RVSALAEELAEELRKSAGKRVDRFELKEEDAVYDVVDETEYVKLVQKRQQ 283
 K KSAL+L EL+KSGAR+VD FEL+EE+A+VD +D Y KLVQKR++
 Sbjct 49 KFKSALDKIKELKKSAGKQVDSFELREEEAVYDELDAAGYARLVQKRRE 195

รูปที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์ tblastx ของสายรหัสยีน *Chlorella* sp. KLSc61

จากการติดตามยีนจากไพรเมอร์คู่ที่ 5 (HvF1/HvR1) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่ใช่ของยีนของไฮโดรจีเนสตามที่คาดไว้ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการค้นหาเป็นชนิด Degenerate primer ซึ่งมีความจำเพาะน้อยลงต่อดีเอ็นเอแม่แบบ (Najafabadi *et al.* 2008) ทำให้ยีนที่สามารถเพิ่มจำนวนอาจไม่ใช่ยีนที่ทำการค้นหาดังนั้นสามารถสรุปว่าไม่สามารถติดตามยีนไฮโดรจีเนสของสายรหัสยีน *Chlorella* sp. KLSc61 ได้ในระดับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ดังนั้นหากมีการทดลองระดับต่อไปในการศึกษาไฮโดรจีเนสของสายรหัสยีนชนิดนี้ อาจต้องทำการศึกษาในระดับโปรตีน หรือทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคอื่น

ตารางที่ 4.4 แสดงการวิเคราะห์ที่เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจากไฟรเมอร์คูที่ 5 (HVFL/HVR1)

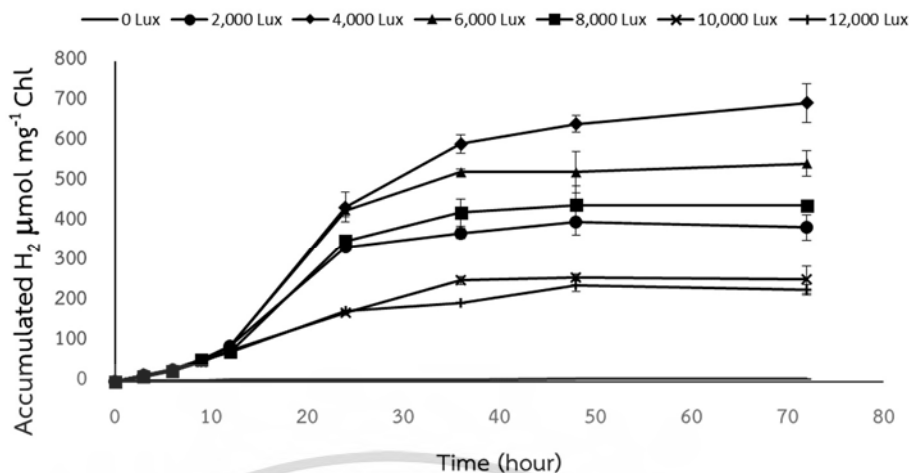
Plasmid	length (bp)	blastN	tblastx		
			Target	E-value	Per. Ident
pGHY1	283	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	7x10 ⁻¹⁵	82.98
pGHY2	303	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	7x10 ⁻¹⁵	85.11
pGHY3	266	Unknown	Unknown		
pGHY4	614	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	2x10 ⁻¹⁴	81.63
pGHY5	536	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	6x10 ⁻¹⁴	82.98
pGHY6	303	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	1x10 ⁻¹⁴	84.78
pGHY7	303	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	4x10 ⁻¹⁵	85.11
pGHY8	303	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	2x10 ⁻¹⁴	82.98
pGHY9	303	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	2x10 ⁻¹⁴	84.78
pGHY10	303	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	4x10 ⁻¹⁵	85.11
pGHY11	303	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	1x10 ⁻¹⁴	84.78
pGHY12	303	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	1x10 ⁻¹⁴	82.98
pGHY13	303	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	3x10 ⁻¹⁵	85.11
pGHY14	303	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	4x10 ⁻¹⁵	85.11
pGHY15	303	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	1x10 ⁻¹⁴	84.78
pGHY16	303	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	1x10 ⁻¹⁴	84.78
pGHY17	303	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	4x10 ⁻¹⁵	85.11
pGHY18	295	Unknown	DNA polymerase alpha catalytic subunit [Chlorella sorokiniana]	1x10 ⁻¹⁴	84.78
pGHY19	267	Unknown	Unknown		
pGHY20	303	Unknown	Unknown		

4.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

การเพาะเลี้ยงเพื่อค้นหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตของก๊าซไฮโดรเจนอย่างมีประสิทธิภาพ เป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งมีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวและการผลิตของก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ความเข้มข้นของแสง อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเบส การจำกัดธาตุอาหาร และการเพิ่มตัวให้อิเล็กตรอน โดยสภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว จึงทำการศึกษาสภาวะดังกล่าวให้เหมาะสมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุด

4.5.1) การศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

การศึกษาอิทธิพลแสงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไล่อากาศ โดยบ่มเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และทำการแปรผันความเข้มแสง ดังนี้ 0, 2,000, 4,000, 6,000, 8,000, 10,000 และ 12,000 ลักซ์ พบว่าที่สภาวะความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 มีความสามารถในการสะสมก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุดคิดเป็น 696.7 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ รองลงมาเป็น 6,000 และ 8,000 ลักซ์ สามารถสะสมก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 545.3 และ 440.9 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.19) เนื่องจากความเข้มแสงมีอิทธิพลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง เมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้น อัตราการสังเคราะห์แสงของเซลล์จะมากขึ้น ดังนั้นจะมีอิเล็กตรอนและโปรตอนที่เป็นขั้วสเตรทมากขึ้น (Meseck *et al.* 2005) โดยอิเล็กตรอนที่เพิ่มมากขึ้นจากกระบวนการออกซิเดชันของน้ำในระบบการสังเคราะห์แสง 2 (PS II) จะถูกขนส่งผ่านกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (photosynthetic electron transport chain) จนถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือ เฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) ก่อนจะส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงขึ้น (Chia *et al.* 2018) อย่างไรก็ตาม การให้แสงมากเกินไปจะเกิดการ photoinhibition และเกิดการขัดขวางกลไกการสังเคราะห์แสง (Aro *et al.* 1993) ความเข้มแสงที่สูงมากเกินไปก่อให้เกิดการจำกัดของแสง (light limitation) การอิ่มตัวของแสง (light saturation) หรือการยับยั้งของแสง (light inhibition) เนื่องจากที่บริเวณศูนย์กลางของระบบสังเคราะห์แสงสองถูกทำลาย (Keren and Krieger-Liszkay 2011) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่สภาวะความเข้มแสง 10,000 และ 12,000 ลักซ์ พบอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลง มีความสามารถในการสะสมก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุดคิดเป็น 254.3 และ 229.6 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ



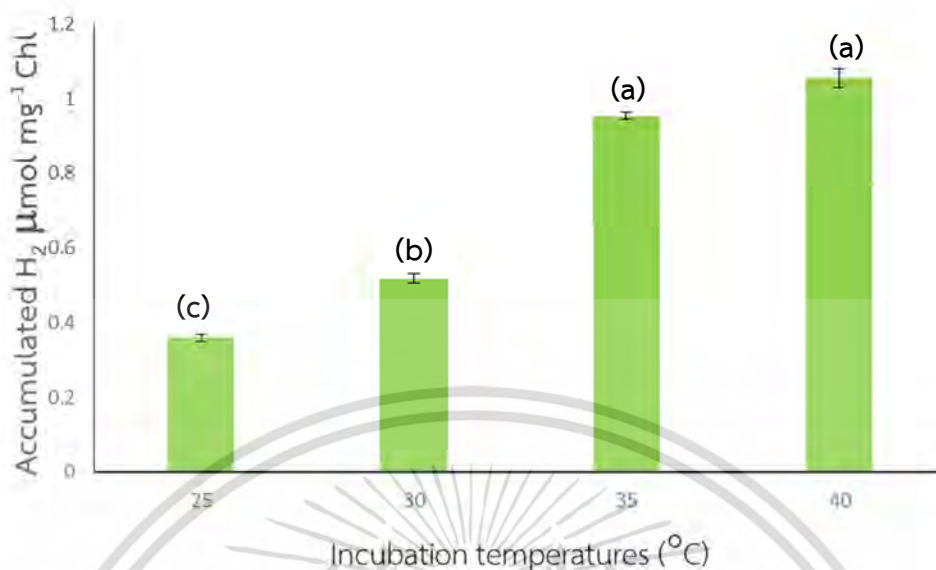
รูปที่ 4.19 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติ ในสถานะที่ไม่มีอากาศ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสงแตกต่างกัน

นอกจากนี้ที่สภาวะ 0 ลักซ์ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่ำ พบอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลง มีความสามารถในการสะสมก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุดคิดเป็น 6.6 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ที่สภาวะความเข้มแสงต่ำ เกินจุดไลท์คอมเพนเซชันพอยท์ (light compensation point) (Lazar 2003) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการสังเคราะห์แสงจะหยุดเมื่ออยู่ในสภาวะความมืด (Uyar *et al.* 2007) เนื่องจากความเข้มของแสงน้อยมาก จนทำให้การสังเคราะห์ด้วยแสงนั้นเกิดขึ้นน้อยกว่ากระบวนการหายใจ น้ำตาลที่สะสมภายในเซลล์ถูกใช้หมดไปจากนั้นสาหร่ายขนาดเล็กจะไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ (Burris 1977) สอดคล้องงานวิจัยของ Melis (2007) รายงานว่าการดูดซับแสงในกระบวนการสังเคราะห์แสงเป็นสิ่งจำเป็นในการสร้างก๊าซไฮโดรเจน เนื่องจากแสงเป็นตัวช่วยในการออกซิเดชันของน้ำพร้อมปล่อยอิเล็กตรอนและโปรตอน พลังงานแสงยังจำเป็นสำหรับการขนส่งภายใน (endergonic transport) ของอิเล็กตรอนไปยัง chloroplast ferredoxin ซึ่งเป็นทางสรีรวิทยาของการให้อิเล็กตรอนให้กับ [Fe]-hydrogenase จึงสามารถกล่าวได้ว่า [Fe]-hydrogenase เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียว (Melis 2007) ซึ่งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Sun *et al.* 2010)

4.5.2) การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์และทำการแปรผันอุณหภูมิ ดังนี้ 25, 30, 35 และ 45 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส สามารถสะสมก๊าซไฮโดรเจนได้มากที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาเป็นอุณหภูมิ 30 และ 25 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.20) เหตุผลที่สามารถเพิ่มการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็นเพราะ *Chlorella* sp. KLSc61 แยกจากแหล่งน้ำจืดบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเทศไทย ซึ่งอยู่ในเขตร้อนบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (South East Asia : SEA) สภาพอากาศร้อนชื้นเกือบตลอดทั้งปี ทั่วประเทศมีอุณหภูมิเฉลี่ยระหว่าง 19-38 องศาเซลเซียส (Phanprasit *et al.* 2021) จึงคาดว่าอุณหภูมิสูงเหมาะสมกับกิจกรรมของเอนไซม์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ซึ่งสอดคล้องกับ Saad และคณะ (2019) รายงานว่าในสภาวะการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* ที่อุณหภูมิ 20, 27 และ 37 องศาเซลเซียส (Saad *et al.* 2019) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ Rubisco และวัฏจักรคัลวิน (Morris and Farrell 2006) เพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ Rubisco ภายใน *C. vulgaris* ส่งผลให้เพิ่มการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์สูง ที่อุณหภูมิ 20–38 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น สสารจะมีพลังงานภายในเพิ่มขึ้นพร้อมอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้น (Falkowski and Raven 2007) นอกจากนี้ อุณหภูมิที่เจริญเติบโตเป็นลักษณะจำเพาะของสายพันธุ์ (Sorokin and Myers 1953) สายพันธุ์คลอเรลล่าบางสายพันธุ์ได้จัดกลุ่มว่าเป็นที่สาหร่ายที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic) โดยสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิ 38–42 องศาเซลเซียส (Khetkorn *et al.* 2017) Kessler และคณะ (1985) รายงานว่าอุณหภูมิที่สูงที่สุดของการเจริญเติบโตจำเพาะลักษณะสายพันธุ์ของจิ้นัส *Chlorella* โดย *Chlorella* 14 สายพันธุ์อยู่ในช่วง 26–30 องศาเซลเซียส *Chlorella saccharophila* อยู่ในช่วง 38–42 องศาเซลเซียส *Chlorella sorokiniana* อยู่ในช่วง 34 องศาเซลเซียส และ *Chlorella fusca* var. *vacuolata* และ *Chlorella kessleri* อยู่ในช่วง 34–36 องศาเซลเซียส (Kessler 1985)

ดังนั้นสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดีอุณหภูมิในช่วง 35 และ 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้แยกจากธรรมชาติในเขตร้อน (Tropical zone) จึงมีวิวัฒนาการของเอนไซม์ให้เหมาะสมกับสภาพอากาศบริเวณแหล่งที่อยู่อาศัย



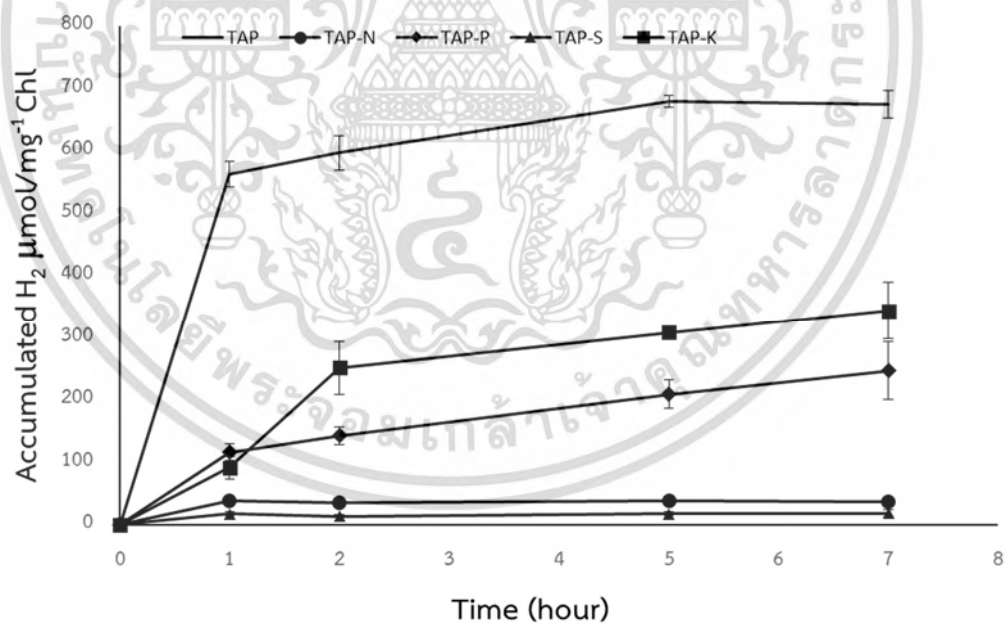
รูปที่ 4.20 การสะสมก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS61 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติ ในสภาวะที่ไม่มีอากาศเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน (อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตไฮโดรเจนจากการวิเคราะห์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$))

4.5.3) การศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของเซลล์

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS61 ในอาหารสูตร TAP (เป็นตัวเปรียบเทียบ) และอาหารสูตร TAP ที่แปรผันชนิดของอาหารที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ (ภาคผนวก ก) ดังนี้ อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P) อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N) และอาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ (TAP-S) ผลการศึกษาอิทธิพลการขาดธาตุอาหารของเซลล์สาหร่ายสีเขียวต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (รูปที่ 4.21) พบว่าการแปรผันชนิดของอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS61 ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เนื่องจากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS61 ภายใน 24 ชั่วโมงแรกที่เพาะในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมน้อยกว่าอาหารเหลว TAP สูตรปกติ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อาหารเหลว TAP สูตรปกติมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมที่มากที่สุดเท่ากับ 674.1 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ รองลงมา เป็นอาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P) อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N) และอาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ (TAP-S)

S) ให้ปริมาณมากก๊าซไฮโดรเจนสะสมที่มากที่สุดเท่ากับ 343.1, 246.3, 37.0 และ 4.8 ไมโครโมล ไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ

ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sirawattanamongkol และคณะ (2020) รายงานว่าสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ไม่มีการตอบสนองเชิงบวกต่อการขาดธาตุอาหารเหมือนกับการศึกษาอื่นๆก่อนหน้านี้ เช่น Papazi และคณะ (2014) ที่รายงานว่าขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนได้ เนื่องจากการขาดโพแทสเซียมสนับสนุนการสลายแป้งภายในเซลล์ อีกทั้งกลูโคสไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นแป้งได้ ซึ่งการสลายแป้งเป็นการออกซิเดชัน เพื่อเปลี่ยนแป้งไปเป็นกลูโคส เมื่อนำกลูโคสไปสลายต่อในวัฏจักรไกลโคไลซิส เซลล์จะมี NADH สะสมมากขึ้น โดย NADH ช่วยทำให้การไหลของอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้อิเล็กตรอนรวมถูกส่งผ่านไปยังแหล่งรวมของพลาสโตควิโนน (plastoquinone-pool) จึงเกิดการกระตุ้นมากขึ้นในระบบแสงที่ 1 ผลลัพธ์คือ อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น ภายใต้กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้ระบบแสงที่ 2 ยังถูกยับยั้ง ส่งผลให้มีออกซิเจนน้อยลง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงทำงานได้ดีขึ้น (Papazi *et al.* 2014)



รูปที่ 4.21 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติและอาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหาร ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

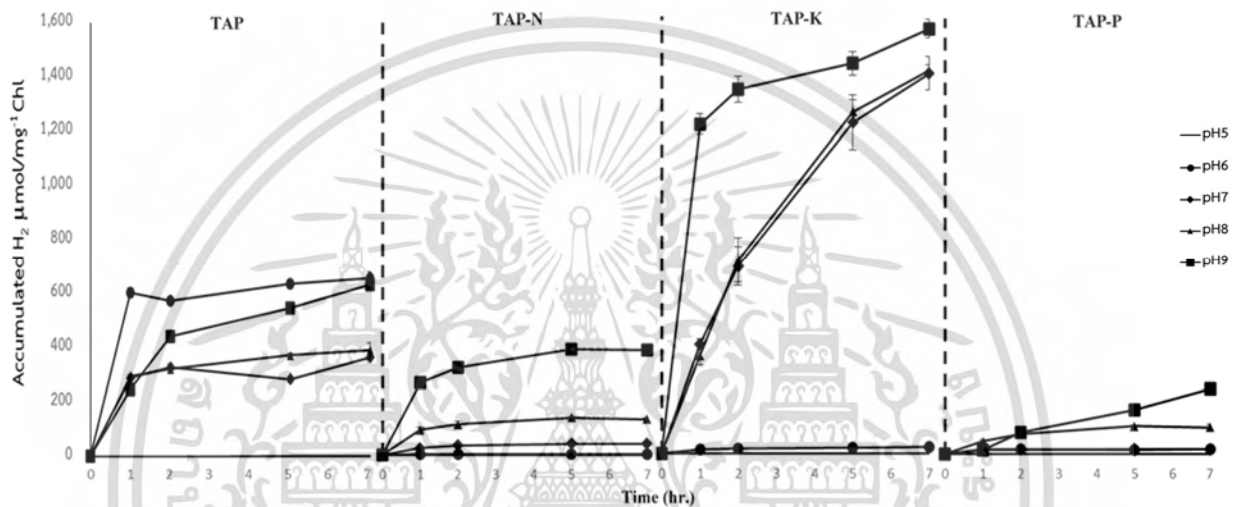
ในการขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Laurinavichene *et al.* 2006; Kosourov *et al.* 2007; Kosourov and Seibert 2009; Tsygankov *et al.* 2006) การรายงานของ Melis (2002) พบว่า โปรตีน D1 เป็นโปรตีนที่อยู่ในระบบแสงที่ 2 (PS II) เป็นศูนย์กลางในการทำงาน (reaction center) หากไม่มีซัลเฟอร์จะส่งผลให้ระบบสังเคราะห์แสงที่ 2 ทำงานได้น้อยลง โดยโปรตีน D1 มีอัตราการสลายและสร้างที่รวดเร็ว (turnover) และไม่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ทัน เนื่องจากซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) และกรดอะมิโนเมไทโอนีน (methionine) โดยกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นองค์ประกอบสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน (Protein biosynthesis) และซ่อมแซมโปรตีน (Protein repair cycle) (Melis 2002) ซึ่งก่อให้เกิดการยับยั้งการเกิดออกซิเจนและอิเล็กตรอนจากการออกซิเดชันของน้ำ เมื่อออกซิเจนถูกผลิตได้น้อยลงส่งผลให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานได้ดีขึ้น จึงผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากขึ้น (Ghirardi *et al.* 2000)

การขาดธาตุอาหารฟอสฟอรัส Batyrova และคณะ (2012) รายงานว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* จะเพิ่มผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนเมื่อป่มเป็นเวลามากกว่า 100 ชั่วโมง หรือประมาณ 4 วัน นอกจากนี้ Batyrova และคณะ (2015) รายงานว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. จะเพิ่มผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนเมื่อป่มเป็นเวลามากกว่า 250 ชั่วโมง หรือประมาณ 10 วัน (Batyrova *et al.* 2012; Batyrova *et al.* 2015) เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดนิวคลีอิก (ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ) และกรดอะมิโนทุกชนิด โดยกรดอะมิโนจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน การแบ่งเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวจะหยุดลง และอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกจำกัด เนื่องจากระดับตัวกลางในวัฏจักรรีดักทีฟเพนโทสฟอสเฟต (reductive pentose phosphate cycle : RPP cycle) มีระดับที่ลดลง ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอิเล็กตรอนที่ได้ในรูป NADPH จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่านำมาใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน จึงนำไปสู่การลดลงของระดับตัวรับพลังงานตัวสุดท้ายส่งผลให้การถ่ายโอนอิเล็กตรอนของระบบการสังเคราะห์แสง (photosynthetic electron-transport activity) เกิดขึ้นได้น้อยลง (Brooks *et al.* 1988) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อวัฏจักรการซ่อมแซมระบบการสังเคราะห์แสง ดังนั้นเมื่อถูกจำกัดจะทำให้ระบบแสงที่ 2 ถูกยับยั้ง และเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีขึ้น (Wykoff *et al.* 1998)

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการขาดธาตุอาหารอาจเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ ทำให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้น้อย เนื่องจากการขาดธาตุอาหารทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์ การสะสมแป้งภายในเซลล์ และการซ่อมแซมเซลล์ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้ระบบต่างๆ ภายในเซลล์ทำงานได้ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ (Ball *et al.* 1989; Kolber *et al.* 1988)

4.5.4) การศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหาร

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 จะเพิ่มการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากขึ้น เมื่อค่าความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้น ส่วนสภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ในสภาวะความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5 จะไม่พบการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งสามารถอธิบายได้ตามการศึกษาก่อนหน้านี้ เมื่อค่าความเป็นกรดเบสลดลงอย่างรวดเร็วอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระบบเมตาบอลิซึมจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ส่งผลให้วิถีการผลิตของตัวกลางเปลี่ยนไปและการผลิตไฮโดรเจนลดลง (Khanal *et al.* 2004)



รูปที่ 4.22 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ที่ป้อนในอาหาร TAP สูตรปกติและอาหารสูตร TAP ขาดธาตุอาหารที่มีการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 โดยปรับพีเอชด้วยกรด-เบส ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เนื่องจากความสามารถการนำสารอาหารเข้าเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปหรือก่อให้เกิดความเป็นพิษของโลหะ (metal toxicity) เนื่องจากในช่วงที่ค่าความเป็นกรดเบสมีความเป็นกรดจะส่งผลให้สารประกอบโลหะบางชนิดเกิดการสลายตัวกลายเป็นไอออนของโลหะและสารละลายซัลเฟต (Sunda 2010) เมื่อสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงมีค่าความเป็นกรดเบสอยู่ในช่วง 6-9 (รูปที่ 4.22)

พบว่าในแต่ละอาหารที่ขาดธาตุอาหารมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงเมื่อมีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 9 ซึ่งไม่เป็นตามที่คาดไว้ว่าค่าความเป็นกรดจะช่วยให้โปรตอนให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะสามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากโปรตอนตามการรายงานของ Antal และคณะ (2016) พบว่า *Chlamydomonas reinhardtii* มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงเมื่อมีค่าความเป็นกรดเบสในช่วง 6.5 ถึง 7.0 เนื่องจากสภาพความเป็นกรดสามารถสร้างสารตั้งต้นโปรตอนให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้มากขึ้น (Antal *et al.* 2016) และความ

เป็นเบสจะลดความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์และวัฏจักรของเซลล์เกิดได้ช้าลงเนื่องจากความเป็นเบสจะเพิ่มความยืดหยุ่นของผนังเซลล์ในเซลล์แม่ (mother cells) ซึ่งไปขัดขวางการแบ่งเซลล์ (Chia *et al.* 2018) ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการทดลองครั้งนี้ที่พบว่าสภาพความเป็นต่างส่งผลให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากขึ้น สำหรับสีเขียว *Chlorella sp. KLS61* ความสามารถในการสะสมก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุดคิดเป็น 1,556.5 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในการเพาะเลี้ยงสภาวะขาดธาตุโพแทสเซียมที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 9 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Maneeruttanarungroj และ Phunpruch (2017) ค้นพบว่าที่สภาวะความเป็นต่างเพียงเล็กน้อยจะสามารถเพิ่มการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากขึ้น (Maneeruttanarungroj and Phunpruch 2017)

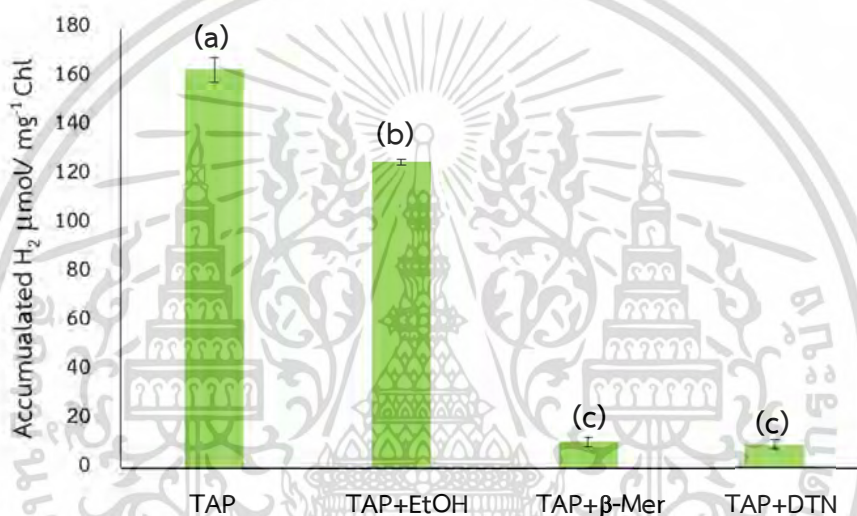
อิทธิพลของค่าความเป็นกรดเบสในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสเพียงเล็กน้อยอาจส่งผลกระทบต่อระบบต่างๆ ภายในเซลล์ของสาหร่าย เช่น เซลล์สาหร่ายอาจถูกจำกัดการเจริญเติบโตเนื่องจากเกิดการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึม (Juneja *et al.* 2013)

4.5.5) การศึกษาอิทธิพลของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

การศึกษาค่าอิทธิพลของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและอาหารเหลวสูตร TAP ที่มีการเติมสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ คือ เอทานอล (ethanol) โซเดียมไดไทโอไนต์ (sodium dithionite) เบต้า-เมอแคปโทเอทานอล (β -mercaptoethanol) โดยความเข้มข้นสุดท้ายของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแต่ละชนิดเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp. KLS61* มีการตอบสนองต่อสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp. KLS61* มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.23) โดยการสะสมก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุดเป็นของอาหารสูตร TAP ปกติ เท่ากับ 163.2 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่ตอบสนองต่อการสะสมก๊าซไฮโดรเจนมากที่สุด คือ เอทานอลที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมที่มากที่สุดเท่ากับ 125.2 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ รองลงมาเป็นเบต้า-เมอแคปโทเอทานอล และ โซเดียมไดไทโอไนต์ มีปริมาณรวมก๊าซไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 24.8 และ 7.6 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ ไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก จ)

เนื่องจากความสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox balancing) กระบวนการทางชีวเคมีที่ช่วยให้สิ่งมีชีวิตรับมือกับโมเลกุลที่โดนทำลายโดยแสง (Photoprotection) และกระบวนการหมักทางเมแทบอลิซึม (Fermentative metabolism) ภายในสิ่งมีชีวิตนั้นเกี่ยวข้องกับการทำงานของ

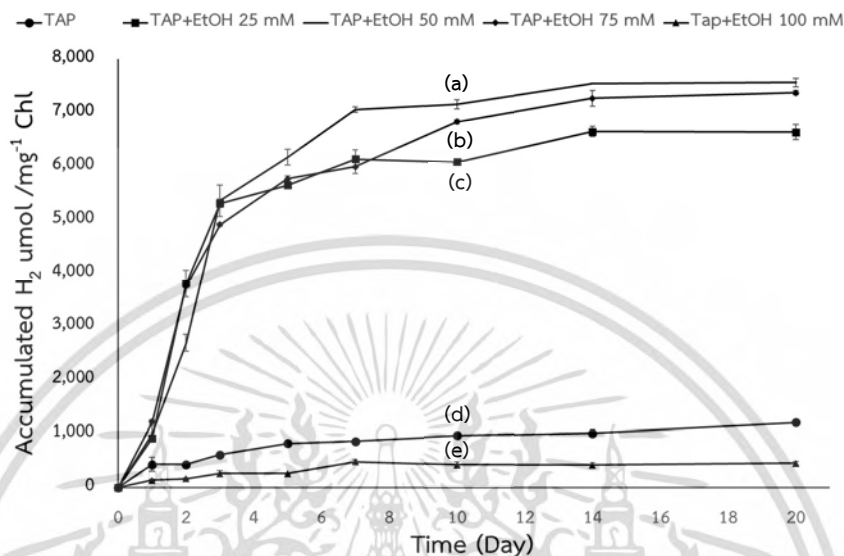
เอนไซม์ไฮโดรจีเนสและการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ทำหน้าที่เป็นแอ่งอิเล็กตรอน (electrom sink) ของปฏิกิริยารีดอกซ์ต่างๆ ในเซลล์ (Khetkorn *et al.* 2017) ดังนั้นสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนถือว่าเป็นแหล่งอิเล็กตรอนที่เหมาะสมต่อตัวรับอิเล็กตรอนใดๆ (Maneeruttanarungroj *et al.* 2010) การเติมเอทานอลในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS61 ส่งผลให้เซลล์สาหร่ายมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมที่สูงขึ้น เมื่อเติมสารที่ให้อิเล็กตรอน โซเดียมไดไทโอไนท์และเบต้าเมอแคปโตเอทานอล ไม่ส่งผลให้มีการสะสมก๊าซไฮโดรเจน อาจเป็นเพราะสารเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวหรือเซลล์ไม่สามารถรับอิเล็กตรอนนั้นได้ เนื่องจากศักย์ไฟฟ้าของตัวให้หรือรับอิเล็กตรอนไม่เหมาะสมกับการทำงานของเซลล์



รูปที่ 4.23 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS61 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติเติมสารตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ ในสถานะที่ไม่มีอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการวิเคราะห์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$))

เมื่อเห็นว่าเอทานอลเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่ดีที่สุด จึงทำการแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลดังนี้ 0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ ผสมกับอาหารเหลว TAP สูตรปกติ ผลการทดลองพบว่าปริมาณสะสมของก๊าซไฮโดรเจนในอาหาร TAP ที่มีเอทานอล 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ อย่างต่อเนื่อง และสูงที่สุดในวันที่ 10 (รูปที่ 4.24) โดยปริมาณสะสมก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุดเป็นของอาหารเหลว TAP สูตรปกติที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอล 50 มิลลิโมลาร์ สามารถสะสมก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 7,160.9 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ รองลงมาเป็นของความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอล 25, 75, 0

และ 100 มิลลิโมลาร์ สามารถสะสมก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 6,073.8, 6,830.1, 955.8 และ 420.0 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 4.24 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS61 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติบ่มในอาหาร TAP สูตรปกติเติมเอทานอล 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตไฮโดรเจนจากการวิเคราะห์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$))

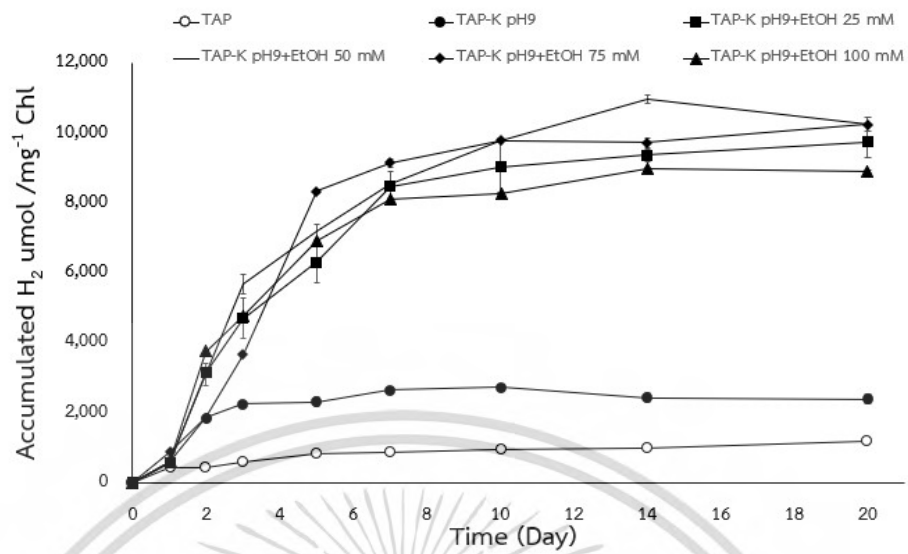
พบการรายงานว่า เอนไซม์ แอลกอฮอล์/เอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol /aldehyde dehydrogenase) ในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงเอทานอลกลายเป็นอะซิเตท (acetate) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS61 อาจจะมีเอนไซม์ชนิดเดียวกันนี้ โดยเอทานอลจะถูกออกซิไดซ์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ปฏิกิริยานี้จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาในรูปของ NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) และถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซิเตท (acetate) โดยเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) กระบวนการออกซิเดชันดังกล่าวจะส่งอิเล็กตรอนในรูป NADH เข้าสู่ระบบการสังเคราะห์แสงสอง โดยผ่านทางพลาสโตควิโนนและผ่านไปสู่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสต่อไป (Melis and Happe 2004)

ดังนั้นเอทานอลถือว่าเป็นแหล่งอิเล็กทรอนิกส์ที่เหมาะสมสำหรับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS61 ซึ่งสามารถเพิ่มการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสะสมสูงกว่าในอาหารสูตร TAP ในการเพาะเลี้ยงปกติถึง 7.5 เท่า จึงน่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาและวิจัยต่อไป

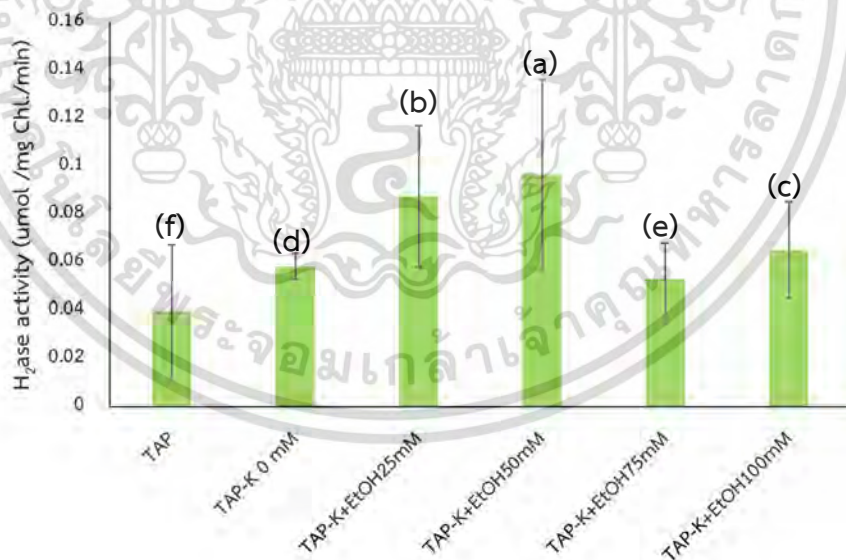
4.6 การศึกษาการรวมปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ทำการศึกษาโดยนำทุกปัจจัยที่เหมาะสมของทุกการทดลองมารวมในการทดลองนี้ โดยเตรียมอาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมและปรับค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 9.0 พร้อมการแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลดังนี้ 0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองพบว่าปริมาณสะสมของก๊าซไฮโดรเจนในอาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมที่มีเอทานอล 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ อย่างต่อเนื่อง และสูงที่สุดในวันที่ 10 (รูปที่ 4.25) โดยปริมาณสะสมก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุดเป็นของอาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมและความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอล 50 มิลลิโมลาร์ สามารถสะสมก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 10,268.1 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ รองลงมาเป็นของความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอล 75, 25, 100, 0 มิลลิโมลาร์ และอาหาร TAP สูตรปกติ สามารถสะสมก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 10,247.5, 9,752.7, 8,904.4, 2,388.5 และ 1,242.9 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ โดยที่อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมที่มีเอทานอล 25, 50, และ 75 มิลลิโมลาร์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับ

ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (รูปที่ 4.26) กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสอิเล็กตรอนจำนวนมาก ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดอกซ์ภายในเซลล์ ขึ้นกับกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและซัสเตรท คือ อิเล็กตรอนและโปรตอนผลของการติดตามกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS61 พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงสุดเป็นของอาหารสูตร TAP ที่มีการเติมเอทานอลความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติ แสดงว่าปริมาณซัสเตรทมีผลโดยตรงกับการเกิดผลิตภัณฑ์ ซึ่งหมายความว่า เอทานอลเป็นสารที่ให้อิเล็กทรอนิกส์ได้ดีและเซลล์สาหร่ายสามารถนำอิเล็กทรอนิกส์ที่ได้จากเอทานอลเข้าสู่เซลล์ได้ และยังสามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมอีกด้วย



รูปที่ 4.26 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ที่ป้อนในอาหาร TAP สูตรปกติและอาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 9.0 และเติมเอทานอล 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.25 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสภาวะแปรผันความเข้มข้นของเอทานอลในอาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 (อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตไฮโดรเจนจากการวิเคราะห์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$))

นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายได้ ถ้ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสภายในเซลล์สูง เซลล์จะมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในปริมาณมาก และยังบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงสอง เมื่อเซลล์มีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงแสดงว่ากิจกรรมการทำงานของระบบแสงสองลดลง เมื่อระบบแสงสองทำงานลดลง การแตกตัวของน้ำจึงลดลง ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนลดลง ส่งผลให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในปริมาณมากขึ้น (Scoma *et al.* 2012; Winkler *et al.* 2002)

ผู้วิจัยได้คำนวณปริมาณไฮโดรเจนสะสมและอัตราการผลิตไฮโดรเจนในหน่วยต่างๆ พร้อมทั้งทำการเปรียบเทียบปริมาณ/อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* KLSc61 กับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นและไซยาโนแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* KLSc61 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนสะสมได้สูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* KLSc59 ถึง 12 เท่า ภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ อาหาร TAP สูตรปกติ ที่เติมเอทานอลความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ และยังพบว่าสูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora sp.* CU2551 ซึ่งสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนสะสมได้สูงกว่า *Tetraspora sp.* CU2551 ถึง 604 และ 165 เท่า ภายใต้การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบอิสระและขาดธาตุอาหารไนโตรเจนและซัลเฟอร์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสะสมในสภาวะการขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมกับสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* KLSc61 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนสะสมได้สูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ถึง 5.2 เท่า และยังสูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ที่ถูกรายงานว่าเป็นโมเดลในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนถึง 4 เท่า นอกจากนี้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* KLSc61 นี้ยังมากกว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena sp.* UTEX 1448 ถึง 114 เท่า และ ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis sp.* PCC 6803 ที่ถูกตรึงในอัลจินตถึง 1.7 เท่า

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจึงสามารถที่จะสรุปภาพรวมได้ว่า การรวมปัจจัยทั้งหมดที่ศึกษามีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสายพันธุ์นี้ พบว่าปัจจัยทั้งหมดมีผลช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย เนื่องจากเซลล์ที่บ่มสภาวะเหมาะสมในอาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมและค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 9 ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 50 มิลลิโมลาร์ จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ประมาณ 8.5 เท่า และเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียวที่เคยมีการวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* KLSc61 มีประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายหลังการปรับสภาวะแล้วสูงกว่าสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่น ดังที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* KLSc61 จึงเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่อไป

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 กับสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย

กลุ่มของสาหร่าย	ชนิดของสาหร่าย	สภาวะ	อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจน			อ้างอิง
			mL/L	mL H ₂	μmol/h/mg Chl a	
สาหร่ายสีเขียว	<i>Chlorella</i> sp. KLSc61	K-deprived with 25 mM ethanol	500 (168 h)	10 (168 h)	10,268 (240 h)	This study
	<i>Chlorella</i> sp. KLSc59	Normal TAP with 1 mM ethanol	724 (36 h)		850 (36 h)	Sirawattanamongkol et al. 2020
	<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	N-S-deprived			17-62	Maneeruttanarungroj et al. 2010
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	K-deprived		1.9		Papazi et al. 2014
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	S-deprived		120 (60 h)		Kosourov et al. 2007
	<i>Anabaena</i> sp. UTEX 1448	N-deprived			90.4	Vargas et al. 2020
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Immobilized in alginate, N-deprived		5.80 (144 h)		Touloupakis et al. 2016
สาหร่ายสีน้ำเงิน-เขียว						

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

เมื่อทำการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 17 สายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกมาศึกษาต่อในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน พบว่าสาหร่ายสีเขียวจำนวน 6 สายพันธุ์ ที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด คือ สาหร่ายสีเขียว BN2, G2, G6, *Chlorella* sp. KLSc59, *Tetraspora* sp. CU2551 และ SR ตามลำดับ จึงนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนดีที่สุด ภายใต้สภาวะที่ใส่อากาศ พบว่าสาหร่ายสีเขียว SR มีความสามารถผลิตก๊าซออกซิเจนได้สูงที่สุด จึงเลือกสาหร่าย SR มาศึกษา ลักษณะทางสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวและศึกษาการปรับสภาวะทางด้านการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

การศึกษาลักษณะทางสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว SR ทางด้านสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่ามีรูปร่าง กลม เส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์เฉลี่ยประมาณ 5.9 ± 0.5 ไมโครเมตร ซึ่งสอดคล้องกับรูปร่างของสาหร่ายสีเขียวกลุ่ม *Chlorella* เพื่อยืนยันสายพันธุ์จึงทำการศึกษาระดับโมเลกุลด้วยการศึกษายีน 18S rDNA พบว่ายีน 18S rDNA มีความคล้ายคลึงกับสาหร่ายสีเขียวกลุ่ม *Chlorella* จริง จึงนำไปจัดกลุ่มเชิงวิวัฒนาการด้วยแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าสาหร่ายสีเขียว SR ถูกจัดสายวิวัฒนาการอยู่ในสาหร่ายสีเขียวกลุ่ม *Chlorella* จากข้อมูลทั้งหมดนี้สามารถจัดกลุ่มของสาหร่ายสีเขียว SR ให้อยู่ในกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* ได้ จึงได้ตั้งชื่อใหม่ว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 แทนการใช้ชื่อสาหร่ายสีเขียว SR การศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถติดตามยีนไฮโดรจีเนสได้ เนื่องจากพบลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นของยีน DNA polymerase alpha catalytic subunit

ส่วนการศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 โดยการแปรผันปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. การแปรผันความเข้มข้นของแสง พบว่าที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุด
2. การแปรผันอุณหภูมิพบว่าที่ 35 และ 40 องศาเซลเซียส มีความสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุดโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
3. การแปรผันการขาดธาตุอาหาร พบว่าที่สภาวะอาหาร TAP สูตรปกติมีความสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุด

4. การแปรผันค่าความเป็นกรดเบส พบว่าสภาวะอาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมและค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 9 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด และสูงกว่าในสภาวะอาหาร TAP สูตรปกติ ถึง 6 เท่า

5. การศึกษาสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน พบว่าเอทานอลเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่ดีแก่สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายที่ 50 มิลลิโมลาร์ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดและสูงกว่าในสภาวะอาหาร TAP สูตรปกติ ถึง 7.5 เท่า

6. การศึกษาการรวมปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ในสภาวะอาหารสูตร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมและค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 9 ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 50 มิลลิโมลาร์ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดและสูงกว่าในสภาวะอาหาร TAP สูตรปกติ ถึง 8.5 เท่า

ปัจจัยทั้งหมดที่ศึกษาทั้งหมดส่งผลต่อระบบการสังเคราะห์แสงและการขนส่งอิเล็กตรอน ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 มีประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายหลังการปรับสภาวะแล้วสูงกว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่นๆที่มาการศึกษาก่อนหน้านี้ จึงเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่อไปในระดับอุตสาหกรรม

5.2 ข้อเสนอแนะ

การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้จนเป็นที่น่าพอใจแล้ว แต่ยังไม่สามารถอธิบายได้ลึกซึ้งถึงสาเหตุการเพิ่มขึ้นของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในสภาวะที่ขาดธาตุโพแทสเซียมและค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 9 จึงควรศึกษาถึงการสะสมแป้งภายในเซลล์เพิ่มเติมและติดตามปริมาณของออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการระเหยการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้การเติมเอทานอลลงไปสามารถเพิ่มขึ้นของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้จึงควรศึกษาทางด้านการเปลี่ยนแปลงของเอทานอลระหว่างการเพาะเลี้ยง

ส่วนด้านการตามหาวิวัฒนาการของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสควรศึกษาเพิ่มเติมในระดับโปรตีนหรือการใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมอื่นอีกครั้ง

เอกสารอ้างอิง

- Jolly, William Lee. "Hydrogen". Encyclopedia Britannica, 1 Jun. 2020, <https://www.britannica.com/science/hydrogen>. Accessed 16 April 2021.
- Antal TK, Kukarskikh GP, Volgusheva AA, Krendeleva TE, Tyystjärvi E, Rubin AB (2016) **Hydrogen photoproduction by immobilized S-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*: Effect of light intensity and spectrum, and initial medium pH.** Algal Research 17:38-45.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.009>
- Aro E-M, Virgin I, Andersson B (1993) **Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1143 (2):113-134.
doi:[https://doi.org/10.1016/00052728\(93\)90134-2](https://doi.org/10.1016/00052728(93)90134-2)
- Azaman SNA, Nagao N, Yusoff FM, Tan SW, Yeap SK (2017) **A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions.** PeerJ 5:e3473. doi:10.7717/peerj.3473
- Bajpai P (2019) **Characteristics of Algae.** In: Bajpai P (ed) Third Generation Biofuels. Springer Singapore, Singapore, pp 11-15.
doi:10.1007/978-981-13-2378-2_3
- Ball SG, Dirick L, Decq A, MARTIAT J-C, Matagne RF (1989) **Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*.** Plant Science 66 (1):1-9
- Balthasar W (1984) **Hydrogen production and technology: today, tomorrow and beyond.** International Journal of Hydrogen Energy 9 (8): 649 - 668 .
doi:[https://doi.org/10.1016/0360-3199\(84\)90263-5](https://doi.org/10.1016/0360-3199(84)90263-5)
- Bamberger CE, Richardson DM (1976) **Hydrogen production from water by thermochemical cycles.** Cryogenics 16 (4) : 197 - 208 .
doi:[https://doi.org/10.1016/0011-2275\(76\)90260-5](https://doi.org/10.1016/0011-2275(76)90260-5)
- Batyrova K, Gavrishcheva A, Ivanova E, Liu JG, Tsygankov A (2015) **Sustainable Hydrogen Photoproduction by Phosphorus-Deprived Marine Green Microalgae *Chlorella* sp.** International Journal of Molecular Sciences 16 (2):2705-2716
doi: 10.3390/ijms16022705

- Batyrova K, Tsygankov A, Kosourov S (2012) **Sustained hydrogen photoproduction of phosphorus deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures.** International Journal of Hydrogen Energy 37:8834-8839.
doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.01.068
- Bock C, Krienitz L, Proschold T (2011) **Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (*Trebouxiophyceae*) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species.** Fottea 11 (2):293-312
- Brooks A (1986) **Effects of phosphorus nutrition on ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase activation, photosynthetic quantum yield and amounts of some Calvin-cycle metabolites in spinach leaves.** Functional Plant Biology 13 (2):221-237
- Brooks A, Woo KC, Wong SC (1988) **Effects of phosphorus nutrition on the response of photosynthesis to CO₂ and O₂, activation of ribulose bisphosphate carboxylase and amounts of ribulose bisphosphate and 3-phosphoglycerate in spinach leaves.** Photosynthesis Research 15 (2):133-141.
doi:10.1007/BF00035257
- Burris JE (1977) **Photosynthesis, photorespiration, and dark respiration in eight species of algae.** Marine Biology 39 (4):371-379.
doi:10.1007/BF00391940
- Chia SR, Ong HC, Chew KW, Show PL, Phang S-M, Ling TC, Nagarajan D, Lee D-J, Chang J-S (2018a) **Sustainable approaches for algae utilisation in bioenergy production.** Renewable Energy 129:838-852.
doi:https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.001
- Chia SR, Ong HC, Chew KW, Show PL, Phang SM, Ling TC, Nagarajan D, Lee DJ, Chang JS (2018b) **Sustainable approaches for algae utilisation in bioenergy production.** Renewable Energy 129:838-852. doi:10.1016/j.renene.2017.04.001
- Das D, Khanna N, Nag Dasgupta C (2014) **Biohydrogen Production: Fundamentals and Technology Advances.** Jurnal
doi:10.1201/b16574
- Das D, Veziroglu TN (2008) **Advances in biological hydrogen production processes.** International Journal of Hydrogen Energy 33 (21): 6046 - 6057.
doi:https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098

- Das D, Veziroğlu TN (2001) **Hydrogen production by biological processes: a survey of literature.** International Journal of Hydrogen Energy 26 (1): 13-28. doi:[https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(00\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(00)00058-6)
- Deng X, Chen B, Xue C, Li D, Hu X, Gao K (2018) **Biomass production and biochemical profiles of a freshwater microalga *Chlorella kessleri* in mixotrophic culture: Effects of light intensity and photoperiodicity.** Bioresource Technology 273. doi:10.1016/j.biortech.2018.11.032
- Dubini (2011) **Green energy from green algae: Biofuel production from *Chlamydomonas reinhardtii*.** Biochem (Lond) 33 (2): 20-23. doi: <https://doi.org/10.1042/BIO03302020>
- Dubini A, Ghirardi ML (2015) **Engineering photosynthetic organisms for the production of biohydrogen.** Photosynthesis Research 123 (3):241-253. doi:10.1007/s11120-014-9991-x
- Falkowski PG, Raven JA (2007) **Aquatic Photosynthesis** (Second Edition). STU - Student edition edn. Princeton University Press. doi:10.2307/j.ctt4cgbxs
- Fremaux S, Beheshti S-M, Ghassemi H, Shahsavan-Markadeh R (2015) **An experimental study on hydrogen-rich gas production via steam gasification of biomass in a research-scale fluidized bed.** Energy Conversion and Management 91:427-432. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.12.048>
- Gabrielyan L, Hakobyan L, Trchounian A (2017) **Characterization of light-dependent hydrogen production by new green microalga *Parachlorella kessleri* in various conditions.** Journal of photochemistry and photobiology B, Biology 175:207-210. doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.09.006
- Gaffron H, Rubin J (1942) **Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae.** Journal of General Physiology 26 (2):219-240. doi:10.1085/jgp.26.2.219
- Gattward JN, Almeida A-AF, Souza Jr JO, Gomes FP, Kronzucker HJ (2012) **Sodium-potassium synergism in *Theobroma cacao*: stimulation of photosynthesis, water-use efficiency and mineral nutrition.** Physiologia Plantarum 146 (3):350-362. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01621.x>

- Ghirardi ML, Zhang L, Lee JW, Flynn T, Seibert M, Greenbaum E, Melis A (2000) **Microalgae: a green source of renewable H₂**. Trends in biotechnology 18 (12):506-511.
doi:10.1016/s0167-7799(00)01511-0
- Hall DO, Mynick HE, Williams RH (1991) **Cooling the greenhouse with bioenergy**. Nature 353 (6339):11-12.
doi:10.1038/353011a0
- Hall, T.A. (1999) **BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT**. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95-98.
- Hallenbeck PC, Benemann JR (2002) **Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes**. International Journal of Hydrogen Energy 27 (11):1185-1193.
doi:https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00131-3
- Hicks GR, Hironaka CM, Dauvillee D, Funke RP, D'Hulst C, Waffenschmidt S, Ball SG (2001) **When simpler is better. Unicellular green algae for discovering new genes and functions in carbohydrate metabolism**. Plant Physiology 127 (4):1334-1338
- Hiemstra-van der Horst G, Hovorka AJ (2009) **Fuelwood: The "other" renewable energy source for Africa**. Biomass and Bioenergy 33 (11):1605-1616.
doi:https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.08.007
- Hosseini SE, Wahid MA (2016) **Hydrogen production from renewable and sustainable energy resources: Promising green energy carrier for clean development**. Renewable and Sustainable Energy Reviews 57:850-866.
doi:10.1016/j.rser.2015.12.112
- Illman AM, Scragg AH, Shales SW (2000) **Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium**. Enzyme and Microbial Technology 27 (8):631-635.
doi:https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00266-0
- Juneja A, Ceballos RM, Murthy GS (2013) **Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review**. Energies 6 (9) : 4607-4638.
doi:10.3390/en6094607

- Kapdan IK, Kargi F (2006) **Bio-hydrogen production from waste materials.** *Enzyme and Microbial Technology* 38 (5) : 569 - 582 .
doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.015>
- Keçebaş A, Kayfeci M (2019) **Chapter 1 - Hydrogen properties.** In: Calise F, D'Accadia MD, Santarelli M, Lanzini A, Ferrero D (eds) *Solar Hydrogen Production.* Academic Press, pp 3-29.
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814853-2.00001-1>
- Keren N, Krieger-Liszkay A (2011) **Photoinhibition: molecular mechanisms and physiological significance.** *Physiologia Plantarum* 142 (1) : 1 - 5 .
doi:[10.1111/j.1399-3054.2011.01467.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01467.x)
- Kessler E (1985) **Upper limits of temperature for growth in *Chlorella* (*Chlorophyceae*).** *Plant Systematics and Evolution* 151 (1) : 67 - 71 .
doi:[10.1007/BF02418020](https://doi.org/10.1007/BF02418020)
- Khan A, Kausar H, Jaferi S, Drouet S, Hano C, Abbasi B, Anjum S (2020) **An Insight into the Algal Evolution and Genomics.** *Biomolecules* 10(11):1524.
doi: [10.3390/biom10111524](https://doi.org/10.3390/biom10111524)
- Khanal SK, Chen W-H, Li L, Sung S (2004) **Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products.** *International Journal of Hydrogen Energy* 29 (11):1123-1131.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.11.002>
- Khetkorn W, Rastogi RP, Incharoensakdi A, Lindblad P, Madamwar D, Pandey A, Larroche C (2017) **Microalgal hydrogen production - A review.** *Bioresource Technology* 243:1194-1206
- Kolber Z, Zehr J, Falkowski P (1988) **Effects of Growth Irradiance and Nitrogen Limitation on Photosynthetic Energy Conversion in Photosystem II.** *Plant Physiology* 88 (3):923-929.
doi:[10.1104/pp.88.3.923](https://doi.org/10.1104/pp.88.3.923)
- Kosourov S, Patrusheva E, Ghirardi ML, Seibert M, Tsygankov A (2007) **A comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions.** *Journal of Biotechnology* 128 (4):776-787. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.12.025>

- Kosourov SN, Seibert M (2009) **Hydrogen photoproduction by nutrient-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized within thin alginate films under aerobic and anaerobic conditions.** *Biotechnology and Bioengineering* 102 (1):50-58.
doi:10.1002/bit.22050
- Kovalev AA, Kovalev DA, Littl YV, Katraeva IV (2020) **Biohydrogen production in the two-stage process of anaerobic bioconversion of organic matter of liquid organic waste with recirculation of digester effluent.** *International Journal of Hydrogen Energy* 45 (51):26831-26839. doi:10.1016/j.ijhydene.2020.07.124
- Kruse O, Hankamer B (2010) **Microalgal hydrogen production.** *Current opinion in biotechnology* 21 (3):238-243.
doi:10.1016/j.copbio.2010.03.012
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) **MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets.** *Molecular Biology and Evolution* 33 (7):1870-1874.
doi:10.1093/molbev/msw054
- Laurinavichene TV, Fedorov AS, Ghirardi ML, Seibert M, Tsygankov AA (2006) **Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells.** *International Journal of Hydrogen Energy* 31 (5):659-667.
doi:https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.05.002
- Lazar T (2003) Taiz, L. and Zeiger, E. **Plant physiology.** 3rd edn. *Ann Bot* 91 (6): 750-751.
doi:10.1093/aob/mcg079
- Lee YK, Shen H (2007) **Basic Culturing Techniques.** In. pp 40 - 56 .
doi:10.1002/9780470995280.ch3
- Levene JI, Mann MK, Margolis RM, Milbrandt A (2007) **An analysis of hydrogen production from renewable electricity sources.** *Solar Energy* 81 (6):773-780.
doi:https://doi.org/10.1016/j.solener.2006.10.005
- Lubitz W, Ogata H (2013) **Hydrogenases, Structure and Function.** In: Lennarz WJ, Lane MD (eds) *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition).* Academic Press, Waltham, pp 562-567.
doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00205-X

- Maneeruttanarungroj C, Lindblad P, Incharoensakdi A (2010) **A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production.** International Journal of Hydrogen Energy 35 (24):13193-13199.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.08.096>
- Maneeruttanarungroj C, Phunpruch S (2017) **Effect of pH on Biohydrogen Production in Green Alga *Tetraspora* sp. CU2551.** Energy Procedia 138:1085-1092.
doi:[10.1016/j.egypro.2017.10.122](https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.122)
- Manish S, Banerjee R (2008) **Comparison of biohydrogen production processes.** International Journal of Hydrogen Energy 33 (1):279-286.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.026>
- Maswana T, Lindblad P, Maneeruttanarungroj C (2020) **Improved biohydrogen production by immobilized cells of the green alga *Tetraspora* sp. CU2551 incubated under aerobic condition.** Journal of Applied Phycology 32:1-9.
doi:[10.1007/s10811-020-02184-3](https://doi.org/10.1007/s10811-020-02184-3)
- Maswana T, Phunpruch S, Lindblad P, Maneeruttanarungroj C (2018) **Enhanced hydrogen production by optimization of immobilized cells of the green alga *Tetraspora* sp. CU2551 grown under anaerobic condition.** Biomass and Bioenergy 111:88-95. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.01.005>
- McKinlay JB, Harwood CS (2010) **Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel.** Current Opinion in Biotechnology 21 (3):244-251
- Melis A (2002) **Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects.** International Journal of Hydrogen Energy 27 (11-12):1217-1228
- Melis A (2007) **Photosynthetic H₂ metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae).** Planta 226 (5):1075-1086. doi:[10.1007/s00425-007-0609-9](https://doi.org/10.1007/s00425-007-0609-9)
- Melis A, Happe T (2004) **Trails of Green Alga Hydrogen Research – from Hans Gaffron to New Frontiers.** Photosynthesis Research 80 (1):401.
doi:[10.1023/B:PRES.0000030421.31730.cb](https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000030421.31730.cb)
- Meseck SL, Alix JH, Wikfors GH (2005) **Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429).** Aquaculture 246 (1):393-404.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.034>

- Meuser JE, D'Adamo S, Jinkerson RE, Mus F, Yang W, Ghirardi ML, Seibert M, Grossman AR, Posewitz MC (2012) **Genetic disruption of both *Chlamydomonas reinhardtii* [FeFe]-hydrogenases: Insight into the role of HYDA2 in H₂ production.** *Biochemical and biophysical research communications* 417 (2):704-709.
doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.002
- Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R, Schäffer AA (2008) **Database indexing for production MegaBLAST searches.** *Bioinformatics* (Oxford, England) 24 (16):1757-1764.
doi:10.1093/bioinformatics/btn322
- Morris IAN, Farrell K (2006) **Photosynthetic Rates, Gross Patterns of Carbon Dioxide Assimilation and Activities of Ribulose Diphosphate Carboxylase in Marine Algae Grown at Different Temperatures.** *Physiologia Plantarum* 25:372-377.
doi:10.1111/j.1399-3054.1971.tb01458.x
- Muradov NZ (1993) **How to produce hydrogen from fossil fuels without CO₂ emission.** *International Journal of Hydrogen Energy* 18 (3):211-215.
doi:https://doi.org/10.1016/0360-3199(93)90021-2
- Najafabadi HS, Saberi A, Torabi N, Chamankhah M (2008) **MAD-DPD: designing highly degenerate primers with maximum amplification specificity.** *BioTechniques* 44 (4):519-520, 522, 524-516.
doi:10.2144/000112694
- Nikolaidis P, Poullikkas A (2017) **A comparative overview of hydrogen production processes.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 67:597-611.
doi:10.1016/j.rser.2016.09.044
- Oliveira MACLd, Monteiro MPC, Robbs PG, Leite SGF (1999) **Growth and Chemical Composition of *Spirulina Maxima* and *Spirulina Platensis* Biomass at Different Temperatures.** *Aquaculture International* 7 (4):261-275.
doi:10.1023/A:1009233230706
- Ördög V, Stirk WA, Bálint P, Aremu AO, Okem A, Lovász C, Molnár Z, van Staden J (2016) **Effect of temperature and nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains.** *Algal Research* 16: 141-149.
doi:https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.001

- Papazi A, Gjindali A-I, Kastanaki E, Assimakopoulos K, Stamatakis K, Kotzabasis K (2014) **Potassium deficiency, a “smart” cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus*.** International Journal of Hydrogen Energy 39 (34):19452-19464.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.09.096>
- Parmar A, Singh NK, Pandey A, Gnansounou E, Madamwar D (2011) **Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels.** Bioresource technology 102 (22):10163-10172.
doi:10.1016/j.biortech.2011.08.030
- Phanprasit W, Rittaprom K, Dokkem S, Meeyai AC, Boonyayothin V, Jaakkola JJK, Näyhä S (2021) **Climate Warming and Occupational Heat and Hot Environment Standards in Thailand.** Safety and Health at Work 12 (1):119-126.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.shaw.2020.09.008>
- Philipps G, Happe T, Hemschemeier A (2012) **Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*.** Planta 235 (4):729-745.
doi:10.1007/s00425-011-1537-2
- Portillo MC, Sririn V, Kanoksilapatham W, Gonzalez JM (2009) **Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand.** Extremophiles : life under extreme conditions 13 (2):321-331. doi:10.1007/s00792-008-0219-x
- Rahman SNA, Masdar MS, Rosli MI, Majlan EH, Husaini T, Kamarudin SK, Daud WRW (2016) **Overview biohydrogen technologies and application in fuel cell technology.** Renewable and Sustainable Energy Reviews 66 : 137 - 162 .
doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.047>
- Ramaraj R, Unpaprom Y, Dussadee N (2016) **Cultivation of Green Microalga, *Chlorella vulgaris* for Biogas Purification.** International Journal of Scientific & Technology Research 3 (2) : 117-122
- Renaud SM, Thinh L-V, Lambrinidis G, Parry DL (2002) **Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures.** Aquaculture 211 (1):195-214.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00875-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00875-4)

- Ruhle T, Hemschemeier A, Melis A, Happe T (2008) **A novel screening protocol for the isolation of hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii* strains.** BMC Plant Biol (8) : 107 - 120
doi: 10.1186/1471-2229-8-107
- Saad MG, Selahi A, Zoromba MS, Mekki L, El-Bana M, Dosoky NS, Nobles D, Shafik HM (2019) **A droplet-based gradient microfluidic to monitor and evaluate the growth of *Chlorella vulgaris* under different levels of nitrogen and temperatures.** Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts 44.
doi:ARTN 10165710.1016/j.algal.2019.101657
- Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier P-Y, Vaca-Garcia C (2014) **Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews 35:265-278.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Santos FM, Gonçalves AL, Pires JCM (2019) **Chapter 1 - Negative emission technologies.** In: Magalhães Pires JC, Cunha Gonçalves ALD (eds) Bioenergy with Carbon Capture and Storage. Academic Press, pp 1-13.
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816229-3.00001-6>
- Sargsyan H, Gabrielyan L, Hakobyan L, Trchounian A (2015) **Light-dark duration alternation effects on *Rhodobacter sphaeroides* growth, membrane properties and bio-hydrogen production in batch culture.** International Journal of Hydrogen Energy 40 (11):4084-4091.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.01.163>
- Scoma A, Bertin L, Pintucci C, Raddi S, Fava F (2012) **Inhibition of photosystem 2 in starch-enriched *Chlamydomonas reinhardtii* cells prevents the efficient induction of H₂ production in sulfur-depleted cultures.** International Journal of Hydrogen Energy 37 (14):10604-10610.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.046>
- Shima S, Pilak O, Vogt S, Schick M, Stagni MS, Meyer-Klaucke W, Warkentin E, Thauer RK, Ermler U (2008) **The Crystal Structure of [Fe]-Hydrogenase Reveals the Geometry of the Active Site.** Science 321 (5888):572.
doi:10.1126/science.1158978

- Singh SP, Singh P (2015) **Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50:431-444.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>
- Sirawattanamongkol T, Maswana T, Maneeruttanarungroj C (2020) **A newly isolated green alga *Chlorella* sp. KLS59: potential for biohydrogen production.** *Journal of Applied Phycology* 32 (5):2927-2936.
doi:10.1007/s10811-020-02140-1
- Solyosi K (2012) **Plastid Structure, Diversification and Interconversions I. Algae.** *Current Chemical Biology* 6 (3) 167-186.
doi:10.2174/2212796811206030002
- Song W, Rashid N, Choi W, Lee K (2011) **Biohydrogen production by immobilized *Chlorella* sp. using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis.** *Bioresource Technology* 102 (18):8676-8681.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.082>
- Sorokin C, Myers J (1953) **A High-Temperature Strain of *Chlorella*.** *Science* 117 (3039):330-331.
doi:10.1126/science.117.3039.330
- Steinfeld A (2005) **Solar thermochemical production of hydrogen—a review.** *Solar Energy* 78 (5):603-615.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.solener.2003.12.012>
- Stephenson M, Stickland LH (1931) **Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme.** *Biochemical Journal* 25 (1):205-214. doi:10.1042/bj0250205
- Sun J, Hopkins RC, Jenney FE, McTernan PM, Adams MW (2010) **Heterologous expression and maturation of an NADP-dependent [NiFe]-hydrogenase: a key enzyme in biofuel production.** *Plos One* 5 (5):e10526.
doi:10.1371/journal.pone.0010526
- Sunda, W. & Guillard, R. R. L., 1976. **The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton.** *Journal of Marine Research* (34) : 511–529
doi:10.1575/1912/1975

- Swanny F, Hemschemeier A, Amandine C, Pruvost J, Legrand J, Happe T, Peltier G, Cournac L (2005) **Autotrophic and Mixotrophic Hydrogen Photoproduction in Sulfur-Deprived *Chlamydomonas* Cells.** Applied and environmental microbiology 71:6199-6205.
doi:10.1128/AEM.71.10.6199-6205.2005
- Tamura K, Nei M (1993) **Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.** Molecular Biology and Evolution 10 (3):512-526.
doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023
- Tanaka A, Tanaka R (2019) **Chapter Six - The biochemistry, physiology, and evolution of the chlorophyll cycle.** In: Grimm B (ed) *Advances in Botanical Research*, vol 90. Academic Press, pp 183-212.
doi:https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.03.005
- Tikhonov AN (2013) **pH-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts.** Photosynthesis Research 116 (2-3):511-534.
doi:10.1007/s11120-013-9845-y
- Tsygankov AA, Kosourov SN, Tolstygina IV, Ghirardi ML, Seibert M (2006) **Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions.** International Journal of Hydrogen Energy 31 (11):1574-1584.
doi:https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.06.024
- Uyar B, Eroglu I, Yücel M, Gündüz U, Türker L (2007) **Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors.** International Journal of Hydrogen Energy 32 (18):4670-4677.
doi:https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.002
- Vogt S, Lyon EJ, Shima S, Thauer RK (2008) **The exchange activities of [Fe] hydrogenase (iron-sulfur-cluster-free hydrogenase) from methanogenic archaea in comparison with the exchange activities of [FeFe] and [NiFe] hydrogenases.** Journal of Biological Inorganic Chemistry 13 (1):97-106.
doi:10.1007/s00775-007-0302-2

- Winkler M, Hemschemeier A, Gotor C, Melis A, Happe T (2002) **[Fe]-hydrogenases in green algae: photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation.** International Journal of Hydrogen Energy 27 (11):1431-1439.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00095-2](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00095-2)
- Wykoff D, Davies J, Melis A, Grossman A (1998) **The Regulation of Photosynthetic Electron Transport during Nutrient Deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*.** Plant Physiol 117:129-139
- Xu LL, Cheng XL, Wang QX (2017) **Effect of co-cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* with *Azotobacter chroococcum* on hydrogen production.** International Journal of Hydrogen 42 (36):22713-22719.
doi:10.1016/j.ijhydene.2017.06.223
- Yamamoto M, Kurihara I, Kawano S (2005) **Late type of daughter cell wall synthesis in one of the *Chlorellaceae*, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).** Planta 221 (6):766-775.
doi:10.1007/s00425-005-1486-8
- Yilmaz F, Balta MT, Selbas R (2016) **A review of solar based hydrogen production methods** (Retracted article. See vol. 83, pg. 176, 2018). Renewable and Sustainable Energy Reviews 56:171-178
- Youm I, Sarr J, Sall M, Kane MM (2000) **Renewable energy activities in Senegal: a review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews 4 (1): 75 - 89 .
doi:[https://doi.org/10.1016/S1364-0321\(99\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S1364-0321(99)00009-X)
- Yu Z, Song M, Pei H, Jiang L, Hou Q, Nie C, Zhang L (2017) **The effects of combined agricultural phytohormones on the growth, carbon partitioning and cell morphology of two screened algae.** Bioresource Technology 239:87-96.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.120>
- Zhang L, Happe T, Melis A (2002) **Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and Hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga).** Planta 214 (4):552-561. doi:10.1007/s004250100660
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) **A greedy algorithm for aligning DNA sequences.** Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology 7 (1-2):203-214.
doi:10.1089/10665270050081478



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

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

ตารางที่ ก-2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม)	Stock (มิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)		
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base)	2.42	100	10		
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.437	250	25		
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05				
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.10				
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.05	10	1		
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.10				
เกลือไดโซเดียม อีดีทีเอ ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	0.05	10	1		
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5.60 มิลลิกรัม				
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.00 มิลลิกรัม				
กรดบอริก (H_3BO_3)	11.40 มิลลิกรัม				
แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	5.52 มิลลิกรัม				
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.16 มิลลิกรัม				
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2.08 มิลลิกรัม				
โคบอลตคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.16 มิลลิกรัม				
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	-			-	1
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น				1 ลิตร	

ตารางที่ ก-3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม)	Stock (มิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)		
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base)	2.42	100	10		
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.437	250	25		
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05				
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.10				
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.084	10	1		
โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	0.02				
เกลือไดโซเดียม อีดีทีเอ ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	0.05	10	1		
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5.60 มิลลิกรัม				
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.00 มิลลิกรัม				
กรดบอริก (H_3BO_3)	11.40 มิลลิกรัม				
แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	5.52 มิลลิกรัม				
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.16 มิลลิกรัม				
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2.08 มิลลิกรัม				
โคบอลตคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.16 มิลลิกรัม				
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	-			-	1
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น				1 ลิตร	

ตารางที่ ก-4 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ขาดธาตุซัลเฟอร์ (TAP-S)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม)	Stock (มิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)		
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base)	2.42	100	10		
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.437	250	25		
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05				
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.082				
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.05	10	1		
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.10				
เกลือไดโซเดียม อีดีทีเอ ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	0.05	10	1		
เฟอร์ริกคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	4 มิลลิกรัม				
ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2)	10.40 มิลลิกรัม				
กรดบอริก (H_3BO_3)	11.40 มิลลิกรัม				
แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	5.52 มิลลิกรัม				
คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.10 มิลลิกรัม				
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2.08 มิลลิกรัม				
โคบอลตคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.16 มิลลิกรัม				
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	-			-	1
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น				1 ลิตร	

ตารางที่ ก-5 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม)	Stock (มิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)		
ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base)	2.42	100	10		
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.437	250	25		
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05				
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.10				
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.89	10	1		
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.81				
เกลือไดโซเดียม อีดีทีเอ ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	0.05	10	1		
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5.60 มิลลิกรัม				
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.00 มิลลิกรัม				
กรดบอริก (H_3BO_3)	11.40 มิลลิกรัม				
แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	5.52 มิลลิกรัม				
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.16 มิลลิกรัม				
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2.08 มิลลิกรัม				
โคบอลตคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.16 มิลลิกรัม				
กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)	-			-	1
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น				1 ลิตร	

วิธีเตรียมอาหารวุ้น TAP

- 1) เตรียมสารละลาย 1-5 ดังแสดงในตารางที่ ก-1
- 2) ปรับปริมาตรอาหารเหลวเป็น 1 ลิตร
- 3) เติมอะการ์ (Agar) 15 กรัม



ภาคผนวก ข

การคำนวณปริมาณไฮโดรเจน

การคำนวณปริมาณไฮโดรเจนในงานวิจัยนี้จะเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานแบบ single point calibration โดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนในอาร์กอน 4 เปอร์เซ็นต์เป็นสารมาตรฐาน ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนในแต่ละครั้งจึงสามารถที่จะคำนวณได้ ได้ดังนี้

- 1) คำนวณปริมาณไฮโดรเจนจากพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโทแกรม โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟของไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอนเป็นสารมาตรฐาน โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์ไฮโดรเจนที่อยู่บน head space ของขวดตั้งสมการนี้

$$\%H_2 = \frac{\text{peak area of sample}}{\text{peak area of 4\% standard hydrogen gas}} \times 4\%$$

- 2) เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ไฮโดรเจนแล้วก็จะทำการเทียบหาปริมาณของไฮโดรเจนในหน่วยลิตร โดยคิดเทียบจากพื้นที่ head space ทั้งหมดที่ใช้จริงในการทดลอง
- 3) คำนวณจำนวนโมลของไฮโดรเจนโดยเปรียบเทียบกับปริมาตรของแก๊ส ณ ความดันบรรยากาศและอุณหภูมิห้อง โดยสภาวะ STP ของแก๊ส 1 โมล จะมีปริมาตร 22.4 ลิตร โดยใช้สูตรตั้งสมการนี้

$$PV = nRT$$

กำหนดให้

$$P = 0.9973 \text{ atm}$$

$$n = 1 \text{ mol}$$

$$T = 305 \text{ K}$$

$$R = 82.0575 \text{ cm}^3 \cdot \text{atm} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

- 4) คำนวณปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อความเข้มข้นของเซลล์หรือปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อคลอโรฟิลล์

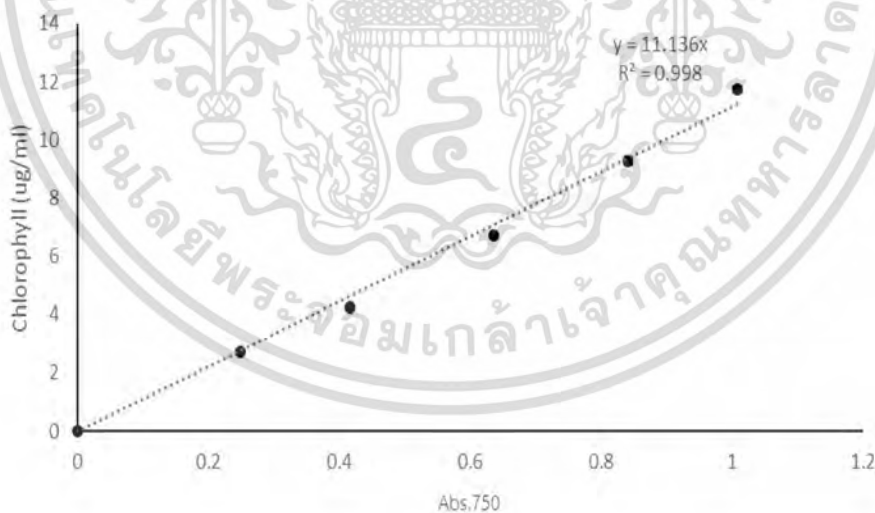
ภาคผนวก ค

การคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์จากค่าความขุ่นของสาหร่าย

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว โดยนำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีการแปรผันค่าความขุ่นสุดท้ายตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.8 โดยแต่ละค่าความขุ่นจะเติมลงหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที และทิ้งส่วนใสจากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปปั่นในที่มีดเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบตามระยะเวลาแล้วนำหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 และ 650 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ดังสมการนี้ (Lee and Shen 2007)

$$\text{Chlorophyll (a+b)} = (4.0 \times A_{665}) + (25.5 \times A_{650})$$

ปริมาณคลอโรฟิลล์ (a+b) สามารถคำนวณได้จากสมการเส้นตรง $y = 11.136x$ เมื่อ y คือค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* KLSc61 ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และ x คือปริมาณคลอโรฟิลล์ (a+b) ในหน่วยไมโครกรัมคลอโรฟิลล์ต่อมิลลิลิตรอาหารเหลว



รูปที่ ค.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์

ภาคผนวก ง

วิธีการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์และเจลอะกาโรส

1. สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Acetate-EDTA

การเตรียมสารละลาย 50X TAE 1 ลิตร

1. ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน (Tris-base) 242 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร
2. เติมนีเอทีเอ (EDTA) 0.5 M 100 มิลลิลิตร
3. เติมกรดอะซิติก (CH_3COOH) 57.1 มิลลิลิตร
4. ปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เท่ากับ 8.0 และปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่น ให้ปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร

เมื่อต้องการใช้งานให้นำสารละลาย 50X TAE มาเจือจาง 1000 เท่าให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5X TAE ด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียมเจลอะกาโรส

เตรียมเจลที่มีความเข้มข้น 1.5% โดยละลายอะกาโรส agarose ใน 0.5X TAE buffer ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟ จากนั้นเทเจลลงบนถาดพลาสติก (plastic tray) ที่มีหวี (comb) วางอยู่ในแนวตั้ง รอจนเจลแข็งแล้วดึงหวีออก

ภาคผนวก จ

การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ ทางสถิติ One-way ANOVA

การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ IBM SPSS Statistics version 25 วิเคราะห์ผลความแปรปรวนวิธีทางสถิติของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว ด้วย One-way ANOVA ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's multiple range test

ชุดข้อมูลที่อยู่ในกลุ่มอักษรแตกต่างกัน คือชุดข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) และชุดข้อมูลที่อยู่ในกลุ่มอักษรเดียวกัน คือ ชุดข้อมูลที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ตารางที่ จ-1 การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลของสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.5)

ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน							
Duncan ^a							
สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	N	Subset for alpha = 0.05					
		a	b	c	d	e	f
G6	3						6.012
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3					8.967	
<i>Chlorella</i> KLSc59	3				12.522		
G2	3			14.780			
BN2	3		34.339				
<i>Chlorella</i> KLSc61	3	49.510					
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.							
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.							

ตารางที่ จ-2 การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผล
การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะ
ที่โล่อากาศ ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.6)

ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน				
Duncan ^a				
สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	N	Subset for alpha = 0.05		
		a	b	c
G6	3			47.9674
BN2	3		67.2897	
<i>Chlorella</i> KLSc61	3	91.9235		
Sig.		1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

ตารางที่ จ-3 การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลการผลิตก๊าซ
ไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* KLScSR ภายใต้สภาวะที่โล่อากาศและแปรผันความเข้มข้น
ที่ระยะเวลา 32 ชั่วโมง (รูปที่ 4.18)

ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน								
Duncan ^a								
ความเข้มข้นแสง	N	Subset for alpha = 0.05						
		a	b	c	d	e	f	g
4,000 ลักซ์	3	594.439						
6,000 ลักซ์	3		524.877					
8,000 ลักซ์	3			423.178				
2,000 ลักซ์	3				371.840			
10,000 ลักซ์	3					252.488		
12,000 ลักซ์	3						195.769	
0 ลักซ์	3							5.288
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.								
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.								

ตารางที่ จ-4 การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* KLScSR ภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศและแปรผันความเข้มข้นที่ระยะเวลา 32 ชั่วโมง (รูปที่ 4.19)

ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน					
Duncan ^a					
อุณหภูมิ	N	Subset for alpha = 0.05			
		a	b	c	d
40	3	1.0562			
35	3		.9538		
30	3			.5181	
25	3				.3594
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

ตารางที่ จ-5 การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* KLSc61 ภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศและแปรผันความเข้มข้นที่ระยะเวลา 32 ชั่วโมง (รูปที่ 4.20)

ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน					
Duncan ^a					
ชนิดของอาหาร	N	Subset for alpha = 0.05			
		a	b	c	d
TAP	3	596.255			
TAP-K	3		251.291		
TAP-P	3			142.155	
TAP-N	3				35.121
TAP-S	3				13.582
Sig.		.287	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

ตารางที่ จ-6 การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศและชนิดของสารที่เป็นตัวให้เล็กตรอนต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.23)

ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน				
Duncan ^a				
ชนิดของสารรีดิวซ์	N	Subset for alpha = 0.05		
		a	b	c
TAP	3	163.152		
TAP+EtOH	3		125.203	
TAP+B-mer	3			10.810
TAP-DNT	3			9.361
Sig.		.569	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

ตารางที่ จ-7 การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศและ ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารที่เป็นตัวให้เล็กตรอนต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว ที่ระยะเวลา 10 วัน (รูปที่ 4.24)

ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน						
Duncan ^a						
ความเข้มข้นของสารรีดิวซ์	N	Subset for alpha = 0.05				
		a	b	c	d	e
TAPpH9+EtOH 50 mM	3	7,160.856				
TAPpH9+EtOH 75 mM	3		6,830.102			
TAPpH9+EtOH 25 mM	3			6,073.806		
TAP	3				955.759	
TAPpH9+EtOH 100 mM	3					419.956
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.						

ตารางที่ จ-8 การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศและศึกษาปัจจัยรวมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ที่ระยะเวลา 20 วัน (รูปที่ 4.25)

ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน				
Duncan ^a				
ความเข้มข้นของสารรีดิวซ์	N	Subset for alpha = 0.05		
		a	b	c
TAPpH9+EtOH 50 mM	3	10,268.052		
TAPpH9+EtOH 75 mM	3	10,247.503		
TAPpH9+EtOH 25 mM	3	9,752.692		
TAPpH9+EtOH 100 mM	3		8,904.380	
TAP				1,203.563
Sig.		.203	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

ตารางที่ จ-9 การทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศ ที่ระยะเวลา 7 วัน (รูปที่ 4.26)

ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน							
Duncan ^a							
ความเข้มข้นของสารรีดิวซ์	N	Subset for alpha = 0.05					
		a	b	c	d	e	f
TAPpH9+EtOH 50 mM	3	1.4477					
TAPpH9+EtOH 25 mM	3		1.3161				
TAPpH9+EtOH 100 mM	3			.9801			
TAPpH9+EtOH 75 mM	3				.8753		
TAP-K pH9						.8010	
TAP							.7912
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.							
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.							

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวณัฐวิกา เหล่าเกื้อ
วัน เดือน ปีเกิด	14 มกราคม 2539
ที่อยู่ปัจจุบัน	661/2 ถนนฉลองกรุง1 แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
ประวัติการศึกษา	2561 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เกรดเฉลี่ย 2.83 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2563 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.56 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-
ผลงานทางวิชาการ	1. Laokua, N. Chanhuab, P and Choochote, W. 2019. “ Biosynthesis of Zinc Oxide nanoparticles using microalgae extract and their antibacterial activity.” In Proceeding of 12 th Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research Conference. 2. Laokua, N. and Maneeruttanarungroj, C. 2020. “ Isolation of high potential hydrogen-producing green algae from fresh water sources” In Proceeding of The 17 th National Kasetsart University Kamphaeng - Saen Conference.