การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC124M4 ด้วยเอธิลมีเทนซัลโฟเนตเพื่อผลิตไฮโดรเจน

พิมพลอย ทุเนตร์
รัชชานนท์ นิลอรรถ
อรกนก สุขจันทร์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปีการศึกษา 2561

MUTANT INDUCTION OF GREEN ALGA *Chlamydomonas reinhardtii* CC124M4 WITH ETHYL METHANESULFONATE FOR HYDROGEN PRODUCTION

PIMPLOY TUNETE

RATCHANON NINAT

ONKANOK SUKCHAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE

OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ด้วยสารเคมีเอทิลมีเทนซัลโฟเนตเพื่อผลิตไฮโดรเจน

ชื่อนักศึกษา นางสาวพิมพลอย ทุเนตร์ รหัส 58050947

นายรัชชานนท์ นิลอรรถ รหัส 58050961

นางสาวอรกนก สุขจันทร์ รหัส 58051010

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้ โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ	
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ด้วยสารเคมีเอทิลมีเทนซัลโฟเนตเพื่อผลิตไฮโดรเจน

ชื่อนักศึกษา นางสาวพิมพลอย ทุเนตร์ รหัส 58050947
นายรัชชานนท์ นิลอรรถ รหัส 58050961
นางสาวอรกนก สุขจันทร์ รหัส 58051010

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนที่ผลิตโดยสาหร่ายสีเขียวจัดเป็นพลังงานทางเลือกชนิดหนึ่ง ซึ่งกำลังเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlamydomonas reinhardtii* สามารถผลิตไฮโดรเจนจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากอากาศ โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 โดยการใช้สารก่อการกลายพันธุ์เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate, EMS) ผลการทดลองพบว่า ได้สาหร่ายสายพันธุ์กลายของ *C. reinhardtii* CC-124M4 จำนวนทั้งหมด 67 สายพันธุ์ ที่มีอัตราการอยู่รอด 5 เปอร์เซ็นต์ในบรรดาสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายทั้งหมด สาหร่ายสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M4A23 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 235.146 ± 9.504 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์ ซึ่งอัตราการผลิตไฮโดรเจนนี้สูงกว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสายพันธุ์ดั้งเดิม *C. reinhardtii* CC-124M4 ถึงประมาณ 3 เท่า ภายใต้สภาวะความเข้มแสงสูงเท่ากับ 15,000 ลักซ์ สาหร่ายสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M4A23 ที่บ่มในอาหารที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 733.572 ± 2.960 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายที่บ่ม ภายใต้สภาวะความเข้มแสงต่ำเท่ากับ 1,000 ลักซ์ ถึงประมาณ 4 เท่า

คำสำคัญ : การกลายพันธุ์ สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต การผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Mutant Induction of green alga *Chlamydomonas reinhardtii* CC124M4 with Ethyl methanesulfonate for hydrogen production
Students	Miss Pimploy Tunete Student ID 58050947
	Mr. Ratchanon Ninat Student ID 58050961
	Miss Onkanok Sukchan Student ID 58051010
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Asst.Prof.Dr.Saranya Phunpruch

Abstract

Hydrogen (H_2) produced by green algae is one of alternative energies that has been increasingly interesting at the present time. The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* can produce H_2 by hydrogenase activity via photosynthetic activity under light anaerobic condition. This work aimed to generate mutant strains of *C. reinhardtii* CC-124M4 by use of the chemical mutagen, Ethylmethanesulfonate (EMS). The result showed that a total of 67 mutant strains of *C. reinhardtii* CC-124M4 was obtained from 5% survival rate. Among them, *C. reinhardtii* CC-124M4A23 gave the maximum H_2 production rate with to 235.146 ± 9.504 mL L^{-1} h^{-1} under sulfur deprivation condition. This H_2 production rate was approximately 3 folds higher than the original strain *C. reinhardtii* CC-124M4. Under high light intensity of 15,000 lux, the mutant *C. reinhardtii* CC-124M4A23 incubated in sulfur-deprived medium showed H_2 production rate with 733.572 ± 2.960 mL L^{-1} h^{-1}. This H_2 production rate was approximately 4 folds higher than that under low light intensity of 1,000 lux.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords: Mutation, Ethylmethanesulfonate, Hydrogen production, Green algae

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษจัดทำขึ้นนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม โครงงานพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คอยให้คำปรึกษาแนะนำและให้ข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่มาโดยตลอด ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการสอบโครงงานพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาตรวจสอบและให้คำแนะนำ ให้ โครงงานพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในทุกเรื่อง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพี่นักวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ทำให้เกิดผลสำเร็จในงานวิจัย

ประโยชน์และคุณค่าของโครงงานพิเศษฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ บิดา มารดา ครูอาจารย์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้สั่งสอนอบรมมาจากอดีตจนถึงปัจจุบันตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังว่า โครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียว

พิมพลอย ทุเนตร์
รัชชานนท์ นิลอรรถ
อรกนก สุขจันทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง-ฉ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ 2

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 ไฮโดรเจนและคุณสมบัติของไฮโดรเจน 4

2.1.1 คุณสมบัติของไฮโดรเจน 5

2.1.2 สมบัติทางเชื้อเพลิงของไฮโดรเจน 6

2.1.3 สมบัติการเผาไหม้ของไฮโดเจน 6

2.1.4 การจัดเก็บกาซไฮโดรเจน 7

2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต 8

2.2.1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria) 9

2.2.2 สาหร่ายสีเขียว (Green algae) 9

2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว 10

2.4 สาหร่ายสีเขียว 13

2.4.1 ลักษณะสำคัญของสาหร่ายสีเขียว 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

2.4.2 ส่วนประกอบของเซลล์สาหร่าย 14
2.4.3 การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว 16
2.5 สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* 17
2.5.1 วัฏจักรชีวิต *Chlamydomonas* sp 18
2.6 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ 19
2.6.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ 20
2.6.2. การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ 20
2.7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 22
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 24
3.1 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง 24
3.2 สารเคมี 24
3.3 อุปกรณ์ 26
3.4 วิธีการทดลอง 27
3.4.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 27
3.4.2 วิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียว*C. reinhardtii* CC-124M4 28
3.4.3 วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน 28
3.4.4 วิธีการศึกษาความเข้มข้นของแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน 29
3.4.5 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ 30
บทที่ 4 ผลวิจัยและการอภิปรายผล 31
4.1 อัตราการรอดชีวิตของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย EMS 31
4.2 ผลการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 สายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรุใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

4.3 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC124M4สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในสภาวะการขาดซัลเฟอร์ 38

4.4 ผลการศึกษาบทบาทของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M4A23 40

4.5 ผลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์กลาย CC-124M4A23 42

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 45

5.1 สรุปผลการวิจัย 45

5.2 ข้อเสนอแนะ 45

เอกสารอ้างอิง 46

ภาคผนวก 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
3.1	สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph Thermal Conductivity Detector (GC-TCD))	29
4.1	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ	32
4.2	อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่บ่มในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายหลังการให้ก๊าซอาร์กอนและบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	35
4.3	ผลผลิตไฮโดรเจนและเปอร์เซ็นต์การเพิ่มผลิตไฮโดนเจนของสาหร่ายสีเขียว *C.reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในชั่วโมงที่ 72 ของการบ่มในอาหาร TAP และอาหารที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)	39
4.4	ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ cc-124M4A23 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้สภาวะมืด (0 ลักซ์)และสภาวะความเข้มแสง1000 ลักซ์	41
4.5	ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์กลาย cc-124M4A23ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้ความเข้มแสง1,000, 2,000, 5,000,10,000, 15,000 ลักซ์	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูป		หน้า
2.1	กระบวนการสังเคราะห์แสงในสาหร่ายสีเขียว	13
2.2	คลอโรพลาสต์ (chloroplaast)	16
2.3	ลักษณะของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	18
2.4	วัฏจักรชีวิตของสาหร่าย *Chlamydomonas* sp.	19
4.1	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 ที่ถูกชักนำให้กิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ	33
4.2	การผลิตไฮโดรเจนที่ช่วงเวลาต่างๆ ของการบ่มสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจานวน 3 สายพันธุ์ ในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ	38
4.3	การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ cc-124M4A23 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้สภาวะมืดและสภาวะที่มีความเข้มแสง 1000 ลักซ์	41
4.4	การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์กลาย cc-124M4A23 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้ความเข้มแสง 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 15,000 ลักซ์	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบัน โลกของเรามีจำนวนประชากรเพิ่มสูงขึ้นทุกๆปี การเพิ่มของประชากรนี้ส่งผลให้มีความต้องการในใช้พลังงานมากขึ้น จากการวิเคราะห์ข้อมูลการบริหารพลังงานของสหรัฐฯ (United states Energy Information Administration , US-EIA) พบว่าการใช้พลังงานทั่วโลกอาจเพิ่มขึ้นถึง 56 เปอเซนต์ ภายในสิ้นปี พ.ศ. 2583 โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้พลังงานปิโตรเลียม ด้วยเหตุนี้ทำให้พลังงานขาดแคลนและมีราคาสูงขึ้น นอกจากนี้การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงปิโตรเลียมยังก่อให้เกิดปัญหาสภาวะโลกร้อนจากการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก อันได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซมีเทน เป็นต้น ทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องคิดค้นและพัฒนาพลังงานในรูปแบบใหม่ขึ้นมาทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงดั้งเดิมและการให้ความสำคัญกับการศึกษาและวิจัยพลังงานทดแทนจึงเป็นเรื่องจำเป็น พลังงานไฮโดรเจนที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตจัดเป็นพลังงานทดแทนชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจในการศึกษาวิจัยในขณะนี้ การเผาไหม้ไฮโดรเจนไม่ปลอดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซเรือนกระจกอื่นๆ ทำให้จัดเป็นพลังงานที่สะอาด มีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพจากสาหร่ายสังเคราะห์แสงโดยเฉพาะสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นระยะเวลายาวนาน ไฮโดรเจนจัดเป็นธาตุที่เบาที่สุด และพบมากที่สุด คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจนคือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย มีความหนาแน่น 0.0899 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร มีจุดหลอมเหลว -259.14 T และมีจุดเดือด -252.77 T (Kruse *et al.*, 2002) การเผาไหม้ไฮโดรเจนนั้นจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำ และไม่ก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในปัจจุบันการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพจากสาหร่ายกำลังเป็นที่ได้รับความสนใจในการศึกษาและวิจัยนิยมเป็นอย่างมาก

สาหร่ายเป็นพืชดั้งเดิมที่สามารถหาได้ง่าย มีขนาดตั้งแต่ขนาดเล็กไปจนถึงขนาดใหญ่ มีการปรับเปลี่ยนสรีรวิทยาทางชีวเคมีและโมเลกุลต่างๆ สามารถสังเคราะห์แสงและได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์และสามารถเพาะเลี้ยงและเจริญเติบโตได้ในแหล่งน้ำที่ไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ สาหร่ายนมีโครงสร้างอย่างง่าย เซลล์มีการจัดเรียงตัวที่ไม่ซับซ้อน อาจจะประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ ไม่มีเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เฉพาะ ไม่มีท่อลำเลียงราก ลำต้น และใบที่แท้จริง สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์อาหารเองได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชชั้นสูง ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว จัดเป็นสาหร่ายที่มีความพิเศษต่างจากพืชเชื้อเพลิงทั่วไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและสามารถนำเอาพลังงานจากแสงอาทิตย์มาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงได้รวดเร็วกว่าพืชทดแทนชนิดอื่นๆ สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายไม่เปลืองพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงและมีค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงดูไม่สูง มีศักยภาพในการเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และไม่มีผลกระทบต่อการเพาะปลูกพืชการเกษตรอื่นๆ สาหร่ายจัดเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (วิทวัส แจ้งเอี่ยม, 2010)

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสามารถทำได้หลายวิธี งานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นไปที่การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนจากการกลายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว การกลายพันธุ์ (Mutation) คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเซลล์ที่เกิดขึ้นกับโมเลกุลของดีเอ็นเอ และสามารถถ่ายทอดลักษณะการเปลี่ยนแปลงนั้นจากเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปยังเซลล์ลูกได้ด้วยกระบวนการแบ่งเซลล์ วิธีที่ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่ายคือการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (Mutagen) โดยในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงการก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้สารเคมี (Chemical mutagen) สารเคมีที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์มีหลายชนิด ได้แก่ เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate) และ สารโคลซิซิน (colchicine) ซึ่งสาหร่ายเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลดีเอ็นเอได้ดี (พีรนุช, 2553)

โครงงานพิเศษนี้มีความสนใจในการศึกษาการกลายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ CC-124M4 เพื่อให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพและให้ผลผลิตสูง
กว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1) เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียว

2) เพื่อคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน

3) เพื่อหาความเข้มข้นของสารเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate) ที่เหมาะสมที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการชักนำสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ CC-124 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate) นำสาหร่ายสีเขียวพันธุ์กลายที่ได้มาทำการคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่ผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด จากนั้นทำการหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ที่จะทำให้ได้ผลผลิตสูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถชักนำสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ CC-124 ให้เกิดการกลายพันธุ์และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจนและคุณสมบัติของไฮโดรเจน

ไฮโดรเจน หรือ H เป็นธาตุที่มีโครงสร้างทางเคมีไม่ซับซ้อน มีน้ำหนักอะตอมเฉลี่ย 1.00794 u (1.007825 u สำหรับไฮโดรเจน$^{-1}$) มีโปรตรอนและอิเล็กตรอนอย่างละ 1 ตัวอยู่ภายในอะตอม ประมาณร้อยละ 75 ของสสารในเอกภพมีไฮโดรเจนเป็นส่วนประกอบ เช่น น้ำเป็นส่วนผสมของโฮโดรเจนและออกซิเจน (H_2O) สารประกอบอินทรีย์หลายชนิด จำพวกไฮโดรคาร์บอนกลุ่มเชื้อเพลิง เช่น ก๊าซโซลีน ก๊าซธรรมชาติ เมทานอล และโพรเพน ก็มีไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก ไฮโดรเจนสามารถแยกได้หลายวิธี เช่น การสลายตัวด้วยความร้อนเป็นการใช้ความร้อนทำให้น้ำเดการสลายตัวได้เป็นออซิเจนและโมเลกุลของไฮโดรเจน กระบวนการเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง โดยการรับโฟตอน (Photon) จากแสงอาทิตย์ไปกระตุ้นอิเล็กตรอน (Electron) ทำให้น้ำแตกตัวเป็นก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซออกซิเจน การรีฟอร์มด้วยพลาสมา เป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไฮโดรคาร์บอน โดยอาศัยหลักการการแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระของแก๊สพาหะ (Carrier Gas) ด้วยแรงดันไฟฟ้าที่ความดันบรรยากาศ แล้วทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น การแยกสลายด้วยไฟฟ้า การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ ผ่านสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลินทรีย์ (microorganism) และ การสังเคราะห์ด้วยแสง เป็นต้น แต่ในปัจจุบันนักวิจัยเริ่มหันมาให้ความสนใจการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพจากสาหร่ายหรือแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อาศัยแสงอาทิตย์ในการเร่งกระบวนการสังเคราะห์แสงเนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย ใช้พื้นที่น้อย และมีค่าใช้จ่ายในการดูแลและเพาะเลี้ยงที่ไม่สูงและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

การสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้นครั้งแรกในต้นคริสต์ศตวรรษที่ 16 ระหว่าง ค.ศ. 1766-1781 โดยเฮนรี คาเวนดิช เป็นคนแรกที่พบว่า ก๊าซไฮโดรเจนเป็นสสารชนิดหนึ่ง เมื่อนำไปเผาไหม้โดยการผสมโลหะกับกรดแก่จะได้ผลผลิตเป็นน้ำ จึงกลายเป็นที่มาของชื่อของไฮโดรเจน ซึ่งเป็นภาษากรีก หมายถึง "ตัวก่อให้เกิดน้ำ" ซึ่งจะเกิดที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 คุณสมบัติของไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่มีน้ำหนักเบาที่สุดและมีน้ำเป็นองค์ประกอบที่สำคัญมากที่สุดของสิ่งมีชีวิตบนโลก เป็นโมเลกุลที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ ชั้นบรรยากาศของโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ppm. มีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุล เท่ากับ 436 kJ/mol (104 kcal/mol) ดังนั้นเมื่อต้องการให้ไฮโดรเจนโมเลกุลทำปฏิกิริยา จึงต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลดังกล่าว เช่น เพิ่มอุณหภูมิ ใช้สารเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น ไฮโดรเจนอะตอมประกอบด้วยนิวเคลียส์ อยู่กลาง ภายในนิวเคลียส ประกอบด้วยโปรตอน และนิวตรอน และมีอิเล็คตรอนวิ่งรอบนอก เหมือนธาตุอื่นๆ ไฮโดรเจนมี 3 ไอโซโทปขึ้นกับจำนวนโปรตอน และจำนวนนิวตรอนที่ต่างกันดังนี้

2.1.1.1. ไฮโดรเจน (Hydrogen) มี 1 โปรตอน และ มี 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 1.0078

2.1.1.2. ดิวเทอเรียม (Deuterium) มี 2 โปรตอน และ มี 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 2.0141

2.1.1.3. ตริเที่ยม (Tritium) มี 3 โปรตอน และ มี 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอมเท่าก 3.0161

ลักษณะทั่วไปของไฮโดรเจนทั้ง 3 สถานะคือ

ไฮโดรเจนในรูปของแข็ง ไม่มีสี เป็นผลึก 6 เหลี่ยม Molar Volume = 22.56 cm3/mol ไฮโดรเจนในรูปของเหลว สามารถเคลื่อนที่ได้เร็วเนื่องจากมีค่า Viscosity ต่ำ และไม่มีสี ไฮโดรเจนในรูปก๊าซ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีความเป็นพิษ ก๊าซไฮโดรเจน 1 ลิตร มีมวล 0.0898 กรัม โมเลกุลของไฮโดรเจน มี 2 รูปแบบ คือ Ortho-Hydrpgen โมเลกุลของนิวเคลียสอะตอมจะหมุนไปในทิศทางเดียวกัน ส่วน Para-Hydrogen โมเลกุลของนิวเคลียสอะตอมจะหมุนไปในทิศทางตรงกันข้าม ทำให้คุณสมบัติด้าน Thermodynamics แตกต่างกัน แต่คุณสมบัติทางเคมีไม่ต่างกัน มีอัตราส่วนความสมดุลระหว่าง Ortho-Hydrpgen : Para-Hydrogen = 3:1 ที่อุณหภูมิห้อง เรียกว่า Normal Hydrogen และรูปแบบไฮโดรเจนที่มีพลังงานต่ำจะเรียกว่า Para-Hydrogen ความร้อนจากปฏิกิริยาในการเปลี่ยน Normal Hydrogen ไปเป็น Para-Hydrogen เรียกว่า DH การละลายของไฮโดรเจนในรูปของเหลวจะเกิดขึ้นได้น้อยจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยไฮโดรเจนมีค่าการละลายที่ 273.15 °K = 1.755×10^{3} mol% ของการละลายของไฮโดรเจนในโลหะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 สมบัติทางเชื้อเพลิงของไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นแก๊สที่มีความไวต่อปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีทางขั้วแอโนด ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนหรืออากาศได้ผลผลิตคือน้ำ จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นแก๊สเชื้อเพลิงได้ ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยไฮโดรเจนมักถูกเก็บรักษาไว้ในรูปไฮโดรเจนเหลว แต่เนื่องจากในธรรมชาติพบว่าก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาณน้อยจึงต้องมีการผลิตไฮโดรเจนขึ้นจากแหล่งเชื้อเพลิงต่างๆ โดยปกติไฮโดรเจนจะมีคุณสมบัติเฉพาะตัว มีจุดเดือดของเชื้อเพลิงที่สภาวะปกติ 20 องศาเคลวินหรือ -253.15 องสาเซลเซียส และมีค่าพลังงานความร้อน 120 KJ/g

2.1.3 สมบัติการเผาไหม้ของไฮโดเจน

ก๊าซไฮโดรเจน (ไดไฮโดรเจนหรือโมเลกุลไฮโดรเจน) มีความไวไฟสูงและจะเผาไหม้ในอากาศที่มีช่วงความเข้มข้นกว้างมากระหว่างร้อยละ 4 ถึง 75 โดยปริมาตร เอนทัลปีของการเผาไหม้สำหรับไฮโดรเจนคือ -286 กิโลจูลต่อโมล (kJ/mol)

$$2\ H_2\ (g) + O2\ (g) \longrightarrow 2\ H_2O\ (l) + 572\ kJ\ (286\ kJ/mol)$$

ก๊าซไฮโดรเจนก่อตัวเป็นสารผสมจะระเบิดเมื่อทำปฏิกิริยากับอากาศที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 -74 และจะระเบิดเมื่อทำปฏิกิริยากับคลอรีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 - 95 สารผสมนี้จะระเบิดขึ้นเองตามธรรมชาติเมื่อโดนความร้อนหรือแสงอาทิตย์ ประกายไฟ อุณหภูมิจุดระเบิดเองของไฮโดรเจนในอากาศ คือ 500 °C เปลวไฟของไฮโดรเจนและออกซิเจนบริสุทธิ์จะปลดปล่อยแสงอัลตราไวโอเลตออก มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า เปรียบเทียบได้จากเปลวไฟสีจางของเครื่องยนต์หลักกระสวยอวกาศกับเปลวไฟที่มองเห็นได้ชัดเจนของจรวดเชื้อเพลิงแข็งกระสวยอวกาศ การตรวจจับการรั่วไหลของไฮโดรเจนที่กำลังเผาไหม้อาจต้องใช้อุปกรณ์ตรวจจับเปลวไฟ หากเกิดการรั่วไหลอาจจะเกิดอันตรายได้มาก โดยไฮโดรเจนสามารถเกิดปฏิกิริยาตามธรรมชาติอย่างรุนแรงที่อุณหภูมิห้องกับคลอรีนและฟลูออรีน เกิดเป็นเฮไลด์ของไฮโดรเจน คือ ไฮโดรเจนคลอไรด์กับไฮโดรเจนฟลูออไรด์ตามลำดับ ซึ่งเป็นกรดอันตราย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 การจัดเก็บก๊าซไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนส่วนใหญ่จะถูกเก็บไว้ในในถังในรูปแบบของเหลว ก๊าซ ของแข็ง หรือในรูปสารประกอบเคมี แต่โดยทั่วไปจะนิยมเก็บในรูปแบบก๊าซซึ่งจะต้องทำการเก็บในถังเก็บที่มีปริมาตรใหญ่เนื่องจากก๊าซไฮโดรเจนมีน้ำหน้ำเบาและมีความหนาแน่นน้อยที่ความดันบรรยากาศ ดังนั้นในการกักเก็บก๊าซไฮโดรเจนให้ได้ปริมาณมากจึงต้องมีอัดความดันที่สูงเข้าไปเพื่อลดปริมาตรของถังเก็บ

การจัดเก็บไฮโดรเจนมีดังนี้

2.1.4.1 การเก็บในรูปของเหลว ทำการเก็บในถังความดันที่มีอุณหภูมิต่ำมากถึง -273 องศาเซลเซียส จะต้องมีการปล่อยก๊าซทิ้งเพื่อควบคุมความดันในถังเก็บ เสียค่าพลังงานไฟฟ้ามากในการทำให้อุณหภูมิต่ำซึ่งสูงถึงหนึ่งในสามของพลังงานไฮโดรเจน

2.1.4.2 การเก็บไว้ในท่อถ่านนาโน (Carbon nanotube) โดยจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความดัน ใช้การดูดซับของถ่านที่อุณหภูมิต่ำ 70 เคลวิน ความดัน 40 บาร์ จะเก็บไฮโดรเจนได้ประมาณ5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

2.1.4.3 การเก็บในรูปสารประกอบเคมี โดยใช้โลหะไฮดรายด์ ต้องคำนึงถึงน้ำหนักถังและอุณหภูมิที่เหมาะสม โลหะไฮดรายด์สามารถเก็บไฮโดรเจนได้ประมาณ 2-3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักถัง จึงเป็นปัญหาในเรื่องน้ำหนักถังเก็บ การบรรจุไฮโดรเจนเข้าถังเก็บต้องมีการระบายความ ร้อนออกจากถังเก็บ และในการจ่ายไฮโดรเจนออกจากถังเก็บก็ต้องให้ความร้อนกับโลหะไฮดรายด์ถึงจะได้ก๊าซไฮโดรเจนออกมาที่แต่ละสภาวะของอุณหภูมิและความดัน

2.1.4.4 การเก็บในรูปสารประกอบไฮดรายด์ จำพวกโซเดียม โพแทสเซียม หรือลิเทียม โซเดียมไฮดรายด์ (NaH) สามารถคายก๊าซไฮโดรเจนด้วยการทำปฏิกิริยากับน้ำได้ สารประกอบโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และก๊าซไฮโดรเจน และในทางกลับกันเมื่อนำโซเดียมไฮดรอกไซด์มาให้ความร้อนก็จะได้โซเดียมไฮดรายด์กับ ก๊าซออกซิเจนกลับมาใหม่ ดังนั้นโซเดียมไฮดรายด์จึงเป็นพาหะพลังงาน ซึ่งสามารถอัดเม็ดและเคลือบผิวกันน้ำเพื่อสะดวกในการขนส่ง โซเดียมไฮดรายด์สามารถเก็บไฮโดรเจนได้ประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

2.1.5 ประโยชน์ของไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ และใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิง ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5.1 การใช้ไฮโดรเจนในอุตสาหกรรมอาหาร มีการใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นตัวทำปฏิกิริยาโดยมีโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น นิกเกิล ทองคำขาว หรือแพลลาเดียม โดยที่ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 150-180 องศาเซลเซียสภายใต้ความดันสูง กระบวนการไฮโดรจีเนชันเป็นกระบวนการที่คายพลังงานออกมามาก ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันในน้ำมันพืชสามารถให้ความร้อนได้ถึง 25 กิโลคาลอรีต่อโมล ซึ่งเพียงพอที่จะเพิ่มอุณหภูมิของน้ำมันได้หยดละ 1.6 ถึง 1.7 องศาเซลเซียส นิยมใช้ไฮโดรเจนในอุตสาหกรรมอาหารประเภทไขมัน เช่น การทำเนยเทียม เนื่องจากสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตให้กับผู้ผลิต และช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์

2.1.5.2 การใช้ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์ เครื่องยนต์ที่เผาไหม้ด้วยไฮโดรเจนจะให้กำลังงานสูงกว่าเครื่องยนต์ที่ใช้แก๊สโซลีนและเชื้อเพลิงดีเซล ไม่ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกสู่บรรยากาศ มีอายุการใช้งานสูงสุดของระบบเซลล์เชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์ประมาณ 3,000-5,000 ชั่วโมง การใช้ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์เผาไหม้ภายในให้ประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้น้ำมันเบนซินเป็นเชื้อเพลิง

2.1.5.3 ด้านการบินและอวกาศสหรัฐ ในปีค.ศ. 1970 องค์กรบริหารการบินและอวกาศสหรัฐอเมริกา (NASA) ได้ใช้ไฮโดรเจนเหลวในการขับเคลื่อนกระสวยอวกาศและจรวดอื่นๆ เข้าสู่วงโคจร ซึ่งผลพลอยได้จากการเผาไหม้ไฮโดรเจน ยังทำให้นักบินอวกาศและลูกเรือได้น้ำบริสุทธิ์เอาไว้ดื่มอีกด้วย

2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต

ไฮโดรเจนที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตอาจเรียกกว่า “ไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen)” การผลิตไฮโดรเจนนี้เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด ยกตัวอย่าง เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงซึ่งสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก สาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้แสงและน้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจน และไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดยังสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้แก่

2.2.1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีคลอโรฟิลล์ชนิดที่เรียกว่า แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (Bacteriochlorophyll) ในการะบวนการสังเคราะห์แสงจุลินทรีย์เหล่านี้จะใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน และไม่ผลิตก๊าซออกซิเจนเปนผลิตภัณฑ์

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมี 2 ชนิด คือ

2.2.1.1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ไม่สะสมกำมะถัน แบคทีเรียสังเคราะห์ที่ไม่สะสมกำมะถันหรือแบคทีเรียสีม่วง (Purple photosynthetic bacteria) มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอ หรือแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ช่วยดูดพลังงานแสง ซึ่งพบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติใน ชั้นน้ำที่มีแสงสว่างส่องถึงมีสารอินทรีย์ และพบการรวมตัวกันเป็นกลุ่มในแหล่งน้ำที่ไม่มีออกซิเจนมี แสงเล็กน้อย ในแหล่งน้ำจืดที่มีซัลไฟด์อยู่จะพบน้อยมาก แต่บางชนิดก็อาศัยอยู่ได้ในที่ที่มีปริมาณซัลไฟด์สูง นอกจากนี้ยังพบได้ในพื้นดิน สระน้ำ คลอง หรือแหล่งน้ำที่สกปรก เช่น บ่อบำบัดน้ำ เสีย ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์สูง แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ไม่สะสมกำมะถัน เช่น *Rhodopseudomonas capsulate* , *R. sphaeroldes*

2.2.1.2 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สะสมกำมะถัน แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สะสมกำมะถันหรือแบคทีเรียสีเขียว (Green photosynthetic bacteria) มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ซี หรือแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ดี แต่มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอ น้อย รงควัตถุที่ใช้สังเคราะห์แสงจะอยู่ภายในเวซิเคิลที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สะสมกำมะถัน เช่น *Chlorodium*, *Prothecochloris* , *Chloroflxus*

2.2.2 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ โดยใช้เพียงแสงและน้ำเป็นแหล่งพลังงานและอิเล็กตรอนโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงที่เกิดขึนในบริเวณคลอโพลาสต์ของเซลล์ นอกจากนี้สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนทั้งในที่มืดและที่มีแสง สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlorella* sp., *Chamydomonas* sp., *Codium* sp. เป็นต้น ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นแสงต่ำเซลล์จะเกิดการกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อความเข้มข้นแสงสูงขึ้นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถูกยับยั้งด้วยออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากการะบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้ลดลง การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยสาหร่ายสีเขียวจึงจัดเป็น Photohydrogen production

2.2.3 ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ประเภทโปรคาริโอต ที่สังเคราะห์แสงแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน (Oxygenic phototrophic prokaryote) ไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ และมีคลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุเหมือนกับในสาหร่ายสีเขียว ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนจาก 2 กระบวนการ คือ

2.2.3.1 กระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) การตรึงไนโตรเจนเป็นการรีดิวซ์ไนโตรเจนจากบรรยากาศและเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนียโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และได้ไฮโดรเจนเป็นผลผลิตพลอยได้

2.2.3.2 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthetic) การสังเคราะห์แสงเป็นการนำเอาแสงมาใช้เป็นแหล่งพลังงานและใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนที่แยกออกจากกัน ซึ่งจะสามารถแก้ปัญหาเนื่องจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจากออกซิเจนที่เป็นผลิตภัณฑ์ของกระบวนการสังเคราะห์แสง ในขั้นตอนแรก ไซยาโนแบคทีเรียจะใช้พลังงานแสงผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงที่หนึ่งและระบบแสงสองร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตเก็บสะสมเป็นชีวมวลของสาหร่าย และในขั้นตอนที่สอง ชีวมวลของสาหร่ายจะถูกนำไปใช้ในการสร้างไฮโดรเจน

2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างอย่างง่าย มีการจัดเรียงตัวของเซลล์ไม่ซับซ้อน ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ ไม่มีเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เฉพาะ ไม่มีท่อลำเลียงรากลำต้น และใบที่แท้จริง สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวจัดเป็นแพลงค์ตอนพืชกลุ่มใหญ่ที่สุดในบรรดาแพลงค์ตอนพืชทั้งหมด สาหร่ายสีเขียวสามารถสร้างอาหารได้เอง โดยอาศัยกระบวการสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสงเช่นเดียวกับพืชชั้นสูง ในบรรดาสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้ พบว่าเป็นพวกสาหร่ายประมาณ 50 – 60 เปอร์เซ็นต์

สาหร่ายสีเขียวมีความพิเศษที่แตกต่างจากพืชเชื้อเพลิงทั่วไป คือ มีความรวดเร็วในระบบสังเคราะห์แสง สามารถนำเอาพลังงานจากแสงอาทิตย์มาใช้ในการสังเคราะห์แสงได้อย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับพืชทดแทนอื่นๆ จึงไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงมาก มีศักยภาพในการเพิ่มจำนวนสูง สามารถเพาะเลี้ยงได้เป็นจำนวนมากโดยไม่ยุ่งยาก ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงไม่เปลือง และไม่มีผลกระทบต่อการเพาะปลูกพืชการเกษตรอื่นๆ นอกจากนี้ยังให้ผลผลิตพลอยได้มูลค่าสูงอื่นๆ เช่น สามารถทำเป็นปุ๋ย อาหารสัตว์ สารปฏิชีวนะ เครื่องสำอาง หรือยารักษาโรค

ในปี ค.ศ. 1939 นายฮานส์ แกฟฟ์รอน ได้ทำการศึกษาเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวเป็นคนแรกโดยวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะที่ไม่มีอากาศและสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีและไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์ จากการทดลองพบว่า สาหร่ายที่อยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะมีการสร้างก๊าซไฮโดรเจนขึ้น โดยผลิตได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง การเพาะเลี้ยงของสาหร่ายสีเขียวแบ่ง ออกเป็น 2 แบบ คือ โฟโตออโตโทรฟิค (Photoautotrophic) และโฟโตเฮเทอโรโทรฟิค (Photoheterotrophic)

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ โฟโตออโตโทรฟิคเป็นกระบวนการที่น่าสนใจ เนื่องจากแหล่งพลังงานที่ใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนคือน้ำและแสง มีราคาถูกและหาได้ง่าย นอกจากนี้ยังไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ แต่กระบวนการนี้มีปัญหาจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนซึ่งก็คือไฮโดรจิเนส โดยออกซิเจน ในขณะที่เกิดกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจะมีออกซิเจนเกิดขึ้นในเวลาเดียวกัน ถ้าจะเลือกสาหร่ายที่อยู่ในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิคมาใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะต้องทำการกำจัดออกซิเจนอยู่ตลอดเวลาอย่างรวดเร็ว ซึ่งไม่เหมาะสมในเชิงปฏิบัติ

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีเหล็กและนิกเกิล พบได้ในคลอโรพลาสต์ ดังที่ได้กล่าวมาการใช้แสงเป็นพลังงานในการทำงานของระบบแสงสองทำให้นำเกิดการแตกตัวได้เป็น อิเล็คตรอน โปรตอน และออซิเจน อิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำจะถูกขนส่งด้วยตัวรับต่างๆในกระบวนการ จนมาถึงตัวรับตัวสุดท้ายในระบบแสงหนึ่งคือ เฟอริด็อกซิน (ferredoxin (Fd)) โดยในสภาวะที่มีอากาศเฟอร์รีดอกซินจะส่งอิเล็กตรอนไปทำการรีดิวซ์ NADP+ มีเอนไซม์เฟอริดอกซินเอ็นเอดีพีรีดักเทส (FNR)เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ส่งผลให้เกิดการ

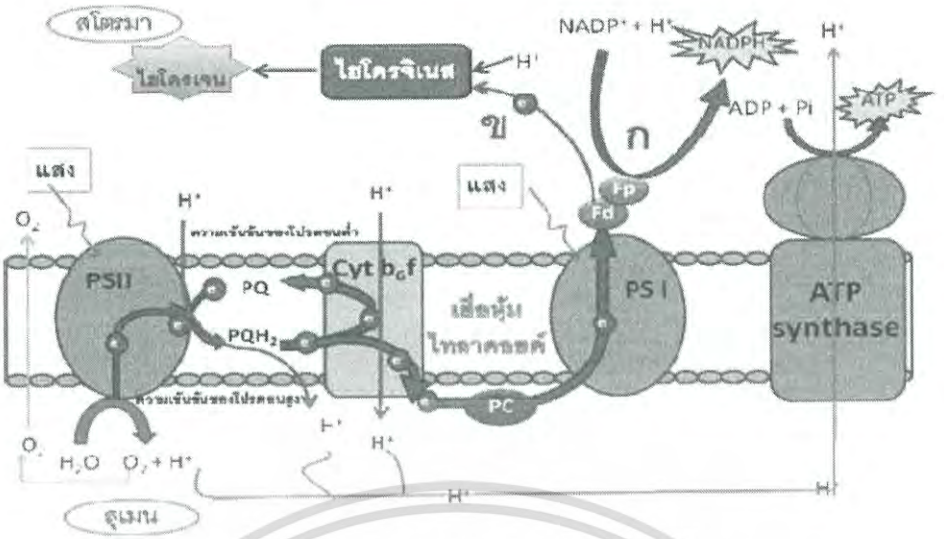
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิต NADPH ซึ่งทำปฏิกิริยากับ ATP และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะได้คาร์โบไฮเดตรเป็นผลิตภัณฑ์ ในขณะเดียวกัน หากเกิดในสภาวะที่ไม่มีอากาศเฟอริด็อกซินจะขนส่งอิเล็คตรอนไปทำปฏิกิริยากับโปรตอน โดยมีเอนไซม์ไฮโดจิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์

2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว

การสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่าย เริ่มจากการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ระบบแสง 2 โดยจะได้รับพลังงานแสง เพื่อกระตุ้นให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาของระบบแสง 2 หลุดออกไปและยังทำให้น้ำเกิดการแตกตัวได้เป็น ออกซิเจน อิเล็กตรอน และโปรตอน อิเล็กตรอนที่ได้จากน้ำจะเข้าไปแทนที่อิเล็กตรอนที่หลุดออกมาจากระบบแสง 2 และจะทำการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่หลุดออกมาไปยังพลาสโตควิโนน (Plastoquinone) ส่งต่อไปยังไซโตโครม และไหลวนกลับมาที่พลาสโตควิโนน ในขณะเดียวกัน โปรตอนก็จะวิ่งลงมาผ่านพลาสโตควิโนนพร้อมกับอิเล็กตรอน โปรตอนจะวิ่งจากสโตรมาซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตอนต่ำ (Low H+) ไปยังลูเมนที่ความเข้มข้นของโปรตอนสูงกว่า (High H+) ส่วนอิเล็กตรอนก็จะเคลื่อนตัวต่อไปโดยมีพลาสโตไซยานิน (plastocyanin) มารับไปยังระบบแสง 1 ในการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนนี้ได้สูญเสียพลังงานเป็นอย่างมาก เพื่อใช้ในการปั๊มโปรตอนจากสโตรมาเข้าสู่ลูเมน จึงต้องมีการกระตุ้นพลังงานด้วยแสงใหม่อีกครั้งในระบบแสง 1 การทำงานของระบบแสง 1 จะคล้ายกับระบบแสง 2 คือ เมื่อได้รับพลังงานจากแสงแล้วก็จะทำให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาของระบบแสง 1 หลุดออกมามายังสโตรมาและอิเล็กตรอนที่วิ่งมาจากระบบแสง 2 ก็จะมาแทนที่อิเล็กตรอนที่หลุดไป หลังจากนั้นอิเล็กตรอนที่หลุดออกมาจะเคลื่อนที่ไปยังเฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) แล้วรีดิวซ์ NADP+ ให้กลายเป็น NADPH โดยเอนไซม์เฟอร์รีดอกซินเอ็นเอดีพีรีดักเตส (ferredoxin NADP reductase) โปรตอนที่อยู่ในลูเมนจะค่อย ๆ เคลื่อนขึ้นไปใน ATP synthase และได้ ATP ออกมา ซึ่ง NADPH ที่ได้จะทำปฏิกิริยากับ ATP และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ได้เป็นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะนำไปใช้เป็นอาหารและเก็บสะสมต่อไป (รูปที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 กระบวนการสังเคราะห์แสงในสาหร่ายสีเขียว

(ที่มา: file:///C:/Users/PG/Downloads/Documents/68530-Article%20Text-160627-1-10-20161007.pdf)

2.4 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวจัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Division Chlorophyta) มีจำนวนทั้งหมดประมาณ 17,500 สปีชีส์ มักพบในน้ำจืดมากกว่าน้ำเค็ม สาหร่ายสีเขียวมีลักษณะคล้ายพืช ทั้งในแง่โครงสร้าง ผนังเซลล์และส่วนประกอบของสารสี สาหร่ายสีเขียวจะมีรงควัตถุในกลุ่มคลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี ในสัดส่วนเดียวกับพืชชั้นสูง อีกทั้งยังมีรงควัตถุเบต้าแคโรทีนและแซนโทฟิลล์อีกด้วย (Gupta and Abu-Ghannam, 2011; Pangestuti and Kim, 2011) นอกจากนี้ ยังพบรงควัตถุ แอสตาแซนธิน (Astaxanthin) ซึ่งเป็นรงควัตถุสีแดงเข้ม คล้ายสีของทับทิมในสาหร่ายสีเขียวอีกด้วย (Yuan et al., 2011) สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่พบในแหล่งน้ำจืด บางชนิดอยู่ร่วมกับราเป็นไลเคน (Lichens) สาหร่ายสีเขียวเกือบทุกชนิดมีระยะอาศัยเพศ โดยเซลล์สืบพันธุ์ใช้แฟลกเจลลา (Flagella) 2 เส้นในการเคลื่อนที่ เชื่อว่าสาหร่ายสีเขียวเป็นบรรพบุรุษทางวิวัฒนาการของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 ลักษณะสำคัญของสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวมีลักษณะสำคัญดังนี้

2.4.1.1 สารสีสังเคราะห์แสง (Photosynthetic pigments) สาหร่ายสีเขียวมีสารสีหลักคือ คลอโรฟิลล์เอ, คลอโรฟิลล์ บี และสารสีประกอบ ได้แก่ แคโรทีน และแซนโธฟิล ซึ่งเป็นสารสีเช่นเดียวกับสารสีที่พบในพืชชั้นสูง

2.4.1.2 ผนังเซลล์ สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่มีผนังเซลล์ 2 ชั้น (แต่บาง Class ก็ไม่มีผนังเซลล์ มีเยื่อหุ้มแทน) ผนังชั้นนอกเป็นพวกเพคติน ผนังชั้นในเป็นพวกเซลลูโลส

2.4.1.3 แฟลกเจลลา (Flagella) แฟลกเจลลาพบเฉพาะในสาหร่ายสีเขียวที่เคลื่อนไหวได้ แฟลกเจลลาเป็นชนิดเรียบคล้ายแส้ (Acronematic type) จำนวนมี 1, 2, 4, 8 หรือเป็นวง ถ้ามีแฟลกเจลลามากกว่า 1 เส้น แฟลกเจลลาจะเท่ากันทุกเส้น

2.4.1.4 ผลผลิตจากการสังเคราะห์แสง อาหารสะสมของสาหร่ายสีเขียวคือ แป้ง โดยจะสะสมในส่วนของเซลล์ที่เรียกว่า ไพรีนอยด์ แป้งประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพคติน

2.4.1.5 รูปร่างของคลอโรพลาสต์ สารสีอยู่ในออร์กาแนลที่มีรูปร่างแน่นอนเรียกว่า คลอโรพลาสต์ คลอโรพลาสต์มีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกันหลายรูปแบบ เช่น เป็นรูปถ้วย เป็นวงรอบเซลล์ รูปเกือกม้า เป็นตาข่าย เป็นขดเกลียว แฉกรูปดาว หรือเป็นแถบข้างเซลล์

2.4.1.6 การจัดกลุ่มของเซลล์ สาหร่ายสีเขียวมีทั้งเป็นเซลล์เดียว กลุ่มเซลล์ หรือต่อเป็นเส้นสาย

2.4.2 ส่วนประกอบของเซลล์สาหร่าย ประกอบด้วยโครงสร้าง 4 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่

2.4.2.1 ผนังเซลล์ (Cell wall)

ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วยสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต บางชนิดเป็นพวกซิลิเกต บางชนิดประกอบด้วย โปรตีน ซึ่งมีหินปูน เหล็ก หรือไคตินหุ้มอยู่ โดยทั่วไป สาหร่ายจะมีผนังเซลล์ 2 ชั้น โดยผนังชั้นนอกจะเป็นสารพวกเพกติน มีลักษณะอ่อนนิ่ม เป็นเมือก ส่วนผนังชั้นในเป็นสารพวกเซลลูโลส ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงกับเซลล์ ทำให้เซลล์คงรูปอยู่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.2 นิวเคลียส (Nucleous)

นิวเคลียสเป็นส่วนที่สำคัญที่สุดของเซลล์ สาหร่ายบางชนิดจัดเป็นพวกโปรคาริโอต (Prokaryote) ซึ่งจะไม่มีนิวเคลียสที่แท้จริง โดยเก็บดีเอ็นเอไว้ในนิวคลอยด์ (Nucleoid) และออร์แกแนลล์ไม่มีเยื่อหุ้ม ส่วนสาหร่ายชนิดที่เป็นยูคาริโอต (Eukaryote) จะมีนิวเคลียสที่แท้จริง นั่นคือ ดีเอ็นเอจะถูกเก็บไว้ในออร์แกแนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม ทำให้โครโมโซมซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากอยู่ภายในนิวเคลียส ไม่ออกมาปะปนกับออร์แกเนลล์อื่นๆ ที่อยู่ ในไซโทพลาสซึม

2.4.2.3ไซโทพลาสซึม(Cytoplasm)

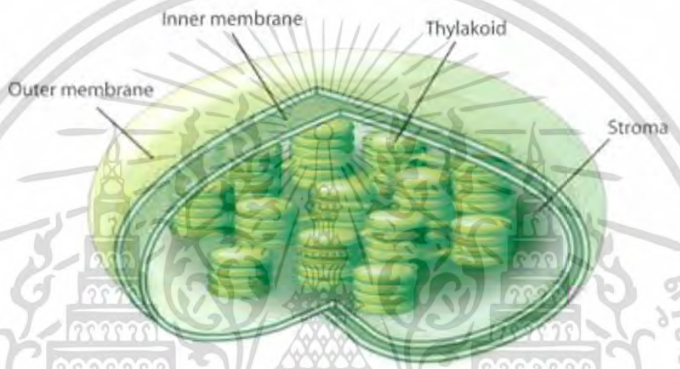
ไซโทพลาสซึมประกอบด้วยน้ำ สารประกอบเคมีที่จำเป็น และออร์แกเนลล์ต่างๆ เช่น พลาสติด (Plastid) ซึ่งเป็นแหล่งรวมของรงควัตถุต่างๆ ในเซลล์ หากพลาสติดมีคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) จะให้สีเขียวเรียกคลอโรพลาสต์ (Chloroplast) แต่ถ้ามีแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) จะให้สีเหลือง ส้ม แดง เรียกโครโมพลาสต์ (Chromoplast) ไพรีนอยด์ (Pyrenoid) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์และสะสมแป้ง สติกมา (Stigma) พบในเซลล์ที่เคลื่อนไหวได้ และแวคิวโอล (Vacuole) ทำหน้าที่ขับน้ำและของเสียออกจากเซลล์ ฯลฯ

2.4.2.4 คลอโรพลาสต์ (Chloroplaast)

คลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น คือ เยื่อหุ้มชั้นนอก (Outer membrane) และเยื่อหุ้มชั้นใน (Inner membrane) (รูปที่ 2.1) เยื่อหุ้มชั้นนอกมีลักษณะเรียบและเป็นตัวควบคุมการผ่านของสารในไซโตพลาซึมกับคลอโรพลาสต์ เยื่อหุ้มชั้นในวางขนานกับเยื่อหุ้มชั้นนอก และมีส่วนที่ยื่นเว้าเข้าข้างในกลายเป็นลาเมลลา (Lamella) ลาเมลลาเป็นเยื่อบางๆ เรียงซ้อนกัน และขนานกันเป็นแผ่นซึ่งลอยอยู่ในของเหลวที่เรียกว่า สโตรมา (Stroma) หรือเมทริกซ์ (Matrix) ซ้อนกันเป็นตั้งเรียกทั้งตั้งว่า กรานุม (Granum) หลายๆ กรานุมรวมกันเรียกว่า กรานา (Grana) และเรียกลาเมลลาแต่ละแผ่นในกรานุมว่า ไทลาคอยด์ (Thylakoid) (รูปที่2.1) ในแต่ละกรานุม จะมีแผ่นไทลาคอยด์ตั้งแต่ 10-100 แผ่น ซึ่งจำนวนจะแตกต่างกันตามชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่น สาหร่ายสีแดงมีไทลาคอยด์แผ่นเดียว สาหร่ายสีเขียวแกมเหลืองหรือสีน้ำตาลแกมเหลืองมีไทลาคอย์เป็นคู่ จำนวนกรานามีตั้งแต่ 40-60 อันใน 1 คลอโรพลาสต์ กรานามีส่วนของเมมเบรนยื่นออกไปเชื่อมกับกรานาอื่น ส่วนที่เชื่อมกันนี้เรียกว่า สโตรมาลาเมลลา (Stroma lamella) หรืออินเตอร์กรานุมลาเมลลา (Intergranum lamella) ส่วนของลาเมลลาประกอบด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ซึ่งมีคลอโรฟิลล์และรงควัตถุอื่น ๆ เช่น แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ติดอยู่บนแผ่นไทลาคอยด์และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีแกรนูลอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีขนาดแตกต่างกัน สำหรับแกรนูลที่มีขนาดใหญ่ภายในมีกลุ่มของรงควัตถุระบบแสงหนึ่ง และรงควัตถุระบบแสงสอง แกรนูลเหล่านี้จึงทำหน้าที่รับพลังงานแสงทำให้อิเล็กตรอนมีพลังงานสูงขึ้น สำหรับแกรนูลขนาดเล็กเป็นที่อยู่ของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาที่ใช้แสง นั่นคือ เยื่อหุ้มลาเมลลาหรือเยื่อหุ้มไทลาคอยด์เป็นที่อยู่ของระบบแสง ที่ใช้ในการดูดพลังงานแสง ส่วนในสโตรมา มีเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาไม่ใช้แสง (Dark reaction) หรือปฏิกิริยาตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ของการสังเคราะห์ด้วยแสง รวมทั้งมี DNA ของตัวเอง จำนวน DNA มีน้อยมาก แต่ก็เพียงพอ ที่จะใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนของ คลอโรพลาสต์



รูปที่ 2.2 คลอโรพลาสต์ (chloroplaast)

(ที่มา :https://sites.google.com/a/samakkhi.ac.th/brainbio/vacuole/mitochondria/chloroplast)

2.4.3 การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวมีการสืบพันธุ์ 2 แบบ คือ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและแบบอาศัยเพศ

2.4.3.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction) การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีหลายวิธี ได้แก่ การแบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์ การแตกตัวของกลุ่มเซลล์ทำให้ได้เซลล์เล็กๆ จำนวนมาก การขาดท่อนพบในพวกเส้นสาย โดยแต่ละท่อนที่ขาดออกสามารถเจริญเติบโตเป็นสายใหม่ได้ต่อไป การสร้างอะคินีต (Akinete) พบเฉพาะในพวกเส้นสายโดยอะคีนีตเป็นเซลล์ที่งอกออกมาและเจริญเป็นต้นใหม่ได้ และการสร้างสปอร์ซึ่งมักเกิดจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมอย่างกะทันหัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual reproduction) การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศทำได้โดยสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่า แกมีต (Gamete) แยกเป็นเพศผู้และเพศเมีย หากแกมีตคนละเพศรวมตัวกันจะได้ไซโกต (Zygote) หลังจากนั้นไซโกตจะสังเคราะห์แสงและสะสมอาหารไว้ในรูปของแป้ง เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม ไซโกตจะเจริญและงอกเป็นต้น

2.5 สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*

สาหร่ายสีเขียวสามารถจัดจำแนกตามอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Division: Chlorophyta

Class: Chlorophyceae

Order: Chlamydomonadales

Family: Chlamydomonadaceae

Genus: *Chlamydomonas*

Species: *C. reinhardtii*

สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นสาหรายเซลล์เดียวที่มีความยาวประมาณ 10 ไมครอน และมีความกว้างประมาณ 3 ไมครอน มีแฟลกเจลลา 2 เส้นดานหนาทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่ (รูปที่ 2.1) มีคลอโรพลาสตขนาดใหญ่หนึ่งอันซึ่งกินเนื้อที่ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ในเซลล (Rochaix, 1995) สาหร่าย *C. reinhardtii* มี eye spot อยู่ที่ขอบดานหนึ่งของคลอโรพลาสต ทำหนาที่ชวยรับแสงและทำใหเซลลรับรูวา ควรจะเคลื่อนที่ไปยังทิศทางใด สาหรายชนิดนี้สามารถเลี้ยงไดงายในหองปฏิบัติการ ทั้งในอาหารเหลวและอาหารวุน โดยสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ใช้แสงเปนแหลงพลังงานอยางเดียว (Photoautotrophic) หรือใชแหลงคาร์บอนอินทรีย์ในรูปของอะซีเตทในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Heterotrophic) โดยทั่วไปเซลล์อยู่ในรูปของแฮพลอยดซึ่งทำให้สามารถศึกษาฟโนไทปไดงาย เซลลจะมีรูปแบบการสืบพันธุเปน mating type + (mt+) หรือ mating type – (mt-) อยางใดอยางหนึ่งตลอดชีวิต ซึ่งจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และสามารถติดตามการถายทอดลักษณะในรุนลูกได้

เอกสารนี้ [illegible] ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.3 ลักษณะของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

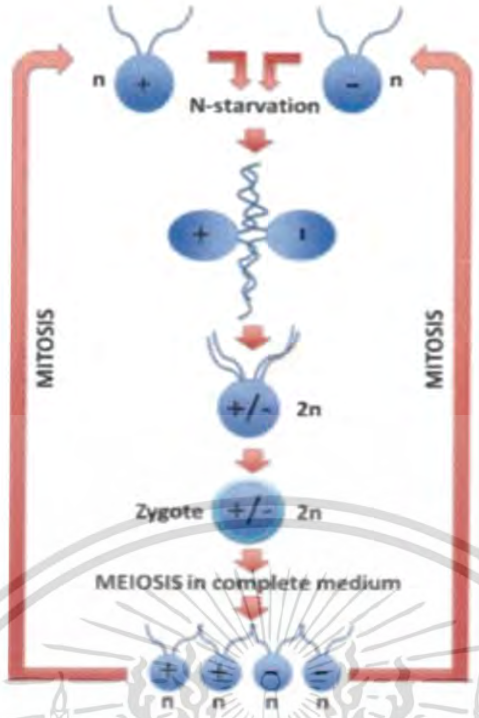
(ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Chlamydomonas_reinhardtii#

/media/File:Chlamydomonas6-1.jpg)

2.5.1 วัฏจักรชีวิต *Chlamydomonas* sp.

วัฏจักรชีวิตของ *Chlamydomonas* sp. เริ่มจากเซลล์ในสภาพแฮพลอยด์ซึ่งจะแบง เซลล แบบไมโทซิส แต่เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะการเจริญที่ไม่เหมาะสม เช่น ขาดธาตุไนโตรเจน เซลลจะเขาสู กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ (Gametogenesis) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนให้เซลลกลายเปนเซลลสืบพันธุ (Gamete) โดยแตละเซลลจะมีการสราง Mating ring ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนแอกติน (Actin) อยู่ใต เยื่อหุมเซลล หลังจากนั้น จะหลั่ง Agglutinin ซึ่งเป็นสารจำพวกไกลโคโปรตีนเพื่อกระตุนการจับกัน ของแฟลกเจลลาระหวางเซลล์ที่มี Mating type ตรงข้ามกัน โดยเริ่มจากการใช ปลายของ แฟลกเจลลามาแตะกันจนกระทั่งแฟลกเจลลาของทั้งสองเซลลสานเขาด้วยกันทั้งสาย เซลล์ที่เขามาอยู ชิดกันจะหลั่งเอนไซม Autolysin เพื่อยอยผนังเซลล ทำให้เซลล์ทั้งสองสามารถรวมตัวกันกลายเป็น เซลลเดียวที่มีแฟลกเจลลา 4 สาย เมื่อแฟลกเจลลาสลายไป เซลลจะสรางผนังเซลล์ที่มีความหนาเป็น พิเศษเพื่อปกป้องไซโกตซึ่งอยู่ในรูปดิพลอยด์ เมื่อสภาวะแวดลอมเหมาะสม ไซโกตจะแบงเซลล์ไมโอ-ซิสเกิดเป็นเซลลแฮพลอยด์ 4 เซลล ซึ่งแบงเซลลแบบไมโทซิสต่อไป (รูปที่ 2.3) (Harris, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 วัฏจักรชีวิตของสาหร่าย *Chlamydomonas* sp.

ที่มา: อัญชลี, 2554

2.6 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต อาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสิ่งมีชีวิตที่เป็นลักษณะใหม่ๆแตกต่างจากลักษณะเดิม ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการและมีประโยชน์ในการช่วยเพิ่มความแปรปวนในสิ่งมีชีวิต การกลายพันธุ์สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ

การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆ มีความถี่ในการเกิดการกลายพันธุ์ต่ำ สาเหตุของการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติเกิดขึ้นเองโดยไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอน ซึ่งอาจเกิดจากองค์ประกอบทางกรรมพันธุ์วิทยาของสิ่งมีชีวิต อาหาร อุณหภูมิ รังสีในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ หรือสิ่งก่อกลายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติโดยที่มนุษย์ไม่ได้ชักนำให้เกิด

2.6.2 การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยในการปรับปรุงผลผลิต ทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณให้ได้ลักษณะใหม่ๆ หรือลักษณะตามที่ต้องการ (Muthusamy and Jayabalan, 2011) วิธีการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำสามารถทำได้ด้วยกระบวนการทางกายภาพและทางเคมีดังนี้

2.6.2.1 การกลายพันธุ์ทางกายภาพ

สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ (Physical mutagen) ได้แก่ รังสีต่างๆ เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet radiation) รังสีแกมมา (Gamma radiation) อนุภาคนิวตรอน เป็นต้น รังสีอัลตราไวโอเลตเป็นรังสีที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงสายพันธุ์ เนื่องจากเป็นวิธีการกลายพันธุ์ที่ทำได้ง่าย และมีประสิทธิภาพสูง การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของสาหร่ายสีเขียวเกิดจากการที่ดีเอ็นเอของสาหร่ายดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254-260 นาโนเมตร พลังงานที่ดูดซับไว้นี้ส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเบสพิวรีนและไพริมิดีน แต่จะพบได้มากในเบสไพริมิดีน โดยเฉพาะไทมีน (Thymine) มีผลทำให้เบสไทมีน 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันจับตัวกันเกิดเป็นไทมีนไดเมอร์ ส่งผลให้เบสไทมีนไม่สามารถจับกับคู่เบสอะดีนีนบนสายพอลินิวคลีโอไทด์ได้ ด้วยเหตุนี้กระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอจึงถูกขัดขวางและทำให้รหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ข้อเสียของการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตคือ สารพันธุกรรมสามารถทำให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2.2 การกลายพันธุ์โดยการใช้สารเคมี

สารเคมีที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์มีหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดจะให้ผลการกลายพันธุ์แตกต่างกันออกไป สารเคมีที่นิยมใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้แก่สาร

เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulphonate (EMS)) , ไดเอทิลซัลเฟต (Diethylsulphate (dES)) และ 5-โบโมยูราซิล (5-Bomouracil (5-BU)) เป็นต้น แต่สารที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มากที่สุด คือ EMS

Ethyl methanesulphonate (EMS) เป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต ซึ่ง EMS เป็นสารเคมีในกลุ่ม alkylating มีประสิทธิภาพสูงในการก่อการกลายพันธุ์ และมีผลกระทบต่อความผิดปกติของโครโมโซมสิ่งมีชีวิตน้อยมาก โดยคุณสมบัติของสาร EMS มีดังนี้

สูตรทางเคมี	$CH_3SO_2OC_2H_5$
คุณสมบัติ	ของเหลวใส ไม่มีสี
มวลโมเลกุล	124 กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น	1.203 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 25 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	85-86 องศาเซลเซียส ที่ 10 มิลลิเมตรปรอท
การละลายน้ำ	ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์

สาร EMS ประกอบด้วยหมู่เอทิล (C_2H_5 : Ethyl group) 1 หมู่ ซึ่งจะถ่ายทอดหมู่นี้ให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาแอลคิเลชัน (Allkylation) โดยสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเบสเพียวรีนและไพริมิดีน รวมทั้งหมู่ฟอสเฟสของดีเอ็นเอ ปฏิกิริยาแอลคิเลชันจะเกิดมากที่สุดในตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนิน (G) ภายหลังทำปฏิกิริยาแล้วกลายเป็น 7-เอทิลกัวนิน (7-Ethylguanine) หรือที่เรียกว่าแอลคิเลเตตกัวนิน (Alkylated guanine)วิธีการที่สาร EMS ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ มีดังต่อไปนี้ การทำให้เกิดการแทนที่คู่เบส โดยการที่มีหมู่เอทิลมาอยู่ในโมเลกุลของกัวนิน ทำให้คุณสมบัติในการเกิดไอออนไนเซชัน (Ionization) แตกต่างไปจากเดิม จึงเกิดการจับคู่เบสที่ผิดปกติไปจากเดิม เช่น 7-Ethylguanine สามารถเข้าจับคู่กับไทมีน (Thymine (T)) ซึ่งจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปสู่การกลายพันธุ์ชนิด transition สาร EMS ยังทำให้เกิดการหลุดหายไปของเบสเพียวรีนจากสายดีเอ็นเอ เพราะการที่มีหมู่เอทิลเข้ามาจับอยู่ในตำแหน่งต่างๆ ในเบสเพียวรีน ทำให้เกิดการตัดขาดของพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลกับเบส จึงเกิดการหลุดออกไปของเบสเพียวรีนและเกิดช่องว่างขึ้นมา เมื่อเซลล์มีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอทำให้เกิดความผิดพลาดที่เบสที่แตกต่างไปจากเดิม ซึ่งนำไปสู่การกลายพันธุ์แบบ transition และ transversion นอกจากนี้ การตัดขาดของหมู่ฟอสเฟสและน้ำตาล อาจทำให้เกิดการขาดออกจากกันของดีเอ็นเอสายคู่และสายเดี่ยว ซึ่งนำไปสู่การหลุดหายไปของส่วนดีเอ็นเอและเกิดการกลายพันธุ์ในที่สุด

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Lee และคณะ (2014) นำ *Chlamydomonas reinhardtii* cc-124 จาก Chlamydomonas resource center ในสหรัฐอเมริกา มาทำการกลายพันธุ์เพื่อศึกษาการผลิตไขมัน โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร Tris-acetate phosphate (TAP) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสงต่อเนื่อง 150 ไมโครลิตรโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 32 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำ *C. reinhardtii* cc-124 ที่เจริญเติบโตในช่วง 32 ชั่วโมงมาปรับความหนาแน่นของสารแขวนลอยของเซลล์ให้ได้ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์มาทำการก่อกลายพันธุ์ด้วยสาร Ethyl methanesulphonate (EMS) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (Sigma-Aldrich, USA) คือ 20, 30 และ 40 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ตัวอย่างที่ได้รับการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS มาล้างด้วยอาหาร TAP 3 ครั้ง และถ่ายเซลล์ลงให้อาหาร TAP ขนาด 20 มิลลิลิตร หลังจากนำเซลล์ที่ถูกก่อกลายพันธุ์มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง TAP และบ่มไว้ 2 สัปดาห์เพื่อตรวจดูโคโลนี นำโคโลนีที่ได้จากเซลล์ที่ถูกก่อกลายพันธุ์โดยสาร EMS มาทำการถ่ายเชื้อลงฟลาสก์ที่บรรจุอาหาร TAP ขนาด 5 มิลลิลิตร นำสาหร่าย *C. reinhardtii* ที่ได้ทำการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ที่เราแยกได้มา 3 สายพันธุ์มเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความเข้มของแสงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยสายพันธุ์ 128 มีการผลิตของไขมันเพิ่มขึ้นสามเท่า สายพันธุ์ 132 และสายพันธุ์ 142 มีการผลิตไขมันเพิ่มขึ้นประมาณ 2.4 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่า สายพันธุ์ที่ได้จากการก่อกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS จะสามารถผลิตไขมันได้มากขึ้นเมื่อเทียบการสายพันธุ์ดั้งเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oncel และ F. Sukan (2011) ได้ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนด้วยแสงในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ในสภาวะที่ปราศจากซัลเฟอร์ โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบให้แสงสว่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง70 ไมโครไอนสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 27 วัน ผลการวิจัยพบว่า แสงสว่างและมืดมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยชี้ให้เห็นว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* ต้องการระยะเวลาสำหรับการผลิตและจะผลิตไฮโดรเจนได้ดีในช่วง 7-10 วันแรก โดยจะผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดในช่วง 5 วันแรก และสามารถผลิตได้แม้กระทั่งในที่มืด

Antal และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากการสังเคราะห์แสงที่ไม่ใช้ออกซิเจนในสภาวะปราศจากซัลเฟอร์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* โดยทำการตรึงเซลล์ของ *C. reinhardtii* ด้วยอัลจิเนตและศึกษาการผลิตของไฮโดรเจนภายใต้การลดลงของซัลเฟอร์ ในงานวิจัย พบว่าปริมาณการผลิตของไฮโดรเจนทั้งหมดสูงถึง 200 มิลลิโมลต่อตารางเมตร (หรือ 0.8 มิลลิโมลต่อ มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์) ที่ ความเข้มแสง 80 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนที่ลดลงภายใต้ความเข้มแสงต่ำและความเข้มแสงสูงอาจเป็นเพราะข้อจำกัดของแสงและการยับยั้งของแสง ซึ่งเกิดจากการเกิดออกซิเจนปริมาณสูงในช่วงแรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายที่ใช้ในโครงงานพิเศษ คือ สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ CC-124M4 โดยได้เชื้อมาจากนางสาวสวรสและนางสาวสาวิตรี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร (สวรสและสาวิตรี, 2561)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

อาหารสูตร Tris acetate phosphate (TAP) (ภาคผนวก ก) (Harris, 2001)

3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. กรดบอริก (H_3BO_3) (Carlo Erba Reagents, Italy)
2. กลาเซียลอะซีติกแอซิด (Glacial acetic acid, $C_2H_4O_2$) (EDM Millipore, Germany)
3. โคบอลท์ (II) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) (Fluka Chemical Corp.,USA)
4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
5. คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) (J.T.Baker, USA)
6. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
7. ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
8. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka Chemical Corp., USA)
9. โซเดียมอะซีเตท ($C_2H_3O_2Na$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
10. โซเดียมโมลิปเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Ajax Finechem, New Zealand)
12. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Carlo Erba Reagents, Italy)
13. ทริสเบส (Tris-base) (Vivantis Ltd., UK)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Carlo Erba Reagents, Italy)
15. แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) (Carlo Erba Reagents,Italy)
16. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Carlo Erba Reagents,Italy)
17. แมงกานีส(II)คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) (Carlo Erba Reagents,Italy)
18. อะการ์ (Agar) (BD DifcoTM Agar, USA)
19. เอทธิลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิด (Ethylene diamine tetraaceticacid,EDTA) (BDH Prolabo Chemicals, UK)
20. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) (Carlo Erba Reagents, Italy)
21. ไอออน (III) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)(BDH Prolabo Chemicals,UK)
22. ไอออน (II) ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
23. ไฮโดรคลอริก (HCl) (Ajax Finechem, New Zealand)

3.2.2 สารเคมีสำหรับการชักจูงให้เกิดการกลายพันธุ์

เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methanesulfonate (ems)) (Sigma-Aldrich,USA.)

3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

1. อะซีโตน (CH_3COCH_3) (Analytical grade) (Fisher Scientific, UK)
2. เมทานอล (CH_3OH) (Analytical grade, Scharlau, Spain)

3.2.4 ก๊าซมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

1. ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาร์กอน (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Praxair,Thailand)
2. ก๊าซอาร์กอนความบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Thonburiwattana Ltd., Thailand)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์

1. กระดาษกรองใยแก้ว GF/C (Glass microfiber filter Grade GF/C) (diameter 47mm) (Whatman, USA)
2. กระบอกตวง (Cylinder) (Kartell, Italy)
3. ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร (Vial)
4. เข็มฉีดก๊าซ (Scientific Glass Engineering, Australia)
5. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph- Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)) 17
6. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)
7. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)
8. เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (HermleLabortech Z38K, Germany)
11. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (Scientific Industries Inc, Genies2, USA)
12. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
13. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1601, Japan)
14. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV 50, Japan)
15. คิวเวตต์ควอตซ์ (Quartz cuvette) (Starna Scientific)
16. ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes) (Labnet, USA)
17. จานเพาะเลี้ยง (Plate) (Pyrex, USA)
18. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
19. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
20. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
21. โถดูดความชื้น (Desiccator)
22. ปิเปตทิป (Pipette tip) ขนาดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

23. พาราฟิล์มขนาด M (Parafilm) (Bemis company, USA)
24. ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)
25. หลอดเซ็นตริฟิวจ์ (Centrifuge Tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
26. หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิตร

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวบนจานอาหารแข็ง TAP นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อสาหร่ายจากอาหารแข็ง TAP ที่เลี้ยงไว้มากระจายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำฟลาสก์ไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วในการเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์หัวเชื้อเริ่มต้นของสาหร่ายสีเขียว โดยการถ่ายโอนสารแขวนลอยเซลล์จากฟลาสก์ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ แล้วนำหลอดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างเซลล์ในอาหาร TAP และกระจายเซลล์ในอาหาร TAP โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 นำสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.4.2 วิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4

นำสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ไปทำการนับเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) ให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ $5\text{-}6\times10^7$ ล้านเซลล์ต่อมิลลิลตร จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างเซลล์ในอาหาร TAP 1ครั้ง และเติมอาหาร TAP 1 มิลลิลิตร ถ่ายเซลล์ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 ครั้ง ทำการเติมเอทิลมีเทนซัลโฟเนตที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 2.5, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 โมโครลิตรต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีปริมาตรสุดท้าย 1000 โมโครลิตร หลังจากผ่านไป 60 นาทีทำการเติมโซเดียมไทโอซัลเฟต 500 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อทำการยับยั้งปฏิกิริยาของเอทิลมีเทนซัลโฟเนต ทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยฟอตเฟสบัฟเฟอร์ 1 ครั้ง และล้างด้วยอาหาร TAP 1 ครั้ง ละลายเซลล์ในอาหาร TAP 0.1 มิลลิลิตร บ่มในที่มืด 24ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการแยกเซลล์สาหร่ายให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Spread plate technique

3.4.3 วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน

การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์กลาย แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1: การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายเพื่อผลิตมวลชีวภาพและการชักนำให้สะสมแป้ง

ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์หัวเชื้อเริ่มต้นสาหร่ายสีเขียวที่มีอายุ 36 ชั่วโมง โดยการถ่ายโอนสารแขวนลอยเซลล์จากฟลาสก์ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP, อาหาร TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) จากนั้นถ่ายลงในอาหารอาหาร TAP, อาหาร TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยจะทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ระยะที่ 2: การผลิตไฮโดรเจน

การหาปริมาณไฮโดรเจนทำได้โดยทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายสีเขียวภายหลังการบ่มในอาหาร TAP และอาหาร TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้แน่น ทำการฉีดก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเซลล์สาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้น นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) มาทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph) ซึ่งมีสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนดังแสดงในตารางที่ 3.1 และทำการคัดเลือกเลือกสาหร่ายสีเขียว *C.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

reinhardtii CC-124 สายพันธุ์กลายที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph Thermal Conductivity Detector (GC-TCD))

พารามิเตอร์	สภาวะ
Column	Packed Column 2m ; Molecular sieve 5 0A 60/80 mesh
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Temperature Program	Injector temperature : 100 °C Column temperature: 50 °C Detector temperature: 100 °C
Carrier gas	Argon Flow rate 20 ml/min (99.999% purity)

3.4.4 วิธีการศึกษาความเข้มข้นของแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกมาศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตมวลชีวภาพในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายมาล้างเซลล์และกระจายเซลล์ของสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP และอาหาร TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) นำเซลล์ไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบเดิม ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น ทำการพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำขวดที่มีเซลล์สาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าในสภาวะที่มีความเข้มแสง 0, 1000, 2000, 5000, 10000, 15000 Lux เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้น นำก๊าซด้านบนมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph) และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

ปิเปตเซลล์สาหร่ายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมอะซีโตน 90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงไป ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้น นำหลอดไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยงในสภาวะเดิม นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 647 และ 664 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Jeffrey และ Humphery (1975) ดังนี้

ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $11.93A_{664}$-$1.93A_{647}$ สมการที่ 3.2

ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $20.36A_{647}$-$5.50A_{664}$ สมการที่ 3.3

ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ + ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 อัตราการรอดชีวิตของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย EMS

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย EMS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 25, 50, 100, 250, 500 มิลลิโมลาร์ บ่มเป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บหลอดในที่มืดที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทำการแยกเซลล์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Spread plate และคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ จากการทดลองพบว่า อัตราการรอดชีวิตของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 สายพันธุ์กลายจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ EMS โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นของ EMS สูงขึ้นทำให้อัตราการรอดของเซลล์ลด เมื่อบ่มเซลล์ในสภาวะที่ปราศจาก EMS (เป็นสภาวะที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตเป็น 100 เปอร์เซ็นต์) จะสามารถนับจำนวนโคโลนีเฉลี่ยบนจานอาหารได้ 405.33 ไอโซเลท เมื่อใช้ความเข้มข้นของสาร EMS มากกว่า 100 มิลลิโมลาร์ จะทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์สาหร่ายเป็นศูนย์ (ตารางที่ 4.1และรูปที่ 4.1)

จากการทดลองพบว่า การใช้ EMS สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของบริเวณเบสในดีเอ็นเอของเซลล์ และส่งผลทำให้เกิดการตายในเซลล์สาหร่าย โดยการใช้สารที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้สาหร่ายมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นและอัตราการอยู่รอดลดลง อัตราการรอดของเซลล์ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาคือประมาณ 3.0-5.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งตรงกับสาหร่ายที่ถูกทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยสาร EMS ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ โดยมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 5.51 เปอร์เซ็นต์ และได้จำนวนโคโลนีทั้งหมด 67 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.1) โดยการกลายพันธุ์เกิดจาก EMS หมู่เอทิล 1 หมู่ ซึ่งหมู่เอทิลนี้จะถูกถ่ายทอดให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอด้วยปฏิกริยาแอลคิเลชัน โดยจะเข้าไปทำปฏิกริยากับเบสเพียวรีนและไพริมิดีน รวมทั้งหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาแอลคิเลชันจะเกิดมากที่สุดในตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนิน (G) ภายหลังการเกิดปฏิกิริยาแล้ว จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น 7-เอทิลกัวนิน หรือที่เรียกว่า แอลคิเลเตตกัวนิน (IAEA,1977) การมีหมู่เอทิลมาอยู่ในโมเลกุลของกัวนิน ทำให้คุณสมบัติในการเกิดไอออนไนเซชัน (Ionization) ที่แตกต่างไปจากเดิม จึงเกิดการจับคู่เบสที่ผิดปกติไปจากเดิม สาร EMS ยังทำให้เกิดการหลุดหายไปของเบสเพียวรีนจากสายดีเอ็นเอ เพราะการที่มีหมู่เอทิลเข้ามาจับอยู่ในตำแหน่งต่างๆ ในเบสเพียวรีน ทำให้เกิดการตัดขาดของพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลกับเบส จึงเกิดการหลุดออกไปของเบสเพียวรีนและเกิดช่องว่างขึ้นมา ต่อมา เมื่อเซลล์มีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเออาจจะเกิดความผิดพลาดได้ที่เบส

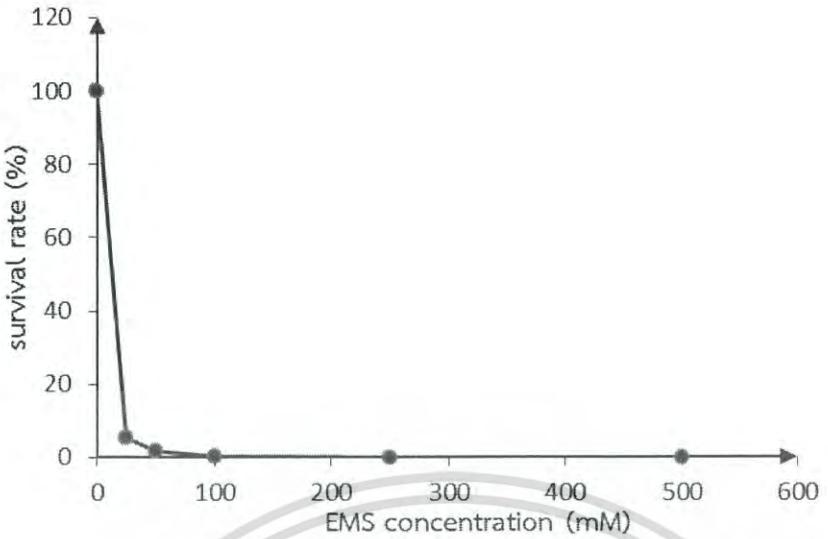
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่แตกต่างไปจากเดิม (IAEA,1977) นำสาหร่ายสายพันธุ์กลายทั้ง 67 ไอโซเลท ไปทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ

EMS concentration (mM)	Number of colonies			Average	Survival rate (%)
	1	2	3		
0	398	406	412	405.33	100
25	22	21	24	22.33	5.51
50	7	6	7	6.67	1.64
100	0	1	1	0.67	0.16
250	0	0	0	0	0.00
500	0	0	0	0	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.2 ผลการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 สายพันธุ์กลาย ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน

จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 มาทำการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ซึ่งทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ได้เซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 สายพันธุ์กลายจำนวน 67 ไอโซเลท จากนั้น นำสาหร่ายสายพันธุ์กลายทั้งหมดมาศึกษาศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยบ่มเซลล์ในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) และวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ภายหลังการพ่นไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน 10 นาที และบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M4 ทุกไอโซเลท รวมทั้งสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ดั้งเดิมที่บ่มในอาหาร TAP-S มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าสายพันธุ์เดียวกันกับที่บ่มในอาหาร TAP และพบว่าในชั่วโมงที่ 24 นั้นสาหร่ายทุกไอโวเลตมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าในชั่วโมงที่ 48 (ตารางที่ 4.2)

ซึ่งสาหร่ายสีเขียวแต่ละชนิดนั้นมีเมแทบอลิซึมของการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกันในการตอบสนองต่อการขาดแหล่งอาหารต่างๆ เนื่องจากการขาดแหล่งซัลเฟอร์ส่งผลให้ระบบแสงสองทำงานลดลง การแตกตัวของน้ำลดลง ออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการแตกตัวของน้ำถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจมากกว่า ทำให้สภาวะของระบบภายในเซลล์เข้าสู่สภาวะที่ปราศจากอากาศได้รวดเร็ว เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกมากขึ้นและมีกิจกรรมสูงขึ้น เป็นเหตุให้สาหร่ายจึงผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Hidehiro และคณะ, 2013) จากนั้น ทำการคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดจำนวน 3 เมื่อบ่มในอาหาร TAP-S เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 24 ชั่วโมง คือ *C.reinhardtii* CC-124M4A23 ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 6.246±0.812 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง, *C. reinhardtii* CC-124M4A24 ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 5.771±0.523 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง, *C. reinhardtii* CC-124M4A34 ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 4.433±0.340 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง เพื่อนำไปศึกษาในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ที่บ่มในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายหลังการให้ก๊าซอาร์กอนและบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

Strains	Hydrogen production rate (μmol L^{-1} h^{-1})			
	TAP Medium		TAP-S Medium	
	24h	48h	24h	48h
Wild type				
CC-124M4	0.822±0.059	0.251±0.172	1.983±0.359	1.258±0.403
Mutant Strains				
CC-124M4A1	1.267±0.060	0.342±0.172	2.615±0.104	1.110±0.085
CC-124M4A2	1.287±0.043	0.434±0.052	2.574±0.471	1.138±0.127
CC-124M4A3	1.053±0.132	0.294±0.051	2.600±0.405	1.383±0.164
CC-124M4A4	1.401±0.130	0.476±0.156	1.663±0.195	0.901±0.203
CC-124M4A5	1.119±0.126	0.605±0.543	1.200±0.271	0.655±0.119
CC-124M4A6	1.333±0.035	0.365±0.013	1.367±0.004	0.419±0.003
CC-124M4A7	0.952±0.077	0.304±0.028	2.978±0.419	1.617±0.035
CC-124M4A8	1.175±0.107	0.362±0.082	3.054±0.646	1.194±0.030
CC-124M4A9	1.173±0.133	0.311±0.045	2.728±0.567	1.355±0.322
CC-124M4A10	0.724±0.152	0.171±0.031	3.512±0.414	1.923±0.223
CC-124M4A11	0.792±0.100	0.215±0.007	1.655±0.193	1.003±0.126
CC-124M4A12	1.249±0.045	0.271±0.150	3.182±0.364	1.632±0.255
CC-124M4A13	1.449±0.105	0.328±0.060	3.168±0.586	1.070±0.070
CC-124M4A14	1.316±0.114	0.320±0.063	2.805±0.301	1.324±0.178
CC-124M4A15	1.306±0.176	0.407±0.119	2.651±0.457	0.912±0.153
CC-124M4A16	0.831±0.042	0.286±0.052	1.225±0.189	0.747±0.331
CC-124M4A17	1.209±0.194	0.294±0.148	2.129±0.581	1.330±0.198
CC-124M4A18	1.396±0.119	0.294±0.107	1.917±0.215	1.132±0.294
CC-124M4A19	0.918±0.263	0.236±0.037	1.449±0.439	0.851±0.107
CC-124M4A20	0.760±0.041	0.254±0.088	2.596±0.303	1.453±0.065

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

Strains	Hydrogen production rate (μmol L^{-1} h^{-1})			
	TAP Medium		TAP-S Medium	
	24h	48h	24h	48h
CC-124M4A21	0.560±0.299	0.204±0.106	0.878±0.437	0.573±0.196
CC-124M4A22	1.259±0.326	0.261±0.117	2.466±0.553	1.912±0.504
CC-124M4A23	1.030±0.105	0.356±0.079	6.246±0.812	3.850±0.544
CC-124M4A24	1.990±0.900	0.685±0.409	5.771±0.523	3.252±0.264
CC-124M4A25	0.894±0.158	0.276±0.074	2.325±0.342	1.266±0.240
CC-124M4A26	0.808±0.114	0.237±0.164	2.368±0.338	1.521±0.203
CC-124M4A27	0.956±0.692	0.176±0.216	2.521±0.315	2.561±0.106
CC-124M4A28	1.318±0.107	0.168±0.032	2.480±0.546	2.555±0.628
CC-124M4A29	1.362±0.023	0.165±0.004	1.359±0.014	0.418±0.003
CC-124M4A30	0.600±0.442	0.088±0.043	3.462±0.238	2.477±0.186
CC-124M4A31	1.809±0.266	0.341±0.128	2.249±0.471	1.564±0.191
CC-124M4A32	1.667±0.709	0.312±0.120	3.078±0.607	0.999±0.763
CC-124M4A33	0.804±0.275	0.227±0.135	2.902±0.642	0.628±0.083
CC-124M4A34	1.440±0.180	0.327±0.095	4.433±0.340	2.943±0.148
CC-124M4A35	1.196±0.138	0.206±0.167	2.709±0.271	2.642±0.297
CC-124M4A36	1.241±0.161	0.116±0.130	3.549±0.387	1.962±0.304
CC-124M4A37	0.953±0.614	0.353±0.074	3.223±0.084	2.444±0.132
CC-124M4A38	1.308±0.173	0.372±0.140	3.751±0.806	2.073±0.337
CC-124M4A39	0.940±0.246	0.043±0.006	3.463±0.273	2.259±0.667
CC-124M4A40	0.944±0.094	0.169±0.068	3.137±0.332	1.714±0.470
CC-124M4A41	0.573±0.209	0.189±0.011	2.892±0.370	1.978±0.249
CC-124M4A42	1.147±0.008	0.172±0.005	1.369±0.033	0.444±0.006
CC-124M4A43	0.875±0.551	0.282±0.005	2.632±0.637	2.117±0.294
CC-124M4A44	1.238±0.351	0.141±0.103	2.883±0.741	2.063±0.349
CC-124M4A45	1.165±0.060	0.157±0.035	2.541±0.143	1.416±0.339

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

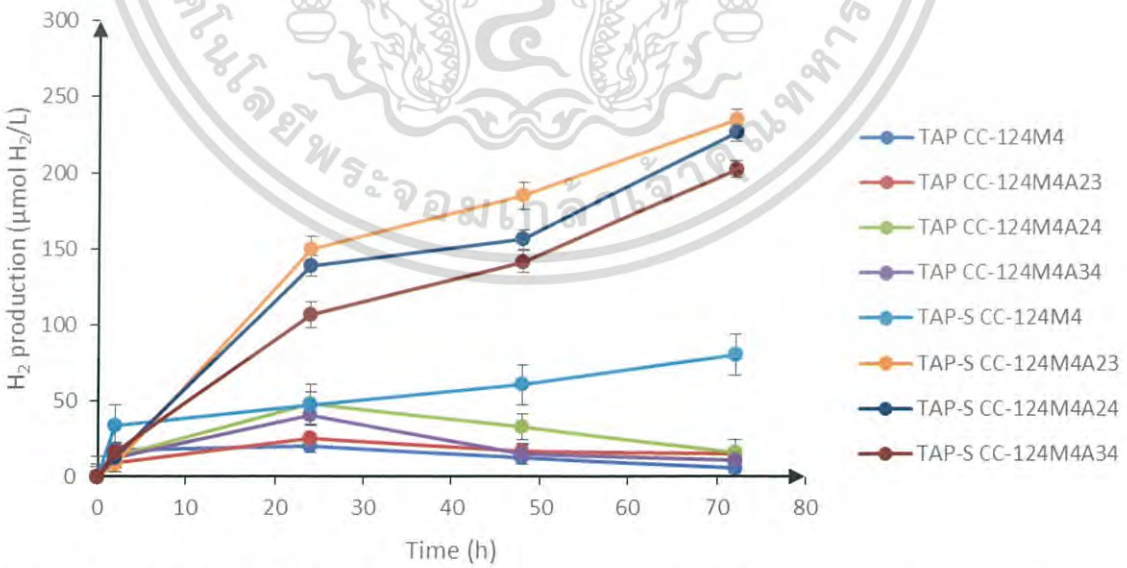
ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

Strains	Hydrogen production rate (μmol L^{-1} h^{-1})			
	TAP Medium		TAP-S Medium	
	24h	48h	24h	48h
CC-124M4A46	0.910±0.194	0.112±0.006	3.328±0.111	1.393±0.287
CC-124M4A47	1.075±0.072	0.216±0.013	3.344±0.571	1.458±0.201
CC-124M4A48	0.996±0.159	0.441±0.024	3.242±1.041	1.225±0.190
CC-124M4A49	1.042±0.144	0.455±0.046	3.416±0.397	1.130±0.149
CC-124M4A50	1.160±0.041	0.238±0.002	1.326±0.009	0.433±0.004
CC-124M4A51	1.153±0.027	0.356±0.039	3.730±0.429	1.312±0.513
CC-124M4A52	1.301±0.184	0.577±0.150	4.148±0.718	1.654±0.544
CC-124M4A53	1.206±0.191	0.323±0.044	2.500±1.435	1.220±0.396
CC-124M4A54	1.106±0.045	0.202±0.000	1.263±0.004	0.361±0.003
CC-124M4A55	0.956±0.427	0.311±0.103	3.826±1.083	1.410±0.280
CC-124M4A56	1.193±0.076	0.411±0.029	3.057±0.625	1.485±0.093
CC-124M4A57	1.164±0.025	0.217±0.001	1.324±0.008	0.417±0.003
CC-124M4A58	1.042±0.207	0.267±0.031	4.431±0.584	1.453±0.382
CC-124M4A59	1.071±0.252	1.902±1.351	4.183±0.735	1.980±0.183
CC-124M4A60	1.209±0.080	0.367±0.030	4.105±0.366	1.739±0.128
CC-124M4A61	1.081±0.053	0.353±0.074	3.405±0.507	1.419±0.262
CC-124M4A62	1.530±0.376	0.801±0.618	3.266±0.416	2.026±0.264
CC-124M4A63	1.204±0.085	0.330±0.047	2.786±0.700	1.826±0.067
CC-124M4A64	1.290±0.154	0.381±0.014	2.420±0.649	1.519±0.427
CC-124M4A65	3.818±0.429	1.219±0.115	2.558±0.333	1.897±0.283
CC-124M4A66	1.143±0.014	0.169±0.001	1.254±0.010	0.474±0.003
CC-124M4A67	0.761±0.073	0.260±0.010	3.136±0.509	1.712±0.131

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกในสภาวะการขาดซัลเฟอร์

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจำนวน 3 สายพันธุ์ มาบ่มในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจาก แหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) และวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจน ภายหลังการบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ เป็นเวลา 2, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์มีการผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์สูงกว่า เมื่อบ่มในอาหาร TAP ปกติประมาณ 2.9 เท่า (รูปที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่า การขาดซัลเฟอร์สามารถส่งเสริมให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนอย่างเห็นได้ชัด เมื่อพิจารณาผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด จะพบว่า *C. reinhardtii* CC-124M4 ทุกสายพันธุ์มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 โดย *C. reinhardtii* CC-124M4A23 ผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 235.146±6.50 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อลิตร รองลงมาคือสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M4A24 ซึ่งมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 226.575±5.50ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อลิตรและ *C. reinhardtii* CC-124M4A34 มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 202.575±5.48 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อลิตร ในขณะที่สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ดั้งเดิม *C. reinhardtii* CC-124M4 มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเพียง 79.899±6.37 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อลิตร (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 การผลิตไฮโดรเจนที่ช่วงเวลาต่างๆ ของการบ่มสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC124M4 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจานวน 3 สายพันธุ์ ในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองจะเห็นได้ชัดว่า สาหร่ายสายพันธุ์กลายมีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ทั้งในอาหาร TAP และ TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) โดยเมื่อพิจารณาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะขาดซัลเฟอร์ สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124M4A23 , *C. reinhardtii* CC-124M4A24 และ *C. reinhardtii* CC-124M4A34 มีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเป็น294.30 ,283.57 และ 253.54 เปอเซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (ตารางที่ 4.3) สาหร่ายสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตสูงสุดคือ *C. reinhardtii* CC-124M4A23 ซึ่งมีการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 2.9 เท่า ด้วยเหตุนี้จึงทำการคัดเลือกสายพันธุ์ *C. reinhardtii* CC-124M4A23 ไปทำการศึกษาในการทดลองถัดไป

ตารางที่ 4.3 ผลผลิตไฮโดรเจนและเปอร์เซ็นต์การเพิ่มผลิตไฮโดนเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในชั่วโมงที่ 72 ของการบ่มในอาหาร TAP และอาหารที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)

Medium	Strains	H_2 Production (μmol H_2 L^{-1})	H_2 Production (%)
TAP	*C. reinhardtii* CC-124M4 (WT)*	5.837±1.75^{C}	100
	C. reinhardtii CC-124M4A23	14.608±10.97^{A}	250.26
	C. reinhardtii CC-124M4A24	15.775±0.69^{A}	270.26
	C. reinhardtii CC-124M4A34	11.162±5.97^{B}	191.29
TAP-S	*C. reinhardtii* CC-124M4 (WT)*	79.899±6.37^{C}	100
	C. reinhardtii CC-124M4A23	235.146±6.50^{A}	294.30
	C. reinhardtii CC-124M4A24	226.575±5.50^{AB}	283.57
	C. reinhardtii CC-124M4A34	202.575±5.48^{B}	253.54

หมายเหตุ * WT คือสายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type), ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาบทบาทของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M4A23

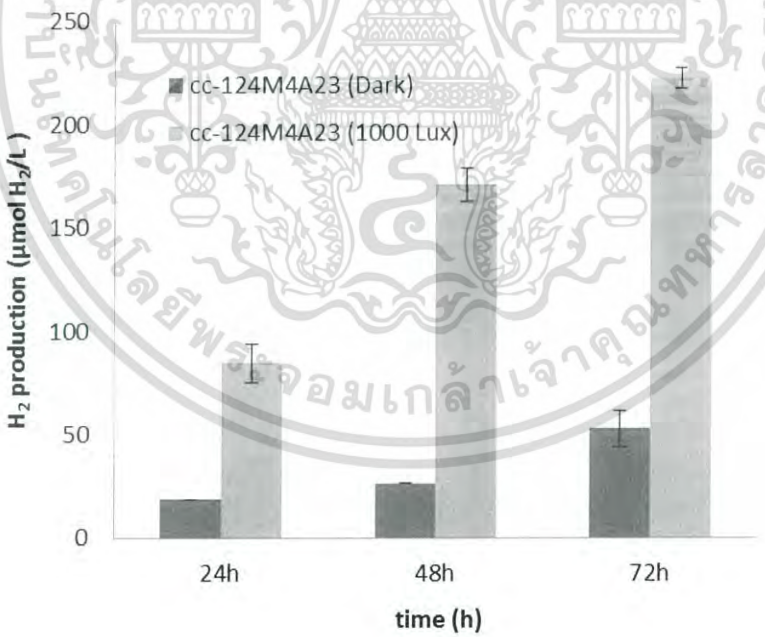
จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4A23 สายพันธุ์กลายที่ผลิตไฮโดรเจนสูงสุด มาศึกษาผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง และสภาวะที่มีความเข้มแสง 1000 ลักซ์ เป็นตัวควบคุม โดยบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ก่อนนำมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจน จากผลการทดลองพบว่า สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124M4A23 ที่บ่มในสภาวะที่ปราศจากแสงมีผลผลิตที่ต่ำกว่าสาหร่ายที่บ่มภายใต้ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ อย่างเห็นได้ชัด โดยที่ชั่วโมงที่ 72 สาหร่ายที่บ่มในที่มืดมีผลผลิตไฮโดรเจนเพียง 52.83 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อลิตร ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มภายใต้ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ มีผลผลิตไฮโดรเจนถึง 222.38 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อลิตร (ตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.3) ซึ่งมากกว่าการผลิตไฮโดรเจนในที่มืดถึง 4.2 เท่า แสดงให้เห็นว่าแสงมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเป็นอย่างมาก หากสาหร่ายได้รับความเข้มแสงและเวลาที่เหมาะสมจะส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น อันเนื่องมาจากกระบวนการสังเคราะห์แสง แต่ถ้าหากสาหร่ายได้รับแสงในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์แสงมาก ออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากการแตกตัวของน้ำจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนลดลง โดยจะทำการศึกษาผลของความเข้มแสงและระยะเวลาบ่มที่เหมาะสม ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสายพันธุ์กลายนี้ศึกษาได้ในการทดลองถัดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ cc-124M4A23 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้สภาวะมืด(0 ลักซ์)และสภาวะความเข้มแสง 1000 ลักซ์

Strain	Light Intensity (Lux)	H_2 Production (μmol H_2 L^{-1})		
		24h	48h	72h
C. reinhardtii CC-124M4A23	0	18.55 ± 0.9^{B}	26.50 ± 3.8^{B}	52.89 ± 6.0^{B}
	1000	84.46 ± 5.9^{A}	171.01 ± 4.1^{A}	222.38 ± 6.2^{A}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน



รูปที่ 4.3 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ cc-124M4A23 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้สภาวะมืดและสภาวะที่มีความเข้มแสง 1000 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์กลาย CC-124M4A23

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4A23 สายพันธุ์กลาย ที่ผลิตไฮโดรเจนสูงสุด มาศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) โดยจะทำการบ่มภายใต้ความเข้มแสง 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 15,000 ลักซ์ ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และนำมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจน จากผลการทดลองพบว่า ที่ชั่วโมงที่ 24 สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4A23 ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มภายใต้ความเข้มแสง 5000 ลักซ์ โดยให้ผลผลิตเท่ากับ 322.89±4.2 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อลิตร ในขณะที่ชั่วโมงที่ 48, 72 สาหร่ายสายพันธุ์นี้จะให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ความเข้มแสง 15,000 ลักซ์ โดยให้ผลผลิตเท่ากับ 733.76±2.3 และ 487.02±6.8 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) จากผลการทดลองพบว่า 24 สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4A23 ให้ผลผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุดที่ความเข้มแสง 15,000 ลักซ์ ในชั่วโมงที่ 48 โดยให้ผลผลิตมากกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะควบคุม (ที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์) ประมาณ 4.30 เท่า และผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะความเข้มแสงตั้งแต่ 2000ลักซ์ขึ้นไป จะเริ่มลดลงเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 72 มีเพียงสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่มีผลผลิตเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 72 (รูปที่ 4.3)

มีงานวิจัยของ (Taras และคณะ, 2016) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. reinhardtii* เพื่อศึกษาสภาวะความเข้มแสงที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะความเข้มแสงที่ต่างกันดังนี้ 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มแสง 0 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีนั้น สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้น้อย เพียง 20-25 T เมื่อเทียบกับความเข้มแสง 5 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และที่ความเข้มแสง 80 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีสาหร่ายสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยสูงถึงประมาณ 20 เท่า เมื่อเทียบกับสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 5 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ขณะที่สาหร่ายที่บ่มภายใต้สภาวะความเข้มแสงที่สูงเกินกว่า 80 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที จะผลิตไฮโดรเจนลดลง แสงสว่างมีความสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตและแมทาบอลิมของสาหร่ายเมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้นจะเกิดการยับยั้งของแสงภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย (อาหาร TAP ปราศจาก

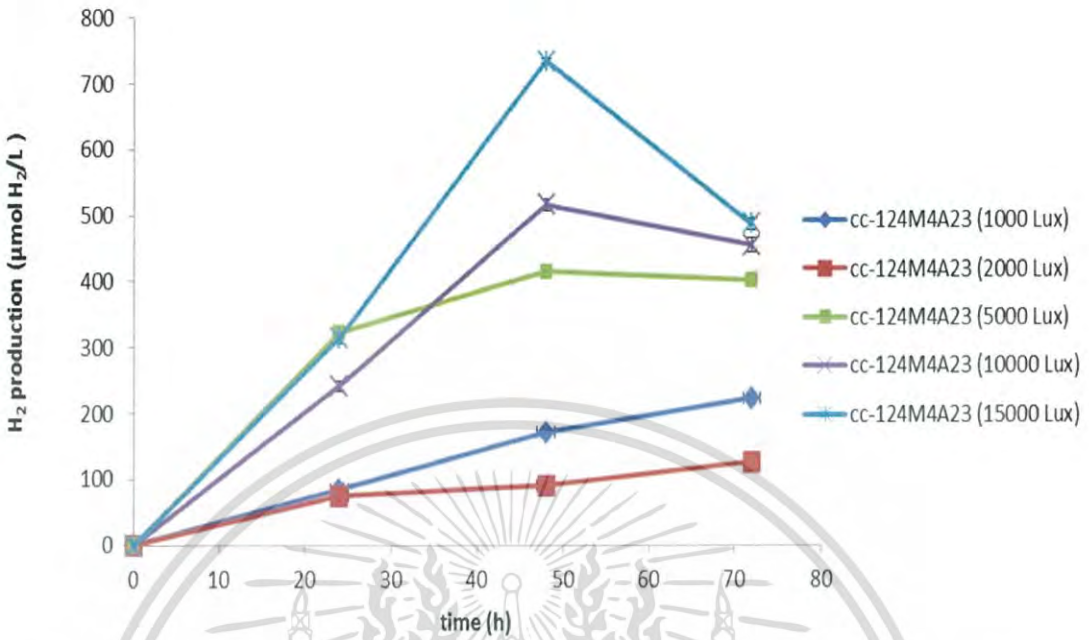
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งซัลเฟอร์) ในขณะที่แสงที่เมื่อความเข้มน้อยเกินไป จะจำกัดการเจริญเติบโต ในสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจน แสงมีส่วนเกี่ยวข้องใน 3 กระบวนการคือ การถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนไปยังไฮโดรเจน , การเกิดออกซิเจนใน PSII ซึ่งควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และการยับยั้งด้วยแสง ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการผลิตไฮโดรเจน โดยการยับยั้งการสร้างไฮโดรเจนภายใต้ความเข้มแสงที่มากเกินส่วนใหญ่เกี่ยวข้องในระยะเริ่มต้นของการเกิดออกซิเจนในอาหาร เมื่อเริ่มมีการสะสมของออกซิเจนในอาหาร ความเข้มข้นของออกซิเจนที่สูงเกินที่ละลายในอาหารจะทำให้เกิดความเสียหายต่อ PSII และยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย ส่วนการยับยั้งการสร้างไฮโดรเจนของแสงที่น้อยเกินไปส่งผลให้การสังเคราะห์แสงเกิดขึ้นได้น้อยลง ทำให้มีการเจริญเติบโตและการผลิตผลผลิตได้น้อยลง (Taras และคณะ, 2013)

ตารางที่ 4.5 ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์กลาย cc-124M4A23 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้ความเข้มแสง 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 15,000 ลักซ์ ตามลำดับ

Strains	Light Intensity (Lux)	H_2 Production (µmol H_2 L^{-1})		
		24h	48h	72h
C. reinhardtii CC-124M4A23	1000	84.46 ± 5.9^{D}	171.01 ± 4.1^{D}	222.38 ± 6.2^{D}
	2000	74.76 ± 2.4^{E}	90.17 ± 5.1^{E}	125.86 ± 8.1^{E}
	5000	322.89 ± 4.2^{A}	414.89 ± 9.1^{C}	401.64 ± 9.0^{C}
	10000	241.35 ± 8.1^{C}	515.91 ± 7.5^{B}	454.67 ± 9.0^{B}
	15000	315.04 ± 7.3^{B}	733.76 ± 2.3^{A}	487.02 ± 6.8^{A}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์กลาย cc-124M4A23 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้ความเข้มแสง 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 15,000 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4 ด้วยสาร Ethyl methanesulfonate (EMS) โดยกำหนดให้มีอัตราการรอด 3-5 T ซึ่งจากผลการทดลองสรุปได้ว่า การใช้สาร Ethyl methanesulfonate (EMS) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 25 mM จะทำให้มีอัตราการรอด 5.51เปอเซ็นต์ และได้สาหร่ายสายพันธุ์กลายทั้งหมดจำนวน 67 ไอโซเลท นำสาหร่ายสายพันธุ์กลายทั้งฟมดมาศึกษาอัตราการผลิตไฮโดรเจน พบว่า *C. reinhardtii* สาหร่ายสายพันธุ์กลายที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด 3 สายพันธุ์ คือ *C. reinhardtii* CC-124M4A23, *C. reinhardtii* CC-124M4A24 และ*C. reinhardtii* CC-124M4*A34* เมื่อนำทั้ง 3 สายพันธุ์มาทำการวัดผลผลิตไฮโดรเจนและเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4A23 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยผลิตได้ถึง 235.146 ± 9.504 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 2.9 เท่า เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ จากนั้น จึงทำการทดลองนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124M4A23 มาเพาะเลี้ยงโดยให้ความเข้มแสงที่ต่างกัน เพื่อศึกษาสภาวะความเข้มแสงที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน ผลการทดลองพบว่าความเข้มแสงที่ที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนคือ 15,000 ลักซ์ โดยสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายนี้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 733.572 ± 2.960 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะควบคุมถึง 4.3 เท่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M4A23 เพิ่มเติม เช่น การผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีอากาศโดยไม่มีการพ่นไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน พีเอชของอาหาร การศึกษาในระดับยีนและจีโนม และอุณหภูมิของการบ่ม นอกจากนี้ สามารถนำสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายทั้ง 67 สายพันธุ์ มาศึกษาต่อการผลิตมวลชีวภาพและเชื้อเพลงชีวภาพอื่นๆได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ครองขวัญ เฉลิมพิชัย. 2558. **ความเป็นไปได้ของการไฮโดรเจนเป็นพลังงานทดแทนในประเทศไทยในอนาคต.**วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีและการจัดการพลังงาน จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.

ชญานีย์ สังวาลย์. 2557. ผลของเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ที่ให้กับโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันต่อการ เปลี่ยนแปลงพันธุ์กรรมของต้นกล้าที่พัฒนา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืช ศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พีรนุช จอมพุก, 2553, เทคโนโลยีนิวเคลียร์กับการเกษตร, ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิทวัส แจ้งเอี่ยม. 2553. **กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่าย**. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ ปีที่ 13, ฉบับที่ 1 มกราคม - มิถุนายน 2553.

สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540, **การกลายพันธุ์ของพืช**, ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เอกรัตน์ วงษ์แก้ว, ศรีสุดา แซ่อึ้ง, วิทวัส แจ้งเอี่ยม. (2557) **การใช้นาโนเทคโนโลยีในผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานทางเลือกและพลังงานสะอาด** กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อัญชลี ศิริขจรกิจ. 2554. **สาหร่ายสีเขียวแคลมิโดโมแนส (*Chlamydomonas reinhardtii*) กับงานวิจัยทางพันธุ์ศาสตร์**.Thai Journal of Genetics. 4(1):9-21.

Bashir, S., A. A. Wani, and I. A. Nawchoo. 2013. Mutagenic sensitivity of gamma rays, EMS and sodium azide in Trigonella foenum-graecum L. Science Research Reporter. 3(1): 20-26.Chanon Lapjit and Meng-Jiau Tseng.2017. "Mutagenic efficiency and effect of ethyl methanesulphonate (EMS) on Erycina pusilla." KHONKAENAG R. J.45 SUPPL .1

Gupta S. & Abu-Ghannam N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. Trends in Food Science & Technology, 22, 315-26.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

K.Paramesh , N.Lakshmana Reddy , M.V.Shankar ,T.Chandrasekhar. 2017. "Enhancement of biological hydrogen productionusing green alga *Chlorococcum minutum.*" *International journal of hydrogen energy*. :1-10.

Khatri, A., I. A. Khan, M. A. Siddiqui, S. Raza, and G. S. Nizamani. 2005. Evaluation of high yielding mutants of Brassica juncea cv. S-9 developed through gamma rays and EMS. Pak. J. Bot. 37(2): 279-284.

Lim, D.K.Y., and P.M. Schenk. 2017. Microalgae selection and improvement as oilcrops: GM vs non-GM strain engineering. AIMS Bioengineering. 4(1): 151-161.

Muthusamy, A. and Jayabalan, N. 2011. In vitro induction of mutation in cotton (Gossypium hirsutum L.) and isolation of mutants with improved yield and fiber characters. Acta Physiologiae Plantarum 33: 1793–1801.

Naik, P. K.; Swain, B. K.; Chakurkar, E. B.; Singh, N. P. , 2012. Performance of dairy cows on green fodder maize based ration in coastal hot and humid climate. Anim. Nutr. Feed Technol., 12 (2): 265-270

Nishida Y., Yamashita E. & Miki W. (2007). Quenching activities of common hydrophillic and lipophillic antioxidants against single oxygen using chemiluminescence detection system. *Carotenoid Science*. 11, 16-20.

Pangestuti R. & Kim Se-Kwon. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. Journal of Functional foods. 3, 255-66.

Saowanee Meechao, Patiruj Jirakranwong and Ornuma Tanadul.2018. "Enhancing lipid productivity in microalgae by mutation induction." KHONKAEN AG R.J. 46(2):367-374.

Shimidzu N., Goto M. & Miki W. (1996). Carotenoids as Singlet Oxygen Quenchers in Marine *Organisms. Fisheries Science*. 62(1), 134-137

Suganuma, K. et al. (2010). Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrixmetalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts. J. Dermatol Sci. 58(2), 136-142.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Taras K. Antal , Galina P. Kukarskikh , Alena A. Volgusheva , Tatyana E. Krendeleva , Esa Tyystjarvi , Andrey B. Rubina. 2016. "Hydrogen photoproduction by immobilized S-deprived Chlamydomonas reinhardtii : Effect of light intensity and spectrum, and initial medium pH." Algal Research. 17:38–45.

Rochain JD. (1995). *Chlamydomonas reinhardii* as the photosynthetic yeast. Bioinformatics 26:2398-2405

Yamashita E. (2006). The effects of a dietary supplement containing Astaxanthin on skin condition. Carotenoid Science. 10, 9-95.

[Online]. Available : http://www.charninenergy.com/pdf/fuelcells.pdf

[Online]. Available : http://www.dede.go.th/dede/index.php?id=246

[Online]. Available : https://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/june22/bacte2.htm

[Online]. Available : https://sites.google.com/site/bioprotista/division-chlorophyta

[Online]. Available : https://sites.google.com/a/samakkhi.ac.th/brain-bio/vacuole/mitochondria/chloroplast

[Online]. Available : https://www.siamchemi.com/%E0%B9%80% E0%B8%9A%E0%B8%95%E0%B9%89%E0%B8%B2%E0%B9%81%E0%B8%84%E0%B9%82%E0%B8%3%E0%B8%97%E0%B8%B5%E0%B8%99/

[Online]. Available :http://th.swewe.net/word_show.htm/?162960_1&Chlamydomonas

[Online]. Available : file:///C:/Users/Ploy/Downloads/962-Article%20Text-1703-1-10-20120402.pdf

[Online]. Available : https://en.wikipedia.org/wiki/Chlamydomonas_ reinhardtii#/media/File:Chlamydomonas6-1.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris acetate phosphate (TAP) (Harris, 2001)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

2X Filner's Beijernicks Solution	25	มิลลิลิตร
1M Potassium Phosphate	1	มิลลิลิตร
Trace mineral solution	5	มิลลิลิตร
Tris-Base	2.42	กรัมต่อลิตร
Glacial Acetic Acid (17.4 mM acetate)	1	มิลลิลิตร

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernicks Solution (500 มิลลิลิตร)

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

ประกอบด้วยสารละลาย Disodium EDTA 5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคน ปรับ พีเอช 6.5 ด้วย 5N โซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารตามด้านล่างเพิ่มตามลำดับ

เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	2.2	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0.51	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.016	กรัม
โซเดียมโมลิเบตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.073	กรัม
โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.016	กรัม

ส่วนประกอบบัฟเฟอร์

20 ml 1M stockโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (1M stock: 6.8 กรัม /50มิลลิลิตร)
30 ml 1M stockไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (1M stock: 8.7 กรัม /50มิลลิลิตร)
(ปรับพีเอช 7.2) สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น 1.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ขาดแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S medium)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

2X Filner's Beijernicks Solution	25	มิลลิลิตร
1M Potassium Phosphate	1	มิลลิลิตร
Trace mineral solution	5	มิลลิลิตร
Tris-Base	2.42	กรัมต่อลิตร
Glacial Acetic Acid (17.4 mM acetate)	1	มิลลิลิตร

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernicks Solution (500 มิลลิลิตร)

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2{\cdot}2H_2O$)	1	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2{\cdot}6H_2O$)	1.642	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

ประกอบด้วยสารละลาย Disodium EDTA 5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคน ปรับ พีเอช 6.5 ด้วย 5N โซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารตามด้านล่างเพิ่มตามลาดับ

เฟอรัสคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_2{\cdot}6H_2O$)	0.486	กรัม
ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	1.04	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2{\cdot}4H_2O$)	0.51	กรัม
คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2{\cdot}2H_2O$)	0.0126	กรัม
โซเดียมโมลิเบตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$)	0.073	กรัม
โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2{\cdot}6H_2O$)	0.016	กรัม

ส่วนประกอบบัฟเฟอร์

20 ml 1M stockโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (1M stock: 6.8 กรัม /50มิลลิลิตร)

30 ml 1M stockไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (1M stock: 8.7 กรัม /50 มิลลิลิตร)

(ปรับพีเอช 7.2) ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

1) นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ (%) จากการ เปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นก๊าซไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอน
2) นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละมาเปรียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร
3) นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาเปรียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิโมล โดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาณไฮโดรเจน 1 มิลลิโมล
4) นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้มาหารจานวนชั่วโมงจะได้ ปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมง
5) นำปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมงที่ได้มาหารปริมาณคลอโรฟิลล์จะได้หน่วยเป็น ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้