

ผลของเอทานอลต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวและการตอบสนอง
ระดับเมแทบอลิซึมในระหว่างการผลิต
EFFECT OF ETHANOL ON HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN
ALGAE AND METABOLOME RESPONSE DURING PRODUCTION
PHASE



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2565

KMITL-2022-SC-M-020-134

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF ETHANOL ON HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN
ALGAE AND METABOLOME RESPONSE DURING PRODUCTION
PHASE



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2022

KMITL-2022-SC-M-020-134

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2022

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|-----------------------------|--|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | ผลของเอทานอลต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวและการตอบสนองระดับเมแทบอลิซึมในระหว่างการผลิต |
| ชื่อนักศึกษา | นางสาวรชณิกร กลิ่นสาลี |
| รหัสนักศึกษา | 63605055 |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) |
| ภาควิชา | ชีววิทยา |
| พ.ศ. | 2565 |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ | รองศาสตราจารย์ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ |

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจน (H_2) จัดเป็นพลังงานทางเลือกที่สะอาดและให้ค่าพลังงานสูงจากการเผาไหม้ จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ เช่น แบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไชยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาสาหร่ายสีเขียวในการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ทั้งภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสงจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ได้ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย 14 สายพันธุ์และทดสอบความสามารถผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีเอทานอลพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLSc61 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ แต่เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโควิด 19 เกิดความไม่ต่อเนื่องของการทำงานวิจัยทำให้สาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLSc61 เกิดภาวะความเครียดจากความเย็นจากการเก็บรักษาสายพันธุ์ทำให้ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนลดลง ผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกหาสายพันธุ์ที่อื่นและพบว่าสาหร่าย G4 มีการผลิตไฮโดรเจนที่ดีที่สุดได้เท่ากับ 6,090.5 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิลิตรคลอโรฟิลล์ เมื่อเติมเอทานอลความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ผลการศึกษายังพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลลดลงในระหว่างกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเมื่อเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้นและยังพบการเพิ่มขึ้นของอะซีทิลดีไฮด์ ผลการติดตามยีนและการศึกษาแผนภูมิต้นไม้ของ ยีน 18S rDNA บ่งชี้ว่าสาหร่ายดังกล่าวถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *Micractinium* sp. จึงให้ชื่อว่า *Micractinium* sp. KLSc 62 นอกจากนี้ การศึกษาการติดตามยีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสทั้งในระดับจีโนมิกและอาร์เอ็นเอยังไม่ประสบผลสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้ และจากการวิเคราะห์ระดับเมแทบอลิซึมพบการแสดงออกของเมแทบอลิซึมในเชิง Up regulation และ Down Regulation และยังสามารถระบุสารเมแทบอลิซึมได้ทั้งหมด 44 สาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : การผลิตไฮโดรเจน เอทานอล สาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 และ
18S rDNA



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|----------------|---|
| Thesis Title | Effect of ethanol on hydrogen production by green algae and metabolome response during production phase |
| Student Name | Rachaneekorn Klinsalee |
| Student ID | 63605055 |
| Degree | Master of Science (Biotechnology) |
| Department | Biology |
| Year | 2022 |
| Thesis Advisor | Assoc. Prof. Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj |

Abstract

Hydrogen (H₂) is classified as a clean alternative energy and provides high energy values from combustion. Many microorganisms can produce hydrogen, such as bacteria, photosynthetic bacteria, cyanobacteria, and green algae. This research focused on the hydrogen production of green algae because it can produce hydrogen under both light and dark conditions from the activities of hydrogenase enzymes. This research studied growth of 14 algae and tested their ability to produce hydrogen under the presence of ethanol. Initially *Chlorella* sp. KLSc61 could produce the highest hydrogen level compared to other species, but long-term storage in freezer led *Chlorella* sp. KLSc61 got cold stress which affected lower hydrogen productivity. Subsequently the new species was selected. Result showed that the G4 algae then produced hydrogen by about 6,090.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Chl under the presence of 30 mM ethanol. Phylogenetic tree of 18S rDNA indicated that this algae belonged to a group of *Micractinium* sp. We then named the algae as *Micractinium* sp. KLSc62. However, investigation of the hydrogenase gene and the alcohol/aldehyde dehydrogenase gene at both genomic and RNA levels were unsuccessful. From the metabolism study, the expression of metabolism revealed is both up-regulation and down-regulation and a total of 44 metabolites were identified.

Keywords : Hydrogen production, Ethanol, Green algae, *Micractinium* sp. KLSc62 and 18S rDNA



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากข้าพเจ้าได้รับความช่วยเหลือ ความกรุณา และการถ่ายทอดวิชาความรู้จากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยได้ให้คำแนะนำและทุ่มเทให้กับลูกศิษย์คนนี้ และเสนอแนะแนวทางการแก้ปัญหา รวมทั้งตรวจ แก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความเมตตา และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบุคคลในครอบครัวทุกคนเป็นอย่างยิ่ง ที่เฝ้าเลี้ยงดู อบรมสั่งสอน และให้ทุนทรัพย์ในการศึกษาเล่าเรียน รวมทั้งเป็นกำลังใจในการแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ เสมอมา รวมทั้งคณาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา และที่สำคัญเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ หน่วยวิจัยพลังงานชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ได้ให้คำปรึกษา คอยให้กำลังใจ และช่วยเหลือในยามที่มีปัญหา และถ้าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีคุณค่าและมีประโยชน์กับบุคคลหรือหน่วยงานใด ข้าพเจ้าขอมอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ขออำนาจคุณพระศรีรัตนตรัยอวยพรให้ทุกท่านมีแต่ความสุขความเจริญ

นางสาวรชนิกร กลิ่นสาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|--|----|
| 2.7 สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน..... | 22 |
| 2.8 เทคโนโลยีเมแทบอลิซึม..... | 23 |
| 2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 24 |
| บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย | |
| 3.1 สารเคมี..... | 27 |
| 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย..... | 28 |
| 3.3 สารเคมีสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ในปฏิกิริยาลูกลูโซพอลิเมอร์..... | 29 |
| 3.4 สารเคมีสำหรับการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า..... | 30 |
| 3.5 ชุดทดสอบ (Kit)..... | 30 |
| 3.6 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส..... | 30 |
| 3.7 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน..... | 30 |
| 3.8 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย..... | 30 |
| 3.9 ศึกษาการเพาะเลี้ยงและการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ ในการผลิตไฮโดรเจนที่ดีที่สุด..... | 31 |
| 3.10 ศึกษาความเข้มข้นเอทานอลที่เหมาะสมแก่การผลิตไฮโดรเจน..... | 32 |
| 3.11 ศึกษา ยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกลูโซพอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)..... | 32 |
| 3.11.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA..... | 33 |
| 3.11.2 การสร้างแผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติกของยีน 18S rDNA..... | 34 |
| 3.12 การติดตามหายีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส..... | 34 |
| 3.12.1 วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอและการทำให้บริสุทธิ์..... | 34 |
| 3.12.2 การทำปฏิกิริยาริเวิร์สทรานสคริปชัน..... | 35 |
| 3.12.3 การติดตามหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสและ ยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกลูโซ พอลิเมอร์..... | 36 |
| 3.12.4 การเชื่อมต่อยีนเป้าหมายกับพลาสมิดพาหะ..... | 39 |
| 3.12.5 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ หรือทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation)..... | 39 |
| 3.12.6 การสกัดพลาสมิด..... | 40 |
| 3.13 การติดตามความเข้มข้นของเอทานอลและอะเซทิลดีไฮด์ ระหว่างกระบวนการผลิต..... | 40 |
| 3.14 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส..... | 41 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|--|------------|
| 3.15 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว..... | 42 |
| 3.16 การหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียว | 42 |
| 3.17 การวิเคราะห์เมแทบอลิซึมภายในเซลล์ระหว่างกระบวนการ การผลิตก๊าซไฮโดรเจน..... | 42 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล | |
| 4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว..... | 44 |
| 4.2 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสม ที่สุดในการผลิตไฮโดรเจน..... | 48 |
| 4.3 ผลการติดตามความเข้มข้นของเอทานอลและอะลดีไฮด์ ระหว่างกระบวนการผลิต | 54 |
| 4.4 ผลการศึกษาสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่สามารถในการ ผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ดีที่สุด | 57 |
| 4.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสง | 57 |
| 4.4.2 การค้นหายีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส | 58 |
| 4.4.3 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการเปรียบเทียบ ความคล้ายคลึงกันของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว | 61 |
| 4.5 ผลการศึกษาการตามหายีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์ อัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส | 64 |
| 4.5.1 การค้นหายีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส | 64 |
| 4.5.2 การค้นหายีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิค ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส | 70 |
| 4.6 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส | 77 |
| 4.7 ผลการวิเคราะห์เมแทบอลิซึมระหว่างกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน | 78 |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ | |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย..... | 91 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ | 92 |
| เอกสารอ้างอิง | 93 |
| ภาคผนวก ก..... | 104 |
| ภาคผนวก ข..... | 106 |
| ภาคผนวก ค..... | 107 |
| ภาคผนวก ง | 109 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|----------------------|-----|
| ภาคผนวก จ..... | 110 |
| ภาคผนวก ฉ..... | 112 |
| ภาคผนวก ช..... | 114 |
| ภาคผนวก ซ..... | 115 |
| ภาคผนวก ฌ..... | 116 |
| ประวัติผู้เขียน..... | 117 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปรภาพ

| | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 2.1 สมการการเผาไหม้ของไฮโดรเจน..... | 4 |
| รูปที่ 2.2 ความต้องการไฮโดรเจนตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ.2564..... | 5 |
| รูปที่ 2.3 แหล่งที่มาของไฮโดรเจนในปี พ.ศ. 2564 | 5 |
| รูปที่ 2.4 การผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า..... | 8 |
| รูปที่ 2.5 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำ ด้วยแสงแบบทางตรง..... | 9 |
| รูปที่ 2.6 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง..... | 11 |
| รูปที่ 2.7 แสดงวิธีการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> | 18 |
| รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาการเกิดและสลายไฮโดรเจน..... | 20 |
| รูปที่ 2.9 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ [FeFe]-hydrogenase | 21 |
| รูปที่ 2.10 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ [NiFe] hydrogenase..... | 22 |
| รูปที่ 2.11 กิจกรรมของเอนไซม์เอนไซม์อัลดีไฮด์/แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส..... | 25 |
| รูปที่ 3.1 ภาพรวมการดำเนินงานหาสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนที่สูงใน สถานะที่มีเอทานอลอยู่ในระบบ | 27 |
| รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 14 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยง ในอาหาร TAP (n=3)..... | 46 |
| รูปที่ 4.2 ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ CUJR01, CUJR04, G2, G4, <i>Chlorella</i> sp. KLSc59, LT, SK และ <i>Chlorella</i> sp. KLSc61..... | 48 |
| รูปที่ 4.3 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 | 49 |
| รูปที่ 4.4 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 รุ่นที่ 30 | 51 |
| รูปที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสายพันธุ์ G2 และ G4 | 52 |
| รูปที่ 4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ G4 ที่ป่มในอาหาร TAP สูตรปกติและอาหาร TAP ที่เติมเอทานอล..... | 54 |
| รูปที่ 4.7 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของอะซีทัลดีไฮด์ เอทานอลและเอ็นโพรพานอล ที่ได้จากการวิเคราะห์จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ..... | 55 |
| รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลระยะเวลาต่าง ๆ โดยสาหร่าย สีเขียวสายพันธุ์ G4..... | 55 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณความเข้มข้นของอะซีทิลไฮดรอกซีไขมันต่าง ๆ โดยสำหรับสายพันธุ์ G4..... 57

รูปที่ 4.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ G4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1000 เท่า 58

รูปที่ 4.11 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA จากการนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5 เปอร์เซ็นต์อะกาโรส 59

รูปที่ 4.12 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) ของ 18SL, 18SM และ 18SS เพื่อหาความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอทั้ง 3 แลบจากสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ G4 60

รูปที่ 4.13 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) คำนวณระยะทางด้วยวิธี Maximum Likelihood Method (Bootstrap 1,000 รอบ) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว G4 และสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่น ๆ 26 สายพันธุ์..... 62

รูปที่ 4.14 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการติดตามยีนไฮโดรจีเนส (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010)..... 64

รูปที่ 4.15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการติดตามยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ HvF2 และ HvR1/HydAR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis..... 66

รูปที่ 4.16 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการติดตามยีนไฮโดรจีเนสโดยใช้สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์บน cDNA..... 68

รูปที่ 4.17 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการติดตามยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ HydA_F1 และ HydA_R1 และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis..... 69

รูปที่ 4.18 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการติดตามยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนสโดยใช้สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์บน cDNA 71

รูปที่ 4.19 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการติดตามยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนสโดยใช้สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์บน cDNA 73

รูปที่ 4.20 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการติดตามยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮด์-
 ทรอจีเนสด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ ADH1_F1 และ ADH1_R1 /ADH1_R2
 และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis 74

รูปที่ 4.21 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการติดตามยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮด์-
 ทรอจีเนสด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ ADH2_F1 และ ADH2_R1
 และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis 75

รูปที่ 4.22 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ blastn ของชิ้นส่วน DNA ที่ได้จากการ PCR
 ในสายรหัสยีน *Micractinium* sp. KLSc62..... 76

รูปที่ 4.23 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและ
 เติมน้ำตาลที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสายรหัส
 ยีน *Micractinium* sp. KLSc62 77

รูปที่ 4.24 แสดงการคัดเลือกตัวอย่างในจุด A-E เพื่อนำส่งวิเคราะห์เมแทบอลิซึม
 ภายในเซลล์ในสายรหัสยีน *Micractinium* sp. KLSc62 จากอัตรา
 การผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP และในอาหาร TAP ที่เติมน้ำตาล
 ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30 มิลลิโมลาร์..... 80

รูปที่ 4.25 แสดงการจัดกลุ่มของ Parent Mass Retention time (min) ในกลุ่มที่
 มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้นแบบที่ 1 (Up-Regulation) 82

รูปที่ 4.26 แสดงการจัดกลุ่มของ Parent Mass Retention time (min) ในกลุ่มที่
 มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้นแบบที่ 2 (Up-Regulation) 83

รูปที่ 4.27 แสดงการจัดกลุ่มของ Parent Mass Retention time (min) ในกลุ่มที่
 มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่ลดลงแบบที่ 3 (Down-Regulation) 84

รูปที่ 4.28 แสดงการจัดกลุ่มของ Parent Mass Retention time (min) ในกลุ่มที่
 มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่ลดลงแบบที่ 4 (Down-Regulation) 85

รูปที่ ค-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสายรหัสยีน *Micractinium* sp.
 KLSc62 (OD₇₅₀) และปริมาณคลอโรฟิลล์ 108

รูปที่ ค-2 แสดงการสกัดคลอโรฟิลล์หลังจากบ่มครบ 24 ชั่วโมงของสายรหัสยีน
Micractinium sp. KLSc62..... 108

รูปที่ ง-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสายรหัสยีน (OD₇₅₀) และ
 น้ำหนักเซลล์แห้ง 109

รูปที่ ง-2 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของสายรหัสยีน *Micractinium* sp. KLSc62
 หลังจากการกรอง 109

รูปที่ จ-1 กราฟมาตรฐานเอทานอล 111

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|-----|
| รูปที่ จ-2 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของเอทานอลที่ได้จากการวิเคราะห์จากเครื่อง แก๊สโครมาโตกราฟ..... | 111 |
| รูปที่ ฉ-1 กราฟมาตรฐานอะซีทัลดีไฮด์..... | 113 |
| รูปที่ ฉ-2 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของอะซีทัลดีไฮด์ที่ได้จากการวิเคราะห์จากเครื่อง แก๊สโครมาโตกราฟ..... | 113 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ..... | 13 |
| ตารางที่ 2.2 ข้อดีและข้อเสียของการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ | 16 |
| ตารางที่ 3.1 แสดงสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิต ได้จากสาหร่ายด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี เทอร์มอลคอนดักทีวิตี- เทคเตอร์ (Gas Chromatography-Thermal conductivity detector; GC-TCD)..... | 31 |
| ตารางที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบของการทำ Polymerase chain reaction..... | 32 |
| ตารางที่ 3.3 แสดงสถานะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเครื่องเพิ่มปริมาณ สารพันธุกรรม | 33 |
| ตารางที่ 3.4 แสดงองค์ประกอบในปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน..... | 36 |
| ตารางที่ 3.5 แสดงสถานะที่ใช้ในปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริป..... | 36 |
| ตารางที่ 3.6 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนไฮโดรจีเนส | 36 |
| ตารางที่ 3.7 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส..... | 37 |
| ตารางที่ 3.8 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนไฮโดรจีเนสออกแบบโดย นางสาวรชนีกร กลิ่นสาลี | 37 |
| ตารางที่ 3.9 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสออกแบบโดย นางสาวรชนีกร กลิ่นสาลี | 37 |
| ตารางที่ 3.10 แสดงการสลับไขว้ของไพรเมอร์เพื่อการเข้าคู่กันของไพรเมอร์เพื่อหา ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส | 38 |
| ตารางที่ 3.11 แสดงองค์ประกอบของการทำ Polymerase chain reaction เพื่อหา ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส | 38 |
| ตารางที่ 3.12 แสดงสถานะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเครื่องเพิ่มปริมาณ สารพันธุกรรมเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสและยีนแอล- กอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส..... | 38 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---------------|--|-----|
| ตารางที่ 3.13 | แสดงองค์ประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อยีนที่สนใจเข้ากับพลาสมิด..... | 39 |
| ตารางที่ 3.14 | แสดงองค์ประกอบเติมสารอื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อใช้ในการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนยีนเป้าหมาย | 40 |
| ตารางที่ 3.15 | แสดงสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์วิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลและอะซีทิลดีไฮด์ที่อยู่ในระบบด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีเฟรมไอออนไนท์เซชัน ดีเทคเตอร์ | 41 |
| ตารางที่ 4.1 | แสดงการระบุเมแทบอลิต์ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้นแบบที่ 1 (Up-Regulation) สถานะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นแต่ในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิต์ที่ลดลงที่ระบุโดย Mass spectrometry ESI/QTOF | 86 |
| ตารางที่ 4.2 | แสดงการระบุเมแทบอลิต์ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้นแบบที่ 2 (Up-Regulation) สถานะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้นตามเช่นกัน ที่ระบุโดย Mass spectrometry ESI/QTOF | 87 |
| ตารางที่ 4.3 | แสดงการระบุเมแทบอลิต์ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่ลดลงแบบที่ 3 (Down-Regulation) สถานะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกลดลงแต่ในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้นที่ระบุโดย Mass spectrometry ESI/QTOF | 88 |
| ตารางที่ 4.4 | แสดงการระบุเมแทบอลิต์ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่ลดลงแบบที่ 4 (Down-Regulation) สถานะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกลดลงและในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิต์ที่ลดลงตามเช่นกัน ที่ระบุโดย Mass spectrometry ESI/QTOF | 89 |
| ตารางที่ ก-1 | อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP) | 104 |
| ตารางที่ ฅ-1 | รหัสและรายชื่อของสารยาสีเขียวในคลังหน่วยวิจัยพลังงานชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง..... | 116 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบัน ประเทศไทยมีการขยายตัวทั้งในด้านเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก รวมทั้งจำนวนประชากรในประเทศที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ความต้องการพลังงานที่จะนำมาใช้ในชีวิตประจำวันเพื่อการดำรงชีวิตของมนุษย์และใช้ในอุตสาหกรรมมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว แหล่งพลังงานที่มนุษย์หลักนิยมใช้ในปัจจุบัน คือ พลังงานที่ได้จากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น ถ่านหิน น้ำมันดิบ และ ก๊าซธรรมชาติ ซึ่งแหล่งพลังงานเหล่านี้มีอยู่ในปริมาณจำกัดและคาดว่าจะหมดไปในอนาคตอันใกล้นี้ นอกจากนี้ การเผาไหม้พลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิลยังปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะโลกร้อนอีกด้วย ดังนั้น มนุษย์จึงจำเป็นต้องแสวงหาแหล่งพลังงานทางเลือกแหล่งใหม่ที่เป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียน ให้ค่าพลังงานสูงและเป็นมิตรกับ สิ่งแวดล้อม พลังงานทางเลือกแหล่งใหม่มีหลายชนิด ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังงานจากมวลชีวภาพ และพลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น

พลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen, H_2) จัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจในการนำมาเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญในอนาคต เนื่องจากพลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่ให้ค่าความร้อนสูง โดยให้พลังงานเท่ากับ 141.65 เมกะจูลต่อกิโลกรัม (Perry, 1963) เมื่อทำการเผาไหม้ไฮโดรเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและไม่ปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นสาเหตุของสภาวะโลกร้อน ในการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพนั้นมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ เช่น แบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไชยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว ฯลฯ ในบรรดาสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมา สาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวสามารถใช้แสงอาทิตย์ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจนโดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวยังสามารถตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศมาใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 fixation) เพื่อผลิตสารประกอบคาร์โบไฮเดรตและชีวมวล ซึ่งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์นี้จะช่วยลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศที่เป็นสาเหตุของสภาวะโลกร้อนอีกด้วย ในปัจจุบันเอทานอลเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่ดีเมื่อเทียบกับแหล่งพลังงานในรูปน้ำมันเชื้อเพลิงปิโตรเลียมอื่นที่นำมาจากใต้พื้นพิภพ เนื่องจากเอทานอลมีกระบวนการผลิตมาจาก zero carbon dioxide นั่นคือการนำคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศกลับมาผลิตเป็นเอทานอลใหม่ จึงทำให้กระบวนการเผาไหม้เอทานอลนี้ไม่ส่งผลต่อปริมาณรวมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศโลก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการผสมเอทานอลลงในน้ำมันเบนซินเพื่อจำหน่ายน้ำมันในหลายผลิตภัณฑ์เช่น น้ำมันแก๊สโซฮอล์95 น้ำมันแก๊สโซฮอล์91 E20 B10 หรือ B7 เป็นต้น เพื่อเป็นการลดสัดส่วนการใช้น้ำมันที่ได้มาจากใต้พื้นพิภพนั่นเอง อย่างไรก็ตาม เทคโนโลยีการผลิตเอทานอลได้มาสู่จุดสูงจนมนุษย์สามารถผลิตเอทานอลขายได้ในราคาที่ต่ำลง

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเอทานอลที่เติมลงไปถือว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าสินค้าให้กับแหล่งพลังงานให้สูงขึ้นด้วยแม้ว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะสามารถผลิตได้จากกระบวนการ Electrolysis ของน้ำ แต่ไฟฟ้าเหล่านั้นก็ถูกผลิตมาจากถ่านหินซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่ยังคงเพิ่มระดับของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศโลก การใช้สาหร่ายสีเขียวให้เป็นผู้ผลิตไฮโดรเจนจึงเป็นหนึ่งในทางออกของปัญหานี้และผู้วิจัยยังสนใจศึกษาการแสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและการแสดงลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีเอทานอลอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อค้นหาสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไฮโดรเจน ภายใต้สภาวะการบ่มกับเอทานอล
- 1.2.2 เพื่อสืบค้นความเข้มข้นเอทานอลที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน
- 1.2.3 เพื่อแสดงลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายด้วยยีน *18S rDNA*
- 1.2.4 เพื่อศึกษาเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ระหว่างกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวจำนวน 14 สายพันธุ์ จากคลังสาหร่ายซึ่งคัดแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์แล้วโดยสมาชิกในหน่วยวิจัยพลังงานชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 1.3.2 สืบค้นความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมแก่การผลิตไฮโดรเจน
- 1.3.3 สืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *18S rDNA* จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) และเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) และการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree)
- 1.3.4 ศึกษาการตามสืบค้นยีนไฮโดรจีเนสและแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ทั้งระดับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1.3.5 ตรวจวัดการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ปริมาณเอทานอล ปริมาณอะซีทัลดีไฮด์ของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก
- 1.3.6 ตรวจวัดกิจกรรมของไฮโดรจีเนสเอนไซม์
- 1.3.7 ติดตามเมแทบอลิต์ที่เปลี่ยนแปลงของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก ภายใต้สภาวะการบ่มด้วยเอทานอล

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ได้ผลผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่สูงมากยิ่งขึ้น
- 1.4.2 ทราบถึงความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว
- 1.4.3 ได้สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้อิทธิพลของเอทานอล
- 1.4.4 ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองระดับเมแทบอลิซึมของสาหร่ายสีเขียวภายใต้อิทธิพลของเอทานอล
- 1.4.5 เป็นองค์ความรู้เริ่มต้นสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับที่ขยายการผลิตที่ใหญ่ขึ้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

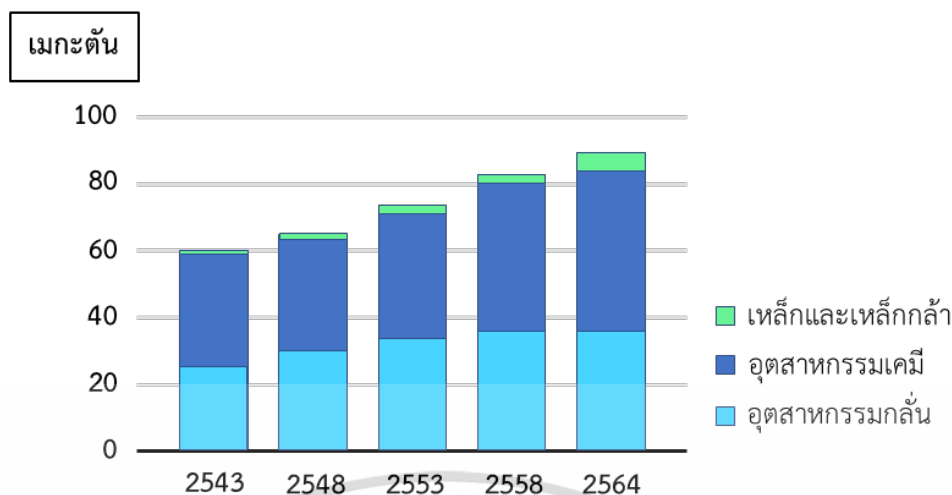
2.1 พลังงานไฮโดรเจน

พลังงานไฮโดรเจนมีศักยภาพที่จะเป็นแหล่งพลังงานทดแทนของโลกในสภาวะปกติไฮโดรเจนอยู่ในสถานะแก๊ส ติดไฟง่าย มีความสะอาด และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อเผาไหม้ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิง จะคายพลังงานความร้อนสูงถึง 286 กิโลจูลต่อโมลของไฮโดรเจน และมีเพียงไอน้ำเป็นผลิตภัณฑ์ ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 สมการการเผาไหม้ของไฮโดรเจน

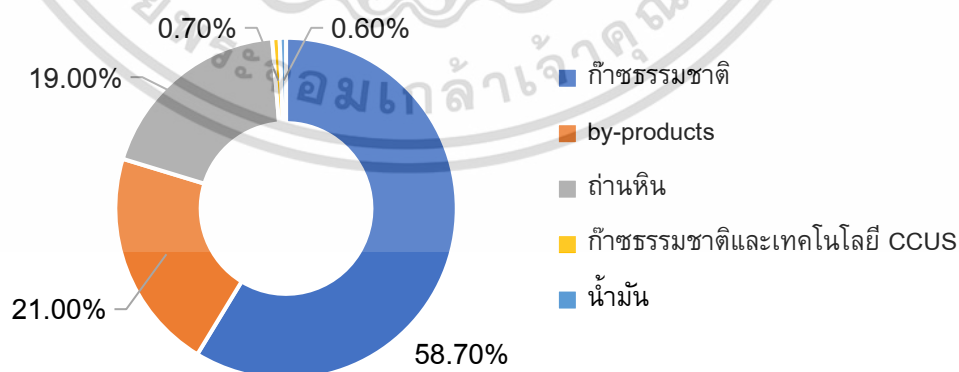
แม้ว่าพลังงานไฮโดรเจนจะมีศักยภาพที่สูง แต่ยังไม่สามารถแทนที่พลังงานอื่น ๆ เช่น การขนส่ง การให้ความอบอุ่นในอาคาร การผลิตไฟฟ้า ได้อย่างเต็มที่ ในปัจจุบันการใช้งานและความต้องการพลังงานไฮโดรเจน จึงจำกัดอยู่ในภาคอุตสาหกรรมเป็นส่วนใหญ่ แต่อย่างไรก็ตาม องค์การพลังงานระหว่างประเทศ (International energy agency) (International Energy Agency, 2021) (รูปที่ 2.2) ได้ผลักดันนโยบายมุ่งสู่พลังงานสะอาดและลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจกสุทธิเป็นศูนย์ (Net Zero Emission) ความต้องการพลังงานไฮโดรเจนในอนาคตจึงมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ขณะที่ความต้องการไฮโดรเจนในปี พ.ศ. 2564 อยู่ที่ 90 เมกะตัน ซึ่งผลิตได้จากแหล่งฟอสซิลเกือบทั้งหมด ผลิตปล่อยคาร์บอนมอนอกไซด์มากถึง 900 เมกะตัน การผลิตไฮโดรเจนที่สะอาดจึงเป็นที่ต้องการ และมีการศึกษาอย่างมาก



รูปที่ 2.2 ความต้องการไฮโดรเจนตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 ถึง 2564 (ดัดแปลงจาก IEA, 2021)

2.2 การผลิตไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากหลากหลายแหล่ง เช่น ถ่านหิน น้ำมัน ก๊าซธรรมชาติ ชีวมวล และนิวเคลียร์ (รูปที่ 2.3) ผ่านวิธีการต่าง ๆ เช่น การกลั่น (reforming) แก๊สซิฟิเคชัน (gasification) อิเล็กโทรไลซิส (electrolysis) ไพโรไลซิส (pyrolysis) และอื่น ๆ (รูปที่ 2.3) ไฮโดรเจนส่วนใหญ่ผลิตจากก๊าซธรรมชาติและฟอสซิลมากถึง 58 เปอร์เซ็นต์ โดยกระบวนการเปลี่ยนรูปก๊าซไปโอมีเทนอัดด้วยไอน้ำ (Steam methane reforming) ซึ่งมีการปล่อยก๊าซเรือนกระจก รองลงมาเป็น by-products 21 เปอร์เซ็นต์ เป็นไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นในโรงงานที่ออกแบบมาสำหรับผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เป็นหลัก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโรงกลั่น ซึ่งการเปลี่ยนรูปของเนฟทาเป็นน้ำมันเบนซินส่งผลให้เกิดไฮโดรเจนออกมา ในปัจจุบันการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งได้เป็น 3 กระบวนการ ดังนี้



รูปที่ 2.3 แหล่งที่มาของไฮโดรเจนในปี พ.ศ. 2564 (ดัดแปลงจาก IEA, 2021)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีทางความร้อน

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีการทางความร้อนเคมี (Thermochemical process) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติโดยนำก๊าซธรรมชาติมาทำปฏิกิริยากับไอน้ำที่มีความร้อนสูง กระบวนการนี้อาจเรียกว่า กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (Steam reforming process) สารตั้งต้นของกระบวนการนี้ ได้แก่ ก๊าซธรรมชาติ เอทานอลหมักจากวัสดุธรรมชาติ เป็นต้น ในปัจจุบัน 95 เปอร์เซ็นต์ของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้จะใช้กระบวนการนี้ในการผลิต หากใช้มีเทนเป็น สารตั้งต้น อาจเรียกกระบวนการนี้ว่า Steam Methane Reformation (SMR)

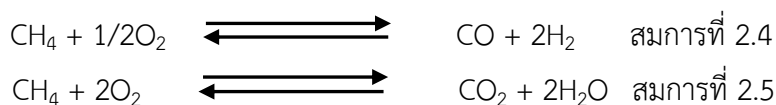
กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ (1) การนำก๊าซธรรมชาติมาทำปฏิกิริยากับไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูง เพื่อให้ได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน (สมการที่ 2.1 และสมการที่ 2.2) จากขั้นที่ 1 จะเห็นได้ว่ามีก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์เกิดขึ้นด้วย ดังนั้น ในขั้นที่ (2) จะมีการนำไอน้ำเข้ามาทำปฏิกิริยากับก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์อีกครั้งเพื่อให้ก๊าซไฮโดรเจนในปริมาณเพิ่มขึ้น (สมการที่ 2.3)



ปัจจุบัน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนส่วนใหญ่ได้มาจากกระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำเป็นหลัก ปฏิกิริยาทั้งหมดเป็นปฏิกิริยาที่ย้อนกลับได้และจำเป็นต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมด้วย จะเห็นได้ว่า ปฏิกิริยาขั้นที่ 1 เป็นปฏิกิริยาเคมีแบบดูดความร้อน และถูกควบคุมด้วยอิทธิพลทางเทอร์โมไดนามิกส์ จึงจำเป็นต้องทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงเพื่อให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์

นอกจากกระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ ยังมีกระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางความร้อนเคมีอีกกระบวนการหนึ่งที่มีชื่อว่า กระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification) ซึ่งเป็นกระบวนการนำสารตั้งต้นที่มักเป็นสารประกอบ อินทรีย์ เช่น ก๊าซมีเทน เอทานอล และชีวมวล เป็นต้น มาทำปฏิกิริยากับออกซิเจนภายใต้อุณหภูมิสูง โดยทั่วไปปฏิกิริยานี้มักทำที่อุณหภูมิสูงกว่า 700 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาออกซิเดชันบางส่วนของก๊าซมีเทนคือ ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (สมการที่ 2.4) และหากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (สมการที่ 2.5) ซึ่งตัวแปรที่ควบคุมว่าปฏิกิริยาที่

เกิดขึ้นนั้นเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบบางส่วนหรือออกซิเดชัน แบบสมบูรณ์นั้นคือ ปริมาณก๊าซออกซิเจน



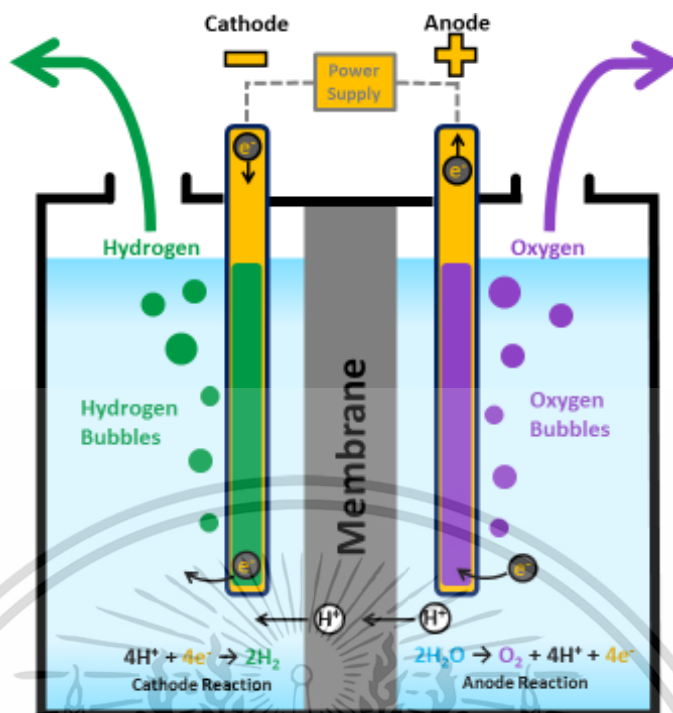
หากใช้ชีวมวลเป็นสารตั้งต้นจะได้ผลิตภัณฑ์ คือ ก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซมีเทน ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (NO_x) นอกจากนี้ กระบวนการแก๊สซิฟิเคชันมีการปลดปล่อยเขม่าเกิดขึ้นมากกว่ากระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ และปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่สังเคราะห์ได้ยังน้อยกว่ากระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำอีกด้วย

2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนโดยแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

การผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrolysis of water) เป็นกระบวนการที่ใช้กระแสไฟฟ้าเพื่อแยกโมเลกุลของน้ำ ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจน และออกซิเจน (สมการที่ 2.6)



กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการแยกน้ำด้วยไฟฟ้าสามารถใช้ไฟฟ้าที่มาจากแหล่งกำเนิดไฟฟ้าทุกชนิด ไม่ว่าจะเป็นไฟฟ้าจากแหล่งพลังงานหมุนเวียน รวมทั้งแหล่งพลังงานนิวเคลียร์ กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าอาศัยอิเล็กโทรด (Electrode) 2 ขั้วที่ตรงข้ามกัน คือ อิเล็กโทรดขั้วบวก (Anode) และอิเล็กโทรดขั้วลบ (Cathode) วิธีการเตรียม คือ จุ่มอิเล็กโทรดลงในน้ำที่ทำให้มีความเป็นตัวนำมากขึ้นโดยการเติมสารพวกอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte) เช่น กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ลงไปไฮโดรเจนอะตอมจะเข้าไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบและออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะอิเล็กโทรดขั้วบวก (รูปที่ 2.4) กระบวนการนี้ต้องใช้กระแสไฟฟ้า สูงถึง 90 กิโลวัตต์ และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต กระบวนการนี้มีข้อดี คือ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง แต่มีข้อเสียคือ ต้องใช้กระแสไฟฟ้าจำนวนมาก ในขั้นตอนของการแยกสลายตัวของน้ำ และจะต้องทำในสภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียส (Mattos and Noronha, 2005)



รูปที่ 2.4 การผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Azwar *et al.*, 2014)

2.2.3 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพ

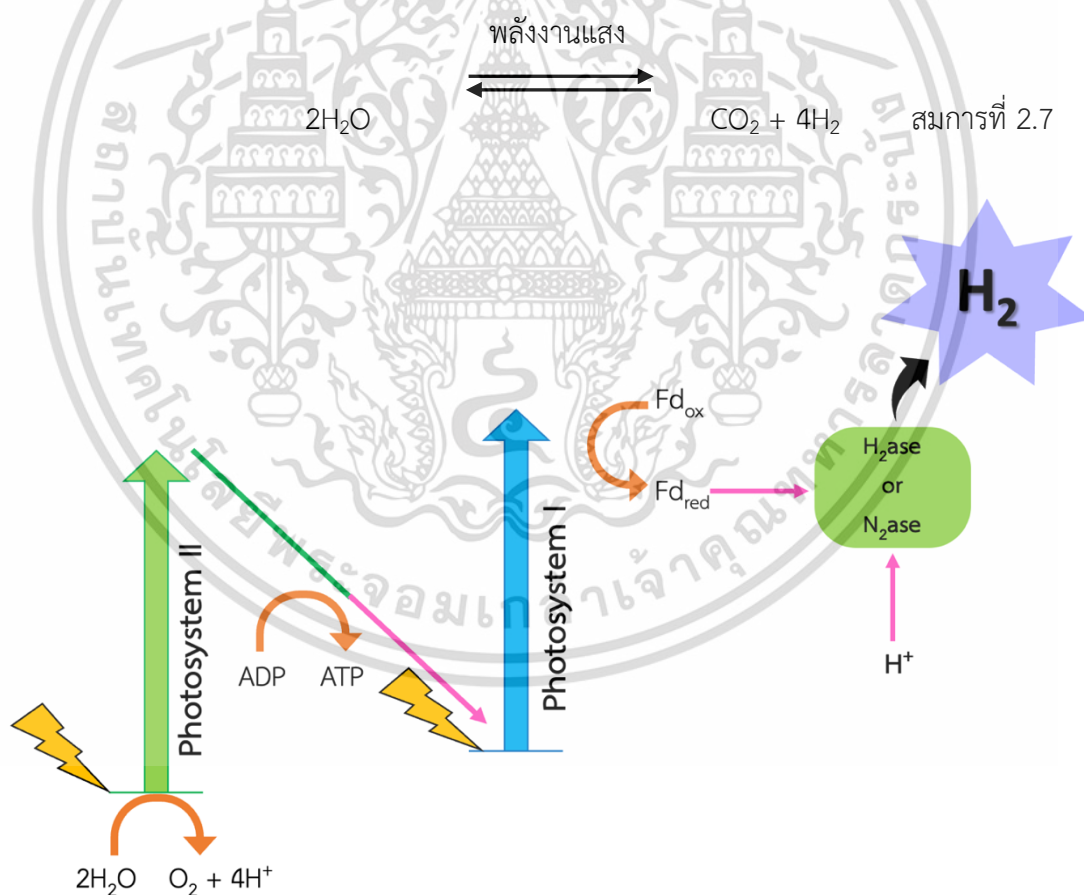
สิ่งมีชีวิตหลายชนิดมีลักษณะและเมแทบอลิซึม (Metabolism) ที่มีผลพลอยได้เป็นไฮโดรเจน เช่น สาหร่ายสีเขียว (Green microalgae) ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria) และแบคทีเรียที่สามารถหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark fermentative bacteria) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพเป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหรือจุลินทรีย์ ไฮโดรเจนที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตถูกเรียกว่า “ไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen)” จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว เป็นต้น แบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจน ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวใช้เพียงแสงและน้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง สำหรับไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจาก กระบวนการตรึงไนโตรเจนได้เช่นกัน (Hallenbeck and Benemann, 2002) โดยทั่วไปการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพสามารถแบ่งเป็น 4 กระบวนการหลัก ๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis)

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรงสามารถพบได้ในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก เช่น สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* (Melis *et al.*, 2000) และ *Chlorella fusca* (Winkler *et al.*, 2002) เป็นต้น ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว เมื่อระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) ของสาหร่ายได้รับพลังงานแสงจะเกิดการกระตุ้นการแตกตัวของน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน (O_2) โปรตอน (H^+) และอิเล็กตรอน (e^-) (สมการที่ 2.7) จากนั้น อิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) และส่งต่อไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไปจนกระทั่งมาถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย คือ เฟอร์รีดอกซิน (Fd) โดยเฟอร์รีดอกซินที่ถูกรีดิวซ์จะส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อสร้างไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (รูปที่ 2.5) (Hallenback and Benemann, 2002)



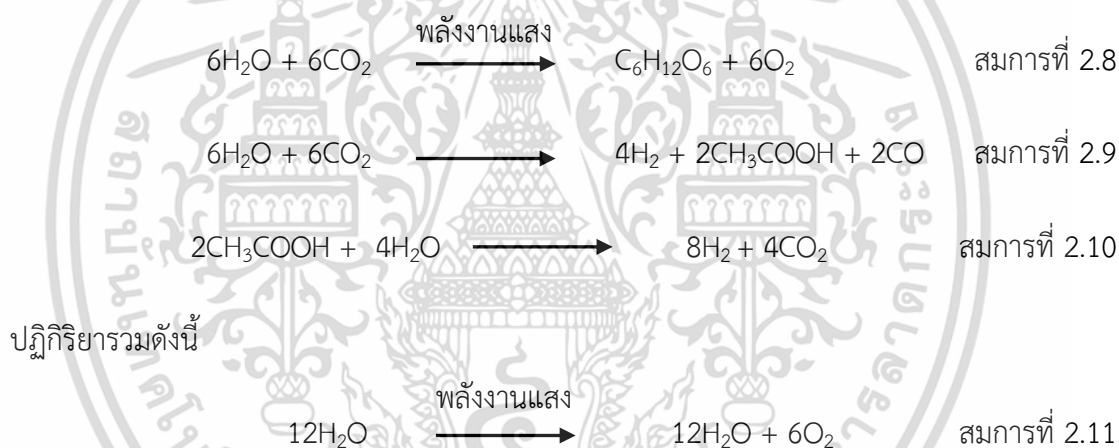
รูปที่ 2.5 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง

(ดัดแปลงจาก Hallenback and Benemann, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.2 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสง แบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis)

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม สามารถพบได้ในสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำ ด้วยแสงแบบทางอ้อมสามารถแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้ ขั้นตอนแรกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจะใช้พลังงานแสงผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงหนึ่งและระบบแสงสองร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อผลิตเป็นคาร์โบไฮเดรตและเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ (สมการที่ 2.8) ขั้นตอนที่สอง เป็นการนำคาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสมไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนโดยกลูโคสของสาหร่ายจะถูกสลายไปเป็นโมเลกุลของอะซีเตท 2 โมเลกุลต่อไฮโดรเจน 4 โมเลกุล (สมการที่ 2.9) และอะซีเตทจะถูกสลายไปเป็นโมเลกุลของไฮโดรเจนเพิ่มได้อีก (สมการที่ 2.10) จาก ปฏิกิริยาทั้งหมด จะเห็นได้ว่าการสลายกลูโคส 1 โมเลกุล ใช้ น้ำ 12 โมเลกุล สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 12 โมเลกุล (สมการที่ 2.11)

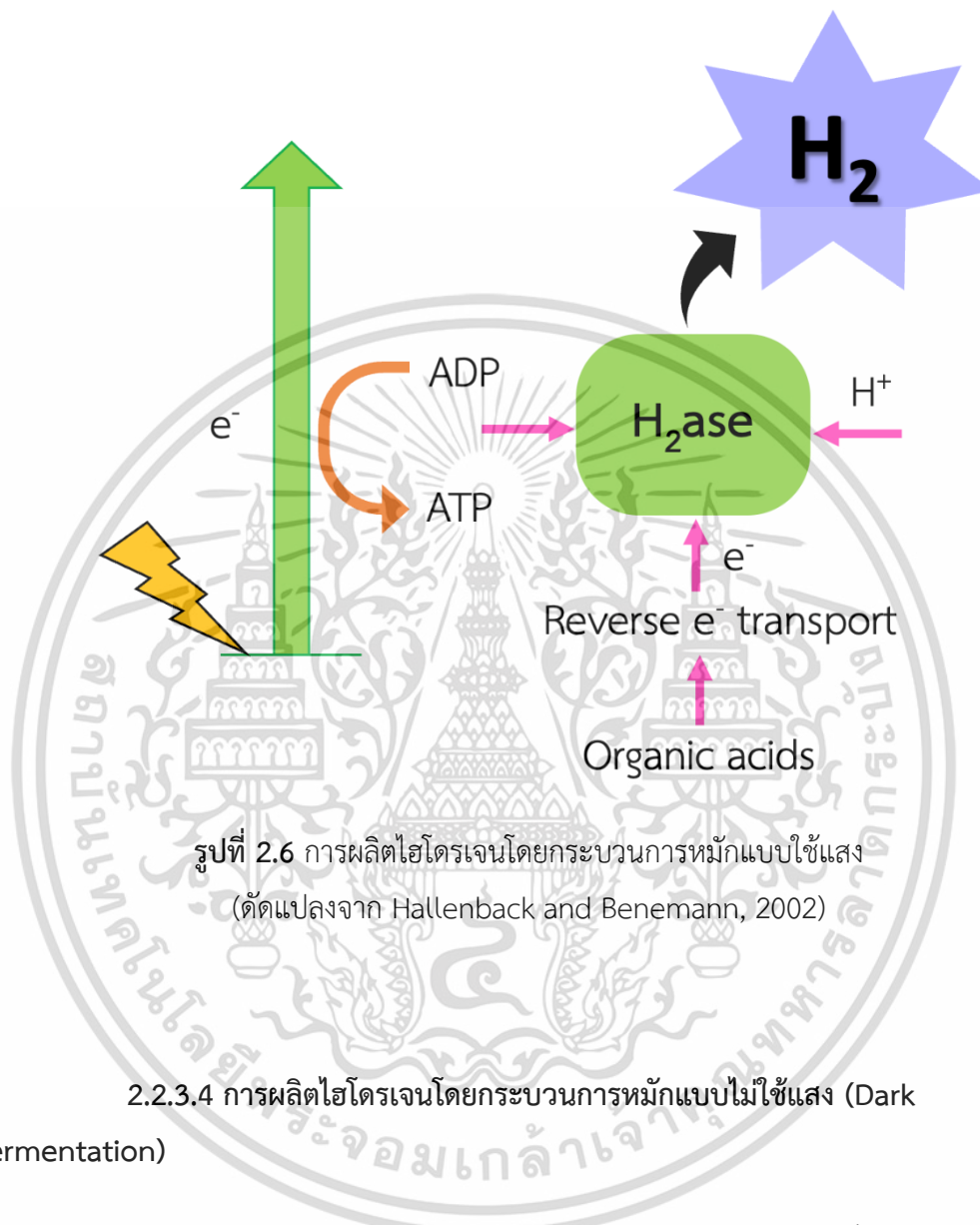


2.2.3.3 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง (Photofermentation)

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง สามารถพบได้ในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น *Rhodobacter capsulatus* (Hillmer and Gest, 1977) *Rhodospseudomonas palustris* (Barbosa et al., 2001) และ *Rhodospirillum rubrum* (Miyake et al., 1982) เป็นต้น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงประกอบด้วยระบบสังเคราะห์แสงระบบเดียว แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิตไฮโดรเจนผ่านระบบแสงหนึ่ง โดยอาศัยเอนไซม์ไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะที่มีแสงและพลังงานในรูปของ ATP ในการขนส่งอิเล็กตรอน นอกจากนี้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้สารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะซีติก กรดแลคติก และกรดบิวทีริก เป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านไปยังเฟอร์รีดอกซินโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาศัยพลังงานในรูป ATP จากนั้น เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเพื่อผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 2.6)



2.2.3.4 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark

fermentation)

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงเป็นกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์ให้เป็นไฮโดรเจน กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงมีข้อได้เปรียบเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและจากกระบวนการหมักแบบใช้แสง คือ การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่ากระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการอื่นๆ และสามารถใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก เช่น น้ำตาลกลูโคส ซีววมวล ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และของเสีย จากการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น (Chen *et al.* 2006) และให้ผลพลอยได้เป็น สารอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อใช้กลูโคส 1 โมเลกุลเป็นสารตั้งต้น จะสามารถผลิตกรดอะซีติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และได้โมเลกุลของไฮโดรเจน 4 โมเลกุล (สมการที่ 2.12) หรือผลิตกรดบิวทีริกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และได้ โมเลกุลของไฮโดรเจน 2 โมเลกุล (สมการที่ 2.13) (Hawkes *et al.*, 2002)



การเพิ่มผลผลิตของไฮโดรเจนในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงจำเป็นต้องควบคุม ปัจจัยต่าง ๆ เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิ เป็นต้น เนื่องจากค่าพีเอชและอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Venkata *et al.*, 2007) จากการที่ได้กล่าวมาข้างต้น จะเห็นว่า การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพ สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไชยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพแต่ละกระบวนการจะมีสารตั้งต้นและกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ (Azwar *et al.* 2014)

| กระบวนการผลิตไฮโดรเจน | สารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน | ลักษณะทั่วไป |
|--|---|---|
| 1. กระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรงและทางอ้อม | <ol style="list-style-type: none"> ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้นในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน | <ol style="list-style-type: none"> ใช้เพียงน้ำ คาร์บอนไดออกไซด์และแสงอาทิตย์ในการผลิตไฮโดรเจน ไฮโดรเจนสามารถถูกผลิตได้โดยตรงจากน้ำและแสงอาทิตย์ ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนโดยการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ พบได้ในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว |
| 2. กระบวนการหมักแบบใช้แสง | <ol style="list-style-type: none"> ใช้อินทรีย์สารเป็นสารตั้งต้น กระบวนการหมักแบบใช้แสงนี้เกิดขึ้นในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน | <ol style="list-style-type: none"> สามารถใช้สารอินทรีย์ที่หลากหลายเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจน เช่น กรดอะซิติก กรดแลคติกและกรดบิวทีริก พบได้ในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ใช้แสงอาทิตย์เป็นพลังงานในการเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้เป็นไฮโดรเจน |
| 3. กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง | <ol style="list-style-type: none"> ใช้อินทรีย์สารและชีวมวลเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจน กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงนี้เกิดขึ้นในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน | <ol style="list-style-type: none"> สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในที่มีด มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูง สามารถใช้อินทรีย์สารที่มีมูลค่าต่ำในกระบวนการผลิต เช่น น้ำตาลกลูโคส ชีวมวล ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ของเสียจากการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรม ได้ผลิตผลพลอยได้หลายชนิด เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ |

2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจน

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการทางชีวภาพ มี 3 ชนิดใหญ่ๆ ดังนี้

2.3.1 แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.3.1.1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสังเคราะห์แสงได้ โดยไม่สร้างออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Anoxygenic phototrophic bacteria) แบคทีเรียในกลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) แบคทีเรียสีม่วงไม่สะสมกำมะถัน (Non-sulfur purple bacteria) ได้แก่ *Athiorhodeceae* sp. (Yin and Wang, 2022) และ *Rhodospirillaceae* sp. (Yin and Wang, 2022) (2) แบคทีเรียสีม่วงที่สะสมกำมะถัน (Purple sulfur bacteria) ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceae* sp. (3) แบคทีเรียสีเขียวที่สะสมกำมะถัน (Green sulfur bacteria) ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp. (Yin and Wang, 2022) แบคทีเรียในกลุ่มนี้ผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยกระบวนการหมักแบบใช้แสง แบคทีเรียในกลุ่มนี้โดยมีรงควัตถุ คือ แบคทีริโอคลอโรฟิลล์ (Bacteriochlorophyll) ที่ต่างออกไปจากรงควัตถุของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว ในการสังเคราะห์แสงแบคทีเรียกลุ่มนี้สังเคราะห์แสงโดยไม่ได้ ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์และสามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์ ซัลเฟอร์ และสารประกอบอินทรีย์เป็นสารให้อิเล็กตรอน

2.3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมัก (Dark fermentative bacteria)

แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถหมักน้ำตาลหรือแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น เช่น น้ำตาลกลูโคส ซิวมวล ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและของเสียจากการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น เพื่อใช้เป็นสารให้อิเล็กตรอนสำหรับผลิตไฮโดรเจน แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน ได้ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Magashaera elsdenii*, *Citrobacter intermedius* และ *Escherichia coli* (Yin and Wang, 2022) เป็นต้น

2.3.2 ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอตที่สังเคราะห์แสงแล้วได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Oxygenic phototrophic prokaryote) ไซยาโนแบคทีเรียมีระบบแสง 2 ระบบและมีกระบวนการสังเคราะห์แสงและชนิดคลอโรฟิลล์เหมือนสาหร่ายสีเขียวและพืช กระบวนการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียคล้ายกับสาหร่ายสีเขียว โดยการผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์แสงแต่ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนได้ ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ ได้แก่ *Anabaena* sp., *Aphanocapsa* sp., *Calothrix* sp., *Mastigocladus* sp., *Nostoc* sp. และ *Synechocystis* sp. (Yin and Wang, 2022) เป็นต้น

2.3.3 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

สาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศทั้งในที่มืด และที่มีแสง การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสง เรียกว่า Photohydrogen production สาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp., *Codium* sp. และ *Scenedesmus* sp. (Gaffron and Rubin, 1942) เป็นต้น การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย สีเขียวส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสง แต่ออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการแตกตัวของน้ำในกระบวนการสังเคราะห์แสงจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้สาหร่ายสีเขียวมีการผลิตไฮโดรเจนลดลง

ในปัจจุบัน สาหร่ายสีเขียวได้รับความสนใจที่จะนำมาผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากสาหร่ายสีเขียว มีข้อได้เปรียบเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นคือ สาหร่ายสีเขียวสามารถนำเอาพลังงานจากแสงอาทิตย์และน้ำซึ่งเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วทั้งภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปและโฟโตเฮเทอโรโทรป รวมถึงใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย ดังนั้น จึงเป็นการลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยง อีกทั้งยังให้ผลิตผลพลอยได้ที่มีมูลค่าสูง ผลพลอยได้สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ สารปฏิชีวนะ เครื่องสำอาง และยารักษาโรค ฯลฯ การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีข้อดีและข้อเสีย ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ข้อดีและข้อเสียของการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ (Das and Veziroglu, 2001)

| ชนิดของสิ่งมีชีวิต | เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน | ข้อดี | ข้อเสีย |
|------------------------|--|---|---|
| สาหร่ายสีเขียว | เอนไซม์ไฮโดรจีเนส | - สามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำและพลังงานแสง | - ออกซิเจนที่เกิดการกระบวนการสังเคราะห์แสงสามารถยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนได้ เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวคือเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจน |
| ไซยาโนแบคทีเรีย | เอนไซม์ไฮโดรจีเนส เอนไซม์ไนโตรจีเนส | - สามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำและพลังงานแสง - สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ | - ออกซิเจนที่เกิดการกระบวนการสังเคราะห์แสงสามารถยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนได้ เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวคือเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจน - ในระหว่างกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียจะเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้น |
| แบคทีเรียสังเคราะห์แสง | เอนไซม์ไฮโดรจีเนส | - สามารถใช้น้ำเสีย โปรตีน เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจน | - ต้องการแสงในการผลิตไฮโดรเจน - กระบวนการหมักของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงอาจทำให้เกิดปัญหาน้ำเสียได้ เนื่องจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงบางชนิด เช่น Purple sulfur bacteria สามารถใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเพื่อให้ได้ ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและซัลไฟด์ |

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

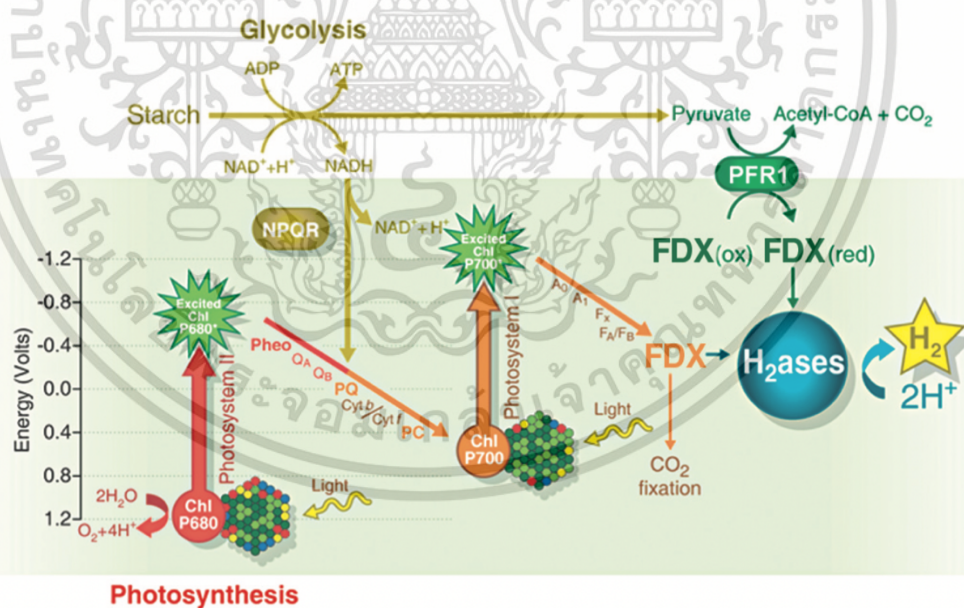
| ชนิดของสิ่งมีชีวิต | เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน | ข้อดี | ข้อเสีย |
|----------------------------------|--------------------------------|--|--|
| แบคทีเรียที่ใช้ กระบวนการหมัก | เอนไซม์ไฮโดรจีเนส | <ul style="list-style-type: none"> - สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในที่ไม่มีแสง - สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันเช่นแป้ง ซูโครส ซิโลส ได้ผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเป็นกรดอะซิติก กรดบิวทิริก กรดแลคติก เป็นต้น | <ul style="list-style-type: none"> - การผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมักจะเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างกระบวนการผลิตไฮโดรเจน |

2.4 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (green algae) ส่วนใหญ่พบได้ทั่วไปกับน้ำจืด มีเพียง 10 เปอร์เซ็นต์อาศัยในทะเล สาหร่ายสีเขียวมีสีเขียวเหมือนพืช เนื่องจากประกอบด้วยสารสีคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และ แคโรทีนอยด์อยู่รวมกันในคลอโรพลาสต์ ซึ่งคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างและจำนวนแตกต่างกัน ไพรีนอยด์อยู่ภายในคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่สร้างอาหารสะสมจำพวกแป้งซึ่งประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ผงเซลล์โดยทั่วไปประกอบด้วยเซลล์ูโลส มีโครงสร้างหลักคือ พอลิแซคคาไรด์ รูปร่างและขนาดของสาหร่ายสีเขียวแตกต่างกันมาก ตั้งแต่เซลล์เดี่ยวกลุ่มเซลล์ฟิลาเมนต์ขนาดเล็กจนถึงมีทลัสขนาดใหญ่

2.5 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการบ่มที่ปราศจากออกซิเจนทั้งในที่มืดและที่มีแสง สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas* sp. และ *Chlorella* sp. เป็นต้น ซึ่งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวเกิดขึ้นได้ 3 รูปแบบ ได้แก่ กระบวนสังเคราะห์แสงแบบทางตรง กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางอ้อมและกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 แสดงวิถีการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* (Dubini 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1 กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis)

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยใช้เพียงแสงและน้ำในการผลิตไฮโดรเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิด คือ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง จากนั้นจึงส่งต่อพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center) ซึ่งคือโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ เมื่อโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ได้รับพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้นและพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เมื่อมีพลังงานในรูปของแสงตกกระทบในบริเวณระบบแสงสอง (PSII) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร เมื่อคลอโรฟิลล์ เอ ถูกกระตุ้นจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ฟีโอไฟทิน (Pheophytin) ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Q: Primary electron acceptor of PSII) จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (PQ: Plastoquinone) ต่อมาเมื่อมีการแตกตัวของน้ำ ได้ออกเป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงสองไปแทนที่อิเล็กตรอนในคลอโรฟิลล์ที่มีการสูญเสียไปในระบบ จากนั้นอิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนนจะถูกส่งต่อไปยังไซโตโครม บี (Cytochrome b) ไซโตโครม เอฟ (Cytochrome f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) และเข้าไปยังระบบแสงหนึ่ง (PSI) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อระบบแสงหนึ่งถูกกระตุ้นจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนหรือแสงมากระตุ้นคลอโรฟิลล์ภายในระบบแสงหนึ่ง คลอโรฟิลล์จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin: Fd) อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินจะไปรวมกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็นก๊าซไฮโดรเจนขึ้น

2.5.2 กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis)

กระบวนการนี้จะเกี่ยวข้องกับระบบแสงหนึ่งและเอ็นเอดีพี พลาสโตควิโนน ออกซิโดรีดักเทส (NADP-plastoquinone oxidoreductase: NPQR) สาหร่ายสีเขียวมีความสามารถที่จะตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้ได้คาร์โบไฮเดรต เช่น แป้งหรือน้ำตาลกลูโคส จะสะสมอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งกระบวนการนี้จะเริ่มจากการย่อยสลายสารประกอบคาร์บอนภายในเซลล์ แป้งจะถูกย่อยโดยเข้ากระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis) ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นไพรูเวต จึงเกิดการปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาในรูปแบบเอ็นเอดีเอช (NADH) โดย NPQR จะนำอิเล็กตรอนที่ได้ไปยังพลาสโตควิโนน (PQ) และส่งไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวอื่น ๆ จนไปยังระบบแสงหนึ่งและถูกกระตุ้นไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส สุดท้ายได้ออกมาเป็นก๊าซไฮโดรเจน

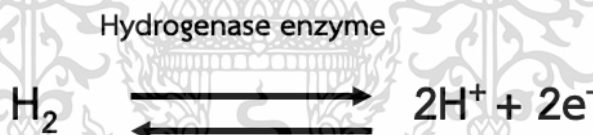
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark fermentation)

กระบวนการแบบไม่ใช้แสงจะเกิดในสภาวะไม่มีแสงและออกซิเจน ซึ่งไพรูเวตจะถูกออกซิไดซ์ผ่านเอนไซม์ไพรูเวต เพอริดอกซิน ออกซิโดรีดักเทส (Pyruvate Ferredoxin Oxidoreductase: PFR) ได้เป็นอะซิติล โคเอ (Acetyl CoA) คาร์บอนไดออกไซด์ และ อิเล็กตรอน โดยจะมีเพอริดอกซินเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายและส่งไปยังไฮโดรจีเนสเอนไซม์ และได้ออกมาเป็นก๊าซไฮโดรเจน กระบวนการนี้จะให้ไฮโดรเจนน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับกระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางตรงและทางอ้อม (Dubini 2011)

2.6 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว

เมื่อประมาณกว่า 70 ปีที่แล้ว การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวถูกค้นพบครั้งแรกโดย Gaffron และ Rubin (Gaffron and Rubin, 1942) จากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอตโดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นไฮโดรเจนและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาการเกิดและสลายไฮโดรเจน

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่มีโคแฟกเตอร์เป็นไอออนของโลหะหรือจัดเป็น “เมทัลโลเอนไซม์ (Metalloenzyme)” เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกได้เป็น 2 ชนิด ตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาดังนี้

1. เอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase)

เอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase) หรือ รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (Reversible hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน เอนไซม์นี้สามารถพบในสิ่งมีชีวิตประเภทโฟโตโทรป (Phototrophic organism) เช่น

ไซยาโนแบคทีเรีย และ สาหร่ายสีเขียว เป็นต้น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

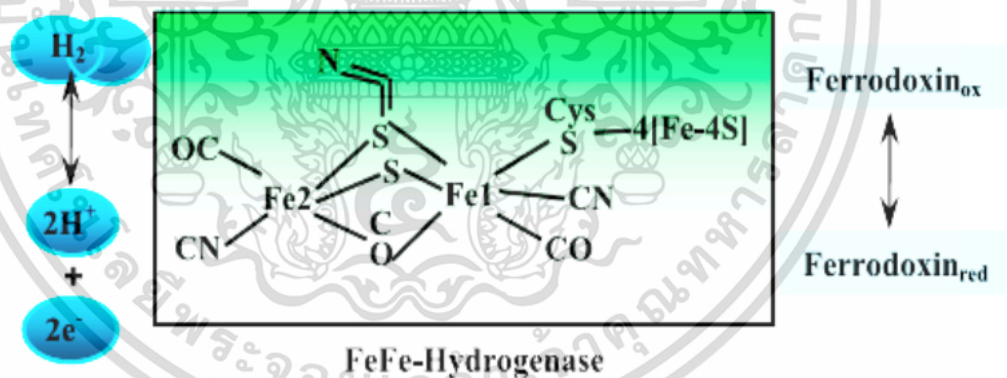
2. เอนไซม์ยูนิไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส (Unidirectional hydrogenase)

เอนไซม์ยูนิไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส (Unidirectional hydrogenase) หรือ อัฟเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน เอนไซม์นี้ส่วนใหญ่พบในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน

อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ตามชนิดของไอออนของโลหะในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ ดังนี้

2.1 เอนไซม์ที่มีเหล็กในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น (FeFe-hydrogenase)

เอนไซม์ [FeFe]-hydrogenase ประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็ก 2 อะตอมอยู่ที่ศูนย์กลางของ บริเวณกระตุ้น โดยเหล็กจะจับกับซัลเฟอร์ของกรดอะมิโนซิสเทอีนของเอนไซม์ เอนไซม์ [FeFe]-hydrogenase นี้ประกอบด้วยคลัสเตอร์ของ [2Fe-2S] และ [4Fe-4S] โดยซัลเฟอร์เปรียบเสมือนเป็นสะพานในการเชื่อมระหว่างโลหะ นอกจากอะตอมของเหล็กที่อยู่บริเวณศูนย์กลางของเอนไซม์จับกับกรดอะมิโนซิสเทอีนแล้ว เหล็กยังจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และไซยาไนด์ (CN) อีกด้วย (Maness *et al.*, 2009) (รูปที่ 2.9)



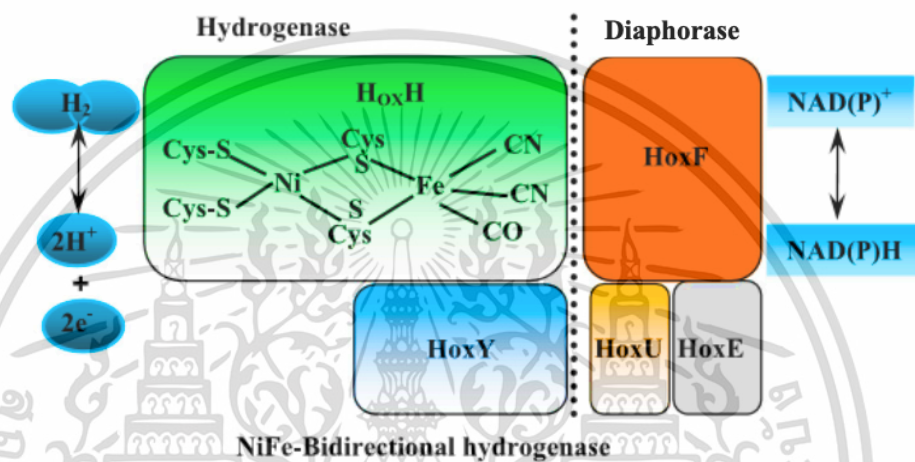
รูปที่ 2.9 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ [FeFe]-hydrogenase (Maness *et al.*, 2009)

2.2 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีนิกเกิลและเหล็กในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น (NiFe- hydrogenase)

เอนไซม์ [NiFe]-hydrogenase เป็น Enzyme complex ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ (1) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อยคือโปรตีน HoxH ซึ่งประกอบด้วยอะตอมของเหล็ก (Fe) และนิกเกิล (Ni) โดยเหล็กเชื่อมอยู่กับอะตอมของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนมอนอกไซด์ ไฮยาไนด์ และซัลเฟอร์ เอนไซม์นี้ทำหน้าที่เหมือนกับเอนไซม์ไฮโดรเจนเนสไฮโดรจีเนส โปรตีน HoxY ประกอบด้วยคลัสเตอร์ของ $[4Fe-4S]$ (2) เอนไซม์ไดอะโฟเรส (Diaphorase) ประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อย คือ โปรตีน HoxF HoxU และ HoxE ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Maness *et al.* 2009) (รูปที่ 2.10)



รูปที่ 2.10 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ [NiFe] hydrogenase (Maness *et al.*, 2009)

2.7 สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) หมายถึงปฏิกิริยาที่โมเลกุลหรืออะตอมมีการสูญเสียอิเล็กตรอนให้กับโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน นับว่าเป็นเรื่องที่น่าสนใจหากเติมสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเพื่อเพิ่มผลิตไฮโดรเจน ซึ่งมีงานวิจัย Maneeruttanarungroj *et al.* 2010 ได้ทำการศึกษาในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora sp.* CU2551 โดยการเติมสาร β -mercaptoethanol ซึ่งเป็นสารที่ให้อิเล็กตรอนลงในอาหารเหลวพบว่า มีสาหร่ายสีเขียวชนิดนี้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่มีค่าสูงสุด คือ 0.42 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อชั่วโมง เนื่องจากว่าสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่เติมลงไปในการเลี้ยงสาหร่ายสามารถให้อิเล็กตรอนและถูกถ่ายโอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอนต่าง ๆ ภายในกระบวนการสังเคราะห์แสง ส่งผลให้มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปที่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสและเกิดก๊าซไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้น

2.8 เทคโนโลยีเมแทบอลอม

เมแทบอลอมิกส์ หรือ การวิเคราะห์สารเมแทบอลิต์ (metabolite analysis) หรือ การรวบรวมข้อมูลสารเมแทบอลิต์ (metabolite profiling) เป็นศาสตร์ทางวิทยาศาสตร์อีกแขนงหนึ่งที่เน้นศึกษาเกี่ยวกับสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก (โดยทั่วไปมีขนาดไม่ต่ำกว่า 1.5 กิโลดาลตัน) ที่สังเคราะห์จากสิ่งมีชีวิตหรือเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของสิ่งมีชีวิตทางชีวภาพ (Chong *et al.*, 2019) เช่น นิวคลีโอไทด์ กรดนิวคลีอิก กรดอะมิโน เพปไทด์สายสั้น กรดไขมัน ไคแซคคาไรด์ โอลิโกแซคคาไรด์ ไวตามิน สารประกอบแอลกอฮอล์ สารประกอบคาร์บอนิล กรดอินทรีย์ สารประกอบซัลเฟอร์ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และ สารชีวโมเลกุลอื่นๆ วัตถุประสงค์ของการศึกษาเมแทบอลอมิกส์เพื่อรวบรวมข้อมูลและปริมาณของ สารเมแทบอลิต์ ทั้งหมด หรือ เมแทบอลอม (metabolome) โดยศึกษาสารที่สังเคราะห์ภายในเซลล์ (intracellular) และสารที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular) ซึ่งผลิตได้จากวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathway) เพื่อให้เกิดความเข้าใจแบบองค์รวม (holistic approach) ของระบบชีวภาพ ที่ตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมและการแสดงออกของพันธุกรรม (Walsh *et al.*, 2016) โดย เทคนิคการวิเคราะห์ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาทางเมแทบอลอมิกส์ ได้แก่ mass spectrometry (MS) นิยมใช้ร่วมกับเทคนิคการแยกสาร เช่น gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS) หรือ liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) และ nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (ศานต์เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลือวิสัย, 2561)

เทคโนโลยีเมแทบอลอมิกส์เริ่มมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ดังงานวิจัยของ Brisson *et al.*, (2021) ได้ศึกษาการระบุเมแทบอลิต์ของเอฟเฟคเตอร์โดยการทำ Exometabolite Profiling ของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีความหลากหลาย exometabolomes ของ microalgal ยังคงมีการศึกษา น้อย คณะผู้วิจัยได้วิเคราะห์เมแทบอลอมที่ถูกล้างออกมาจากสาหร่ายยูคาริโอตที่มีความหลากหลาย ทางสายวิวัฒนาการและทางนิเวศวิทยา 4 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ, *Chlamydomonas reinhardtii* มาจากน้ำจืด, *Desmodesmus* sp. มาจากน้ำกร่อย, *Phaeodactylum tricornutum* มาจากทะเล และ *Microchloropsis salina* จากทะเล เพื่อระบุ สารเมแทบอลิต์ที่ปล่อยออกมา เมื่อเปรียบเทียบกับ metabolomes ทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่ามีไคเปปไทด์และไตรเปปไทด์ที่แตกต่างกันหลายตัวที่หลั่งออกมาจากสาหร่ายแต่ละชนิด ลูไมโครม (lumichrome) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ทราบกันว่าเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชและ สารประกอบคล้ายพอสตาแกลนดินชนิดใหม่ (prostaglandin) ตรวจสอบเพิ่มเติมถึงผลกระทบของ การเติมสารประกอบ 8 ชนิดจากภายนอกที่เลือกโดยพิจารณาจากการเพิ่มคุณค่าของ exometabolome ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย จากสารประกอบเหล่านี้ 5 ชนิด (ลูไมโครม, 5'-S-เมทิล-5'-ไทโอดีโนซีน, 17-ฟีนิล ไตรนอร์ พอสตาแกลนดิน A2, กรดโดดีเคนไดโอยิก และ กรดอะลิยูริติก) ส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายอย่างน้อยหนึ่งชนิด

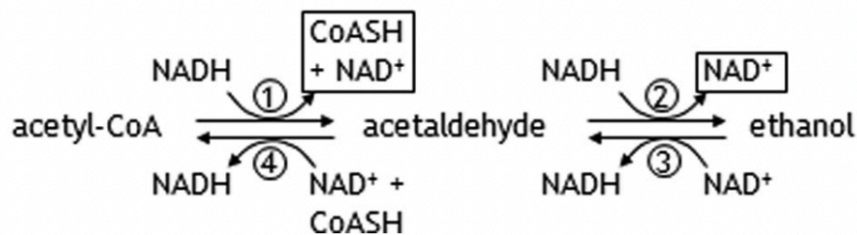
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเมแทบอไลต์จากการเติมสารประกอบสองชนิดเหล่านี้ (กรดโดดีแคนไดโอยิกและกรดอะลูริติก) ให้ผลลัพธ์ที่ต่างกันโดยเพิ่มการเจริญเติบโตของสาหร่ายบางชนิดและลดการเจริญเติบโตของสาหร่ายบางชนิด เผยให้เห็นกลุ่มใหม่ของ microalgal exometabolites ซึ่งบางกลุ่มอาจเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของสาหร่ายเมื่อได้รับจากภายนอก ซึ่งบ่งชี้ถึงบทบาทที่เป็นไปของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสาหร่ายต่างสายพันธุ์

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Maneeruttanarungroj *et al.* 2010 จากงานวิจัยนี้ได้พบสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนที่มีเซลล์เดียวชนิดใหม่ถูกแยกได้จากบ่อน้ำจืดในจังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย ถูกจัดจำแนกอยู่ในตระกูล *Tetraspora* ซึ่งการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอช เพิ่มขึ้นจาก 5.75 เป็น 9.30 แต่อย่างไรก็ตาม ค่าพีเอชที่ 5.25 แทบไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น แต่พบว่าเกิดการกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณสองเท่าจากการเติม β -mercaptoethanol 0.5 มิลลิโมลาร์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP และในระหว่างขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากไนโตรเจนและกำมะถันให้ไฮโดรเจนที่คำนวณได้สูงสุด 17.3 ถึง 61.7 ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ($\mu\text{mol/mg chl a/h}$) เป็นอัตราการผลิตที่สูงมากเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวอื่น ๆ และทำให้สังเกตเห็นว่าการใช้สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนนั้นมีผลต่อการเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

จากงานวิจัย Lis *et al.* 2017 ได้ศึกษาลักษณะเชิงโมเลกุลของเอนไซม์อัลดีไฮด์/แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Aldehyde/alcohol dehydrogenases: ADHE) จากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีสองหน้าที่ที่เกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจากอะซีตัล-โคเอ โดยมีอะซีตัลดีไฮด์เป็นตัวกลางและมีบทบาทสำคัญในความสัมพันธ์ของรีดอกซ์แบบไม่ใช้ออกซิเจนในแบคทีเรียหลายชนิด จากงานวิจัยพบกิจกรรมของเอนไซม์ที่กระตุ้นโดย ADHE โดยเริ่มจากเอทานอลจะถูกออกซิไดซ์ได้เป็นอะซีตัลดีไฮด์ โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ได้อิเล็กตรอนออกมาเป็นนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: NADP) จากนั้นจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นอะซีเตท โดยเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่สามารถย้อนกลับได้ จากรูปที่ 2.11 ซึ่งสามารถใช้อธิบายการเปลี่ยนแปลงของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้



รูปที่ 2.11 กิจกรรมของเอนไซม์เอนไซม์อัลดีไฮด์/แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (Lis, *et al.* 2017)

งานวิจัย Sengmee *et al.* 2017 ศึกษาความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 4, 8, 12, 16, และ 20 กรัมต่อลิตร ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ผลการวิจัยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตไฮโดรเจนและไขมันโดยสาหร่ายขนาดเล็กคือ กลีเซอรอลที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ 16 กรัมต่อลิตร ให้การผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ 10.31 ± 0.05 มิลลิลิตรต่อลิตร และเมื่อเลี้ยงในถังหมัก 1 ลิตร ให้การผลิตไฮโดรเจนสูงถึง 11.65 ± 0.65 มิลลิลิตรต่อลิตร พร้อมด้วยปริมาณไขมันมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์

จากงานวิจัย Prasertsan *et al.* 2021 ได้ศึกษาการเพิ่มไบโอมิเทนโดยใช้น้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มเป็นอาหารในการเลี้ยงเชื้อจากเติมกากตะกอนจุลินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic microbial sludge) และเติมกลีเซอรอลและเอทานอล ความเข้มข้น 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิจัยพบว่า อัตราการผลิตก๊าซมีเทนที่เติมกลีเซอรอล 1 เปอร์เซ็นต์ ลดลง 38 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เติมเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการผลิตมีเทนสูงกว่าชุดควบคุมถึง 67 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิจัยชี้ชัดว่าอัตราการผลิตก๊าซมีเทนจากเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอัตราการผลิตโดยใช้กลีเซอรอล 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนถึง 2.7 เท่า จากการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่อยู่ในกากตะกอนพบแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ คือ *Sandarakinotalea sp.*, *Lachnobacterium sp.*, *Blautia sp.*, *Marinobacter sp.*, *Anaerotruncus sp.*, *Enterobacter sp.* และ *Acinetobacter sp.*

จากการศึกษาการตอบสนองระดับเมแทบอลิซึมจากการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่ใช้ออกซิเจนในสภาวะที่ขาดกำมะถันของงานวิจัย Zhou *et al.* 2009 โดยใช้สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* โดยใช้ นิวเคลียร์แมก-เนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: NMR spectroscopy) เครื่องแมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) และเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin layer chromatography) ผลการวิจัยระบุว่าสาหร่ายสีเขียวได้ใช้อะซิเตทเพื่อสะสมพลังงานสำรองใน 24 ชั่วโมงแรกของการสูญเสียกำมะถัน นอกจากนี้ยังมีการสะสมไตรเอซิลกลีเซอรไรต์ไว้ในเซลล์จำนวนมากในชั่วโมงที่ 24 ถึง 72 แรก การที่ค่าพีเอชลดลงเกิดจากการเผาผลาญพลังงานจากการกระบวนหมัก มีการผลิตไฮโดรเจนและระดับกรดอะมิโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้น ในระยะสุดท้ายจาก 72 ถึง 120 ชั่วโมง เมแทบอลิซึมช้าลงทำให้พีเอชนั้นคงที่แม้ว่ายังมีการ
สะสมของแป้งและไตรเอซิลกลีเซอไรด์ยังคงอยู่ในเซลล์ ดังนั้นสรุปได้ว่าการผลิตไฮโดรเจนไม่ได้
ชะลอตัวลงเนื่องจากพลังงานสำรองหมด แต่เกิดจากการขาดกัมมะถันหรือการสะสมสารที่เป็นพิษต่อ
เซลล์

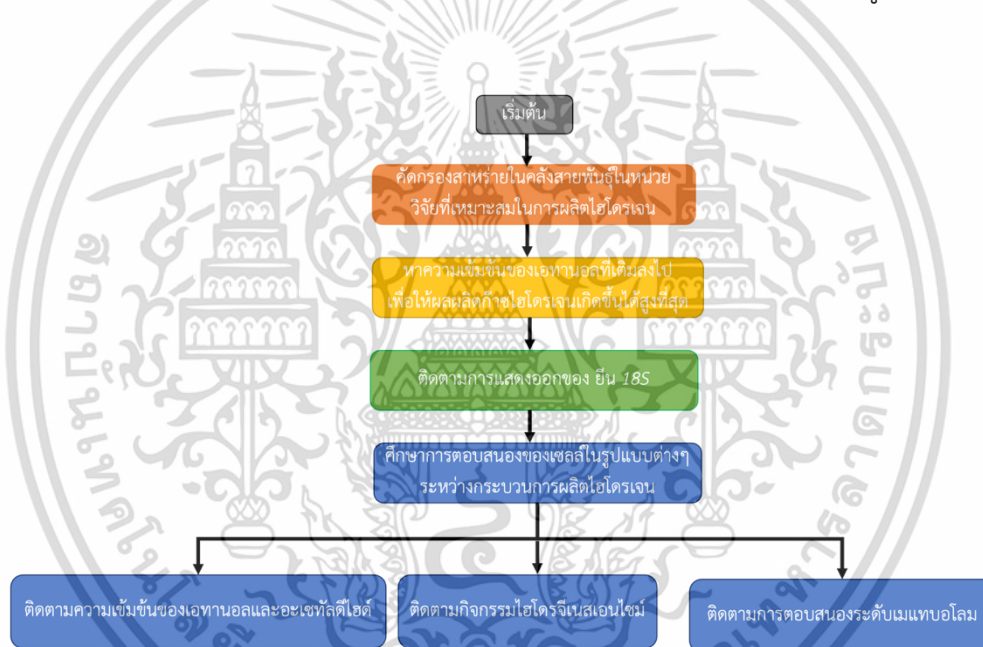


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ภาพรวมของงานในการหาสาหร่ายที่สามารถผลิตไฮโดรเจนที่ดีที่สุดในสภาวะที่มีเอทานอล เริ่มจากการคัดกรองสาหร่ายสีเขียวในคลังหน่วยวิจัยพลังงานชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในสภาวะที่มีเอทานอล จากนั้นทดสอบความเข้มข้นเอทานอลที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ติดตามหา 18S rDNA และ ศึกษาการตอบสนองของเซลล์ในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ การวิเคราะห์ ปริมาณเอทานอลและอะเซทัลดีไฮด์ในอาหารเหลว การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ และ การวิเคราะห์ระดับเมแทบอลิซึม แสดงดังในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ภาพรวมการดำเนินงานหาสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนที่สูงในสภาวะที่มีเอทานอลอยู่ในระบบ

3.1 สารเคมี

- 3.1.1 Acetic acid glacial (CARLO ERBA, India)
- 3.1.2 Acetaldehyde (ACS Chemicals, India)
- 3.1.3 Ammonium chloride (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.4 Ammonium molybdate tetrahydrate (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.5 Ammonium Persulfate (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.6 Calcium chloride dihydrate (CARLO ERBA, India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.7 Copper(II) sulfate pentahydrate (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.8 Dipotassium hydrogen phosphate (Ajax Finechem Pty, Australia)
- 3.1.9 Disodium EDTA (CARLO ERBA, India)
- 3.1.10 Ethanol (RCI LABSCAN, Ireland)
- 3.1.11 Hydrochloric acid (QREC, New zealand)
- 3.1.12 Iron(III) chloride hexahydrate (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.13 Iron(III) sulfate heptahydrate (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.14 N-propanol (KemAus, Australia)
- 3.1.15 Liquid nitrogen
- 3.1.16 Magnesium sulfate heptahydrate (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.17 Manganese chloride tetrahydrate (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.18 β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.19 Methanol (KemAus, Australia)
- 3.1.20 Potassium chloride (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.21 Potassium dihydrogen phosphate (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.22 Sodium acetate (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.23 Sodium dodecyl sulfate (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.24 Sodium hydroxide (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.25 Boric acid (LOBALO Chemie, India)
- 3.1.26 Tris base (CARLO ERBA, India)
- 3.1.27 Zinc sulfate heptahydrate (LOBALO Chemie, India)

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.2.1 เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ (Glassware)
- 3.2.2 จานเพาะเชื้อ (Petri dish) และเข็มเขี่ยเชื้อแบบกลม (Loop)
- 3.2.3 โกร่งบด (Mortar and Pestle)
- 3.2.4 ช้อนตักสารสแตนเลส (Spatula Stainth)
- 3.2.5 เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)
- 3.2.6 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- 3.2.7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Thailand))
- 3.2.8 ไมโครปิเปตต์ (Pipet-lite xls, Rainin Mettler Toledo, Switzerland)
- 3.2.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Mini centrifuge) (Thermo Fisher, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Thermo Fisher, Germany)
- 3.2.11 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดคลื่นแสง (UV-Vis spectrophotometer)
- 3.2.12 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดและเบส (pH meter)
- 3.2.13 เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic Processor)
- 3.2.14 เครื่องอ่านปฏิกิริยาในถาดหลุม (Microplate reader)
- 3.2.15 คิวเวตต์ (Semi-micro cuvette, path length 10 mm)
- 3.2.16 ตู้บ่มแบบเขย่าและควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
- 3.2.17 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow)
- 3.2.18 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.2.19 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (JS Research INC, Korea)
- 3.2.20 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
- 3.2.21 กระบอกฉีดยา (Syringe) และเข็มฉีดยา (Hypodermic needle) (Nipro, Thailand)
- 3.2.22 ตัวล็อคเข็มฉีดยา (Syringe valve push button, luer lock) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.2.23 หลอดเซนติฟิวก์พลาสติกและฝาปิด 15 และ 50 มิลลิลิตร (Centrifuge tube with screw cap)
- 3.2.24 หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1 และ 2 มิลลิลิตร (Eppendorf, Germany)
- 3.2.25 หลอดพีซีอาร์ (PCR Tube) (Eppendorf, Germany)
- 3.2.26 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Thermal Cycler) (U-Therm International H.K. Limited, China)
- 3.2.27 ชุดอุปกรณ์แยกด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipment) (BIO-RAD, USA)
- 3.2.28 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Berner)
- 3.2.29 เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph)
- 3.2.30 ขวดแก้ว (Gas-tight vial) ขนาด 13 และ 100 มิลลิลิตร พร้อมจุกยางและฝาปิดอะลูมิเนียม
- 3.2.31 ขวดแก้ว (Gas-tight vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร พร้อมฝาพลาสติกและแผ่น Septa ที่เคลือบซิลิโคน
- 3.2.32 เครื่องถ่ายภาพจากเจล (Gel Doc EZ Imaging System) (BIO-RAD, USA)

3.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.3.1 ไดออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotide triphosphate, dNTPs)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.2 เอนไซม์ DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific, USA)
- 3.3.3 ไพรเมอร์ (18S Forward primer, 18S Reverse primer, HydAF primer, HvF1 primer, HvF2 primer, HydAR primer, HvR1 primer, HvR2 primer, ADH_F1 primer, ADH_R1 primer และ ADH_R2 primer)
- 3.3.4 บัฟเฟอร์ 10X DreamTaq Green (Thermo Scientific, USA)

3.4 สารเคมีสำหรับการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า

- 3.4.1 อะกาโรส (Agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
- 3.4.2 สารละลาย 6X loading buffer
- 3.4.3 สารละลาย 50X Tris-acetate-EDTA
- 3.4.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (KAPA DNA Ladder) (KAPA Biosystems, USA)

3.5 ชุดทดสอบ (Kit)

- 3.5.1 ชุดการทำบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ PCR (TIANGEN™ Universal DNA Purification Kit)
- 3.5.2 ชุดการทำให้บริสุทธิ์ของ RNA (TIANGEN™ RNAprep Pure Kit For Plant)
- 3.5.3 ชุดสังเคราะห์ cDNA (cNDA Synthesis Kit, biotech rabbit™)
- 3.5.4 ชุด PCR Cloning (pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega)
- 3.5.5 ชุดสกัดพลาสมิด (FavorPrep™ GEL Plasmid Extraction Mini Kit) (FAVORGEN biotech corp., Taiwan)

3.6 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

- 3.6.1 Methyl viologen (ACROS Organics™, China)
- 3.6.2 Sodium dithionite (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.6.3 Triton X-100 (ACROS ORGANICS, USA)

3.7 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

- 3.7.1 ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาร์กอน (Linde, Thailand)
- 3.7.2 ก๊าซอาร์กอนที่มีความบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์ (Linde, Thailand)

3.8 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

- 3.8.1 แอมพิซิลลิน (Ampicillin Sodium Salt) (VMR Life science, Strongsville USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.2 กานาไมซิน (Kanamycin) (Thai Meiji Phamaceutical, Thailand)

3.9 ศึกษาการเพาะเลี้ยงและการคัดเลือกสายสเตรปโตไมซีตที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนที่ดีที่สุด

เตรียมหัวเชื้อสายสเตรปโตไมซีตต่าง ๆ ด้วยอาหารเหลวสูตร TAP (Tris-Acetate-Phosphate) (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) นำโคโลนีเดี่ยวของสายสเตรปโตไมซีต มาเลี้ยงลงในอาหารเหลวประมาณ 1-2 โคโลนี (จะให้ค่า OD เริ่มต้นประมาณ 0.05) เลี้ยงแบบเขย่าภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นกระจายเซลล์ในน้ำปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร บีเบดต์สารแขวนลอยเซลล์นี้ลงอาหาร TAP และ TAP ที่เติมเอทานอล โดยให้ค่าความขุ่น (OD_{750}) สอดคล้องเท่ากับ 0.1 บรรจุสารแขวนลอยเซลล์ 25 มิลลิลิตร ในขวดเก็บก๊าซขนาด 103 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 3 ขวด ปิดขวดด้วยยางและล็อกด้วยแหวนอลูมิเนียม เป่าไล่อากาศด้วยอาร์กอนที่ความดัน 0.1 psi เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อกำจัดออกซิเจนออกจากระบบ บ่มขวดสเตรปโตไมซีตนี้ที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าขวดด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที จากนั้นตรวจวัดก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นตามช่วงเวลาที่ต้องการด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี โดยมีสภาวะของระบบดำเนินการดังแสดงในตารางที่ 3.1 สายสเตรปโตไมซีตที่ถูกระบุด้วยเอทานอลได้ดีที่สุด จะได้รับเลือกและใช้ศึกษาต่อในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากสายสเตรปโตไมซีตด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี เทอร์มอลคอนดักติวิตี ดีเทคเตอร์ (Gas Chromatography-Thermal conductivity detector; GC-TCD)

| พารามิเตอร์ | สภาวะของระบบดำเนินการ |
|---------------------|---|
| Carrier Gas | Argon flow rate 30 mL/min (99.999% purity) |
| Column | - Pack column 1.5 m X 1.0 mm - Molecular sieve 5 Å mesh 80/100 |
| Detector | Thermal conductivity detector (TCD) |
| Temperature Program | - Injector temperature: 100 °C - Oven temperature: 40 °C - Detector temperature: 150 °C |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10 ศึกษาความเข้มข้นเอทานอลที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.10 และกระจายเซลล์ในอาหาร TAP ที่เติมเอทานอลที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ จากนั้นจะนำไปทดสอบการผลิตไฮโดรเจน โดยบรรจุสารแขวนลอยสาหร่าย 20 มิลลิลิตรในขวดเก็บก๊าซขนาด 103 มิลลิลิตร ตามวิธีดังข้อ 3.10 ติดตามไฮโดรเจนที่ผลิตได้จนกว่าจะไม่พบการเพิ่มขึ้นของผลผลิต เมื่อได้ความเข้มข้นเอทานอลที่ดีที่สุดแล้ว เซลล์ตามช่วงเวลาต่าง ๆ จะถูกนำไปศึกษาการตอบสนองของเซลล์ต่อไป

3.11 ศึกษา ยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้เซลล์สาหร่ายและ cDNA (Sirawattanamongkol *et al.*, 2020) เป็นแม่แบบ ซึ่งมีไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010 ดังนี้

- 1) Forward Primer: 5' CAGCAGCCGCGTAATT3'
- 2) Reverse Primer: 5' CATCTAAGGGCATCACAGACC3'

จากนั้นใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้มีการตั้งโปรแกรมไว้ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และตารางที่ 3.3 ตามลำดับ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส (Agarose Gel Electrophoresis) ในความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Borate-EDTA และนำไปส่องด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล (Gel Doc EZ Imaging System) เพื่อตรวจสอบแถบและขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ จากนั้นส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติก (Phylogenetic tree) ต่อไป

ตารางที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบของสารผสมปฏิกิริยาในกระบวนการ Polymerase chain reaction

| ส่วนประกอบ | ปริมาณ (ไมโครลิตร) |
|--------------------------------------|--------------------|
| DNA Template | 1 |
| Forward Primer (10 มิลลิโมลาร์) | 1 |
| Reverse Primer (10 มิลลิโมลาร์) | 1 |
| dNTPs (10 มิลลิโมลาร์) | 1 |
| DreamTaq DNA polymerase 5 U/ μ L | 0.1 |
| 10x DreamTaq polymerase buffer | 2 |
| น้ำกลั่น | 13.9 |
| ปริมาณรวม | 20 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 แสดงสถานะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

| ขั้นตอน | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา | จำนวนรอบ |
|----------------------|-------------------------|-----------|----------|
| Initial Denaturation | 95 | 1 นาที | 1 |
| Denaturation | 95 | 30 วินาที | 35 |
| Annealing | 50 | 30 วินาที | |
| Extension | 72 | 1 นาที | |
| Final Extension | 72 | 5 นาที | 1 |

3.11.1) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

ตัดแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ PCR ในเจลออกจากเจลและทำให้ผลิตภัณฑ์นั้นบริสุทธิ์ด้วยชุดการทำให้บริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ PCR ตามขั้นตอนดังนี้ (TIANGEN™ Universal DNA Purification Kit) นำชิ้นเจลดีเอ็นเอที่ตัดมาใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำบัฟเฟอร์ลงไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ต่อน้ำหนัก 100 มิลลิกรัมของเจล) แล้วนำหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีชิ้นเจลอยู่ไปแช่ลงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เจลที่ละลายหมดแล้วจะกลายเป็นสารละลายสีเหลือง ปิดเตตสารละลายบัฟเฟอร์ BL ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน CB2 คอลัมน์และนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และทิ้งส่วนของเหลว จากนั้นนำสารละลายสีเหลืองที่ได้จากการละลายเจลใส่ลงใน CB2 คอลัมน์ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ BL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนของเหลว เติมน้ำบัฟเฟอร์ PW ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนของเหลว ทำซ้ำในขั้นตอนนี้อีกครั้ง จากนั้นปั่นเหวี่ยงต่ออีกครั้งเพื่อให้ของเหลวออกจากคอลัมน์ให้หมดที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ทำการย้ายคอลัมน์ CB2 ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงตรงกลางคอลัมน์ CB2 และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสอีกครั้ง เพื่อยืนยันว่าการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์นั้นสำเร็จ ทำการส่งตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Ward Medic ประเทศไทย

3.11.2) การสร้างแผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติก (Phylogenetic tree) ของยีน 18S rDNA

เมื่อได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์จากการส่งวิเคราะห์แล้ว ได้นำข้อมูลมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้วิธี Maximum Likelihood (ML) เพื่อใช้เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของยีน 18S rDNA กับสาหร่ายสายพันธุ์อื่น ๆ ในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความคล้ายคลึง (DNA alignment) ด้วย Clustal omega ในโปรแกรม MEGA11 โดยให้ทำการสุ่ม (Bootstrap) เท่ากับ 1,000 ครั้ง (Kibret *et al.*, 2018)

3.12 การติดตามยีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

ในการศึกษา ยีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจะใช้ cDNA เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องสกัดอาร์เอ็นเอและเปลี่ยนเป็นดีเอ็นเอคู่สม (Complementary DNA หรือ cDNA) และใช้ในการติดตามหายีนไฮโดรจีเนสและ ยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ต่อไป

3.12.1) วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอและการทำให้บริสุทธิ์

นำสาหร่ายสีเขียวที่เลี้ยงในอาหาร TAP เลี้ยงแบบเขย่าภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นกับเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ต่อไปใช้ซอแนตัสสแตนเลส (Spatula Stainth) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตักตะกอนสาหร่ายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงประมาณ 50-100 มิลลิกรัม ใส่ลงในโถรงบดปลอดเชื้อ เติมนิโตรเจนเหลวลงไปประมาณ 10 มิลลิลิตร บดอย่างระมัดระวังไม่ให้รุนแรงมากจนเกินไป ใช้เวลาในการบดประมาณ 5 นาที จากนั้นใช้ซอแนตัสสแตนเลสตักแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และจะใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ (TIANGEN™ RNAprep Pure Kit For Plant) ซึ่งจะมีขั้นตอนดังนี้

เติมนัฟเฟอร์ RL ลงไปในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีสาหร่ายที่ผ่านการบดแตกเซลล์แล้ว ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ต่อไปนำไปแช่ลงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 นาที ต่อไปย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน RNase-Free Filter CS คอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-5 นาที ปิดเตตส์ส่วนที่เป็นสารละลายย้ายลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในขั้นตอนนี้ทำอย่างระมัดระวังไม่ให้ส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์ติดมาด้วย ทิ้งในส่วนของคอลัมน์ไป ต่อไปเติมเอทานอล 96-100 เปอร์เซ็นต์ (สารละลาย 1 ส่วนต่อเอทานอล 0.5 ส่วน เช่น ปิดเตตส์สารละลายมาได้ 500 ไมโครลิตร เติมน้ำเอทานอลลงไป 250 ไมโครลิตร) ลงไปในหลอดที่มีสารละลายอยู่และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันทันทีโดยให้เทคนิคการปิดเตตส์สารขึ้นและลง จากนั้นย้ายสารละลายผสมนี้ลงใน RNase-Free Spin CR3 คอลัมน์ และปิดฝา

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คอลัมน์อย่างระมัดระวัง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0.5–1 นาที ที่มีส่วนที่เป็นของเหลว เติมน้ำบัฟเฟอร์ RW1 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ลงใน RNase-Free Spin CR3 คอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0.5–1 นาที ที่มีส่วนที่เป็นของเหลว เติมน้ำ DNase I Working Solution ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางของ RNase-Free Spin CR3 คอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที และ เติมน้ำบัฟเฟอร์ RW1 อีกครั้ง ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ลงใน RNase-Free Spin CR3 คอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0.5–1 นาที ที่มีส่วนที่เป็นของเหลว ต่อไปเติมน้ำบัฟเฟอร์ RW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน RNase-Free Spin CR3 คอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0.5–1 นาที ที่มีส่วนที่เป็นของเหลว ทำซ้ำในขั้นตอนนี้อีกครั้ง จากนั้นปั่นเหวี่ยงต่ออีกครั้งเพื่อให้ของเหลวออกจากคอลัมน์ให้หมดที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทำการย้าย RNase-Free Spin CR3 คอลัมน์ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย RNase-Free Water ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงตรงกลางคอลัมน์ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้อาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์ จากนั้นแบ่งอาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟลิซิสอีกครั้ง เพื่อยืนยันว่าการสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จ ในส่วนที่เหลือนำไปจัดเก็บที่ตู้เก็บเชื้อ -80 องศาเซลเซียส ในทันทีเพื่อป้องกันอาร์เอ็นเอเกิดการสลายตัว

3.12.2) การทำปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน (Reverse transcription)

นำอาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้จากการสกัดมาทำปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA ซึ่งองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาอยู่ในตารางที่ 3.4 ในการผสมองค์ประกอบต่าง ๆ นั้นจะทำในอุณหภูมิที่เย็น จากนั้นจะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตั้งชุดโปรแกรมเพื่อเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA ดังแสดงในตารางที่ 3.5 เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเสร็จเรียบร้อยแล้วนั้น จะนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเก็บรักษาสภาพไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการติดตามยีนไฮโดรจีเนสและ ยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสต่อไป

ตารางที่ 3.4 แสดงองค์ประกอบในปฏิกิริยาริเวิร์สทรานสคริปชัน

| ส่วนประกอบ | ปริมาณ (ไมโครลิตร) |
|--|--------------------|
| RNA (0.1-1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | 5 |
| RNase Inhibitor (20 U/ μL) | 1 |
| Oligo dT (10 ไมโครโมลาร์) | 0.5 |
| dNTPs (10 มิลลิโมลาร์) | 4 |
| M-MuLVReverse transcriptase Enzyme | 1 |
| 10x Buffer | 5 |
| น้ำ RNase Free | 3.5 |
| ปริมาตรรวม | 20 |

ตารางที่ 3.5 แสดงสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาริเวิร์สทรานสคริป

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) |
|-------------------------|-------------|
| 42 | 60 |
| 85 | 10 |
| 4 | Forever |

3.12.3) การติดตามลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ไพรมเมอร์ทั้งหมดที่ใช้เป็น Degenerate Primer ซึ่งไพรมเมอร์ในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส จะแสดงดังในตารางที่ 3.6 และตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.6 แสดงรายละเอียดของไพรมเมอร์ที่ใช้ในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนส ออกแบบโดย Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010

| ชนิดของไพรมเมอร์ | ชื่อไพรมเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|------------------|---------------|----------------------------|
| Forward primer | HvF2 | 5' TGCCCATGTTACCA 3' |
| Reverse primer | HvR1 | 5' CKSCTGSCGCTTCTG 3' |
| | HydAR | 5' GCCACRTAGTGBGTGTGCAG 3' |

ตารางที่ 3.7 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ออกแบบโดย Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010

| ชนิดของไพรเมอร์ | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|-----------------|--------------|--------------------------|
| Forward primer | ADH1_F1 | 5' GCGAGAACATGCTSTGGT 3' |
| Reverse primer | ADH1_R1 | 5' ACTSGTACTGCGGGAAGG 3' |
| | ADH1_R2 | 5' AGCGGGTAGCGCGGGTTS 3' |

ตารางที่ 3.8 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนส ออกแบบโดย นางสาวชนิกร กลิ่นสาลี

| ชนิดของไพรเมอร์ | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|-----------------|--------------|-----------------------------|
| Forward primer | HydA_F1 | 5' GTGCTTCCCAAGCTGAAGACT 3' |
| Reverse primer | HydA_R1 | 5' GCTCACTCGGACGCATAAGT 3' |

ตารางที่ 3.9 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ออกแบบโดย นางสาวชนิกร กลิ่นสาลี

| ชนิดของไพรเมอร์ | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|-----------------|--------------|----------------------------|
| Forward primer | ADH2_F1 | 5' GGCTGAGAAGTTTGAGACGC 3' |
| Reverse primer | ADH2_R2 | 5' CTTGCGGAATGTGTCGAG 3' |

นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010 สามารถนำมาเข้าสู่สลับไขว้เพื่อเข้าคู่กัน ได้ออกมาเป็นในตารางที่ 3.10 ซึ่งจะมีองค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแสดงดังในตารางที่ 3.11 และใช้โปรแกรมในการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR โดยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังในตารางที่ 3.12 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis) ในความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Borate-EDTA และนำไปส่องด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล (Gel Doc EZ Imaging System) เพื่อตรวจสอบแถบและขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ทำการส่งตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 3.10 แสดงการสลับไขว้ของไพรเมอร์เพื่อการเข้าคู่กันของไพรเมอร์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสออกแบบโดย Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010

| แบบที่ | Forward primer | Reverse primer |
|--------|----------------|----------------|
| 1 | HvF2 | HvR1 |
| 2 | | HydAR |
| 3 | ADH1_F1 | ADH1_R1 |
| 4 | | ADH1_R2 |

ตารางที่ 3.11 แสดงองค์ประกอบของสารผสมปฏิกิริยาสำหรับ Polymerase chain reaction เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

| ส่วนประกอบ | ปริมาณ (ไมโครลิตร) |
|--------------------------------------|--------------------|
| DNA Template | 1 |
| Forward Primer (10 มิลลิโมลาร์) | 1 |
| Reverse Primer (10 มิลลิโมลาร์) | 1 |
| dNTPs (10 มิลลิโมลาร์) | 1 |
| DreamTaq DNA polymerase 5 U/ μ L | 0.1 |
| 10x DreamTaq polymerase buffer | 2 |
| น้ำกลั่น | 13.9 |
| ปริมาตรรวม | 20 |

ตารางที่ 3.12 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

| ขั้นตอน | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา | จำนวนรอบ |
|----------------------|-------------------------|-----------|----------|
| Initial Denaturation | 95 | 1 นาที | 1 |
| Denaturation | 95 | 30 วินาที | 35 |
| Annealing | 50 | 30 วินาที | |
| Extension | 72 | 1 นาที | |
| Final Extension | 72 | 5 นาที | 1 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.12.4) การเชื่อมต่อยีนเป้าหมายกับพลาสมิดพาหะ pGEM®-T Easy Vector

นำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ ซึ่งจะใช้พาหะเป็น pGEM®-T Easy Vector ซึ่งจะมียังประกอบในการเชื่อมต่อยีนเป้าหมายเข้ากับพาหะดังในตารางที่ 3.13 ผสมเข้ากันในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเสร็จแล้วจะได้เป็น Ligation Reaction

ตารางที่ 3.13 แสดงองค์ประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อยีนที่สนใจเข้ากับพลาสมิด

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) |
|----------------------------------|---------------------|
| ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ | 3.5 |
| T4 DNA Ligation 2x buffer | 5 |
| pGEM®-T Easy Vector (50ng/μL) | 0.5 |
| T4 DNA Ligase (3 Weiss units/μL) | 1 |
| ปริมาตรรวม | 10 |

3.12.5) การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์หรือทรานสฟอร์เมชัน (Transformation)

การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์หรือทรานสฟอร์เมชันเป็นการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรียเพื่อใช้แบคทีเรียในการเพิ่มจำนวนของยีนเป้าหมาย ซึ่งจะมีขั้นตอนดังนี้ นำ Competent cells (*Escherichia coli* DH5α) ออกจากตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ Ligation Reaction ที่ได้จาก 3.13.4 ปริมาตร 4 ไมโครลิตรไปผสมกับ Competent cells 100 ไมโครลิตร ผสมอย่างเบา ๆ 1-3 ครั้งแล้วนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และนำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นนำลงไปแช่น้ำแข็งทันที จับเวลา 2 นาทีเสร็จแล้วเติมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อสูตร LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมา spread ลงบนอาหารแข็งสูตร LB (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่ออาหารแข็ง 1 เพลท) ซึ่งในอาหารแข็งสูตร LB จะมีการเติมสารอื่น ๆ เพิ่มเติมเพื่อใช้ในการคัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนยีนเป้าหมายซึ่งจะแสดงดังในตารางที่ 3.14 เมื่อทำการกระจายเซลล์เรียบร้อยแล้ว นำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวและเลี้ยงในอาหาร LB เพื่อเพิ่มจำนวนแล้วนำมาสกัดพลาสมิดต่อไป

ตารางที่ 3.14 แสดงองค์ประกอบเติมสารอื่น ๆ เพิ่มเติมเพื่อใช้ในการคัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนยีนเป้าหมาย

| ส่วนประกอบ | ความเข้มข้นสุดท้าย |
|---|--------------------------|
| Isopropyl β - d-1-thiogalactopyranoside (IPTG)) | 0.1 มิลลิโมลาร์ |
| Ampicillin | 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร |
| X-gal | 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร |

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

เก็บเกี่ยวเซลล์แบคทีเรียปริมาณ 1-3 มิลลิลิตร โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 11,000 x g เป็นระยะเวลา 1 นาที และเทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำฟเฟอร์ FAPD1 (ผสม RNase แล้ว) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กระจายให้เซลล์และน้ำฟเฟอร์ให้ผสมกัน จากนั้นเติมน้ำฟเฟอร์ FAPD2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดขึ้นลงอย่างเบาๆ 5-10 ครั้ง และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-5 นาที เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นเติมน้ำฟเฟอร์ FAPD3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร พลิกหลอดขึ้นลงอย่างเบา ๆ 5-10 ครั้ง ทิ้งที่เติมน้ำฟเฟอร์ ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 18,000 x g เป็นระยะเวลา 5 นาที ย้ายส่วนของเหลวที่ได้ลงคอลัมน์ (FAPD Column) จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 11,000 x g เป็นระยะเวลา 30 วินาที และทิ้งส่วนใส เติมน้ำฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 11,000 x g เป็นระยะเวลา 30 วินาที และทิ้งส่วนใส เติมน้ำฟเฟอร์ Wash ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 11,000 x g เป็นระยะเวลา 30 วินาที และทิ้งส่วนใส ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 18,000 x g เป็นระยะเวลา 3 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง นำคอลัมน์ที่แห้งแล้ววางลงบนหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ Elution Buffer หรือ ddH₂O ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บริเวณตรงกลางของเมมเบรนของคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 1 นาที ณ อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 18,000 x g เป็นระยะเวลา 1 นาที และเก็บสารละลายพลาสมิดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.13 การวัดความเข้มข้นของเอทานอลและอะเซทิลดีไฮด์ระหว่างกระบวนการผลิต

ในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลและอะเซทิลดีไฮด์ระหว่างกระบวนการผลิตนั้น เก็บตัวอย่างเซลล์จากหัวข้อ 3.10 โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยา เก็บตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ โดยการปักเข็มลงไปใน Glass tight vials ผ่านจุกยาง ดูดสารแขวนลอยเซลล์ออกมาปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วน supernatant ไปกรองด้วยฟิลเตอร์กรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นปีเปตต์ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองแล้วปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในขวดแก้ว (Gas-tight vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นขวดใส่ตัวอย่างสำหรับฉีด Gas Chromatography โดยเฉพาะ จากนั้นเติมโพรพานอล (N-propanol) ซึ่งจะใช้เป็น Internal Standard ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ที่ผ่านการกรองด้วยฟิลเตอร์กรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ในอัตราส่วน ตัวอย่าง 1 ส่วน ต่อ โพรพานอล 1 ส่วน v/v) จากนั้นปิดด้วยฝาเกลียวและนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลและอะซีทัลดีไฮด์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-2014 Capillary GC: SHIMADZU) โดยมีสถานะของระบบดำเนินการดังแสดงในตารางที่ 3.14

ตารางที่ 3.15 แสดงสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์หิวเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลและอะซีทัลดีไฮด์ที่อยู่ในระบบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี เฟรมไอออนไนท์เซชัน ดีเทคเตอร์ (Gas Chromatography-Flame Ionization Detector ; GC-FID)

| พารามิเตอร์ | สถานะของระบบการดำเนินการ |
|---------------------|--|
| Carrier Gas | Helium flow rate 40 mL/min |
| Column | DB-1 (Inner Diameter: 0.25mm และ Length: 30m) |
| Detector | Flame Ionization Detector (FID) |
| Temperature Program | - Injector temperature: 180 °C - Column temperature: 60 °C - Detector temperature: 60 °C |

3.14 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เตรียมสารละลายเมทิลไวโอลोजেনที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (Sirawattanamongkol *et al.*, 2020) และสารละลายไทรทอน เอ็กซ์ 100 (Triton X-100) ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (โดยมวลต่อปริมาตร) ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นทำการเติมเมทิลไวโอลोजেনปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายไทรทอน เอ็กซ์ 100 ปริมาตร 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เข็มเก็บก๊าซฉีดสารต่าง ๆ เข้าไปในขวด vial ที่ปราศจากอากาศขนาด 13 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไดไทโอไนท์ที่ความเข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร เติมสารแขวนลอยเซลล์สำหรับยีสี่เขียวตามหัวข้อ 3.9 มาใส่ก๊าซออกซิเจนด้วยการพ่นอาร์กอน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรทำการบ่มใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีโดยใช้ระบบเดียวกันกับตารางที่ 3.1

3.15 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว

นำสารแขวนลอยสาหร่ายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดฝาเกลียว นำไปปั่นเหวี่ยงและเทส่วนใส 900 ไมโครลิตรทิ้ง เติมน้ำกลั่น 900 ไมโครลิตร เขย่ากระจายเซลล์ นำไปบ่มในที่มืดอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 และ 650 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ดังสมการ (Lee and Shen, 2004)

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

3.16 การวัดน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียว

อบกระดาศกรงรูปทรงขนาด 0.45 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นลงในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักบนเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จนได้น้ำหนักคงที่ (A) จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยของสาหร่ายปริมาตร 30 มิลลิลิตร มากรองผ่านชุดกรอง โดยใช้กระดาศกรงรูปทรงขนาด 0.45 ไมโครเมตร ที่ชั่งน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และทิ้งให้เย็นลงในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักกระดาศหลังกรองจนได้น้ำหนักคงที่ (B) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสามารถหาได้จาก

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย (g/L)} = (B - A) \times 1000 / 30$$

3.17 การวิเคราะห์เมแทบอลอไมท์ภายในเซลล์ระหว่างกระบวนการการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

เก็บเกี่ยวสารแขวนลอยสาหร่ายจากข้อ 3.10 โดยปั่นเหวี่ยง 4,300 รอบต่อนาที 5 นาที ล้างเซลล์ด้วย 1X PBS บัฟเฟอร์ (Phosphate Buffered Saline) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร กระจายตะกอนเซลล์ใน 1X PBS บัฟเฟอร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องผสมอัลตราโซนิค ความถี่สูงที่ 25 kHz, 500 watt, on/off ที่ 1s/1s และ Amplitude 40% เป็นเวลา 5 นาทีบนน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 4,300 รอบต่อนาที 5 นาที ดูดส่วนใส 500 ไมโครลิตร ใส่ไมโครเซนตริฟิวจ์นำส่งวิเคราะห์ Metabolomics คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งตัวอย่างจะถูกหั่นและละลายตัวอย่างในเอทานอลก่อนเข้าเครื่องวิเคราะห์

ในการระบุสารเมแทบอลอไมท์ที่ภายในเซลล์ระหว่างกระบวนการการผลิตก๊าซไฮโดรเจนข้อมูลแมสสเปกตรัม (Mass spectrum) ทั้งหมดถูกกำหนดโดยใช้ซอฟต์แวร์วิเคราะห์ คือ MetFrag (<https://msbi.ipb-halle.de/MetFrag>) การระบุเมแทบอลอไมท์ดำเนินการโดยใช้ฐานข้อมูล KEGG

(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ซึ่งในฐานะข้อมูลนี้จะเป็นสารเมแทบอลิต์ที่อยู่ในสิ่งมีชีวิตผู้วิจัยจึงใช้ฐานข้อมูล KEGG ในการระบุสารเมแทบอลิต์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อต่อยอดการใช้ประโยชน์จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าการเติมเอทานอล พบว่าให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นมากกว่า 2 เท่า (Laokua. *et al.*, 2022) ซึ่งอาจจะมีสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีเอทานอลด้วยเช่นกันเพื่อเป็นประโยชน์และเป็นข้อมูลไว้ภายในอนาคตสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว การศึกษานั้นจะเริ่มจากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถที่ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในสภาวะที่มีเอทานอล และศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอทานอลที่จะให้ไฮโดรเจนได้ดีที่สุด จากนั้นจะศึกษาเกี่ยวกับลักษณะของสายพันธุ์ของสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษา ติดตามความเข้มข้นของเอทานอล และอะเซทิลดี-ไฮโดรเจน รวมถึงติดตามกิจกรรมไฮโดรจีเนสเอนไซม์ และวิเคราะห์เมแทบอลิซึมระหว่างกระบวนการผลิต

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว ทั้งหมด 14 สายพันธุ์ โดยนำสาหร่ายสีเขียวมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 โดยเขาที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยสาหร่ายทุกๆ 12 ชั่วโมง มาศึกษาการเจริญเติบโตโดยวัดความขุ่นของเซลล์จากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่า ในรูปที่ 4.1 ตั้งแต่ระยะการเพาะเลี้ยงตั้งแต่จนถึงชั่วโมงที่ 12 หรือระยะ Lag phase มีสาหร่ายหลายสายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตสูง ได้แก่ G2, SK G4, *Chlorella* sp. KLSc59, *Tetraspora* sp. CU2551, CUJR08, *Chlorella* sp. LT และ CUJR04 และชั่วโมงที่ 24 ถึง 36 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายอยู่ในระยะการเจริญแบบคงที่ (Stationary phase)

เมื่อสาหร่ายสีเขียวเจริญเติบโตภายใต้การเพาะเลี้ยงในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิก สาหร่ายจะใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานสาหร่ายจะตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศร่วมกับการแตกตัวของน้ำจากกระบวนการสังเคราะห์แสงเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและออกซิเจน สำหรับการเจริญเติบโตภายใต้การเพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก สาหร่ายจะใช้อะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อให้ได้อะซีเตทและโซเดียมเป็นผลิตภัณฑ์ และการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิก สาหร่ายสามารถใช้ทั้งคาร์บอนไดออกไซด์และอะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโต (Heifetz *et al.*, 2000)

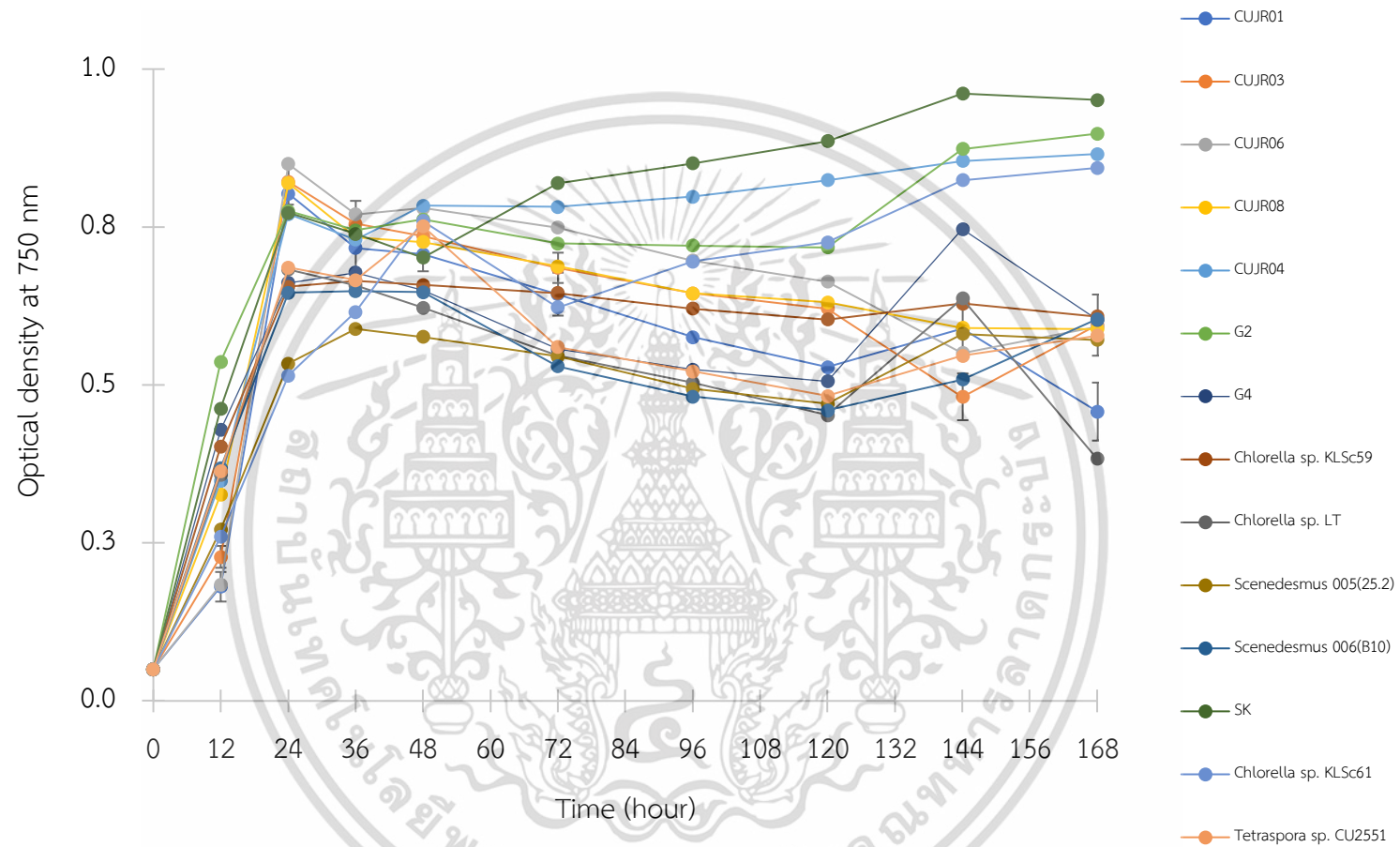
ในการศึกษานี้สาหร่ายสีเขียวทุกที่เลี้ยงไว้ทั้งหมด 14 สายพันธุ์สามารถเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฮเทอโรโทรฟิกโดยใช้อะซีติกหรืออะซีเตทในอาหาร TAP เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต (Heifetz *et al.*, 2000) โดยสามารถแบ่งระยะการเจริญเติบโตออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่ (1) ระยะการปรับตัวของเซลล์ (Lag phase) (2) ระยะการเพิ่มจำนวนเซลล์แบบทวีคูณ (Exponential phase หรือ ระยะ Log phase) (3) ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (Stationary phase) และ (4) ระยะการตายของเซลล์ (Death phase) นอกจากนี้ อาหาร TAP ยังประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ได้แก่ ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส เป็นต้น (Harris, 1989) โดยไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของเบสในกรดนิวคลีอิก กรดอะมิโนในโปรตีน และเป็นองค์ประกอบของโมเลกุลคลอโรฟิลล์อีกด้วย (Philipps *et al.*, 2012; Preininger *et al.*, 2015) สำหรับซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนซิสเทอีนและเมไทโอนีนในโปรตีน (Leustek *et al.*, 2000) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของเซลล์ (Grossman and Takahashi, 2001) ฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของหมู่ฟอสเฟตในกรดนิวคลีอิกฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์และเป็นองค์ประกอบของ ATP ซึ่งเป็นตัวให้พลังงานแก่เซลล์อีกด้วย (Rausch and Bucher, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

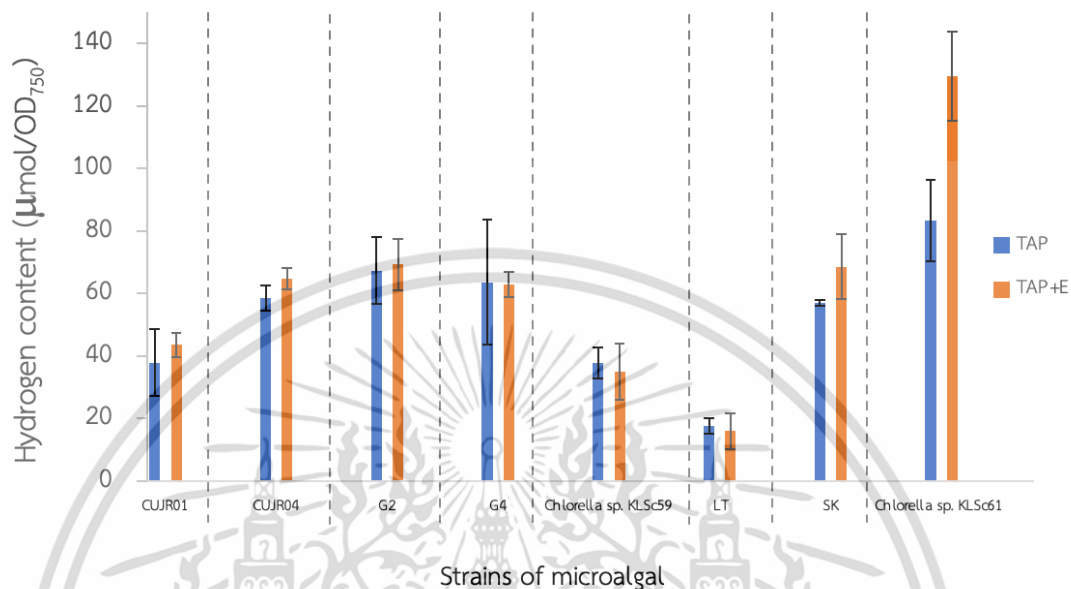


รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 14 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ($n=3$)

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว พบสาหร่ายที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีจำนวน 8 สายพันธุ์ คือ CUJR01, CUJR04, G2, G4, *Chlorella* sp. KLSc59, LT, SK และ *Chlorella* sp. KLSc61 เลี้ยงที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงนำสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 8 สายพันธุ์นี้ มาศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีเอทานอลความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ และสภาวะที่ไม่มีเอทานอล ในขวดแก้วไร้อากาศขนาด 13 มิลลิลิตร และใส่สารแขวนลอยเชื้อเป็นการทดสอบลงไป 5 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 3 วัน และวัดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ในการทดสอบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว จะตรวจสอบจากผลโครมาโทแกรม (chromatogram) จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่าก๊าซที่มีระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time, RT) ช่วง 0.4, 0.6 และ 1.15 นาที คือ ก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจนตามลำดับ และการวิเคราะห์ผลจะนำพื้นที่ใต้กราฟ (peak) ของไฮโดรเจนที่ได้มาคำนวณผลเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข)

จากการทดสอบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีเอทานอล พบว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLSc61 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ โดยมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีเอทานอลเท่ากับ 129.56 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{750}) ในขณะที่ภายในสภาวะที่ไม่มีเอทานอลให้ก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 83.32 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่นของเซลล์ ส่วนสาหร่ายสีเขียว G2, SK, CUJR04, G4, CUJR01, *Chlorella* sp. KLSc59 และ LT มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 69.31, 68.49, 64.76, 62.84, 43.52, 34.92, 15.92 และ ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{750}) ตามลำดับ (รูปที่ 4.2) ในขณะที่สภาวะที่ไม่มีเอทานอลนั้นสาหร่าย G2, SK, CUJR04, G4, CUJR01, *Chlorella* sp. KLSc59 และ LT สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เท่ากับ 67.33, 63.64, 58.53, 57.03, 37.85, 37.71 และ 17.57 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{750}) ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าในสภาวะที่มีเอทานอลนั้นสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLSc61 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งได้มีการทดลองการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีเอทานอลทั้งหมด 3 ครั้ง พบว่า *Chlorella* sp. KLSc61 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงที่สุดทั้ง 3 ครั้ง และด้วยเนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ Laokua. *et al.*, (2022) ได้ศึกษาการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนและปรับสภาวะเพื่อเพิ่มการผลิต พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLSc61 สามารถสร้างไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเอทานอล

ดังนั้น ในการทำงานวิจัยนี้จึงเลือก สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ภายใต้สภาวะที่ไล่
อากาศมาศึกษาชนิด และศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไฮโดรเจน ในการทดลอง
ต่อไป

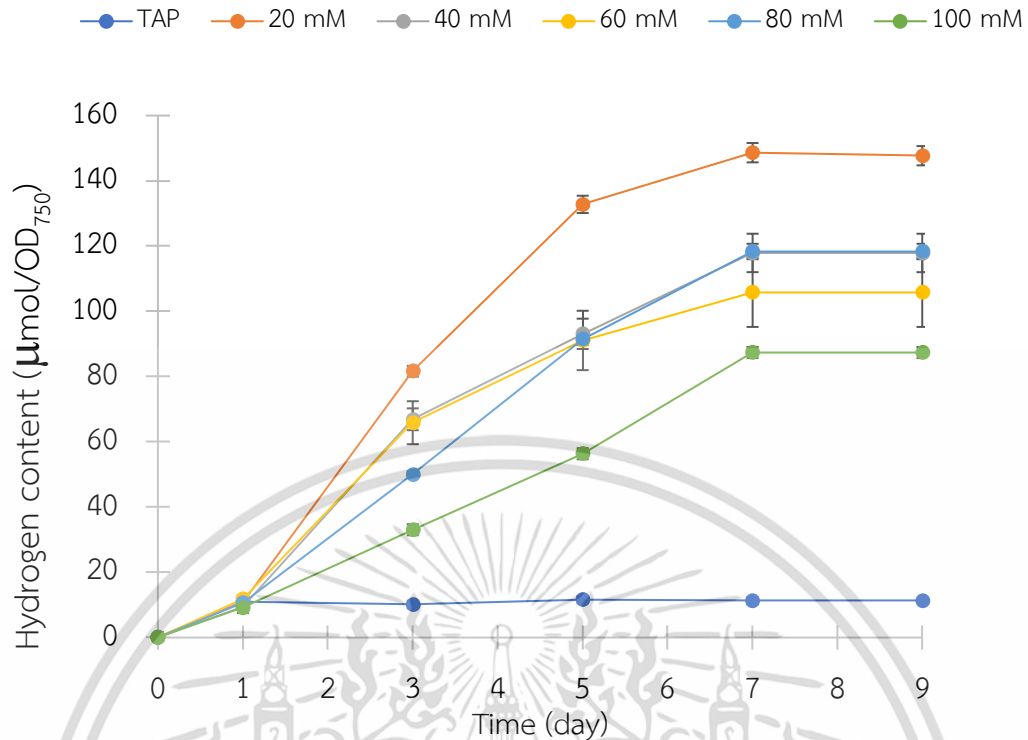


รูปที่ 4.2 ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ CUJR01, CUJR04, G2, G4, *Chlorella* sp. KLSc59, LT, SK และ *Chlorella* sp. KLSc61 ภายใต้สภาวะที่มีเอทานอล ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ ภายใต้แสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 3 วัน

4.2 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไฮโดรเจน

เมื่อได้สายพันธุ์ที่ดีที่สุดในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีเอทานอลแล้ว คือ *Chlorella* sp. KLSc61 จากนั้นได้แปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลเท่ากับ 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ ในขวดแก้วไร้อากาศขนาด 103 มิลลิลิตร และใส่ สารแขวนลอยเชื้อเป็นการทดสอบลงไป 20 มิลลิลิตร ติดตามไฮโดรเจนที่ผลิตได้จนกว่าจะไม่พบการ เพิ่มขึ้นของผลผลิต จากการศึกษาพบว่าในรูปที่ 4.3 สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มี เอทานอลสูงกว่าตัวควบคุม (เลี้ยงในอาหาร TAP) อย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 7 ซึ่งความเข้มข้นของ เอทานอลสุดท้ายเท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ ให้ไฮโดรเจนสูงถึง 148.622 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่า ความขุ่นของเซลล์ (OD₇₅₀) เมื่อเทียบกับอาหารสูตร TAP ปกติ ในวันที่ 7 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจน เพียง 11.279 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่นของเซลล์ (OD₇₅₀)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติ และอาหาร TAP สูตรปกติเติมเอทานอล 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสนั้นมีระบบการทำงานที่เกี่ยวข้องกันกับความสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox balancing) กระบวนการทางชีวเคมีที่ช่วยให้สิ่งมีชีวิตรับมือกับโมเลกุลที่โดนทำลายด้วยแสงอาทิตย์ (Photoprotection) และกระบวนการหมักทางเมแทบอลิซึม (Fermentative metabolism) ภายในสิ่งมีชีวิต ดังนั้นสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ถือว่าเป็นแหล่งอิเล็กตรอนที่เหมาะสมต่อตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัด ๆ ไป ซึ่งไปสอดคล้องกับงานวิจัยของ Maneeruttanarungroj. *et al.*, (2011) และ Ruttana. *et al.* (2010) ที่พบว่าเมื่อเติมสารให้อิเล็กตรอนเบต้าเมอแคปโตเอทานอลความเข้มข้นในช่วง 0.25-1.25 มิลลิโมลาร์และความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 และ สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ตามลำดับ ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับอาหารเหลว TAP ปกติ ในทางกลับกันเมื่อเติมสารให้อิเล็กตรอนไดไทโอทริทอลความเข้มข้นในช่วง 0.25 - 1.25 มิลลิโมลาร์ ในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 และเติมสารให้อิเล็กตรอนไดไทโอไนท์ และ เมทิลไวโอลเจนความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลงเมื่อเทียบกับอาหารเหลว TAP ปกติ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสารแต่ละชนิดมีโครงสร้างและสภาพขั้วที่แตกต่างกันทำให้สารบางชนิดสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้โดยซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์หรือแพร่ผ่านช่องของเซลล์ได้ และศักย์ของไฟฟ้าของตัวรับและให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

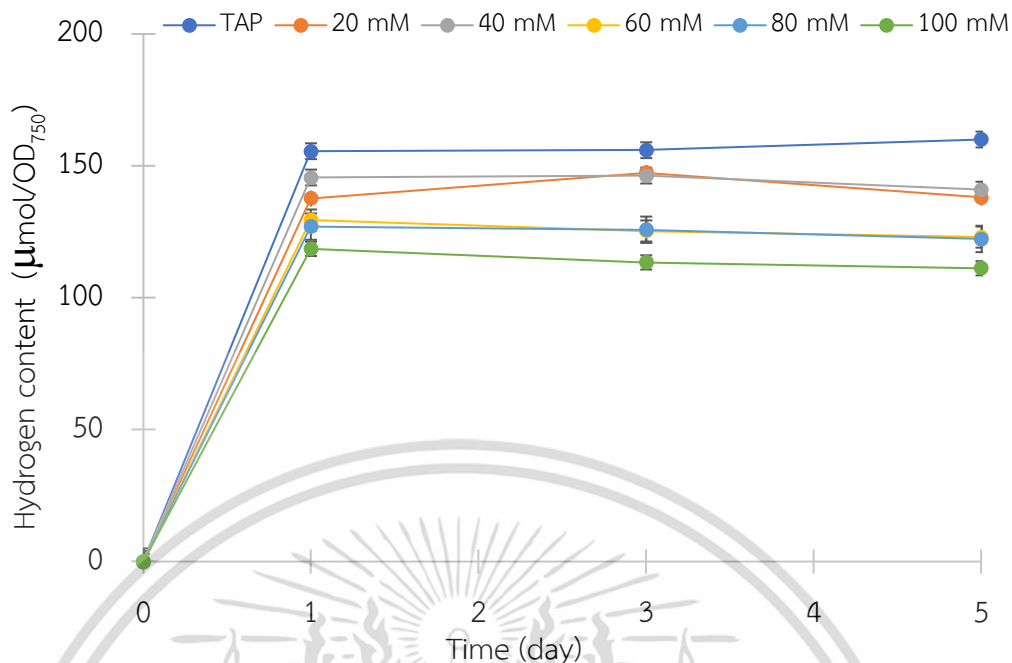
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิเล็กทรอนิกส์ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลล์ นอกจากนี้งานวิจัยของ Kruse and Hankamer (2010) ยังกล่าวถึงการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ทำหน้าที่เป็นแอ่งอิเล็กทรอนิกส์ (electrom sink) ของปฏิกิริยารีดอกซ์ต่าง ๆ ในเซลล์ อย่างไรก็ตาม สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนบางชนิดไม่สามารถเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่ดีได้

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะใช้เอทานอลเป็นแหล่งอิเล็กทรอนิกส์ที่เหมาะสมสำหรับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 เนื่องจากเมื่อเทียบอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะอาหาร TAP ที่เติมเอทานอลความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิโมลาร์ สูงกว่าอาหาร TAP สูตรปกติถึง 13.5 เท่า ดังนั้นได้เลือกสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ไปศึกษาความเข้มข้นของเอทานอลและอะซีทัลดีไฮด์ในขั้นตอนถัดไป

แต่เนื่องจากสถานการณ์โควิด-19 ผลกระทบทางลบจากการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสโควิด-19 จึงเกิดปัญหาอย่างมาก ทางคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จึงได้มาตรการเพื่อความปลอดภัย อนุญาตให้เข้ามาทำงานวิจัยได้ ทำให้เกิดความไม่ต่อเนื่องในการทำงานวิจัย ผู้วิจัยจึงได้นำเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งและเชื้อที่อยู่ในอาหารเอียงไปแช่ตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 0 ถึง 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นผ่านไป 3 เดือน เมื่อมาตรการคลี่คลายลงสามารถเข้ามาทำงานวิจัยต่อได้ ผู้วิจัยจึงได้นำสาหร่ายที่ได้เก็บเอาไว้ในตู้เย็นมา Activate เพื่อนำมาทำการศึกษา พบว่าในรูปที่ 4.4 สาหร่ายสีเขียวในสภาวะอาหาร TAP ที่มีเอทานอลนั้น มีอัตราการผลิตที่ลดลงและเปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าในวันที่ 3 สภาวะอาหาร TAP ที่มีเอทานอลนั้นเริ่มมีอัตราการเพิ่มของไฮโดรเจนเมื่อเทียบกับอาหาร TAP ปกติ เมื่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนเปลี่ยนแปลงไป ผู้วิจัยเลยได้ทำการเลี้ยงเชื้อไปเรื่อย ๆ ทั้งหมด 30 รุ่น (Generations) ซึ่ง 1 รุ่นจะใช้เวลาเลี้ยง 5 วัน โดยจะนำรุ่นที่ 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ไปทดสอบอัตราการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งพบว่าการผลิตไฮโดรเจนยังคงมีแนวโน้มที่ลดลงในสภาวะอาหาร TAP ที่มีเอทานอลเมื่อเทียบกับรูปที่ 4.3 เมื่อเกิดเหตุการณ์เช่นนี้ผู้วิจัยจึงมีความจำเป็นที่จะต้องนำสาหร่ายในห้องปฏิบัติการมาค้นหาสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตในสภาวะที่มีเอทานอลใหม่อีกครั้ง นำสาหร่ายสายพันธุ์ G2 และ G4 เลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติและอาหาร TAP ที่มีการเติมเอทานอลลงไปความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ในขวดแก้วไร้อากาศขนาด 103 มิลลิลิตร และใส่สารแขวนลอยเชื้อเป็นการทดสอบลงไป 20 มิลลิลิตร โดยทำให้เป็นสภาวะไร้อากาศโดยการเป่าไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน 10 นาที นำไปบ่มโดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Chromatograph) ทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากโครมาโตแกรม (Chromatogram) มาคำนวณผลเปรียบเทียบกับก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



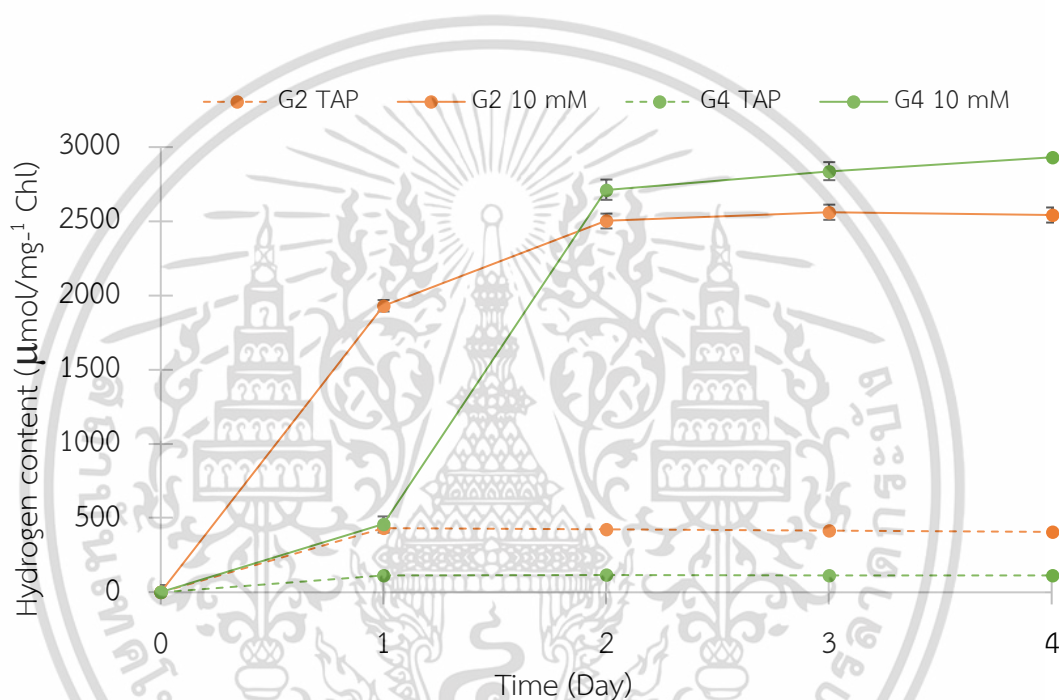
รูปที่ 4.4 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 รุ่นที่ 30 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติ และอาหาร TAP สูตรปกติเติมเอทานอล 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

จากผลการศึกษาในรูปที่ 4.5 พบว่าในวันที่ 2 สาหร่ายสายพันธุ์ G2 และ G4 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 2501.8 และ 2712.7 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับซึ่งอาจจะไม่แตกต่างกันมาก แต่ในวันที่ 3 และ วันที่ 4 สายพันธุ์ G2 มีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 2,561.0 และ 2,542.3 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ซึ่งคงที่และน้อยกว่าไฮโดรเจนที่ได้จากสายพันธุ์ G4 ที่ผลิตไฮโดรเจนได้ 2,837.9 และ 2,931.2 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำสาหร่ายสายพันธุ์ G4 ไปศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

หลังจากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ไปแช่เย็นมาเพื่อเป็นการเก็บรักษา 3 เดือนอย่างต่อเนื่อง ด้วยเหตุผลการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 พบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ลดลงในสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLSc61 สภาวะอาหาร TAP ที่มีเอทานอลนั้นอาจเกิดจากความเครียดจากความเย็น (Cold Stress) อาจจะทำให้สาหร่ายมีการเปลี่ยนแปลงระดับยีนเพื่อให้อยู่รอดได้ในสภาวะความเครียด อาจส่งผลให้การทำงานของยีนไฮโดรจีเนสลดลง ซึ่งสอดคล้องกับ Calhoun *et al.*, 2021 ได้ศึกษาการแสดงลักษณะเฉพาะแบบหลายโอมิกที่มีผลจากความเครียดที่มาจากอุณหภูมิในสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus* ซึ่งการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตสาหร่ายเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ และความทนทานต่อความเครียดจากสิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องมีการระบุลักษณะเฉพาะในระดับจีโนมิกส์ ผู้วิจัยได้ทำการเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส (Cold

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

stress) 28.2 องศาเซลเซียส (Control) และ 38.2 องศาเซลเซียส (Heat stress) โดยใช้สาหร่าย *Scenedesmus* sp. NREL 46B-D3 พบว่าการเจริญเติบโตสูงสุดและมีความสามารถในการสะสมมวลชีวภาพสูงสุดอยู่ที่ 28.2 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงถึง 30 กรัม/วัน และการวิเคราะห์ฟังก์ชันจีโนมิกส์เผยให้เห็นว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไขมัน Ion channels และ anti-porters มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น ความเครียดจากอุณหภูมิทำให้เมแทบอลิซึมของกรดไขมันและการสังเคราะห์กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนแสดงให้เห็นว่า มีการสังเคราะห์กรดไขมันจำนวนมากและมีการแสดงออกมากเกินไปด้วยภายใต้ความเครียดจากความเย็น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกระดับยีนซึ่งส่งผลต่อระดับเมแทบอลิซึมได้



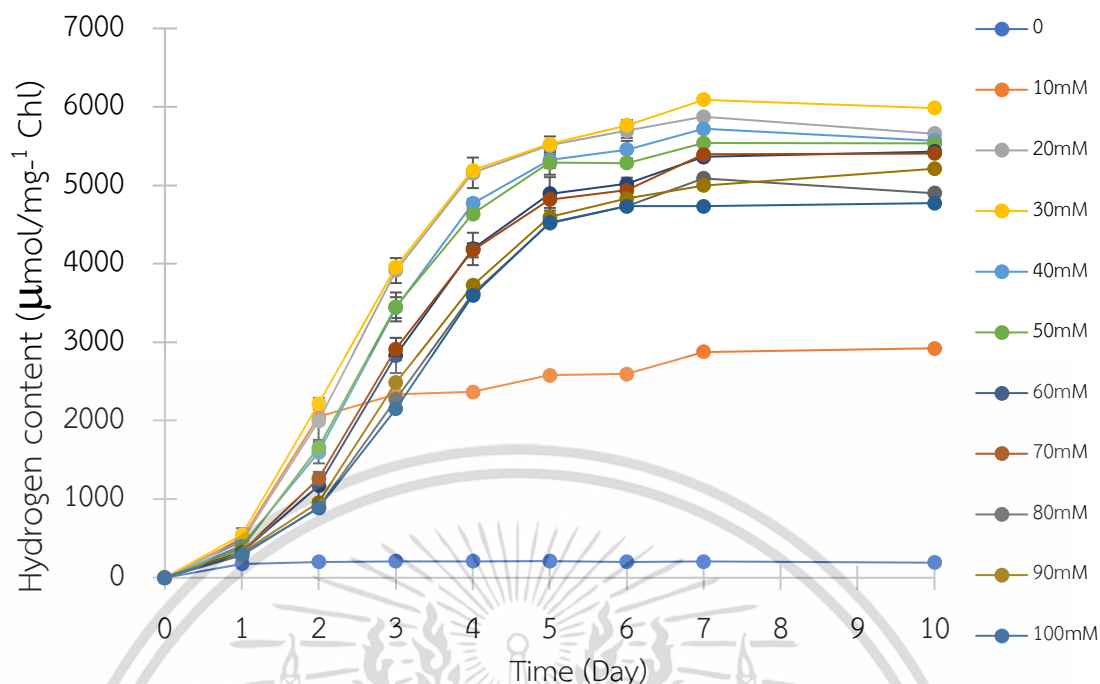
รูปที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสายพันธุ์ G2 และ G4 ในอาหาร TAP ปกติ และอาหาร TAP ที่เติมเอทานอล 10 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะไร้อากาศ บ่มอย่างต่อเนื่องภายใต้แสง 3,500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

โดยที่ Lindberg *et al.*, 2022 ได้ทำการศึกษาการกระตุ้นการสร้างสารประกอบต่าง ๆ จากสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะความเครียดจากอุณหภูมิที่ต่ำ โดยทำการเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris* และ *Scenedesmus* sp. ในที่อุณหภูมิ 22 และ 5 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิต่ำสาหร่ายจะมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและสัณฐานวิทยาอย่างมาก ณ อุณหภูมิต่ำสาหร่าย *C. vulgaris* มีการตอบสนองต่อการสร้างโปรไฟล์น้ำตาลได้แตกต่างจาก *Scenedesmus* sp. พบการเพิ่มปริมาณทั้ง sucrose และ Raffinose Family Oligosaccharides (RFOs) ในขณะที่สาหร่าย *Scenedesmus* sp. มีการผลิตปริมาณ sucrose อย่างลดลงเมื่อเลี้ยงในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และยังพบว่าทั้งสองสาหร่ายเพิ่มปริมาณ total fatty acid methyl ester (FAME) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ ณ อุณหภูมิต่ำ แต่อย่างไรก็ตามโปรไฟล์ของ FAME แตกต่างกันไปมาก สาหร่าย *C. vulgaris* ส่วนใหญ่จะพบการเพิ่มของไขมัน C18:1 และน้อยกว่าไขมัน C18:3 ในขณะที่ *Scenedesmus* sp. พบว่าไขมัน C18:1 นั้นลดลง แต่พบการเพิ่มของไขมัน C18:3 อย่างมาก นอกจากนี้สัณฐานวิทยาของ *C. vulgaris* เปลี่ยนไปเล็กน้อยที่อุณหภูมิต่ำ ลง ขณะที่ *Scenedesmus* sp. นั้นแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงขนาดและรูปร่างอย่างมาก อุณหภูมิต่ำทำให้เกิดการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำเป็นต่อโภชนาการของมนุษย์ได้ เพราะฉะนั้นความเย็นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการสร้างไขมันในสาหร่าย ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงไปของความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่พบในงานวิจัย

เมื่อพบว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ G4 มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในสถานะที่มีการเติมเอทานอลได้ จึงได้ทำการสืบค้นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต ซึ่งได้เติมสารแขวนลอยด้วยความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 (OD₇₅₀) และกระจายเซลล์ในอาหาร TAP ที่เติมเอทานอล ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 มิลลิโมลาร์ จากนั้นจะนำไปทดสอบการผลิตไฮโดรเจนโดยบรรจุสารแขวนลอยสาหร่าย 20 มิลลิลิตร ในขวดเก็บก๊าซขนาด 103 มิลลิลิตร ในสถานะที่ไร้อากาศ จากผลจากการศึกษาพบว่ารูปที่ 4.6 ปริมาณไฮโดรเจนในอาหาร TAP ที่เติมเอทานอลให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ถึง 100 มิลลิโมลาร์ มีการสะสมไฮโดรเจนโดยเริ่มจากวันที่ 2 มีการสะสมอย่างต่อเนื่องและเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ และคงที่ในวันที่ 10 ซึ่งปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่สะสมที่สูงที่สุดเป็นอาหาร TAP ที่มีการเติมเอทานอล ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 30 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 7 มีการสะสมไฮโดรเจนเท่ากับ 6,090.5 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ รองลงมาเป็นความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ในอาหาร TAP มีการสะสมไฮโดรเจนในวันที่ 7 เท่ากับ 5,722.5 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์

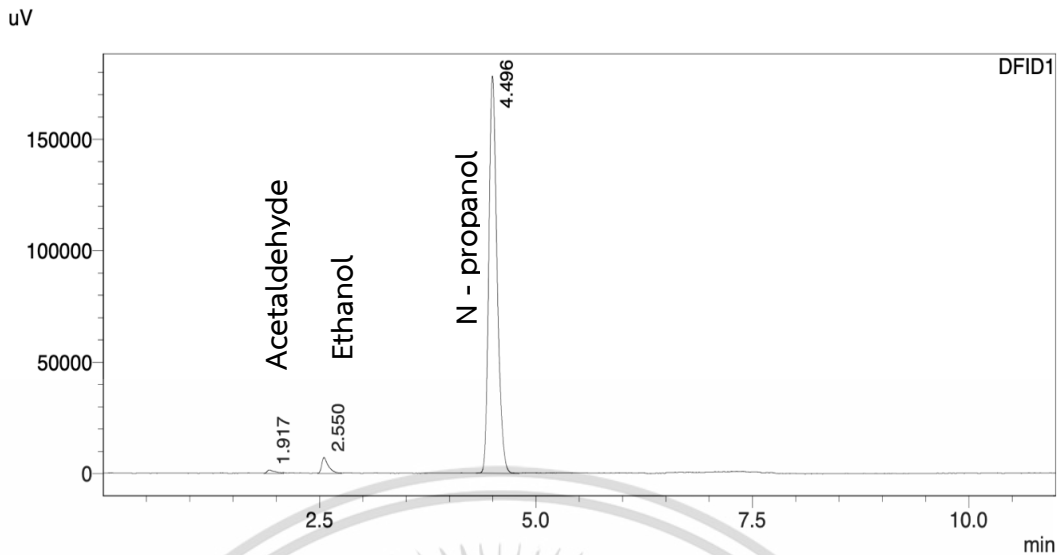
ดังนั้น ในสถานะอาหาร TAP ที่เติมเอทานอล ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้สาหร่ายสายพันธุ์ G4 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยมากกว่าในอาหาร TAP ปกติถึง 29.5 เท่า



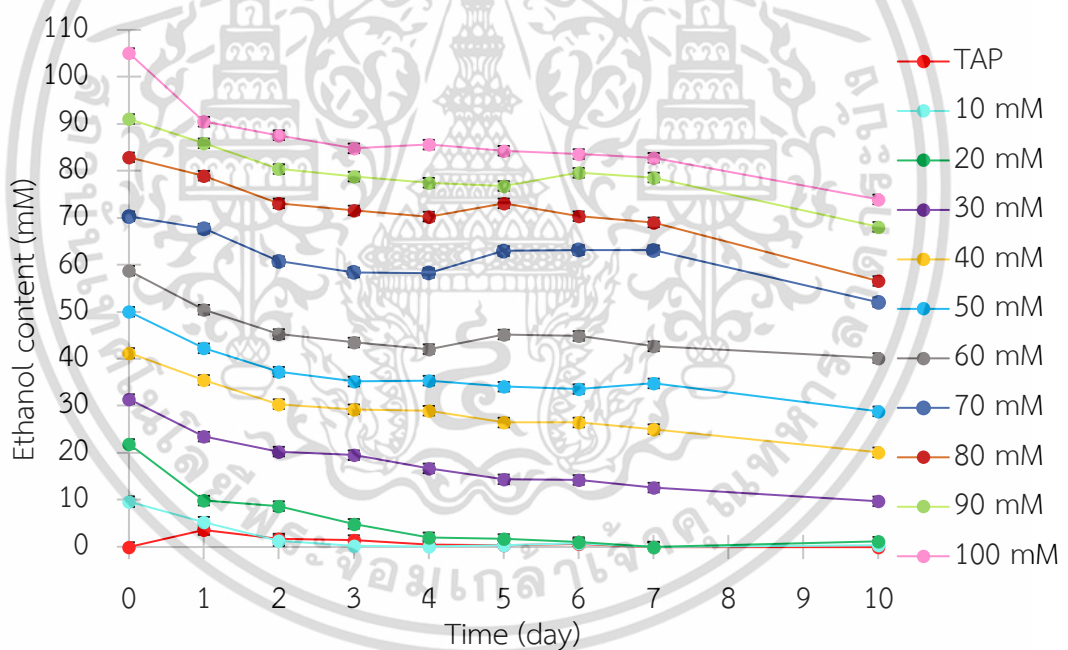
รูปที่ 4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ G4 ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติ และอาหาร TAP ที่เติมเอทานอล 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 (OD_{750}) ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

4.3 ผลการวัดความเข้มข้นของเอทานอลและอะเซทิลดีไฮด์ระหว่างกระบวนการผลิต

การศึกษาความเข้มข้นของเอทานอลและอะเซทิลดีไฮด์ระหว่างกระบวนการผลิตโดยใช้สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ G4 ได้เซลล์เก็บตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร กรองตัวอย่างด้วยฟิลเตอร์กรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ผสมตัวอย่างและ Internal standard (N-propanol) อัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลและอะเซทิลดีไฮด์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-2014 Capillary GC: SHIMADZU) จะตรวจสอบจากผลโครมาโทแกรม (chromatogram) รูปที่ 4.7 พบว่าที่มีระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time, RT) ช่วง 1.9, 2.5 และ 4.5 นาที คือเอทานอล อะเซทิลดีไฮด์ และ เอ็น-โพรพานอล ตามลำดับ และการวิเคราะห์ผลจะนำพื้นที่ใต้กราฟ (peak) ของเอทานอลและอะเซทิลดีไฮด์ที่ได้มาคำนวณผลเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน 1 เปอร์เซนต์ เอ็น-โพรพานอล (ภาคผนวก ค)



รูปที่ 4.7 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของอะซีทัลดีไฮด์ เอทานอลและเอ็น-โพรพานอลที่ได้จากการวิเคราะห์จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลระยะเวลาต่าง ๆ ของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ G4 เพาะเลี้ยงในแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 (OD₇₅₀)

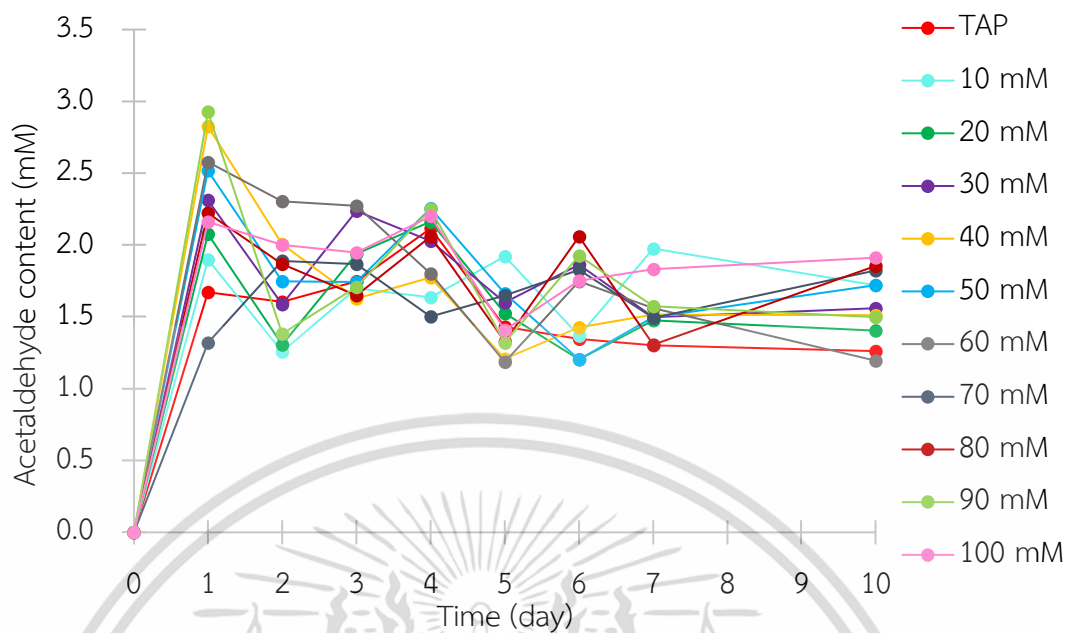
จากการศึกษาพบว่า การคำนวณคิดหาปริมาณของเอทานอลที่เติมลงไปให้ความเข้มข้นสุดท้ายเมื่ออยู่ในอาหาร TAP นั้นค่อนข้างที่จะแม่นยำเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี จากรูปที่ 4.8 พบว่า ในทุก ๆ ความเข้มข้นนั้นเริ่มมีอัตราการลดลงตั้งแต่วันที่ 1 และลดลงเรื่อย ๆ และในวันที่ 10

เอทานอลนั้นลดลงมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นชัดว่าเซลล์นั้นใช้เอทานอลเป็นแหล่ง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่โดยระบบอัตโนมัติ การตีพิมพ์
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิเล็กทรอนิกส์ได้เป็นอย่างดีเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบอัตราการผลิตไฮโดรเจนจากรูปที่ 4.6 และพบว่าอาหารที่เติมเอทานอลที่ความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ นั้นสาหร่ายสีเขียว G4 สามารถนำเอทานอลไปเป็นแหล่งอิเล็กทรอนิกส์ได้อย่างดี เนื่องจากในวันที่ 5 พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลลดลงเหลือเพียงแค่ 0.37 และ 1.70 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

จากการติดตามความเข้มข้นของอะซีทัลดีไฮด์นี้จากรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของอะซีทัลดีไฮด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ในอาหาร TAP ที่เติมเอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ นั้นมีค่าที่แปรปรวนและยังพบว่าตัวอย่างที่เติมเอทานอลในทุกความเข้มข้นนั้นมีความเข้มข้นของอะซีทัลดีไฮด์เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 1 จากนั้นจะลดลงและเพิ่มขึ้น ไม่คงที่ นั้นอาจจะเนื่องจากอะซีทัลดีไฮด์นั้นเป็นสารตัวกลาง (intermediary metabolite) สามารถสร้างปฏิกิริยา Anabolism คือ การสังเคราะห์สารโมเลกุลเล็กเป็นสารโมเลกุลใหญ่ และยังสร้างปฏิกิริยา Catabolism คือ กระบวนการสลายโมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารโมเลกุลเล็กได้ ทำให้ความเข้มข้นของอะซีทัลดีไฮด์นั้นขึ้นและลงเพื่อรักษาสสมดุลของเซลล์เอาไว้ให้อยู่รอดต่อไปได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lis *et al.*, 2017 ได้ศึกษาลักษณะเชิงโมเลกุลของเอนไซม์อัลดีไฮด์/แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (Aldehyde/alcohol dehydrogenases: ADHE) จากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีสองหน้าที่ที่เกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจาก อะซีติล-โคเอ (Acetyl Co-A) โดยมีอะซีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) เป็นตัวกลางและมีบทบาทสำคัญในสมดุลของรีดอกซ์แบบไม่ใช้ออกซิเจนในแบคทีเรียหลายชนิด จากงานวิจัยพบกิจกรรมของเอนไซม์ที่กระตุ้นโดย ADHE โดยเริ่มจากเอทานอลจะถูกออกซิเดชันได้เป็นมีอะซีทัลดีไฮด์ โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) ได้อิเล็กตรอนออกมาเป็นนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: NADPH) จากนั้นจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นอะซีเตท (Acetate) โดยเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Aldehyde dehydrogenase) ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่สามารถย้อนกลับได้ (Bifunction)

ดังนั้นเอทานอลสามารถเป็นแหล่งอิเล็กทรอนิกส์ที่ดีและเหมาะสมต่อสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ G4 ได้และยังให้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงถึง 29.5 เท่า ศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและติดตามหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA ต่อไป



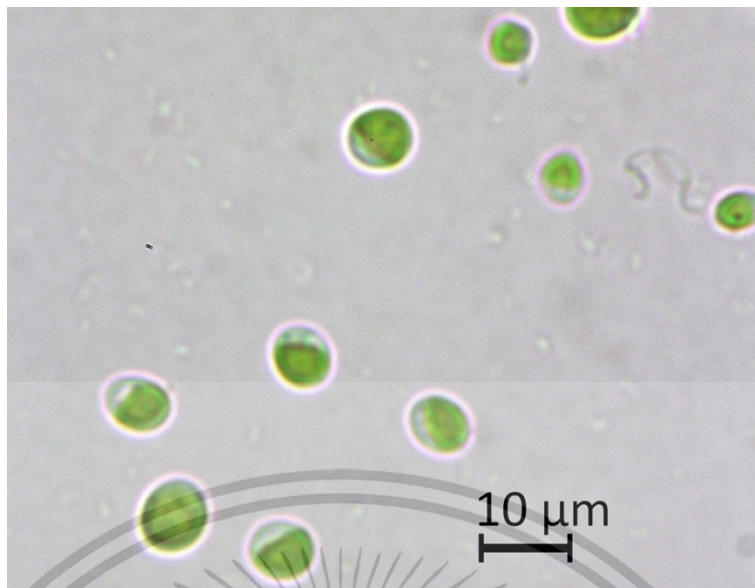
รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณความเข้มข้นของอะซีตัลดีไฮด์ระยะเวลาต่าง ๆ โดยสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ G4 เพาะเลี้ยงในแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 (OD_{750}) วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-2014 Capillary GC: SHIMADZU)

4.4 ผลการศึกษาสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่สามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ดีที่สุด

การแสดงผลลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว G4 จะศึกษาใน 2 ลักษณะ คือ การดูสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และวิธีการติดตามหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

4.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

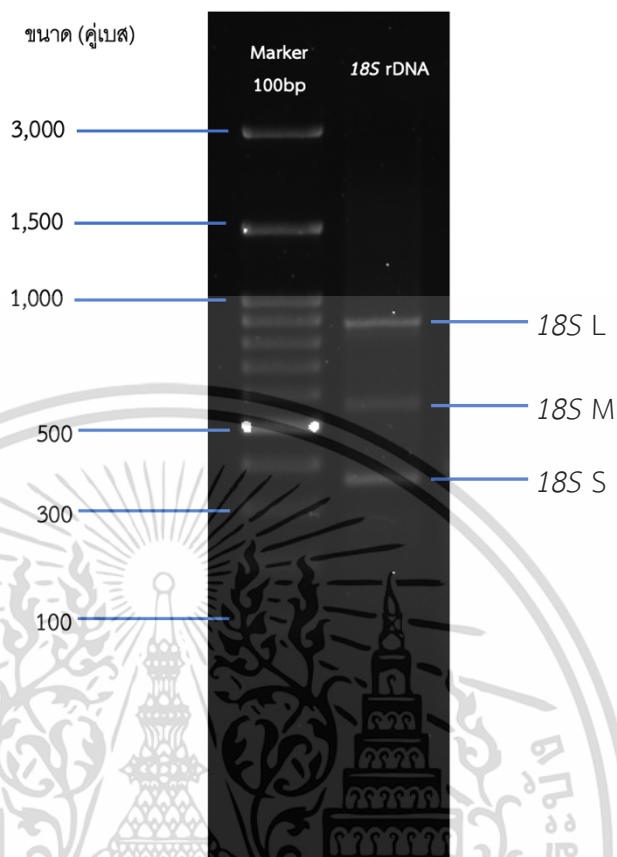
จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสายพันธุ์ G4 โดยนำเซลล์ในระยะเจริญคงที่ (Stationary phase) มาศึกษารูปร่างและลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 1,000 เท่าและบันทึกภาพโดยใช้โปรแกรม NS-Elements D 3.2 พบว่า สาหร่ายสายพันธุ์ G4 มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างค่อนข้างกลมหรือเป็นวงรี สีเขียว ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 2-10 ไมโครเมตร คลอโรพลาสต์มักอยู่ด้านข้าง หรือมักเป็นรูปถ้วย สอดคล้องกับรายงานของ Yamamoto *et al.*, (2004) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp.



รูปที่ 4.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ G4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1000 เท่า

4.4.2 การค้นหายีน *18S* rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณชิ้นยีน *18S* rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้เซลล์สาหร่ายเป็นแม่แบบ และเติมองค์ประกอบส่วนอื่น ๆ ลงไป ดังตารางที่ 3.2 และจะใช้ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด คือ ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ *18S* rDNA Forward (5' CAGCAGCCGCGGTAATT 3') และ ไพรเมอร์ *18S* rDNA Reverse (5' CATCTAAGGGCATCACAGACC 3') และเมื่อผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล (Gel Doc EZ Imaging System) ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ *18S* rDNA Forward และ *18S* rDNA Reverse เจอดีเอ็นเอเป้าหมายของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ G4 และสามารถที่จะเพิ่มจำนวนได้ หลุมแรกคือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder) และ *18S* rDNA คือ ผลิตภัณฑ์ PCR (รูปที่ 4.11) พบว่าเจอชิ้นส่วนเป้าหมายอยู่ 3 แถบที่มีขนาด 800 คู่เบส 550 คู่เบส และ 350 คู่เบส ตามลำดับ และเมื่อเทียบปริมาณความเข้มข้นของยีน *18S* rDNA นั้นเท่ากับ 40, 30 และ 40 นาโนกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร



รูปที่ 4.11 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *18S rDNA* จากการนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5 เปอร์เซ็นต์อะกาโรส DNA Ladder: ดีเอ็นเอมาตรฐาน (SMOBIO ExcelBand™ 100 bp+3K DNA Ladder)

เมื่อทราบขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 3 แถบ ของยีน *18S rDNA* ที่ได้ จากเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ขั้นต่อไป นำ ผลิตภัณฑ์ PCR มาทำบริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัดบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์จาก PCR (TIANGEN™ Universal DNA Purification Kit) ก็จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ไปวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสอีกครั้ง ก่อนทำการส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีการตั้งชื่อให้กับดีเอ็นเอตัวอย่างที่นำส่งไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส 550 คู่เบส และ 350 คู่เบส ว่า *18S L* *18S M* และ *18S S* ตามลำดับ

ผลของการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *18S rDNA* พบว่าตัวอย่าง *18S L* *18S M* และ *18S S* มีขนาด 513 324 และ 312 คู่เบส เมื่อนำดีเอ็นเอทั้ง 3 แถบนี้มา Alignments เข้าด้วยกัน พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *18S S* และ *18S M* เป็นส่วนหนึ่งของ *18S L* แสดงในรูปที่

4.12 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```

18SL -----
18SM -----
18SS CGTAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCA

18SL -----ACCTTGTTGCCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGG
18SM -----CCACCTTGTTGCCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGG
18SS CTGGCAGGGCCACCTTGTTGCCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGG
*****

18SL AGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATAC
18SM AGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATAC
18SS AGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATAC
*****

18SL ATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGT
18SM ATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGT
18SS ATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGT
*****

18SL AATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGCATTTCGATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCCTTGG
18SM AATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGCATTTCGATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCCTTGG
18SS AATGATTAAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATG-----GAAGCATGAGGCAATAACAG
*****!* ** *.*: * :** *.. * *!*..*:*: .*

18SL ATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTCGCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA
18SM ATTTATGAAAGACT-----
18SS GTCTGTGATGCCCTTAG-----
.* *.**:. .*

18SL CGAAAGTTGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCC
18SM -----
18SS -----

18SL GACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAG
18SM -----
18SS -----

18SL TTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGG
18SM -----
18SS -----

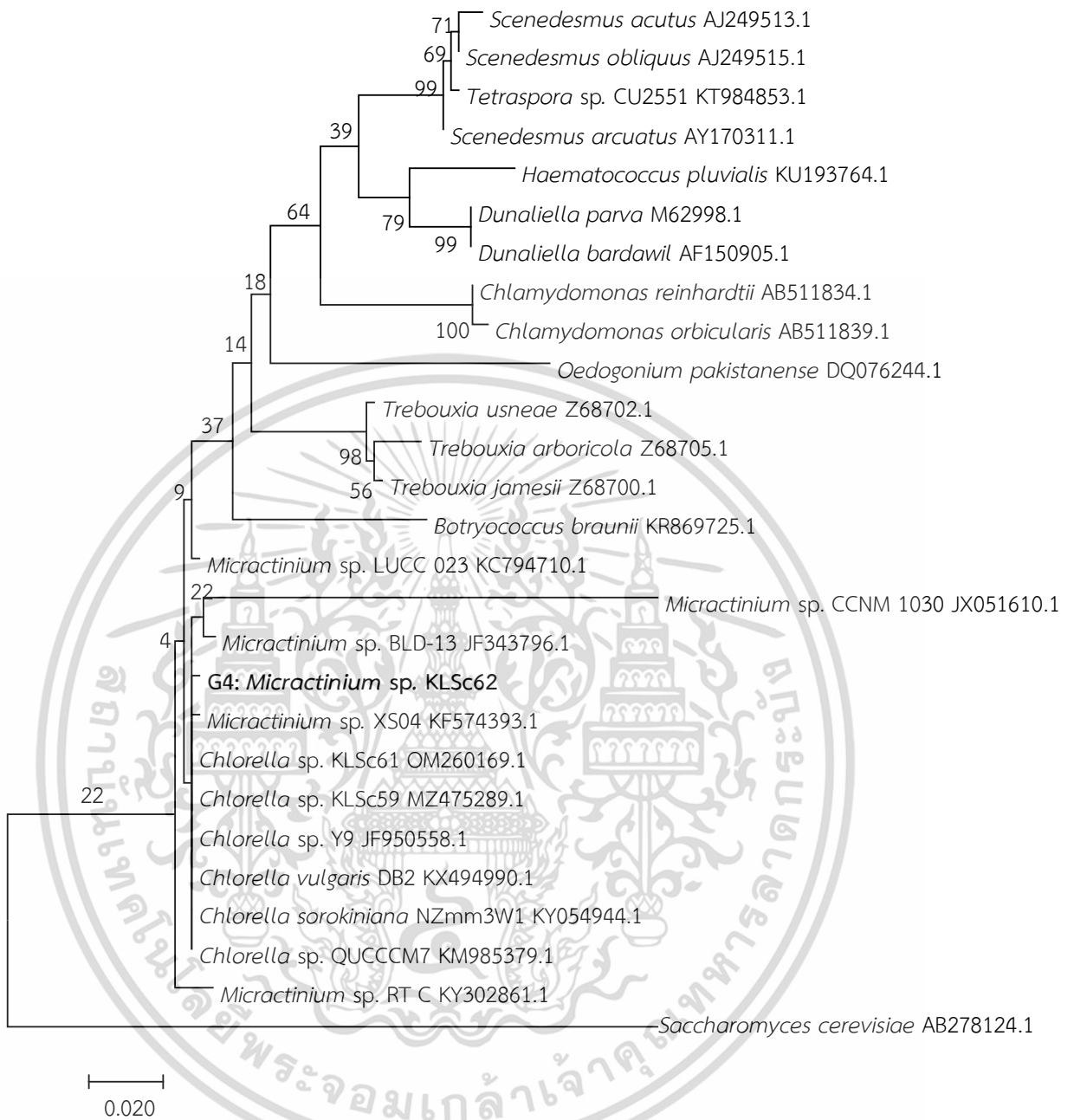
```

รูปที่ 4.12 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) ของ 18S L 18S M และ 18S S เพื่อหาความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอทั้ง 3 แถบ จากสายรหัสยีนยิวสายพันธุ์ G4

จากการที่พบซ้ำยีน 18S rDNA 3 แถบ อาจเกิดจากความซับซ้อนของโครงสร้าง Genomic DNA และโครงสร้างทุติยภูมิเสียสภาพ หรืออาจเกิด Hairpin Loop อาจเกิดการขาดของเส้นแม่แบบจากความร้อนที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดความไม่ต่อเนื่อง ทำให้ได้เป้าหมายของยีน 18S rDNA หลายชิ้นส่วนหรือหลายแถบนั่นเอง อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าทั้ง 3 ซ้ำยีน คือส่วนของ DNA เส้นเดียวกัน จึงใช้ 18S ชิ้นส่วนขนาดใหญ่ที่สุดไปใช้ในการศึกษาต่อไป

4.4.3 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของ ยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว

เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว G4 แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่ถูกรายงานไว้ใน NCBI Genbank (Laokua *et al.*, 2022) ทำการคัดเลือก ยีน 18S rDNA ที่มีความคล้ายคลึงกับยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว G4 จำนวนทั้งสิ้น 26 สายพันธุ์ ดังนี้ *Scenedesmus acutus* AJ249513.1, *Scenedesmus obliquus* AJ249515.1, *Scenedesmus arcuatus* AY170311.1, *Tetraspora* sp. CU2551 KT984853.1, *Haematococcus pluvialis* KU193764.1, *Dunaliella parva* M62998.1, *Dunaliella bardawil* AF150905.1, *Chlamydomonas reinhardtii* AB511834.1, *Chlamydomonas orbicularis* AB511839.1, *Oedogonium pakistanense* DQ076244.1, *Trebouxia usneae* Z68702.1, *Trebouxia arboricola* Z68705.1, *Trebouxia jamesii* Z68700.1, *Botryococcus braunii* KR869725.1, *Micractinium* sp. LUCC 023 KC794710.1, *Micractinium* sp. CCNM 1030 JX051610.1, *Micractinium* sp. BLD-13 JF343796.1, *Micractinium* sp. XS04 KF574393.1, *Chlorella* sp. KLSc61 OM260169.1, *Chlorella* sp. KLSc59 MZ475289.1, *Chlorella* sp. Y9 JF950558.1, *Chlorella vulgaris* DB2 KX494990.1, *Chlorella sorokiniana* NZmm3W1 KY054944.1, *Chlorella* sp. QUCCCM7 KM985379.1, *Micractinium* sp. RT C KY302861.1 โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* AB278124.1 เป็น outer group จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 18S rDNA ที่ได้ทำการคัดเลือกไว้ รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว G4 มาจัดลำดับความคล้ายและแผนภูมิต้นไม้พร้อมทั้งคำนวณระยะทางด้วยวิธี Maximum Likelihood Method (ML) ซึ่งเป็นโปรแกรมแพ็คเกจใน โปรแกรม MEGA 11 และทำการ bootstrap 1,000 ครั้ง เพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) คำนวณระยะทางด้วยวิธี Maximum Likelihood Method (Bootstrap 1,000 รอบ) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว G4 (*Micractinium* sp. KLSc62) และสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่น ๆ 26 สายพันธุ์ โดยมี outer group คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ ตัวเลขที่ลงท้ายของสิ่งมีชีวิตในแต่ละสายพันธุ์แสดง accession number ในฐานข้อมูล NCBI

จากแผนภูมิต้นไม้ในรูปที่ 4.13 พบว่าแผนภูมิสามารถจำแนกความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวในแต่ละสายพันธุ์ โดยระยะทางระหว่างแต่ละกลุ่มของแผนภูมิต้นไม้มีความใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย G4 นั้นมีความคล้ายคลึงและใกล้เคียงกับสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. มาก ผู้วิจัยเลยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 18S rDNA ของสาหร่าย *Micractinium* sp. และ *Chlorella* sp. มาศึกษาความคล้ายคลึงกันเป็นพิเศษเพื่อที่จะระบุสายพันธุ์ของสาหร่ายได้อย่างชัดเจน ดังนั้น ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงเล็กน้อยอาจทำให้เกิดการแยกไปสู่อีกกลุ่มหนึ่งได้

ผลการทดลองที่ได้ในรูปที่ 4.13 แสดงว่านิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว G4 มีความคล้ายคลึงกับกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า สาหร่ายสีเขียว G4 มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. XS04 มากที่สุด ดังนั้น ผู้วิจัยจึงแสดงลักษณะของสาหร่ายสีเขียว G4 ที่คัดเลือกได้จากแหล่งน้ำจืดภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ว่าควรอยู่ในจีนัสของ *Micractinium* และทำการตั้งชื่อใหม่เรียกว่า สาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 โดย KL หมายถึงสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ Sc62 คือ การคัดแยกสาหร่ายสีเขียวในปี 2562 โดยคณะวิทยาศาสตร์ ดังนั้น ในการทดลองลำดับถัดไปผู้วิจัยจะใช้ชื่อสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 แทนการเรียก สาหร่ายสีเขียว G4

เมื่อจำแนกสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 ตามหลักอนุกรมวิธานพบว่า จัดอยู่ในไฟลัมคลอโรไฟตา (Chlorophyta) โดยสามารถแสดง อนุกรมวิธานของสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 ได้ดังนี้

Domain: Eukaryota

Kingdom: Plantae

Division: Chlorophyta

Class: Trebouxiophyceae

Order: Chlorellales

Family: Chlorellaceae

Genus: *Micractinium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาการตามหายีนไฮโดรจีเนสและแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส

4.5.1 การค้นหายีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

4.5.1.1 การค้นหายีนไฮโดรจีเนสออกแบบไพรเมอร์โดย Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010

การตามหายีนไฮโดรจีเนสใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 3 เส้น โดยเป็น Forward primer 1 เส้น และ Reverse primer 2 เส้น (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) ดังแสดงในรูปที่ 4.14

AJ298228.1 *Chlorella fusca* mRNA for Fe-hydrogenase hydA gene

```

1 GCGGAATTAC TAGTGATAAG CAGTGGTAAC AACGCAGAGT CGCGGGCAGG GACTCGATCA
61 GTTGTATATGT GTTGCCCGGT GGTGCAAGT AGGCACGCAG GCGGTGCAAG GCATGTTGCT
121 GTCCGTGCAG CAGGGCCAAC ATCTGAGTGT GATTGTCTCT CAACACCTCA GGCCAAGCTG
181 CCTCACTGGC AGCAGGCTCT GGATGAGCTC GCCAAGCCCA AGGAGAGCAG GAGGTTGATG
241 ATCGCGCAAA TCGCCTCCGC TGTTCGTGTC GCTATTGCTG AGACCATTGG CTTGGCCCCA
301 GGAGATGTCA CCATTGGGCA GCTCGTGACT GGGCTGCGTA TGCTTGCTT TGATTATGTC
361 TTTGACACCC TGTGTTGGTGC TGACCTGACC ATTATGGAGG AGGGAACGGA GCTGCTGCAT
421 CGCCTGCAGG ACCATCTGGA GCAGCACCCC AACCAAGGAG AGCCACTGCC CATGTTCCACC
481 AGTTGCTGCC CAGGCTGGGT TGCCATGGTT GAAAAGAGCA ATCCTGAGCT CATCCCCTAC
541 CTGTCACTTT GCAAGTCGCC TCAGATGATG CTTGGGGCCG TTATCAAGAA CTACTATGCA
601 CAGCAGGTTG GAGTGCAGCC CAGTGACATC TGCAACGTGT CAGTCATGCC ATGCGTACGC
661 AAGCAGGGAG AGGCTGACCG GGAGTGGTTC AACACCACAG GTGCAGGCCCT TGCCCGTGAT
721 GTTGATCATG TGGTACTAC TGCTGAGGTT GGTAAAGATAT TCCTGGAGCG TGGCATCAAG
781 CTGAATGAGC TGCCAGAGAG CAACTTTGAC AACCCATTG GCGAGGGCAC AGGTGGTGTCT
841 CTGCTGTTTG GCACCACTGG AGTGTTCATG GAGGCAGCAC TTCGCACAGT CTATGAAGTG
901 GTGACCCAGA AGCCCATGGG TCGTGTGAC TTTGAGGAGG TGCGAGGCCCT TGAAGGAATC
961 AAGGAGGCAG AGATCACACT CAAGCCAGGA GACGACAGCC CATTCAAAGC CTTCCGAGGA
1021 GCTGATGGGC AGGGCATCAC GCTCAAGATT GCAGTAGCCA ATGGGCTTGG CAATGCCAAG
1081 AAGCTCATCA AGAGCCTGTC AGAGGGCAAG GCCAAGTATG ATTTTCATTGA GGTTCATGGCA
1141 TGCCCTGGTG GCTGCATGG CCGAGGCGGT CAGCCCGCA GACTGACAA GCAGATCCTG
1201 CAGAAGCGCC AGCAGGGTAT GTACAACCTG GATGAGCGCA GTACCATCCG CCGCAGCCAT
1261 GATAACCCAT TCATCCAGGC GCTGTATGAC AAGTTCCTAG GCGCACCCAA CAGCCACAAG
1321 GCACATGATC TGCTGCACAC ACACTATGTG GCAGGTGGA TTCCAGAGGA GAAGTGAGGG
1381 ACCGAGGCCG GAGTGGTGT ATTAGTGTAG AGCTAGGCAG CAGGGATCTG GCCGCATTTG
1441 GGTGCTGTTG TTTGGTTGG CATCAAAGAT ATGATGAATG TACAATCTAT TGGGTTCTTT
1501 GTATCTCATT CATGACTGCT GCTTGGTGTG GTATGGGCCA GGAAGAAGCC CGCATCAATG
1561 CATGTGAAC AGGTGGCTCC ACATATGAAC CCTATCTGGA TGTTTAAGGT ACCTGAAACA
1621 ATAGTGCATC GGCTCTGCAT GGCTCAACAA CCTGTCTTCA GAGCAGGTGT ATTCCACACC
1681 ATCTTGATTT ACCTACCACT CTGTAGTTCA AGTGGTCAA TTGAATGTCT ATGGCAGCTA
1741 CGCCTGCAGT TCATAGTCTA TGAAGGTTTC ACCAGAGTCC ATGTCCCTCA TATTTTTTGT
1801 TTTATATGCC TTGATTATGC CCCTGAACC ATGTCAATG CACACAAGTT GGTGCGAGGA
1861 CAGGCGGCAT CGTACATCTC AATTTTCAGA ACTTGTGAGT GCGGCATTGC CTTATTTGTA
1921 CTCTTGCACT CCTGTTTAC CCTTGCTACT GCCTTGCACT CATCTTGTGTT TTGCAAGCAA
1981 CAGCTCATGC ATTGCAATCG ATCATCACGT ACATCCGTGC CATATTACA TGTTTTTGAC
2041 TTGCAAATCA ACCACCAGGC AGTGGGTAAT TTGCCAGGCT GGGTGCACCTN TGGGCCATTT
2101 GGGCAGCCCT CTTGTGGCGA GCTNTGCTGC AGGGCCAAGC TGAGTGCATC AGACTCAGCA
2161 GGCTGCTGCT GGCACCTGAG AATGTGAAA AGGGCATTCA ACTACATGTC ATATTAGGT
2221 TGACCTGAGA CAGCCGTAAG AATATCATTT TGTGCTGAAC TTAGTCTGCA ATGTCATGCC
2281 ATGATGTGTG TTTCAGGGAT GGATAAGGGA GGTCCCTTCT CAATTACATG CCTTCAAGA
2341 GACTTCAATA TCTGTTGTCA GTGACTTGTG TGTGTTTGT TAATCCAGGG NTNCCAAAAA
2401 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

CTGCCCATGTTCCACC Forward primer HvF2 5'TGCCCATGTTCCACCA3'

CAGAAGCGCC AGCAG Reverse primer HvR1 5'CKSCTGSCGCTTCTG3'

TGCTGCACAC ACACTATGTGGC Reverse primer HydAR 5'GCCACRTAGTGBGTGTGCAG3'

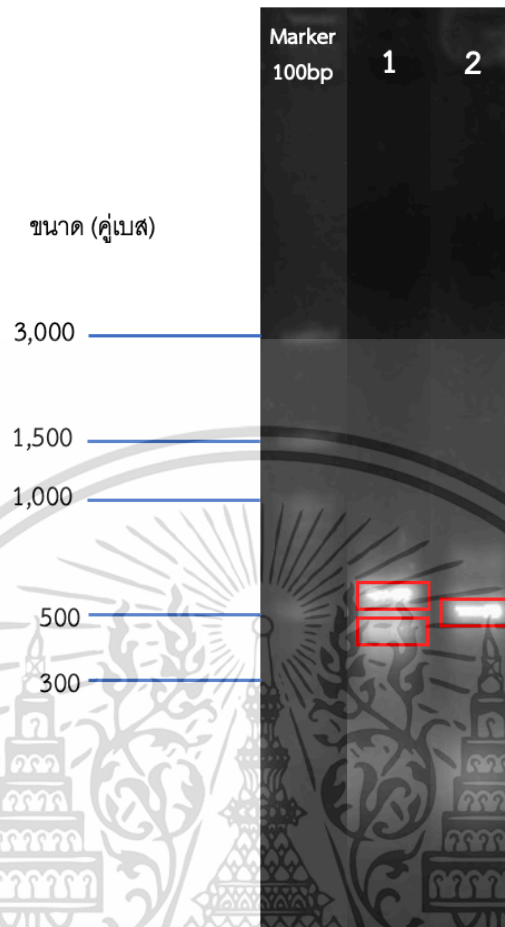
รูปที่ 4.14 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการติดตามยีนไฮโดรจีเนสโดยใช้สายห่วยสี่เขียว *Chlorella fusca* เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์บน cDNA (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จะใช้แม่แบบเป็น cDNA จากสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 โดยการเติมองค์ประกอบต่างๆ ลงไปดังในตารางที่ 3.2 และใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังในตารางที่ 3.3 ซึ่งไพรเมอร์ทั้งหมด 3 เส้น โดยเป็น Forward primer 1 เส้น และ Reverse primer 2 เส้น ไพรเมอร์ทั้ง 3 เส้นสามารถจับคู่ไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 2 รูปแบบที่แตกต่างกัน ดังในตารางที่ 3.10 โดยสามารถยืนยันว่าตำแหน่งไพรเมอร์ทั้ง 3 เส้น อยู่บริเวณยีนไฮโดรจีเนส (Fe-hydrogenase : *hydA* gene) ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella fusca* AJ298228.1 ทั้งหมด (รูปที่ 4.14) เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และถ่ายด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล (Gel Doc) จากผลการทดลอง พบว่าการจับคู่ไพรเมอร์ทั้ง 2 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ cDNA เป็นแม่แบบได้ โดยหลุมแรกจะเป็น ดีเอ็นเอมาตรฐาน หลุมที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ HvF2 และ HvR1 พบผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นหลายแถบ แต่เกิดดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณสูงที่สุด 2 แถบ มีขนาดประมาณ 550 และ 450 คู่เบส ตามลำดับ ส่วนหลุมที่ 3 เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ HvF2 และ HydAR พบผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นหลายแถบเช่นกัน แต่มี 1 แถบที่มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายสูงที่สุด มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส ดังในรูปที่ 4.15

เมื่อทำการตัดชิ้นเจลในรูป 4.15 ตามแถบต่าง ๆ ทั้ง 3 ขนาด ดังที่กล่าวไปทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ที่ได้ไปยืนยันด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสอีกครั้ง เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ และ 3 ขนาด ซึ่งคาดว่ายีนทั้ง 3 ขนาดนี้อาจมียีนใดยีนหนึ่งเป็นยีนไฮโดรจีเนส

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นจะเริ่มจากนำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะเป็น pGEM®-T Easy Vector ซึ่งจะมีองค์ประกอบในการเชื่อมต่อยีนเป้าหมายเข้ากับพาหะดังในตารางที่ 3.13 ผสมเข้ากันในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ Ligation Reaction ที่ได้จาก 3.13.4 ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ไปผสมกับ Competent cells และตรวจสอบการเพิ่มส่งต่อชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายสู่พาหะ ด้วยวิธี Blue-White colony screening เมื่อผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง จะเห็นโคโลนีของเชื้อ *E.coli* เจริญขึ้นมา จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวนวลไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อนำมาสกัดพลาสมิด และคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ พบว่ามี 18 ตัวอย่างที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่จึงได้ทำการสกัดพลาสมิดเพื่อส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 4.15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการติดตามยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ HvF2 และ HvR1/HydAR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis หลุมที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน หลุมที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ HvF2 และ HvR1 และหลุมที่ 3 คือ เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ HvF2 และ HydAR

หลังจากที่ทำการส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนส เพื่อที่จะทราบขนาดคู่เบสและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ ทั้ง 18 ชิ้นไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถูกรายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastN ผลที่ได้คือ ชนิดดีเอ็นเอทั้ง 3 ขนาด ที่ทำการโคลนเข้าพาหะนั้นไม่ใช่ยีนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส แต่เป็นยีนที่เป็น unknown เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์นั้นยังไม่ใช่ยีนไฮโดรจีเนส ผู้วิจัยได้ทดลองทำการทดลองเริ่มตั้งแต่การทำ PCR และโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย และส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ผลที่ได้ก็ยังคง ยีนที่เป็น unknown อยู่ ซึ่งอาจจะเกิดจากความหลากหลายของยีนไฮโดรจีเนสหลากหลายสายพันธุ์อาจทำให้ไพรเมอร์อาจจะไม่จำเพาะกับสายสำหรับ *Micractinium* sp. KLSc62 จากนั้นผู้วิจัยจึงได้ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์

ใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.1.2 การค้นหายีนไฮโดรจีเนส

การเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จะใช้แม่แบบเป็น cDNA จากสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 2 เส้น โดยเป็น Forward primer 1 เส้น และ Reverse primer 1 เส้น สามารถยืนยันได้ว่าตำแหน่งไพรเมอร์ทั้ง 2 เส้น อยู่บริเวณยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ได้ (รูปที่ 4.16) จากผลการทดลองพบว่าการจับคู่ไพรเมอร์ทั้ง 2 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ cDNA เป็นแม่แบบได้ โดยหลุมแรกจะเป็น ดีเอ็นเอมาตรฐาน หลุมที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ HydA_F1 และ HydA_R1 พบผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นหลายแถบ แต่เกิดดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณสูงที่สุด 1 แถบ มีขนาดประมาณ 475 คู่เบส ดังในรูปที่ 4.17 เมื่อทำการตัดชิ้นเจล ดังที่กล่าวไปเพื่อทำบริสุทธิ์ขึ้น PCR จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ที่ได้ไปยืนยันด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสอีกครั้ง

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นจะเริ่มจากนำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะเป็น pGEM®-T Easy Vector และตรวจสอบการเพิ่มส่งต่อขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายสู่พาหะ ด้วยวิธี Blue-White colony screening จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวนวลไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อที่จะนำมาสกัดพลาสมิด และคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ พบว่ามี 9 ตัวอย่างที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่จึงได้ทำการสกัดพลาสมิดเพื่อส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

Chlamydomonas reinhardtii iron hydrogenase (HYD2)

CAAATATACAAGTGCTGACAAACAAGACCCACAACAATTCCCCTGAAGACTATTTCGTGCGCAGGCACAACC
 GAGCGAACCGCGGCAACTGTCCCTGGCCCCGACTCAGCCTACTTGTCTCAATTAGCTAGTGTCTGCG
 GATAGATTAGCAGGATGGCGCTTGGTCTTCTTGCCTGCAAGAGTCGAGCTGCGCGCGGGTCAGGCCG
 TGGCATGTGCTCGCCGACCAATGCCCTGCTCACCCGCGGCAGTGGTGCCTGCCTAGCCGTGCG
 GGGCAAGTTCTTCAATCTAAGTCAGAAGGTCCTTTCGTGCGAGTCTGCGCGCGGCTCGACCATTTCGTGTG
 GCAGCGACCGCAACTGATGCTGTTCCGCACTGGAAGCTCGCGCTCGAGGAGCTTGACAAGCCCAAGGATG
 GCGGCCGAAGGCTTGTATCGCGCAAGTGGCCCCGGCCGTCGCGTTCGCATTGCTGAGTCATTTCGGCCT
 GGCCCCGGGTGCCGTGTGCGCGGGCAACTAGCCACCGGCTTGCCTGCCCCGCTCGGCTTCGACCAGGTGTTT
 GACAGCTGTTTCGCGGGCGACTGACCATCATGGAGGAGGCACGGAGTGTGCTGCACCCCTCAAGGAGC
 ACCTGGAGGCCACCCGCACTCCGATGAGCCGCTGCCCATGTTACCAGCTGCTGCCCCGGCTGGGTGCG
 CATGATGGAGAAGTCTACCCGAGCTCATTCCCTTCGTGAGCTCCTGCAAGAGTCCCCAGATGATGATG
 GGCGCCATGGTGAAGACCTACCTGTCCGAGAAGCAGGGCATCCCCGCCAAGGACATCGTCATGGTCTCCG
 TCATGCCTTGCCTGCGCAAGCAGGGCGAGGCTGACCGCGAGTGGTTCTGTGTGAGCGAGCCGGCGTGC
 CGACGTGGACCACGTAATCACACCAGCCGAGCTGGGCAACATCTTCAAGGAGCGTGGCATCAACCTGCC
 GAGCTGCCCGACAGTACTGGGACAGCCGCTGGGCTGGGCTCCGGCGCCGGCGTACTGTTCCGACCA
 CCGCGCGCTCATGGAGGCGGCGCTGCGCACGGCCTACGAGATAGTGACCAGGAGCCCTGCCGCGCT
 CAACCTGAGCGAGGTGCGCGGCTTGGACGGCATCAAGGAGGCGTCCGTGACGCTGGTCCCCGCTCCGGG
 TCCAAGTTCGCGGAGCTGGTGGCGGAGCGCTGGCGCACAAAGTTCGAGGAGGCGCGCGGCTGAGGCGG
 CGGCGGGGTGGAGGGCGCGTGAAGCGGCCATCGCGTACGACGGCGGCCAGGGTTTCTCCACGGATGA
 CGGCAAGGGCGGCTGAAGCTGCGGGTGGCGGTGGCGAACGGCCTGGGCAACGCCAAGAAGCTGATCGGC
 AAGATGGTATCTGGCGAGGCCAAGTACGACTTCGTAGAAATCATGGCCTGCCCTGCCGCTGCGTGGGCG
 GCGCGGCCAGCCCCGCTCCACCACAGCAGATCACCCAGAAGCGGCAGGCGGCTCTGTACGACCTGGA
 CGAGCGCAACACGCTGCGCCGCGAGCCACGAAAACGAGGCGGTCAACCAGCTGTACAAGGATTCCTGGG
 GAGCCCTGTCCACCAGCGCCACGAGTGTGTCACACCCACTACGTGCCAGGCGGCGCCGAGGCCGATG
 CTTAGGGCACAGCTCTTGCCTGGTATGTGTAACTTATGCGTCCGAGTGGCTTGGACTTGGAGCTGCG
 GAAGCCGACTGCCGAGGCGGGGAGCGCCGCTGCGGAGCATATGCGATGTATGGTGGTAGTGGAGGCGGC
 TGTGGGATCACTATGACACGGACACTTCGAATAAGGTTGCGCAGCTAGCGCTAAGGGGTGGTGCGCCCT
 GGTTCATACACATACATCCCCACGCGGAGGTAGGGGCATGTTATAAGTGAGATCATCATGTTTTGCTC
 GGATTCAGATACTTAAGGACTGAAAGGTTGGATTATTGCTTTGAACGGAACAGGAGTGGGTTGGATTA
 CAATTGCTTGAACGGTGGGATTTAGCATCTTACAGTACACAGAATGTTACATCTAGTGGACACGCGC
 GGCCTGAGCGCATAACATCATGCGCATGTGCGCCTTCGCTGCACGCACGTACGTAACCGACGGCGGTAT
 TCGTCGGAAGTGTGTGTGTCATTAGGTTTGTGTTTGTGCTGATGTGGTGGTGGCAAACTGGGACTCAT
 GTACGTTACGGTATGGCTGTGCCACCGTACATGTGGCGATGTGATTGTGAGTCTCCTGCTGTCTCACGC
 GCAGGGGGAGGTGCAACCACCCGTTGTGCGAGCCCTCTTATATAATAAGCTAAGCGTCTTTCAAAGCT
 GAGTTTTGCAATGGTGTGGCGCCAGGCCGCCAGCTGTTTTTGGTGTGAGGTAGGTACGGGCCCATGGGCT
 TTGACAGTGCCTGGAAGTGTGTCACGCGCTGTGTGACCCAGTTGACCACCGGCAGGCGCAACATGGCGCAC
 AGACAGTGTCTATGACCTGTAACACTGCCCTGCCTTA

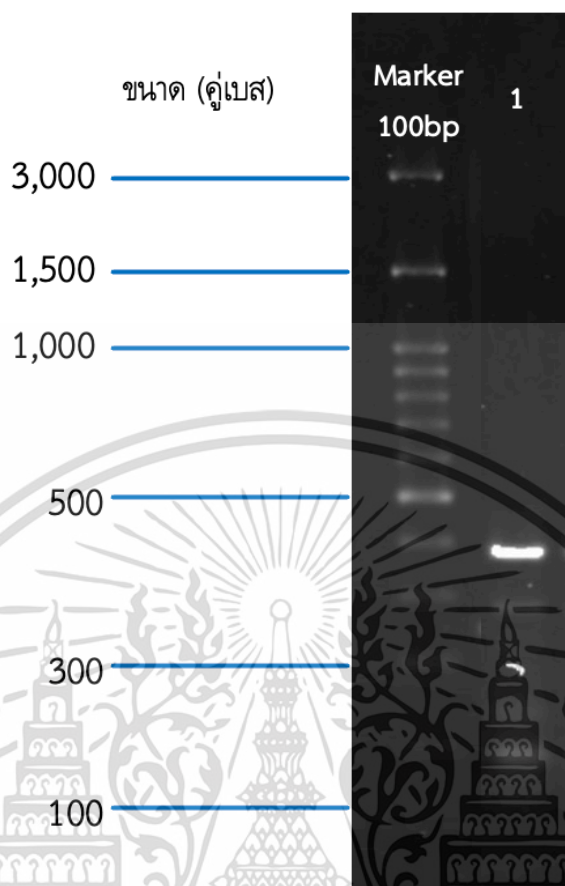
CCTGCAAGAGTCCCCAGATGATG คือ Forward primer HydA_F1

5'GTGCTCCAAGCTGAAGACT3'

ACTTATGCGTCCGAGTGGAG คือ Reverse primer HydA_R1

5'CTTCGCGGAATGTGTCGAG3'

รูปที่ 4.16 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการติดตามยีนไฮโดรจีเนสโดยใช้สายสีเขียว
Chlamydomonas reinhardtii เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์บน cDNA



รูปที่ 4.17 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการติดตามยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ HydA_F1 และ HydA_R1 และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis หลุมที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน หลุมที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ HydA_F1 และ HydA_R1

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ทั้ง 9 ตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถูกรายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastN ผลที่ได้คือ ดีเอ็นเอที่ทำการโคลนเข้าพานั้น ไม่ใช่ยีนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส แต่เป็นยีนที่เป็น unknown ผู้วิจัยได้ทดลองทำการทดลองเริ่มตั้งแต่การทำ PCR และโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย และส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ผลที่ได้ก็ยังคง ยีนที่เป็น unknown

4.5.2 การค้นหายีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ-

เรส

4.5.2.1 การค้นหายีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสออกแบบไพรเมอร์โดย Maneeruttanarungroj et al., 2010

การตามหายีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 3 เส้น โดยเป็น Forward primer 1 เส้น และ Reverse primer 2 เส้น (Maneeruttanarungroj et al., 2010) ดังแสดงในรูปที่ 4.18 การเพิ่มปริมาณยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จะใช้แม่แบบเป็น cDNA จากสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 โดยการเติมองค์ประกอบต่างๆ ลงไปดังในตารางที่ 3.2 และใช้เครื่องปริมาณสารพันธุกรรม ดังในตารางที่ 3.3 ซึ่ง ไพรเมอร์ทั้ง 3 เส้นสามารถจับคู่ไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 2 รูปแบบที่แตกต่างกัน ดังในตารางที่ 3.10 โดยสามารถยืนยันว่าตำแหน่งไพรเมอร์ทั้ง 3 เส้น อยู่บริเวณยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ทั้งหมด (รูปที่ 4.18) เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และถ่ายด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล (Gel Doc) จากผลการทดลองพบว่าการจับคู่ไพรเมอร์ทั้ง 2 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ cDNA เป็นแม่แบบได้เหมือนกันกับยีนไฮโดรจีเนส โดยหลุมแรกจะเป็น ดีเอ็นเอมาตรฐาน หลุมที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ ADH1_F1 และ ADH1_R1 และหลุมที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ ADH1_F1 และ ADH1_R2 จะเห็นได้ว่าทั้งหลุมที่ 2 และหลุมที่ 3 พบผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นหลายแถบ แต่มีแถบของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณสูงที่สุดและเห็นได้อย่างชัดเจนเพียง 1 แถบ มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส ดังในรูปที่ 4.19

เมื่อทำการตัดชิ้นเจลในรูป 4.19 ที่สนใจแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ที่ได้ไปยืนยันด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสอีกครั้ง การหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นจะเริ่มจากนำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะเป็น pGEM®-T Easy Vector ซึ่งจะมียังค์ประกอบในการเชื่อมต่อยีนเป้าหมายเข้ากับพาหะดังในตารางที่ 3.13 ผสมเข้ากันในหลอดไมโครเซนตริฟิวจจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ Ligation Reaction ที่ได้จาก 3.13.4 ปริมาตร 4 ไมโครลิตรไปผสมกับ Competent cells และตรวจสอบการเพิ่มส่งต่อชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายสู่พาหะ ด้วยวิธี Blue-White colony screening เมื่อผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง จะเห็นโคโลนีของเชื้อ *E. coli* เจริญขึ้นมา จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาววนลไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อที่จะนำมาสกัดพลาสมิด และคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ พบว่ามีเพียง 2 ตัวอย่างที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่จึงได้ทำการสกัดพลาสมิดเพื่อส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

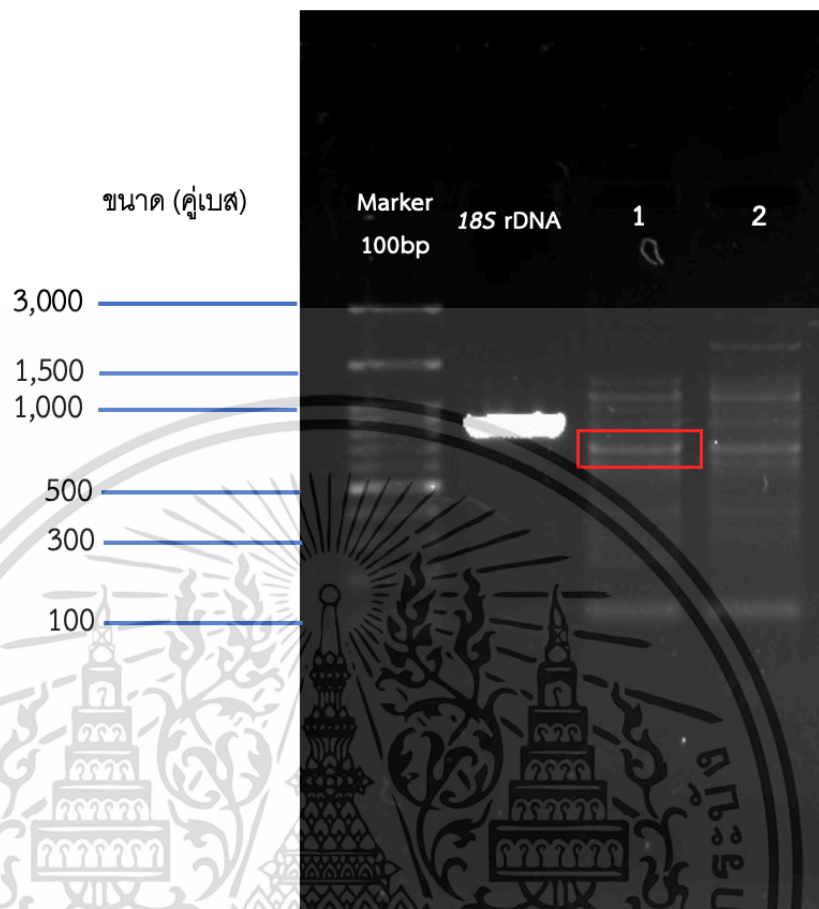
GGTGGATGAGGGTCCCGGGGACATGCCAACATCGCGGTTGACATGGCCCTTGATTGTCCCAACAACATGCAGATCTACTTCAAGGGCGGTGC
 CTGGAGTGGCGCTGACCGATCTGCGTGGCAAATCGCGCTTTTCATTGTACGGACAAGCCGCTTTTTGACATGGGATACGCCACAAGGTACCC
 CACATCTGGACAGCATTAACTGTGCCACCAGGTATGCTCGGTGAAACGCGCTTTTAGACAATACGTATCAAATAGGAAGAATAAAGCATTTA
 GCGACCTTCGGTTCGGCGGGTGGTTTTTCGGCGACCCGCTGCTGATGGTGACGCACCTCGCGATCGGCCCTTGCCCTTGCCCCGGCTTT
 AGCCCTCGCTGTCCGCTTACGCCAAAAGCCTTCTTAAAGCAATACACCTTTAGCAAGCCACAACCTTAAACAGCAGCTAAGCTATGCAGCAG
 CAGCAGCAGCAGCTCTCCGACCCGGTGTGCCTCCGCGCCGCCACGGTTCGCGCCGGCGCCACCTCGGCCTCCGGCGGGCGCTGCA
 GCCGCCCGGTCTGCTACACGCCCTGATGCGCTGCGCGGCTGGCGAGCCACCAGGCCATTGCGTCTGATCCATGCGCAGTCCATT
 TGGAAAGTGGAGTATTCTGACCAGCACAACAGCAACCGCTCGCACGCGCAGCTCGACTGCCACCCTCGCGGGCTCACCCACACACTTCGGCC
 CCACCACCACGAGGTCTTACCAGTGCACCCCGACCCGCTGCGCTGCAATTGAGGCGGGTCTGAAGGAGATCTGGAGTTCAAGCCCGATG
 TCATCATCGCTGGGTGGTGGCTGCCATGAGCGCCCAAGGTATGCGCGCAGGGACTGGCGTTGGCGGTGCTTTGCAACAGTGCATGGAA
 GCGGGCTATTTAAGGGAACAAGGGTGTGCTCTCTGTTTCCAAAGTGGCCACGCATACATCAACTTTACCTCTTCCCTCGACCTCTGCCA
 CTCACAGATCATGTGGTGTGACGAGTGCACCCGACCCGCTTGCAGCGCTGGCCATGCGCTTCATGACATCCGAAGCGGTGTACGAGGT
 GCCGGAGTGGGCAAGAAGGCCACCATGGTGTGCATCCACCACCAAGTGGCACCAGTGGCGGCTCGGAGGTGACGCCCTTCTCGTGGTGCACCGACGAGC
 GCCTGGGGCCAAAGTACCCCTGGCCGGTGTGGGGGATGAGGGGAGCTCAAGGGGGGAAGCGGCTGGGAGGGGGCGCCAGGCAAG
 GGCCGGTAGGCTGCGCAACATGCTCAACCATCACCCACTGACCCACCTTCCCTCCCTCCCTGCTCTCTCCCCACACAGATTACGCCCTG
 ACCCCAGCATGGCATTGTGGACCCCGCTGGTGTCAACATGCCAAGAAGTGCACCCCTGGGGCGGATTGACGCGCTCACGCACGCGCT
 GGAGAGTACGTCCATCTGCGCACCGGTGCTGACTAGTTGCCCGCTGACTGGGTTTGTGGAGGCGAGGGGGGCCATTGCAAGACACA
 CCTGTATTCTGGGGCTCGTCTAGGTGTGGGAAAGATGCTGCTGAGCGCCGCGCCACGCTCCGCCCTCCCGCGCCCTCACAGACTACACCA
 AGGGTCTGTCGCGGAGGCCATCAGCTGCTGTTCAAGTACTGCCCGCGCTACGCCAAGGGTCAACGACTACTGGCGGTGAGAAGGTGC
 ACTACGCCCGCAGGTGAGTGTGCTGCTGCTGGCAGGAGCGCCGGGGGCTGATGTTGGGTGGCAATCGCCCGTGTCAAGGAGGGGTGGG
 GCGCACAGCCGCCCTGTGGGGAGGAAAGCATTACTAGTGGTGTGATAGCCAAAGCGCACTGGCTGACTGCCCATGTGCTGTCTGG
 TCCCCAGATTGCCGGCATGGCTTCGCAACGCTTCTGGCATCTGCCACTCATGGCGACAAGCTGGGGCGCCCTACCAGTGCCTCACGG
 CCTGGCCAAAGCGCGCTGATCAGCCAGTGCATCCGCTACAACGCCACCGACATGCCCGCAAGCAGGCGGCTTCCCGCAGTACGAGTACCCAC
 CGCAAGCAGGTGAGGGCGCAGCAGGAGATGAGAGCCGTTGAGTGCAGCGCGCCGACGATGCCACACATGTTATGTCGTGCTGTGAATCA
 CCTGTGCGCGATGGGATTGCCAGTTACACAAGTTGCCAACCCCTTCTCCACCACACACACACAGCCACATCTCCCTACTAGGACTAC
 GCCGACTGCGCAACATGCTGGCGTGGCGGCAACCGTGGAGGAGAGGTGATCAAGCTGATTGAGCGGTGGAGGAGCTCAAGGCCAAGGT
 GGACATCCCGCCACCATCAAGGAGATCTCAACGACCCCAAGTGGAGCGCGACTTCTTGGCGAACGTGGAGCGTGAAGAACGGGTCCGTGT
 GGGTGGGCTCACTGTGGGTGGGTGGCTGTACCGGCTCCAATATTACATGCTGTCCGGCGAGGTGCGTAAATTTATGCTCTGGCGTGA
 TGTAAAGCGTGCACITGGCTTTGGTGTGGGACTCGCAAGGAGTTCAGCTTACCCCGCCCGCTCTCTCCCATCGCTCGCAGCTGGCCGA
 GGACGCTTCGACGACAGTGCACGGGCGCCCAACCCGCGTACCCGCTCATGGCCGACCTGAAGCAGCTCTACTGGACGCCACCGCCGCGCCA
 TCCTGCCGTCAAGACCCCTGGAGTCTTCTCCAAGTCAACTAAGCAGCTGGCTGCCGAGCGGCTGCTCAAGGAGCGGGGCGAGGAGGAG
 CAGGATTCAGCGACGCAATTTATGGGAGATGTGCTGGTGGGCTCCGCGCCCTGAGGTTCCACGAGTGGCGCACCCGCGCTGATGATAAA
 GCGCGCGGAGACCCGCTCACTCGCGGCGAGTCTTGGCACGGGGCGCATAGGCGCCCATCCGGTGTACAGGCGACAATGGATATGTG
 TCAGCGATACCGGCCCTCACTCCGCTGTGTAATGAGTACGATGTACGTGACGAGGACGGGTTCCAGGACTTGGGGGTGTTTTAAGCGT
 GGCACATGCCGCCACCCGCGGCTGGTTTTCCCGCACGCTTCTGCTGCTACATTAGGTTGTGGCGCACCACTGCTTTCGTTTGTGCTCAT
 GAGTGGCTTGAGAGGGCGGCTGGAGGAGCAGTGGGGACGCTGAGGAGCCTCGCGCCCATGACTGAAGAGTCAATGATCATGTAGTCGCA
 TGTTCCTTTGCGGTGACGCGTGTACTGAGTACCCTGTGACTGTGAGCTGTTGAGCGTGCGCCAAAACGCGTGGGAGGAAGCACTGCCTG
 GCCGCCCGCGCGAGTACCGTTCGTGTTGATGACAGTTGGCTAAGTAAGTATTCTTGGGCTTACTCTGCGGATCTGGAGGGAGGCG
 CCATGTCATGGCGTGGTCTGCGACGTGTCTGTAAGTACCTGATGATGGA

CCTTCCCGCAGTACGAGT คือ Reverse primer ADHR1 5' CKSCTGSCGCTTCTG 3'

CAACCCGCGCTACCCGCT คือ Reverse primer ADHAR 5' GCCACRTAGTGBGTGTGCAG 3'

รูปที่ 4.18 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการติดตามยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสโดยใช้
 สำหรับยีสี่เขี้ยว *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์บน cDNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการติดตามยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮด์ทรานส์เฟอเรสด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ ADH1_F1 และ ADH1_R1 /ADH1_R2 และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis หลุมที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน หลุมที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ ADH1_F1 และ ADH1_R1 และหลุมที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ ADH1_F1 และ ADH1_R2

หลังจากที่ทำการส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดริเนส นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ทั้ง 2 ตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถูกรายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastN ผลที่ได้คือ ดีเอ็นเอที่ทำการโคลนเข้าพานั้น ไม่ใช่ยีนของเอนไซม์แอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮด์ทรานส์เฟอเรส แต่เป็นยีนที่เป็น unknown เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์นั้นยังไม่ใช่ยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮด์ทรานส์เฟอเรส ผู้วิจัยได้ทดลองทำการทดลองเริ่มตั้งแต่การทำ PCR และโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย และส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ผลที่ได้ก็ยังคง ยีนที่เป็น unknown อยู่ ซึ่งอาจจะเกิดจากความหลากหลายของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสหลากหลายสายพันธุ์อาจทำให้ไพรเมอร์อาจจะไม่จำเพาะกับสายสำหรับ *Micractinium* sp. KLSc62 จากนั้นผู้วิจัยจึงได้ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ใหม่

4.5.2.2 การค้นหายีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส

GR283029.1 752547 *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-503 strain)

```
CTCGTCCCACAGCTCGGCGGTGCGCCGGTACGGCCCGCGCGCTCCACCCAGAACGAGCCGTCCACCATG
CGGCGCTGCACCGGCAGCGCGTCCAGCCGCGCCACCTGCTCCGGCGCCAGCTGCCAGCCACCCACCAGCA
CCTCCAGGTTGGCGGCGATGCGCAGCGGGTTGACGAACCTGGGCAGCACGCTGGTGC CGCGCTGCACAGC
CCAGCGGATGAGCACCTGCGCGGGGCGACTTGCCAGCTCCGCCGCCACGGCCGCCACGGTCTCGTCCCTTG
AGGGGCGACGGCACGTCCGCGGGCGCGCCCAATGACTGCGGCGCTGTGGGGCAGCCAGCGGGCAGTAGG
CGGTGAGGTGGACGCCGCGGGCCGCGCACCAGGACCCGAGCTCCTCGTTGCGCCAGTAGGGGTGCGCCTC
AACCTGGTTGACGGCGGGTGGATGCGGGCGCGGGCCATCAGCGCCTCAAGCTTCTTGGCTGAGAAGTTT
GAGACGCGGATCGTGCGGACCAATCCCTTGGTCACCAGCTGCTTCATGGCCGACCGTGTGAGCCAGCG
GCGGCTGGACCTCGGGGCCCGGGGTGCCGGTGACGGCCAGTGATGAGGTGAGGATCCCAAATAGGAC
ACCCAGGTCCTCCTGGCTCCTGCGGCAGGGCGCCTCCACACGGGCCGGGGTTCGTGGGCCGGGTTCACAAG
CTATGAACGTGAAGAACCACCATCCTCTCGTTTCTCGACACATTCCGCGAAGCACAGCCCCAAGGGCTAGT
```

GGCTGAGAAGTTTGAGACGC คือ Forward primer ADH2_F1

5'GGCTGAGAAGTTTGAGACGC3'

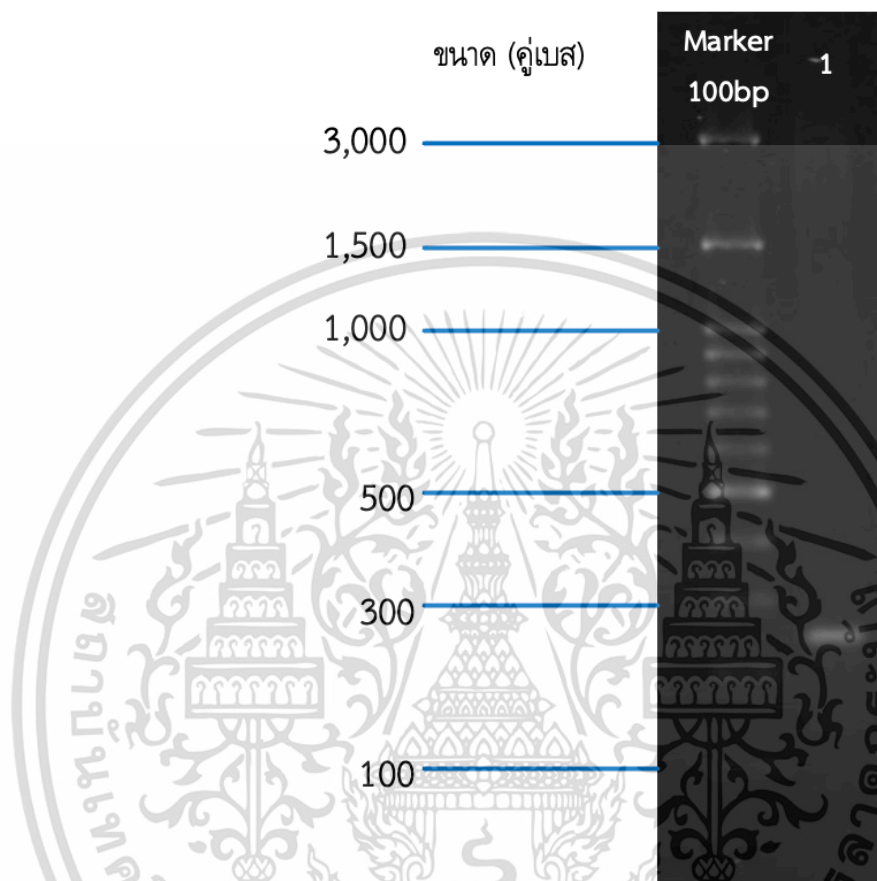
CTCGACACATTCCGCGAAG คือ Reverse primer ADH2_R2 5'CTTCGCGGAATGTGTCGAG3'

รูปที่ 4.20 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการติดตามยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสโดยใช้สายรหัสเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์บน cDNA

การเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จะใช้แม่แบบเป็น cDNA จากสายรหัสเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 2 เส้น โดยเป็น Forward primer 1 เส้น และ Reverse primer 1 เส้น ไพรเมอร์ทั้ง 2 เส้นสามารถยืนยันได้ว่าตำแหน่งไพรเมอร์ทั้ง 2 เส้น อยู่บริเวณยีนไฮโดรจีเนสของสายรหัสเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ได้ (รูปที่ 4.20) จากผลการทดลองพบว่าการจับคู่ไพรเมอร์ทั้ง 2 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ cDNA เป็นแม่แบบได้ โดยหลุมแรกจะเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน หลุมที่ 2 คือผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ ADH2_F1 และ ADH2_R1 พบผลิตภัณฑ์ PCR ดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณสูงที่สุด 1 แถบ มีขนาดประมาณ 250 คู่เบส ดังในรูปที่ 4.21 เมื่อทำการตัดชิ้นเจล ดังที่กล่าวไปเพื่อทำบริสุทธิ์ขึ้น PCR จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ที่ได้ไปยืนยันด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสอีกครั้ง

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นจะเริ่มจากนำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะเป็น pGEM®-T Easy Vector และตรวจสอบการเพิ่มส่งต่อขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายสู่พาหะ ด้วยวิธี Blue-White colony screening จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวนวลไปเพิ่มจำนวนเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อนำมาสกัดพลาสมิด และคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ พบว่ามี 6 ตัวอย่างที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่จึงได้ทำการสกัดพลาสมิดเพื่อส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 4.21 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการติดตามยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ ADH2_F1 และ ADH2_R1 และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis หลุมที่ 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน หลุมที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ ADH2_F1 และ ADH2_R1

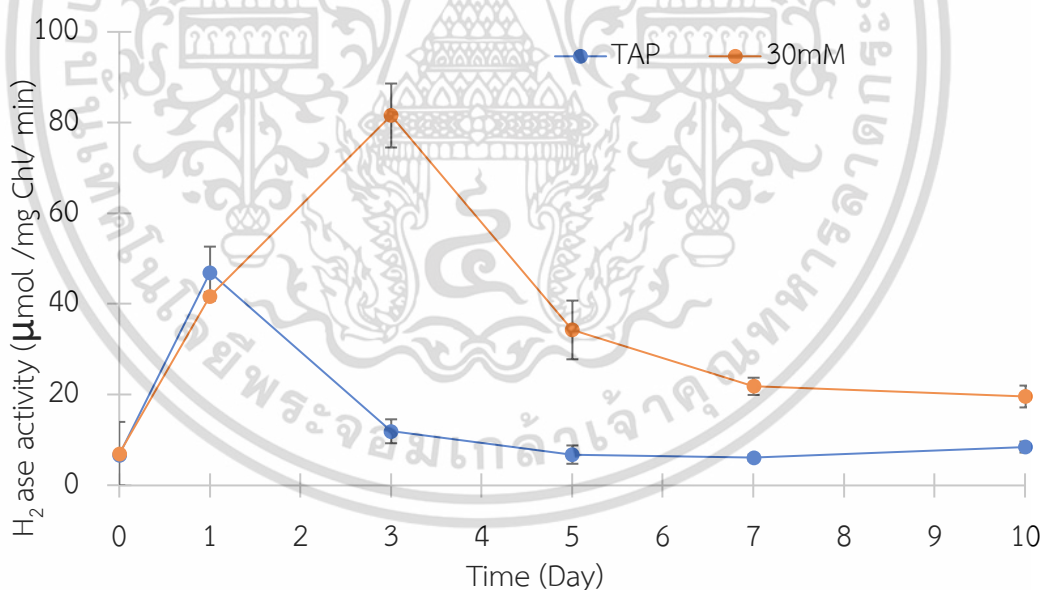
จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ทั้ง 6 ตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถูกรายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastN ผลที่ได้คือ ดีเอ็นเอที่ทำการโคลนเข้าพานั้น ไม่ใช่ยีนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส แต่เป็นยีนที่เป็น unknown ผู้วิจัยได้ทดลองทำการทดลองเริ่มตั้งแต่การทำ PCR และโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย และส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ผลที่ได้ก็ยังคง ยีนที่เป็น unknown ดังในรูปที่ 4.22

รูปที่ 4.22 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ blastn ของชิ้นส่วน DNA ที่ได้จากการ PCR ในสายรายชื่อเชื้อ *Micractinium* sp. KLSc62

จากผลการทดลองทั้งหมด พบว่าไม่สามารถติดตามหายีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในสายรายชื่อเชื้อสายพันธุ์ *Micractinium* sp. KLSc62 ได้ อาจจะเป็นเพราะว่าไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาครั้งนี้เป็น Degenerate primer จึงมีความจำเพาะเจาะจงน้อยลงเมื่อเทียบกับ Specific primer หากมีการทดลองระดับต่อไปใน การศึกษายีนไฮโดรจีเนสและยีนแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ของสายรายชื่อเชื้อนี้ อาจต้องทำการศึกษาในระดับโปรตีน หรือทำการศึกษาในระดับพันธุวิศวกรรม

4.6 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase activity) ปริมาณของซับสเตรท และปริมาณออกซิเจน โดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีกิจกรรมในการทำงานมากดังนั้นเซลล์สาหร่ายก็ควรที่จะผลิต ก๊าซไฮโดรเจนได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ยังขึ้นกับปริมาณซับสเตรท ได้แก่ อิเล็กตรอนและโปรตอนภายในเซลล์ นอกจากนี้ปริมาณออกซิเจนยังส่งผลต่อผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนอีกด้วย เนื่องจากโมเลกุลของออกซิเจนจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังนั้น ระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 จะเป็นตัวควบคุมปริมาณของอิเล็กตรอน โปรตอน และ ออกซิเจน ดังนั้น ถ้าระบบแสงที่ 2 ทำงานได้ดี ส่งผลให้มีอิเล็กตรอนและโปรตอนซึ่งเป็นซับสเตรทในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมาก อย่างไรก็ตามปริมาณออกซิเจนที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสก็จะมากตามไปด้วย แต่ในทางกลับกันถ้าระบบแสงที่ 2 ทำงานได้น้อย ปริมาณอิเล็กตรอนก็จะน้อย ซึ่งออกซิเจนที่เป็นตัวยับยั้งการผลิตก๊าซไฮโดรเจนก็จะลดลงตามไปด้วย (Scoma *et al.*, 2012) ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาในการเติมสารให้อิเล็กตรอนภายนอกให้กับเซลล์เพื่อที่จะเซลล์จะได้นำอิเล็กตรอนเสริมนอกเซลล์เข้าไปเป็นซับสเตรทเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มสูงขึ้น และได้ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ในรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.23 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและเติมเอทานอลที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่าย สีเขียว *Microactinium sp.* KLSc62

พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในอาหารสูตร TAP ที่มีการเติมเอทานอลความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 3, 5, 7 และวันที่ 10 สูงกว่าในอาหาร TAP สูตรปกติ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ในอาหารที่เติมเอทานอลในวันที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 81.557 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที่ และในวันที่ 5 ลดลงเหลือ 34.280 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในรูปที่ 4.6 อาจจะเป็นเนื่องจากในวันที่ 3 เป็นช่วงเวลาที่เซลล์ผ่านการปรับตัวในสภาวะที่มีเอทานอล ซึ่งเอทานอลนั้นจะถูกออกซิไดซ์ โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส กลายเป็นอะซีทัลดีไฮด์ซึ่งจะได้อิเล็กตรอนออกมาในรูปของ NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) และอะซีทัลดีไฮด์ จะถูกออกซิไดซ์โดยอะซีทัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส กลายเป็นอะซีเตท ซึ่งอิเล็กตรอนที่ได้จากการถูกออกซิไดซ์นี้จะเข้าสู่ระบบแสงที่ 2 โดยพลาสโตควิโนน (Plastoquinone) ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอน และจะถูกส่งต่อไปให้ตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปจนถึงเฟอร์ริดอกซิน (Ferredoxin) อิเล็กตรอนที่ถูกส่งไปจะทำให้ปฏิกิริยากับโปรตอนในสโตรมา (Stroma) โดยใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส เกิดเป็นก๊าซไฮโดรเจน แสดงว่าปริมาณซับสเตรทมีผลโดยตรงกับการเกิดผลิตภัณฑ์ ซึ่งหมายความว่า เอทานอลเป็นสารที่ให้อิเล็กตรอนได้ดีและเซลล์สาหร่ายสามารถนำอิเล็กตรอนที่ได้จากเอทานอลเข้าสู่เซลล์ได้ และยังสามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมอีกด้วย

4.7 ผลการวิเคราะห์เมแทบอลิซึมระหว่างกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

จากการศึกษาการระบุสารเมแทบอลิซึม ผู้วิจัยได้ส่งตัวอย่างโดยคัดเลือกจากกราฟแสดงอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะอาหาร TAP ปกติ และอาหาร TAP ที่มีการเติมเอทานอลลงไป 30 มิลลิโมลาร์ ในรูปที่ 4.24 กำหนดให้จุดเริ่มต้นของการลงสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายหรือวันที่ 0 เป็นจุด A จุด B และจุด C คือวันที่ 3 และ 7 วันในสภาวะปกติ ตามลำดับ ซึ่งจุด D และจุด E คือวันที่ 3 และวันที่ 7 คือสภาวะที่เติมเอทานอลลงไป ตามลำดับ ผู้วิจัยได้ทำการเลือกส่งตัวอย่างจากวันที่ 3 เนื่องจากในสภาวะที่มีเอทานอลนั้นเป็นระยะที่เริ่มมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่เพิ่มสูงขึ้นจึงได้เลือกจุดนี้เพื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม และเลือกส่งตัวอย่างในวันที่ 7 เนื่องจากทั้งในสภาวะปกติและในสภาวะที่เติมเอทานอลนั้นจากรูปที่ 4.24 จะเห็นได้ว่าทั้ง 2 สภาวะนี้มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่คงที่ในวันที่ 7 จึงได้เลือกจุดนี้เพื่อเปรียบเทียบกับจุดอื่น ๆ

หลังจากที่ได้ส่งตัวอย่างให้กับทางศูนย์ Metabolomics คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อวิเคราะห์เมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ด้วยเครื่อง Gas chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (GC/Q-TOF) ซึ่งจะได้ข้อมูลเป็นค่า Parent mass, Retention time และ Mass spectrum และทำการ Normalize ด้วยพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด (Total Area) หลังจากนั้นผู้วิจัยได้ทำการหาค่าเฉลี่ยข้อมูลจาก 3 ซ้ำ เมื่อได้ค่าเฉลี่ยออกมาแล้วจึงได้คัดข้อมูลออกมาเป็นในรูปของ Relative เพื่อความง่ายของการคัดเลือกข้อมูล จากนั้นผู้วิจัยจึงได้แบ่งการแสดงผลออกของสารเมแทบอลิซึมออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) การแสดงออกที่เพิ่มขึ้น (Up Regulation)

รูปแบบที่ 1 การแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ในสภาวะอาหาร TAP ที่มีเอทานอลมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิต์ลดลง

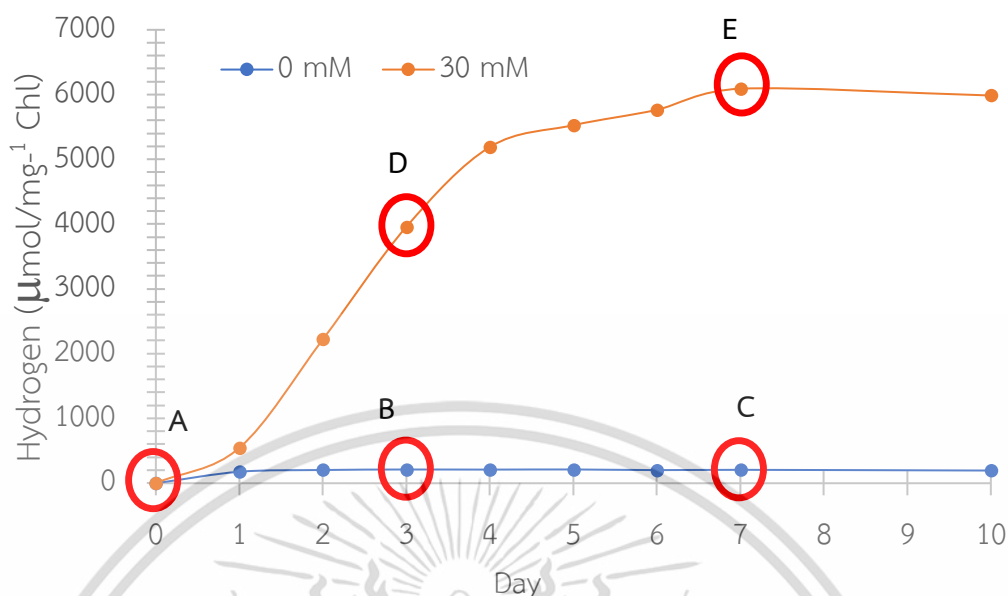
รูปแบบที่ 2 การแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ในสภาวะอาหาร TAP ที่มีเอทานอลมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้นตามเช่นกัน

2) การแสดงออกที่ลดลง (Down Regulation)

รูปแบบที่ 3 การแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ในสภาวะอาหาร TAP ที่มีเอทานอลมีการแสดงออกลดลงแต่ในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้น

รูปแบบที่ 4 การแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ในสภาวะอาหาร TAP ที่มีเอทานอลมีการแสดงออกลดลงและในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิต์ที่ลดลงตามเช่นกัน

ผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกข้อมูลและจัดข้อมูลตามของสารเมแทบอลิต์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Up Regulation และ Down Regulation และจำแนกออกเป็นรูปแบบต่าง ๆ รูปที่ 4.25 พบว่ามี Parent Mass ทั้งหมด 9 ที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้นแบบที่ 1 (Up-Regulation) สภาวะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นแต่ในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิต์ที่ลดลง และพบว่ามี Parent Mass 12 ตัว ที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้นแบบที่ 2 (Up-Regulation) สภาวะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้นตามเช่นกัน แสดงดังรูปที่ 4.26



รูปที่ 4.24 แสดงการคัดเลือกตัวอย่างในจุด A-E เพื่อนำส่งวิเคราะห์เมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ในสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 จากอัตราการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP และในอาหาร TAP ที่เติมเอทานอลความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30 มิลลิโมลาร์

ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิซึมที่ลดลงแบบที่ 3 (Down-Regulation) สภาวะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกลดลงแต่ในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิซึมที่เพิ่มขึ้น รูปที่ 4.27 พบว่ามี Parent Mass 9 ตัวที่มีการแสดงออกอย่างชัดเจนดังตามในกลุ่มที่จำแนกไว้ และรูปที่ 4.28 พบว่ามี Parent Mass 14 ตัวที่มีการแสดงออกอย่างชัดเจนในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิซึมที่ลดลงแบบที่ 4 (Down-Regulation) สภาวะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกลดลงและในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิซึมที่ลดลงตามเช่นกัน

เนื่องจากมี Parent Mass หลายตัวที่น่าสนใจจากการจำแนกกลุ่มต่าง ๆ จากการแสดงออกที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงต้องการที่อยากจะทำทราบและศึกษาของสารเมแทบอลิซึม จึงจำเป็นต้องมีการระบุสารเมแทบอลิซึมที่อยู่ในเซลล์ระหว่างกระบวนการการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งการระบุชื่อสารนั้นจำเป็นที่จะต้องข้อมูลแมสสเปกตรัม (Mass spectrum) และ Parent Mass (m/z) ซึ่งจะใช้ซอฟต์แวร์วิเคราะห์ คือ MetFrag (<https://msbi.ipb-halle.de/MetFrag>) การระบุเมแทบอลิซึมดำเนินการโดยใช้ฐานข้อมูล KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ซึ่งในฐานข้อมูลนี้จะเป็นสารเมแทบอลิซึมที่อยู่ในสิ่งมีชีวิตผู้วิจัยจึงใช้ฐานข้อมูล KEGG ในการระบุสารเมแทบอลิซึม

จากการศึกษาสารเมแทบอลิซึมที่มีความโดดเด่นและน่าสนใจในกลุ่มต่าง ๆ ที่ได้จำแนกไว้จะแสดงดังในรูปที่ 4.25-4.28 และได้ถูกนำมาค้นหาชื่อสารเคมีผ่าน MetFrag ทำให้ได้ข้อมูลสารเคมีใน

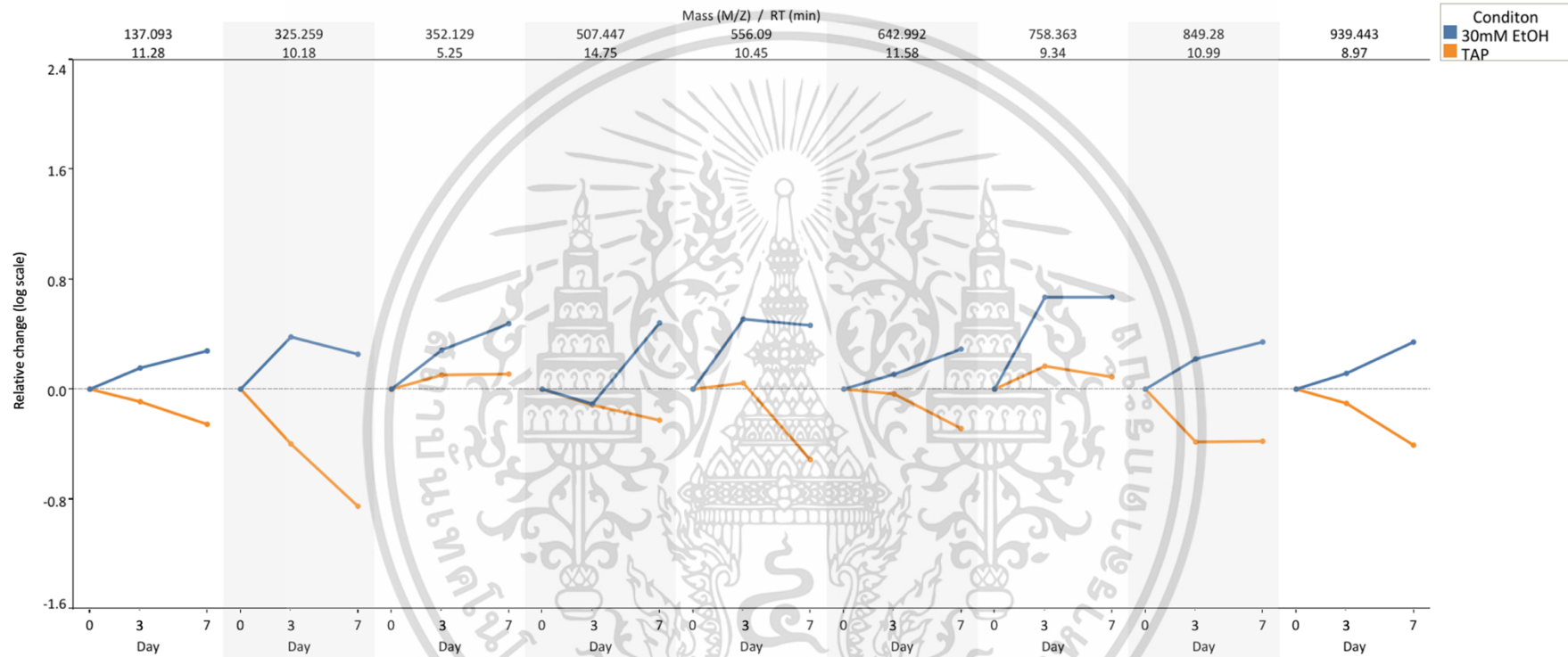
แต่ละกลุ่มออกมาดังแสดงในตารางที่ 4.1 - 4.4 ซึ่งสารเมแทบอลิซึมที่ระบุได้ในกลุ่ม Up regulation

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

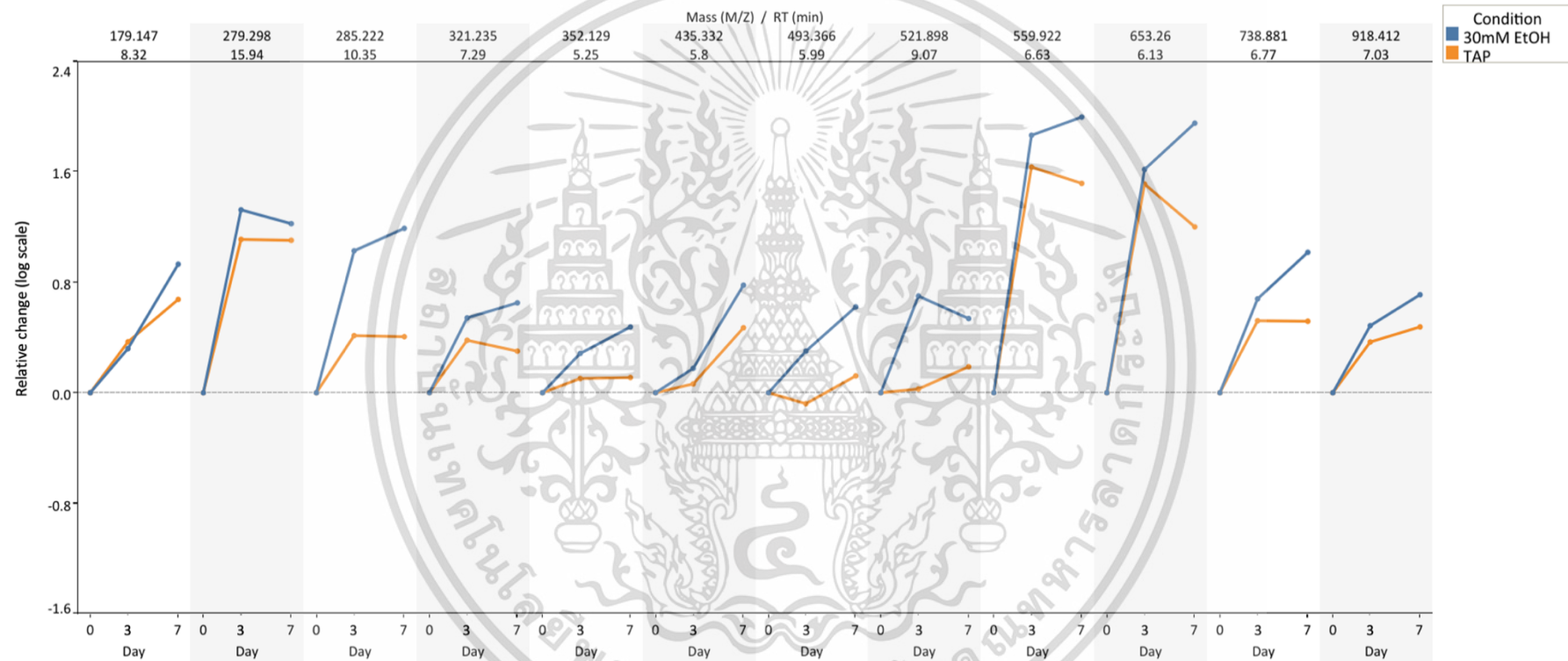
พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับสารสีที่มาจากสาหร่าย *Micractinium* sp. KLSC62 คือสาร Thermocryptoxanthin-15 เป็น Provitamin A อยู่ในกลุ่มแซนโทฟิลล์ และสาร Peonidin-3-(p-coumaroyl)-rutinoside-5-glucoside เป็นสารสีฟลาโวนอยด์ ในกลุ่มของแอนโทโรไซยานิน สารเมแทบอลิต์ที่ระบุได้ในกลุ่มของ Down regulation คือสาร gamma-Terpinyl acetate เป็นสารเมแทบอลิต์ที่น่าสนใจและเป็นหนึ่งในสารเมแทบอลิต์ที่อยู่ในวัฏจักร Mevalonate ซึ่งมีสารตั้งต้นเป็นอะซีติล-โคเอ จากการออกซิโดซอะซีทิลดีไฮด์กลายเป็นอะซีเตท จากนั้นอะซีเตทจะเข้าไปในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle) แล้วอาจจะเป็นไปได้ที่อะซีเตทจะถูกเติมโคเอเข้าไปกลายเป็นอะซีติล-โคเอ และเข้าสู่วัฏจักร Mevalonate เพื่อตอบสนองต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ต่อไปก็เป็นได้ ซึ่งการระบุสารเมแทบอลิต์สามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาเมแทบอลิต์ที่สำคัญและสามารถผลิตไปใช้ประโยชน์ในสภาวะที่เติมเอทานอลในอนาคตได้



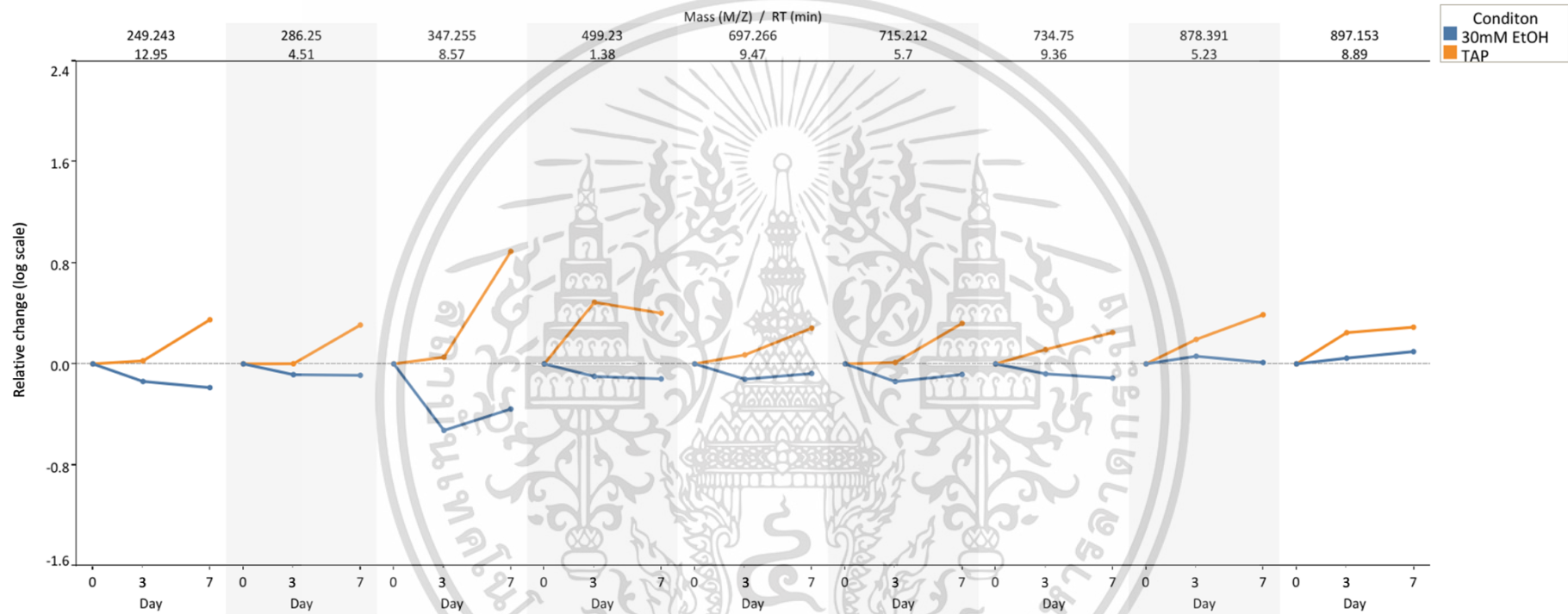
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



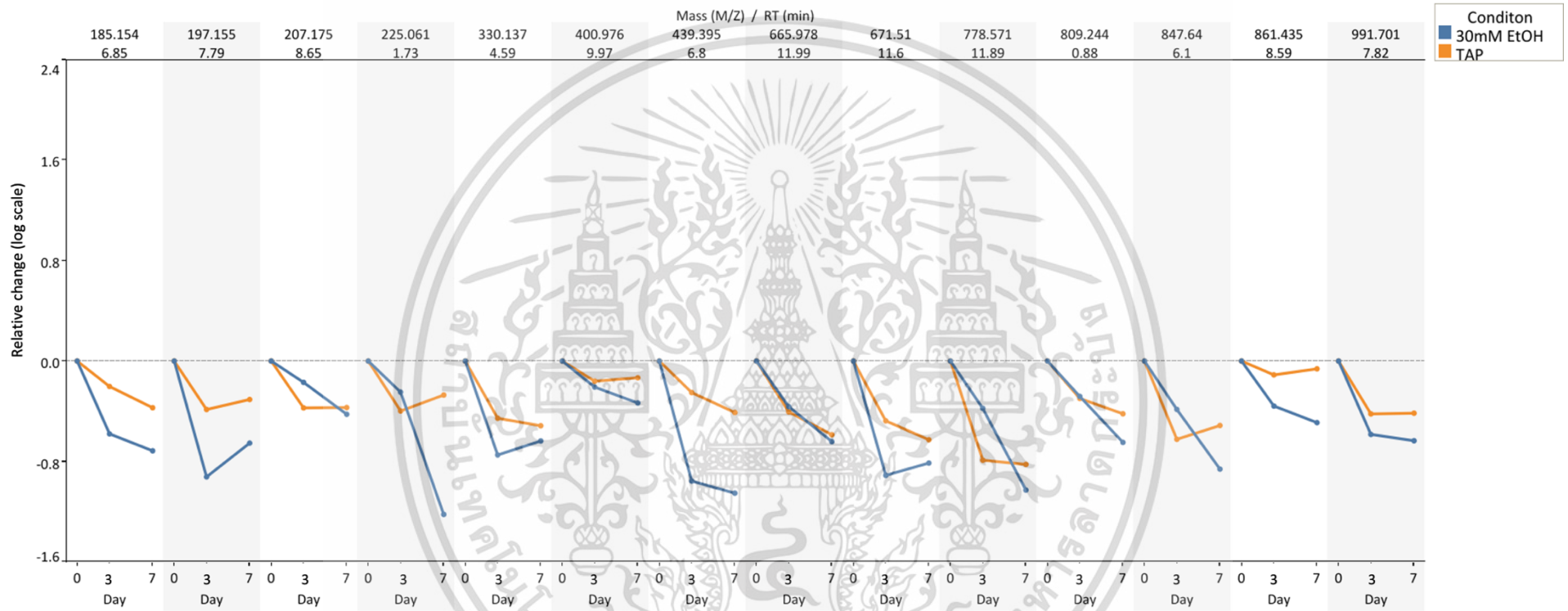
รูปที่ 4.25 แสดงการจัดกลุ่มของ Parent Mass Retention time (min) ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้นแบบที่ 1 (Up-Regulation) สภาวะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นแต่ในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิต์ที่ลดลง



รูปที่ 4.26 แสดงการจัดกลุ่มของ Parent Mass Retention time (min) ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอไลต์ที่เพิ่มขึ้นแบบที่ 2 (Up-Regulation) สภาวะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอไลต์ที่เพิ่มขึ้นตามเช่นกัน



รูปที่ 4.27 แสดงการจัดกลุ่มของ Parent Mass Retention time (min) ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่ลดลงแบบที่ 3 (Down-Regulation) สภาวะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกลดลงแต่ในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิซึมที่เพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.28 แสดงการจัดกลุ่มของ Parent Mass Retention time (min) ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่ลดลงแบบที่ 4 (Down-Regulation) สภาวะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกลดลงและในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิต์ที่ลดลงตามเช่นกัน

ตารางที่ 4.1 แสดงการระบุเมแทบอลิต์ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้นแบบที่ 1 (Up-Regulation) สภาวะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นแต่ในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิต์ลดลง ที่ระบุโดย Mass spectrometry ESI/QTOF

| No | InChIKey1 | RT (min) | mass (m/z) | MolecularFormula | CompoundName | ANOVA p value |
|----|----------------|----------|------------|---|--|---------------|
| 1 | KLSLBUSXWBJMEC | 11.28 | 137.09 | C ₉ H ₁₂ O | 4-Propylphenol | 7.11E-07 |
| 2 | FZPHMACGWIAGFA | 10.18 | 325.26 | C ₁₉ H ₃₂ O ₄ | Decylubiquinol | 0.0432 |
| 3 | LVBIMVQYUKOENY | 5.25 | 352.13 | C ₁₃ H ₂₁ NO ₁₀ | N-Acetyl-4-O-acetylneuraminate | 9.75E-05 |
| 4 | KGNWKZGVYSTAOX | 14.75 | 507.45 | C ₂₉ H ₃₀ O ₈ | Piperaduncin B | 0.021108 |
| 5 | NNPBOGAWNUIKAO | 10.45 | 556.09 | C ₂₆ H ₁₉ Cl ₂ N ₃ O ₇ | 4"-O-Demethylrebecamycin | 0.026756 |
| 6 | FNZZYRONWCJZTM | 11.58 | 642.99 | C ₃₂ H ₃₄ O ₁₄ | Haemocorin | 4.09E-07 |
| 7 | YPXVWSJGANMFFQ | 9.34 | 758.36 | C ₃₆ H ₃₇ O ₁₈ | Cyanidin 3-O-(6-O-p-coumaroyl) glucoside-5-O-glucoside | 4.09E-07 |
| 8 | ZFWOUNNKSHIAFK | 10.99 | 849.28 | C ₄₂ H ₄₀ O ₁₉ | Sennoside C | 0.029637 |
| 9 | RDUYXVUZPBWYNT | 8.97 | 939.44 | C ₆₁ H ₉₄ O ₇ | Thermocryptoxanthin-15 | 0.044256 |

ตารางที่ 4.2 แสดงการระบุเมแทบอลิต์ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่เพิ่มขึ้นแบบที่ 2 (Up-Regulation) สภาวะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิซึมที่เพิ่มขึ้นตามเช่นกัน ที่ระบุโดย Mass spectrometry ESI/QTOF

| NO | InChiKey1 | RT (min) | mass (m/z) | MolecularFormula | CompoundName | ANOVA p value |
|----|----------------|----------|------------|---|--|---------------|
| 1 | SZWBRVPZWJYIHI | 8.32 | 179.15 | C ₁₂ H ₁₈ O | 4-n-Hexylphenol | 0.008295 |
| 2 | VZCCETWTMQHEPK | 15.94 | 279.30 | C ₁₈ H ₃₀ O ₂ | (6Z,9Z,12Z)-Octadecatrienoic acid | 0.004145 |
| 3 | NCYCYZXNIZJOKI | 10.35 | 285.22 | C ₂₀ H ₂₈ O | Retinal | 0.007763 |
| 4 | JSFATNQSLKRBCI | 7.29 | 321.24 | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | (15S)-15-Hydroxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoate | 0.006095 |
| 5 | UIFMNMVSZSUBTD | 5.25 | 352.13 | C ₁₂ H ₂₂ N ₃ O ₇ P | N-Acetyl dimethyl phosphinothricin tripeptide | 9.75E-05 |
| 6 | USFJGINJGUIFY | 5.80 | 435.33 | C ₂₇ H ₄₆ O ₄ | 3alpha,7alpha,12alpha-Trihydroxy-5beta-cholestan-26-al | 0.001532 |
| 7 | HBLUGHSSFJXCOA | 5.99 | 493.37 | C ₂₈ H ₃₆ N ₄ O ₄ | Mucronine B | 4.09E-08 |
| 8 | PHBDHXOBFUBCJD | 9.07 | 521.90 | C ₁₁ H ₁₈ N ₅ O ₁₃ P ₃ | 5"-Guanylylmethylenebisphosphonate | 1.02E-07 |
| 9 | SRNWOUGRCWSEMX | 6.63 | 559.92 | C ₁₅ H ₂₃ N ₅ O ₁₄ P ₂ | ADP-ribose | 0.006823 |
| 10 | VULLCGFNYWDRHL | 6.13 | 653.26 | C ₃₂ H ₄₄ O ₁₄ | beta-D-Gentiobiosyl crocetin | 0.000522 |
| 11 | BQRWHFIYTDHAGA | 6.77 | 738.88 | C ₂₀ H ₂₄ N ₁₀ O ₁₃ P ₂ S ₂ | Molybdopterin guanine dinucleotide | 0.021703 |
| 12 | HSCDIYSCENTRGJ | 7.03 | 918.41 | C ₄₃ H ₄₉ O ₂₂ | Peonidin-3-(p-coumaroyl)-rutinoside-5-glucoside | 0.043513 |

ตารางที่ 4.3 แสดงการระบุเมแทบอลิไต์ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่ลดลงแบบที่ 3 (Down-Regulation) สภาวะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกลดลงแต่ในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิซึมที่เพิ่มขึ้น ที่ระบุโดย Mass spectrometry ESI/QTOF

| No | InChiKey1 | RT (min) | mass (m/z) | MolecularFormula | CompoundName | ANOVA p value |
|----|----------------|----------|------------|--|---|---------------|
| 1 | FPXSXMFOYWRHDX | 12.95 | 249.24 | C ₁₇ H ₂₈ O | Sterol | 0.00483 |
| 2 | VOKSWYLNZZRQPF | 4.51 | 286.25 | C ₁₉ H ₂₇ NO | Pentazocine | 6.30E-05 |
| 3 | BMPKIAPYMZISR | 8.57 | 347.26 | C ₂₂ H ₃₄ O ₃ | Taxa-4(20),11(12)-dien-5alpha-acetoxy-10beta-ol | 0.026946 |
| 4 | WRILMBKQMSIVJG | 1.38 | 499.23 | C ₂₄ H ₃₄ O ₁₁ | Iridodial glucoside tetraacetate | 0.002063 |
| 5 | FJAQNRBDVKIICK | 9.47 | 697.27 | C ₃₅ H ₃₇ ClN ₂ O ₁₁ | Clorobiocin | 0.014678 |
| 6 | NXMILGRUJOPZOM | 5.70 | 715.21 | C ₃₇ H ₄₆ O ₁₄ | Urdamycin G | 4.96E-05 |
| 7 | ULGZDMOFRHVEP | 9.36 | 734.75 | C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃ | Erythromycin | 0.04053 |
| 8 | APTNAZODMUFPO | 5.23 | 878.39 | C ₂₆ H ₃₈ N ₇ O ₁₇ P ₃ S ₂ | Thiophene-2-carbonyl-CoA | 6.06E-05 |
| 9 | KIAIWUYRVXWYAI | 8.89 | 897.15 | C ₄₄ H ₅₆ N ₄ O ₁₆ | Precorrin 6Y | 0.011133 |

ตารางที่ 4.4 แสดงการระบุเมแทบอลิต์ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของสารเมแทบอลิต์ที่ลดลงแบบที่ 4 (Down-Regulation) สภาวะที่มีเอทานอลมีการแสดงออกลดลง และในอาหาร TAP ปกติมีการแสดงออกระดับเมแทบอลิซึมที่ลดลงตามเช่นกัน ที่ระบุโดย Mass spectrometry ESI/QTOF

| No | InChIKey1 | RT (min) | mass (m/z) | MolecularFormula | CompoundName | ANOVA p value |
|----|----------------|----------|------------|---|---|---------------|
| 1 | FRPZMMHWLSIFAZ | 6.85 | 185.15 | C ₁₁ H ₂₀ O ₂ | Undecylenic acid | 0.020758 |
| 2 | ZKKBZSOYCMSYRW | 7.79 | 197.16 | C ₁₂ H ₂₀ O ₂ | gamma-Terpinyl acetate | 0.003999 |
| 3 | ISAVYTVYFVQUDY | 8.65 | 207.18 | C ₁₄ H ₂₂ O | 4-tert-Octylphenol | 0.003025 |
| 4 | ZNAJIKYTBGAQQ | 1.73 | 225.06 | C ₁₁ H ₁₂ O ₅ | 2-Benzylmalic acid | 0.01218 |
| 5 | BIGUPJIJZYJMV | 4.59 | 330.14 | C ₁₈ H ₁₉ NO ₅ | 1-O-Acetyllycorine | 0.00017 |
| 6 | RCBREGAYXGRKBS | 9.97 | 400.98 | C ₉ H ₂₂ O ₁₃ P ₂ | Bis(glycerophospho)-glycerol | 0.000513 |
| 7 | LYHFPFHXBUEPX | 6.80 | 439.40 | C ₃₂ H ₅₄ | 3,22-Dimethyl-1,2,23,24-tetrahydro-2,3,22,23-tetrahydrosqualene | 0.001031 |
| 8 | SENPVEZBRZQVST | 11.99 | 665.98 | C ₂₁ H ₂₇ N ₆ O ₁₅ P ₂ | Deamino-NAD+ | 0.019667 |
| 9 | AGJUUSQLGVCRQA | 11.60 | 671.51 | C ₃₅ H ₅₈ O ₁₂ | Fungichromin | 0.007118 |
| 10 | HBNALZRPCNRSPZ | 11.89 | 778.57 | C ₄₉ H ₉₄ O ₆ | 1-Dodecanoyl-2-hexadecanoyl-3-octadecanoyl-sn-glycerol | 0.016249 |
| 11 | LPGWZGMPDKDHEP | 0.88 | 809.24 | C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₉ | Leurosine | 4.77E-12 |
| 12 | UFPHFKCTOZIAFY | 6.10 | 847.64 | C ₅₅ H ₉₁ O ₄ P | all-trans-Undecaprenyl phosphate | 6.16E-05 |
| 13 | IIXOXWXMCPVLL | 8.59 | 861.44 | C ₂₆ H ₃₈ N ₇ O ₁₈ P ₃ S | 2-Furoyl-CoA | 0.002442 |

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

| No | InChIKey1 | RT (min) | mass (m/z) | MolecularFormula | CompoundName | ANOVA p value |
|----|----------------|-------------|---------------|--|---|------------------|
| 14 | NUWRQHMMPHBACN | 7.82 | 991.70 | C ₅₅ H ₉₂ O ₁₁ P ₂ | trans,octacis-Decaprenylphospho-beta-D-ribofuranose 5- phosphate | 1.30E-07 |

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

เมื่อทำการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวให้ห้องปฏิบัติการทั้งหมด 14 สายพันธุ์ เพื่อที่จะคัดเลือกมาศึกษาต่อในแง่ของความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน พบว่ามี 8 สายพันธุ์ ที่มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดคือ CUJR01, CUJR04, G2, G4, *Chlorella* sp. KLSc59, LT, SK และ *Chlorella* sp. KLSc61 จึงนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในอาหารที่มีการเติมเอทานอลความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เมื่อบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLSc59 สามารถให้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุด จึงนำมาศึกษาหาความเข้มข้นของเอทานอลต่อไป แต่เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 เกิดความไม่ต่อเนื่องของการเข้ามาทำงานวิจัยและได้นำสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KLSc59 ไปเก็บรักษาในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ทำให้สาหร่ายเกิดสภาวะ Cold stress และทำให้สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 สูญเสียประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซึ่งผู้วิจัยได้มีการ Activate สาหร่ายด้วยวิธีการเลี้ยงบนอาหารแข็ง TAP ไป 30 รุ่น (Generation) เพื่อให้เซลล์ได้มีการปรับตัวกลับมาเป็นเช่นเดิม แต่ไม่สำเร็จ ผู้วิจัยจึงต้องทำการคัดเลือกหาสาหร่ายสายพันธุ์อื่นเพื่อให้นักวิจัยได้เดินหน้าต่อไป เมื่อทำการคัดเลือกพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ G4 มีความสามารถสูงในการผลิตไฮโดรเจนภายในสภาวะที่เติมเอทานอล ผู้วิจัยจึงได้เลือกสาหร่ายสายพันธุ์ G4 มาศึกษาหาความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

การศึกษาหาความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนนั้นพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ G4 ในอาหารที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้าย 30 มิลลิโมลาร์สามารถให้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในวันที่ 7 มีค่าเท่ากับ 6,090.5 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ซึ่งสูงกว่าตัวควบคุมถึง 29.5 เท่า และจากการติดตามความเข้มข้นของเอทานอลและอะซีทัลดีไฮด์ พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลลดลงในระหว่างกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเมื่อเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้นและยังพบการทำงานของอะซีทัลดีไฮด์อีกด้วย ทำให้เห็นได้ว่าเอทานอลที่เติมลงไปสามารถเปลี่ยนไปเป็นอะซีทัลดีไฮด์ได้

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว G4 พบว่า เซลล์สาหร่ายมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม มีขนาดประมาณ 2-10 ไมโครเมตร และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *18S rDNA* ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ทำแผนภูมิต้นไม้ พบว่าสาหร่ายสีเขียว G4 มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. XS04 มากที่สุด ดังนั้นควรจัดให้สาหร่ายสีเขียว G4 อยู่ในจีนัส ของ *Micractinium* และทำการตั้งชื่อใหม่ เรียกว่า สาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 อย่างไรก็ตามไม่สามารถติดตามหาถิ่นของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

และแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสได้ในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากลำดับดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้อาจจะยังไม่เหมาะสม

นำสายรหัสยีน *Micractinium* sp. KLSc62 มาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสพบว่าสภาวะที่มีเอทานอลนั้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงกว่าในสูตรอาหารปกติตั้งแต่วันที่ 3 ของการเลี้ยงดังนั้นเอทานอลสามารถเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่ดีแก่สายรหัส *Micractinium* sp. KLSc62 ได้ และในการศึกษาเมแทบอลิซึมพบว่ามีสารเมแทบอลิต์หลายสารที่แสดงออกทั้งในเชิงของ Up Regulation และ Down Regulation ทั้ง 2 รูปแบบตามที่ได้จัดกลุ่มไว้ และยังสามารถระบุชื่อของสารเมแทบอลิต์ได้ถึง 44 สาร ซึ่งสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยในแง่ของการศึกษาเมแทบอลิต์ที่มีประโยชน์โดยมีเอทานอลเป็นตัวชักนำได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองของการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสายรหัสยีน *Micractinium* sp. KLSc62 ให้ผลเป็นที่น่าพึงพอใจ ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ อาจจะสามารถศึกษาสารให้อิเล็กตรอนตัวอื่น ๆ หรือปรับปรุงสายพันธุ์ *Micractinium* sp. KLSc62 และยังไม่สามารถอธิบายบทบาทหน้าที่ของอิเล็กตรอนได้อย่างลึกซึ้ง ควรศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอทานอลในแง่มุมอื่น ๆ เพื่อหาหลักฐานยืนยันบทบาทของเอทานอลได้อย่างชัดเจน ควรมีการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อในรูปแบบวิธีอื่นเพื่อป้องกันการสูญเสียความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนและควรทำการศึกษาอิทธิพลจากสภาวะความเครียดจากความเย็น (Cold stress)

ในส่วนของการตามหาเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและแอลกอฮอล์/อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสสามารถศึกษาเพิ่มเติมในระดับจีโนมแทน

เอกสารอ้างอิง

1. ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิไลย์. 2559. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในการศึกษา ข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม 2560:1-16
2. Alexander, N.P., Budenholzer, M., Eskin, A., Torres, E., and Clarke S. (2015). **Ethanol-induced differential gene expression and acetyl-CoA metabolism in a longevity model of the nematode *Caenorhabditis elegans***. *Experimental Gerontology*, 61, 20–30. doi:10.1016/j.exger.2014.11.010
3. Anjana, K. and Kaushik, A., (2014) . **Enhanced hydrogen production by immobilized cyanobacterium *Lyngbya perelegans* under varying anaerobic conditions**. *Biomass Bioenerg* 63, 54-57.
4. Atteia, A., van Lis, R., Mendoza-Hernández, G., Henze, K., Martin, W., Riveros-Rosas, H., and González-Halphen, D. (2003). **Bifunctional aldehyde/alcohol dehydrogenase (ADHE) in chlorophyte algal mitochondria**. *Plant Mol. Biol.* 53, 175–188
5. Azwar, M. Y., Hussain, M. A. and Abdul-Wahab, A. K. (2014). **Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review.**” *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 31 : 158-173.
6. Batyrova, K.A., Tsygankov, A.A. and Kosourov, S.N. (2012). **Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures**. *Int J Hydrogen Energ* 37, 8834-8839.
7. Chia, S.R., Ong, H.C., Chew, K.W., Show, P.L., Phang, S.M., Ling, T.C., Nagarajan, D., Lee, D.J. and Chang, J.S. (2018) . **Sustainable approaches for algae utilisation in bioenergy production**. *Renew Energ* 129, 838-852.
8. Chong, J., O. Soufan, C. Li, I. Caraus, S. Li, G. Bourque, D. S. Wishart, and J. Xia. (2018). **MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis**. *Nucleic Acids Research* 46(W1):W486-W494..
9. Dubini, A. (2011). **Green energy: Biofuel production from *Chlamydomonas reinhardtii***. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 70–72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. Ellabban, O., Abu-Rub, H. and Blaabjerg, F. (2014). **Renewable energy resources: Current status, future prospects and their enabling technology.** *Renew Sustain Energy Rev* 39, 748-764.
11. Gaffron, H. and Rubin, J. (1942). **Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae.** *The Journal of General Physiology.* 26 : 219-240.
12. Gallaher, S. D., Fitz-Gibbon, S. T., Glaesener, A. G., Pellegrini, M. and Merchant, S. S. (2015). ***Chlamydomonas* genome resource for laboratory strains reveals a mosaic of sequence variation, identifies true strain histories, and enables strain-specific studies.** *The Plant Cell.* 29 : 2335-2352.
13. Ghirardi, M.L., Togasaki, R.K. and Seibert, M. (1997). **Oxygen sensitivity of algal H₂-production.** *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 63(1) : 141.
14. Ghirardi, M. L., Zhang, L., Lee, J. W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E. and Melis, A. (2000). **Microalgae: a green source of renewable H₂.** *Trends in Biotechnology.* 18 : 506-511.
15. Giardi, M. T., Rea, G., Lambreva, M. D., Antonacci, A., Pastorelli, S., Bertalan, I., Johanningmeier U. and Mattoo, A. K. (2013). **Mutations of photosystem II D1 protein that empower efficient phenotypes of *Chlamydomonas reinhardtii* under extreme environment in space.** *PloS one.* 8(5) : e64352. 110
16. Glass, A. D. and Fernando, M. (1992). **Homeostatic processes for the maintenance of the K⁺ content of plant cells: a model.** *Israel Journal of Botany.* 41 : 145- 166.
17. Gonzalez-Ballester, D., Jurado-Oller, J.L. and Fernandez, E. (2015). **Relevance of nutrient media composition for hydrogen production in *Chlamydomonas*.** *Photosynthesis Research.* 125(3) : 395-406.
18. Grossman, A. and Takahashi, H. (2001). **Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions.** *Annual Review of Plant Biology.* 52 : 163-210.
19. Guan, Y.F., Deng, M.C., Yu, X.J. and Zhang, W. (2004). **Two-stage photo-biological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis*.** *Biochem Eng J* 19, 69- 73.
20. Hahn, J.J., Ghirardi, M.L. and Jacoby, W.A. (2007). **Immobilized algal cells used for hydrogen production.** *Biochem Eng J* 37, 75-79.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21. Hallenbeck, P. C. and Benemann, J. R. (2002). **Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes.** International Journal of Hydrogen Energy. 27(11-12) : 1185-1193.
22. Harris, E.H. (1989). **The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to. biology and laboratory use.** San Diego : Academic Press.
23. Heifetz, P.B., Förster, B., Osmond, C.B., Giles, L.J. and Boynton, J.E. (2000). **Effects of Acetate on Facultative Autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* Assessed by Photosynthetic Measurements and Stable Isotope Analyses.** Plant Physiology. 122(4) : 1439-1446.
24. International Energy Agency (IEA).(2021), **Global Hydrogen Review 2021**, IEA, Paris <https://www.iea.org/reports/global-hydrogen-review-2021>
25. Kibret, M., Garzon, J.F., Urban, E., Zehl, M., Wronski, V.K., Ruckert, C., Busch, T., Kalinowski, J., Rolinger, J.M., Abate, D. and Zotchev, S.B. (2018) . ***Streptomyces* spp. From Ethiopia Producing Antimicrobial Compounds: Characterization via Bioassays, Genome Analyses, and Mass Spectrometry.** Frontiers in Microbiology 9:1270.
26. Khetkorn, W., Rastogi, R.P., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., Madamwar, D., Pandey and A., Larroche, C. (2017). **Microalgal hydrogen production - A review.** Bioresource Technol 243, 1194-1206.
27. Kruse, O. and Hankamer, B. (2010). **Microalgal hydrogen production.** Current Opinion Biotechnology. 21 : 238-243.
28. Lindberg, A., Niemi, C., Takahashi, J., Sellstedt, A. and Gentili, F.G. (2022). **Cold stress stimulates algae to produce value-added compounds.** Bioresource Technology Reports 19 (2022) 101145
29. Laokua, N., Rittiyon, N., Kornrawudaphikasama, Y., Klinsalee, R., Tonawut, Y., Preechaphonkul, N., Raksajit, W., Khetkorn, W., Dejtsakdi, W. and Maneeruttanarungroj, C. (2022). **Optimal conditions for maximized H₂ yield from a new green algal strain *Chlorella* sp. KLSc61.** Journal of Applied Phycology (2022) 34:1909–1919
30. Lateef, S. A., Beneragama, N., Yamashiro, T., Iwasaki, M. and Umetsu, K. (2014). **Batch anaerobic co-digestion of cow manure and waste milk in two-stage process for hydrogen and methane productions.** Bioprocess and Biosystems Engineering, 37(3), 355–363.

31. Lay, C. H., Lin, H. C., Sen, B., Chu, C. Y. and Lin, C. Y. (2012). **Simultaneous hydrogen and ethanol production from sweet potato via dark fermentation.** *Journal of Cleaner Production*, 27, 155–164.
32. Lay, C. H., Wu, J. H., Hsiao, C. L., Chang, J. J., Chen, C. C. and Lin, C. Y. (2010). **Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation.** *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13445–13451.
33. Lee, K. S., Hsu, Y. F., Lo, Y. C., Lin, P. J., Lin, C. Y. and Chang, J. S. (2008). **Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora.** *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5), 1565–1572.
34. Lee, H., Torres, C. I., Parameswaran, P. and Rittmann, B. E. (2009). **Fate of H₂ in an upflow single-chamber microbial electrolysis cell using a metal-catalyst-free cathode.** *Environmental Science and Technology*, 43(20), 7971–7976.
35. Lee, Y.K. and Shen, H. (2004). **Basic culturing techniques.** In: Richmond, A. [Eds], *Handbook of microalgal culture*. IS Press. pp. 40-50.
36. Levin, D. B., Islam, R., Cicek, N. and Sparling, R. (2006). **Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates.** *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11), 1496–1503.
37. Li, D. M. and Chen, H. Z. (2007). **Biological hydrogen production from steam-exploded straw by simultaneous saccharification and fermentation.** *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(12), 1742–1748.
38. Li, D., Jiao, C. X., He, W., Yan, Z. Y., Yuan, Y. X. and Li, Z. D. (2016). **Comparison of micro-aerobic and anaerobic fermentative hydrogen production from corn straw.** *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(12), 5456–5464.
39. Li, W. W. and Yu, H. Q. (2011). **Biohydrogen production with high-rate bioreactors.** In A. Pandey, C. Larroche, S. C. Ricke, C. Dussap, & E. Gnansounou (Eds.), *Biofuels* (pp. 537–567). Amsterdam: Academic Press (Chapter 24).
40. Lin, C., Wu, S., Lee, K., Lin, P., Lin, C. and Chang, J. (2007). **Integration of fermentative hydrogen process and fuel cell for on-line electricity generation.** *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(7), 802–808.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

41. Liu, Y., Fang, J., Tong, X., Huan, C., Ji, G. and Zeng, Y. (2019). **Change to biogas production in solid-state anaerobic digestion using rice straw as substrates at different temperatures.** *Bioresource Technology*, 293, 122066.
42. Liu, S. and Li, W. Z. (2013). **Effects of mixing ratio on hydrogen production from anaerobic co-fermentation of cattle manure and food waste.** *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery*, 44, 114–118.
43. Liu, D., Liu, D., Zeng, R. J. and Angelidaki, I. (2006). **Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process.** *Water Research*, 40(11), 2230–2236.
44. Liu, H. Y. and Wang, G. C. (2014). **Fermentative hydrogen production from macro-algae *Laminaria japonica* using anaerobic mixed bacteria.** *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(17), 9012–9017.
45. Liu, X., Zhu, Y. and Yang, S. (2006). **Construction and characterization of ack deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid and hydrogen production.** *Biotechnology Progress*, 22(5), 1265–1275.
46. Ljunggren, M., Wallberg, O. and Zacchi, G. (2011). **Techno-economic comparison of a biological hydrogen process and a 2nd generation ethanol process using barley straw as feedstock.** *Bioresource Technology*, 102(20), 9524–9531.
47. Ljunggren, M. and Zacchi, G. (2010). **Techno-economic analysis of a two-step biological process producing hydrogen and methane.** *Bioresource Technology*, 101(20), 7780–7788.
48. Logan, B. E., Call, D., Cheng, S., Hamelers, H. V. M., Sleutels, T. H. J. A. and Jeremiasse, A. W. (2008). **Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter.** *Environmental Science and Technology*, 42(23), 8630–8640.
49. Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R. A., Schröder, U., Keller, J. and Freguia, S. (2006). **Microbial fuel cells: Methodology and technology.** *Environmental Science and Technology*, 40(17), 5181–5192.
50. Lopes, S. L., Fragoso, R., Duarte, E. and Marques, P. A. S. S. (2015). **Bioconversion of *Jatropha curcas* seed cake to hydrogen by a strain of *Enterobacter aerogenes*.** *Fuel*, 139, 715–719.

51. Lovato, G., Albanez, R., Stracieri, L., Ruggero, L. S., Ratusznei, S. M. and Domingues Rodrigues, J. A. (2018). **Hydrogen production by co-digesting cheese whey and glycerin in an AnSBBR: Temperature effect.** *Biochemical Engineering Journal*, 138, 81–90.
52. Luan, J. F., Hu, Z. T., Li, Y. M. and Zou, Z. G. (2011). **The biotechnology of hydrogen production by enterobacter, citrobacter and clostridium from wastewater which contained castor oil, soybean oil or engine oil.** *Current Opinion in Biotechnology*, 221, S149.
53. Luk, H. T., Mondelli, C., Ferre, D. C., Stewart, J. A. and Perez-Ramirez, J. (2017). **Status and prospects in higher alcohols synthesis from syngas.** *Chemical Society Reviews*, 46(5), 1358–1426.
54. Luque, R. (2010). **Algal biofuels: The eternal promise?** *Energy and Environmental Science*, 3(3), 254–257.
55. Maru, S. T., Lopez, F., Kengen, S. W. M., Constanti, M. and Medina, F. (2016). **Dark fermentative hydrogen and ethanol production from biodiesel waste glycerol using a co-culture of *Escherichia coli* and *Enterobacter* sp.** *Fuel*, 186, 375–384.
56. Magneschi, L., Catalanotti, C., Subramanian, V., Dubini, A., Yang, W., Mus, F., Peewits, M. C., Seibert, M., Perata, P. and Grossman, A. R. (2012) **A mutant in the ADH1 gene of *Chlamydomonas reinhardtii* elicits metabolic restructuring during anaerobiosis.** *Plant Physiol.* 158, 1293–1305
57. Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P. and Incharoensakdi, A., (2010). **A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production.** *International Journal of Hydrogen Energy.* 35: 13193-13199..
58. Matthew, T., W. Zhou, J. Rupprecht, L. Lim, S. R. Thomas-Hall, A. Doebbe, O. Kruse, B. Hankamer, U. C. Marx, S. M. and Schenk P. M. (2009). **The metabolome of *Chlamydomonas reinhardtii* following induction of anaerobic H₂ production by sulfur depletion.** *J Biol Chem* 284(35): 23415-23425.
59. Maswana, T., Phunpruch, S., Lindblad, P. and Maneeruttanarungroj, C. (2018). **Enhanced hydrogen production by optimization of immobilized cells of the green alga *Tetraspora* sp. CU2551 grown under anaerobic condition.** *Biomass Bioenergy* 111, 88- 95.

60. McKinlay, J.B. and Harwood, C.S. (2010). **Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel.** *Curr Opin Biotech* 21, 244-251.
61. Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M. L. and Seibert, M. (2000). **Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Plant physiology*. 122 : 127-136.
62. Navarro, E., Montagud, A., de Cordoba, P.F. and Urchueguia, J.F. (2009). **Metabolic flux analysis of the hydrogen production potential in *Synechocystis* sp. PCC6803.** *Int J Hydrogen Energy* 34, 8828-8838.
63. Papazi, A., Gjindali, A.I., Kastanaki, E., Assimakopoulos, K., Stamatakis, K. and Kotzabasis, K. (2014). **Potassium deficiency, a "smart" cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus*.** *Int J Hydrogen Energy* 39, 19452-19464.
64. Parmar, A., Singh, N.K., Pandey, A., Gnansounou, E. and Madamwar, D. (2011). **Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels.** *Bioresource Technol* 102, 10163- 10172.
65. Philipps, G., Happe, T. and Hemschemeier, A. (2012). **Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Planta*. 235(4) : 729-745.
66. Prasertsan, P., C. Leamdum, S. Chantong, C. Mamimin, P. Kongjan and S. O-Thong (2021). **Enhanced biogas production by co-digestion of crude glycerol and ethanol with palm oil mill effluent and microbial community analysis.** *Biomass and Bioenergy* 148.
67. Ravina, C. G., Chang, C. I., Tsakraklides, G. P., McDermott, J. P., Vega, J. M., Leustek, T. and Davies, J. P. (2002). **The sac mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* reveal transcriptional and posttranscriptional control of cysteine biosynthesis.** *Plant Physiology*. 130(4) : 2076-2084.
68. Ruttana, S. Junyapoon, S. Incharoensakdi, A. and Phunpruch, S. (2010). **Hydrogen Production by the green alga *Scenedesmus* sp. KMITL-01 under heterotrophic conditions.** 114-120. In *Proceeding of the 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology*. Bangkok: King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang and Nong Khai Campus: Khon Kaen University.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

69. Scoma, A., Bertin, L., Pintucci, C., Raddi, S. and Fava F. (2012). **Inhibition of photosystem 2 in starch-enriched *Chlamydomonas reinhardtii* cells prevents the efficient induction of H₂ production in sulfur-depleted cultures.** International Journal of Hydrogen Energy 37 (14):10604-10610.
70. Sirawattanamongkol, T., Maswana, T. and Maneeruttanarungroj, C. (2020) **A newly isolated green alga *Chlorella* sp. KLS59: potential for biohydrogen production.** Journal of Applied Phycology 32 (5):2927-2936. doi:10.1007/s10811-020-02140-1
71. Srirangan, K., Pyne, M.E., Perry, and Chou, C. (2011). **Biochemical and genetic engineering strategies to enhance hydrogen production in photosynthesis algae and cyanobacteria.** *Bioresource Technology*. 102: 8589-8604.
72. Song, K.S., Degawa, M., Nakamura, Y., Kanazawa, H., Umezawa, H. and Kawarada, H. (2004). **Surface-modified diamond field-effect transistors for enzyme-immobilized biosensors.** *Jpn J Appl Phys* 2 43, L814-L817.
73. Stephenson, M. and Stickland, LH. (1931). **Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme.** *Biochem J*. 25(1):205-214.
74. Schulz, R., Schnackenberg, J., Stangier, K., Wunschiers, R., Zinn, T. and Senger, H. (1998). **Light dependent hydrogen production of the green algae.** In: Zaborisky *et al.*, [Eds], *BioHydrogen*. Plenum Press, New York.
75. Sengmee, D., B. Cheirsilp, T. T. Suksaroge and P. Prasertsan (2017). **Biophotolysis-based hydrogen and lipid production by oleaginous microalgae using crude glycerol as exogenous carbon source.** International Journal of Hydrogen Energy 42(4): 1970-1976.
76. Stitt, M., Lilley, R.M.C., Gerhardt, R. and Heldt, H.W. (1989). **Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves.** *Method Enzymol*. 174, 518–552.
77. Tsirigoti, A., Tzovenis, I., Koutsaviti, A., Economou-Amili, A., Ioannou, E. and Melkonian, M. (2020). **Biofilm cultivation of marine dinoflagellates under different temperatures and nitrogen regimes enhances DHA productivity.** *J. Appl. Phycol*. 32, 865–880.

78. Ueno, Y., Kurano, N. and Miyachi, S. (1999). **Purification and Characterization of hydrogenase from the marine green alga *Chlorococcum littorale***. FEBS Letters. 443 : 144-148.100
79. Van Lis, R. M., Popek, Y., Coute, A., Kosta, D., Drapier, W., Nitschke, R. and Atteia, A. (2017). **Concerted Up-regulation of Aldehyde/Alcohol Dehydrogenase (ADHE) and Starch in *Chlamydomonas reinhardtii* Increases Survival under Dark Anoxia**. J Biol Chem 292(6): 2395-2410.
80. Velea, S., Dragos, N., Ilie, L., Stalpeanu, D., Nicoara, A. and Stepan, E. (2009). **Biological sequestration of carbon dioxide from thermal power plant emissions, by absorbtion in microalgal culture media**. Rom. Biotechnol. Lett. 14 (4), 4485–4500.
81. Vogt, S., Lyon, E.J., Shima, S. and Thauer, R.K. (2008). **The exchange activities of [Fe] hydrogenase (iron-sulfur-cluster-free hydrogenase) from methanogenicarchaea in comparison with the exchange activities of [FeFe] and [NiFe] hydrogenase**. Journal of Biological Inorganic Chemistry. 13: 97-106.
82. Walsh, A. M., F. Crispie, K. Kilcawley, O. O'Sullivan, M. G. O'Sullivan, M. J. Claesson, and P. D. Cotter. (2016). **Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir**. mSystems 1(5):e00052-00016.
83. Wang, B., Li, Y., Wu, N. and Lan, C.Q. (2008). **CO₂ bio-mitigation using microalgae**. Appl. Microbiol. Biotech. 79 (5), 707–718.
84. Winkler, M., Hemschemeier, A., Gotor, C., Melis, A. and Happe, T. (2002). **[Fe]-hydrogenases in green algae: photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation**. International Journal of Hydrogen Energy. 27(11-12) : 1431-1439.
85. Wykoff, D.D., Davies, J.P., Melis, A. and Grossman, A.R. (1998). **The regulation of photosynthesis electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii***. Plant Physiology. 117: 129-139.
86. Xu, L.L., Cheng, X.L. and Wang, Q.X. (2017). **Effect of co-cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* with *Azotobacter chroococcum* on hydrogen production**. Int J Hydrogen Energ 42, 22713-22719.
87. Yin, Y. and Wang, J. (2022). **Production of biohydrogen**. Biofuels and Biorefining Volume 1 Current Technologies for Biomass Conversion, Pages 283-337

88. Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A. and Kawano, S. (2004) **Regeneration, and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).** J Plant Res 2004: 117:257–64.
89. Yilmaz, F., Balta, M.T. and Selbas, R. (2016). **A review of solar based hydrogen production methods.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. 56: 171-178.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) อาหาร Tris acetate phosphate (TAP)

เตรียม Stock solution และผสมสำหรับอาหาร TAP ดังตารางที่ ก-1 ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริกจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

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

| หมายเลข | สารเคมี | ปริมาณ (กรัม) | Stock (มิลลิลิตร) | TAP 1 ลิตร |
|---------|---|---|-------------------|--------------|
| 1 | Tris-base | 2.42 กรัม | 100 | 10 มิลลิลิตร |
| 2 | NH ₄ Cl CaCl ₂ ·2H ₂ O MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.40 กรัม 0.05 กรัม 0.10 กรัม | 250 | 25 มิลลิลิตร |
| 3 | KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ | 0.05 กรัม 0.10 กรัม | 10 | 1 มิลลิลิตร |
| 4 | Na ₂ -EDTA FeSO ₄ ·7H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O H ₃ BO ₃ MnCl ₂ ·4H ₂ O CuSO ₄ ·5H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.05 กรัม 5.60 มิลลิกรัม 22.00 มิลลิกรัม 11.40 มิลลิกรัม 5.52 มิลลิกรัม 0.16 มิลลิกรัม 1.10 มิลลิกรัม 0.16 มิลลิกรัม | 10 | 1 มิลลิลิตร |
| 5 | Glacial acetic acid | - | - | 1 มิลลิลิตร |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) ยาปฏิชีวนะ

ซังยาปฏิชีวนะจากนั้นละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองปราศจากเชื้อ 0.22 ไมโครเมตร ลงในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3) อาหารวุ้น TAP

- อาหารเหลว TAP 100 มิลลิลิตร
- อะการ์ อะการ์ (Agar Agar) 1.5 กรัม

4) สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Acetate-EDTA

4.1 สารละลาย 50X TAE 1 ลิตร

- ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน (Tris-base) 242 กรัม
- กรดอะซิติก (Acetic acid) 57.1 มิลลิลิตร
- อีดีทีเอ (EDTA) 0.5 M 100 มิลลิลิตร

4.2 นำ Tris-base มาละลายในน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร

4.3 เติมอีดีทีเอ และกรดอะซิติกลงในสารละลาย

4.4 ปรับค่าความเป็นกรดเบส เป็น 8.0

4.5 จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

4.6 นำสารละลาย 50X TAE เจือจาง 1000 เท่าให้มีความเข้มข้น 0.5X TAE ด้วยน้ำกลั่น

ภาคผนวก ข

การคำนวณปริมาณไฮโดรเจน

ในงานวิจัยนี้จะใช้ 4 เปอร์เซ็นต์ของก๊าซไฮโดรเจนในอาร์กอนเป็นสารมาตรฐานเพื่อนำมาใช้ในการคำนวณปริมาณก๊าซไฮโดรเจน โดยคำนวณจากการเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานแบบ single point calibration ซึ่งแสดงการคำนวณได้ดังนี้

- 1) นำพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมของไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์มาเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมที่วัดได้จากขวด vial เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไฮโดรเจนในขวด vial ดังสมการด้านล่างนี้

$$\%H_2 = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของ 4\% ไฮโดรเจนมาตรฐาน}} \times 4\%$$

- 2) เมื่อได้เปอร์เซ็นต์ไฮโดรเจนในขวด vial แล้วทำการเปลี่ยนเปอร์เซ็นต์ให้เป็นหน่วยลิตรโดยคิดเทียบจาก head space ที่ใช้จริงในการทดลอง
- 3) คำนวณจำนวนโมลของไฮโดรเจน โดยใช้สูตร $PV = nRT$ (เทียบจากปริมาตรของก๊าซ ณ ความดันบรรยากาศและที่อุณหภูมิห้อง เมื่อ $P = 1 \text{ atm}$, $R = 0.0821 \text{ L}\cdot\text{atm}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- 4) คำนวณปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อคลอโรฟิลล์ ($\mu\text{mol H}_2/\text{mg Chl.}$)

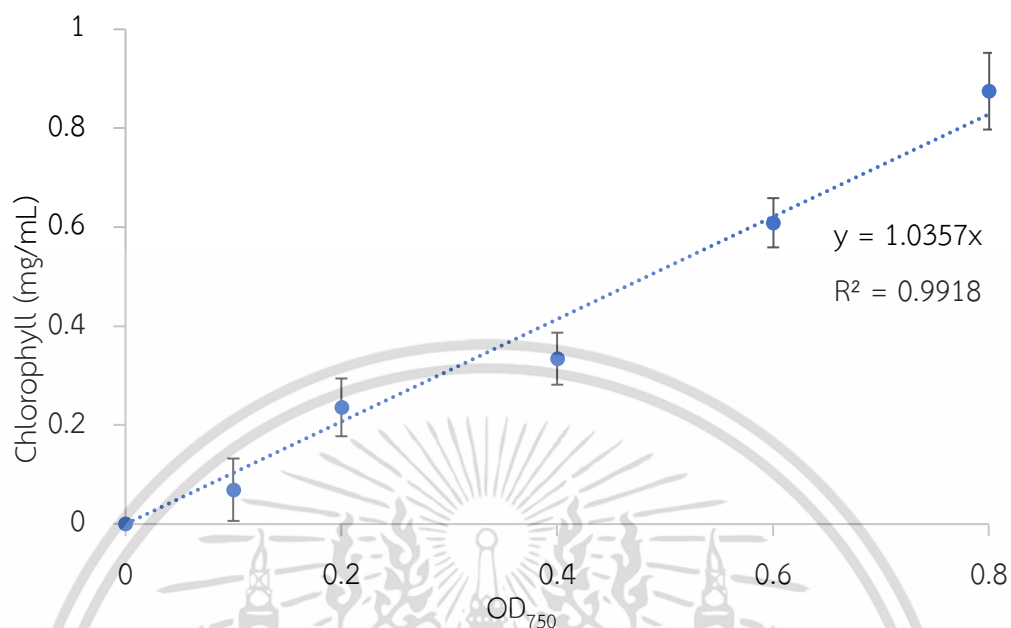
ภาคผนวก ค

การคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์จากความขุ่นของสาหร่าย

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว โดยนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีการแปรผันค่าความขุ่นสุดท้ายตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.8 โดยแต่ละค่าความขุ่นจะเติมลงหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที และ ทิ้งส่วนใสจากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรทุกหลอด นำไปปั่นในที่มืดเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงโดยจะเขย่าตลอดเวลา เมื่อครบตามระยะเวลาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 และ 650 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ ดังสมการนี้

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

ปริมาณคลอโรฟิลล์ (a+b) ของสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 ในอาหาร TAP สามารถคำนวณได้จากสมการเส้นตรง $y = 1.0357x$ เมื่อ y คือ ค่าดูดกลืนแสงหรือค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) และ x คือ ปริมาณคลอโรฟิลล์ (a+b) ในหน่วยมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อมิลลิลิตรอาหารเหลว TAP ซึ่งคำนวณได้จากสมการดังกล่าว



รูปที่ ค-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียวเขียว *Micractinium* sp. KLS62 (OD₇₅₀) และปริมาณคลอโรฟิลล์



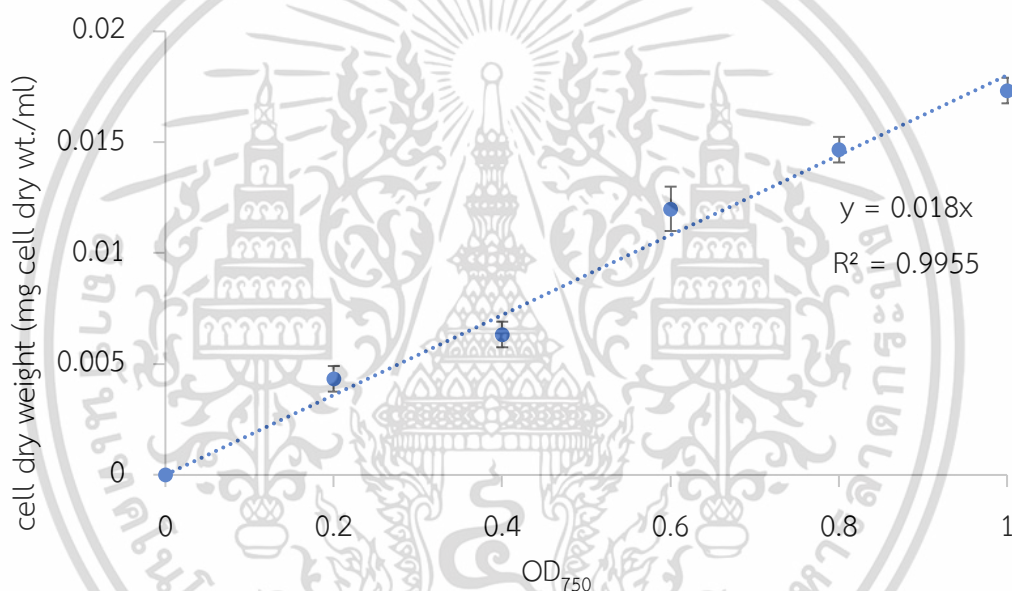
รูปที่ ค-2 แสดงการสกัดคลอโรฟิลล์หลังจากบ่มครบ 24 ชั่วโมงของสาหร่าย *Micractinium* sp. KLS62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

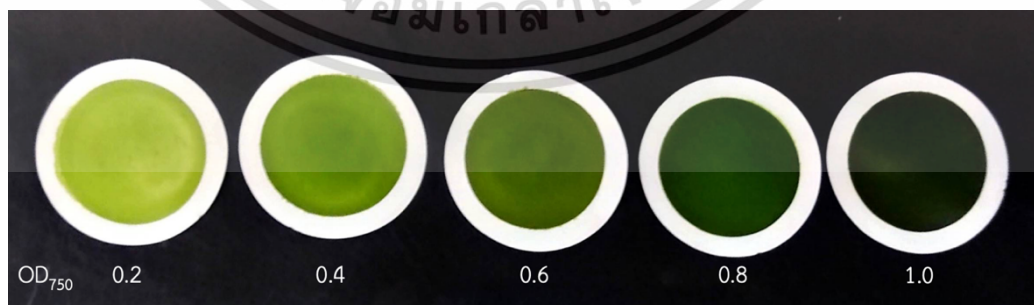
ภาคผนวก ง

การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งจากค่าความขุ่นของสาหร่าย

น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 สามารถคำนวณได้จากสมการเส้นตรง $y = 0.018x$ โดยที่ y คือค่าการดูดกลืนแสงหรือค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) และ x คือน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 ในหน่วยมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตรอาหารเหลว TAP



รูปที่ ง-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียว (OD_{750}) และน้ำหนักเซลล์แห้ง



รูปที่ ง-2 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียว *Micractinium* sp. KLSc62 หลังจากการกรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

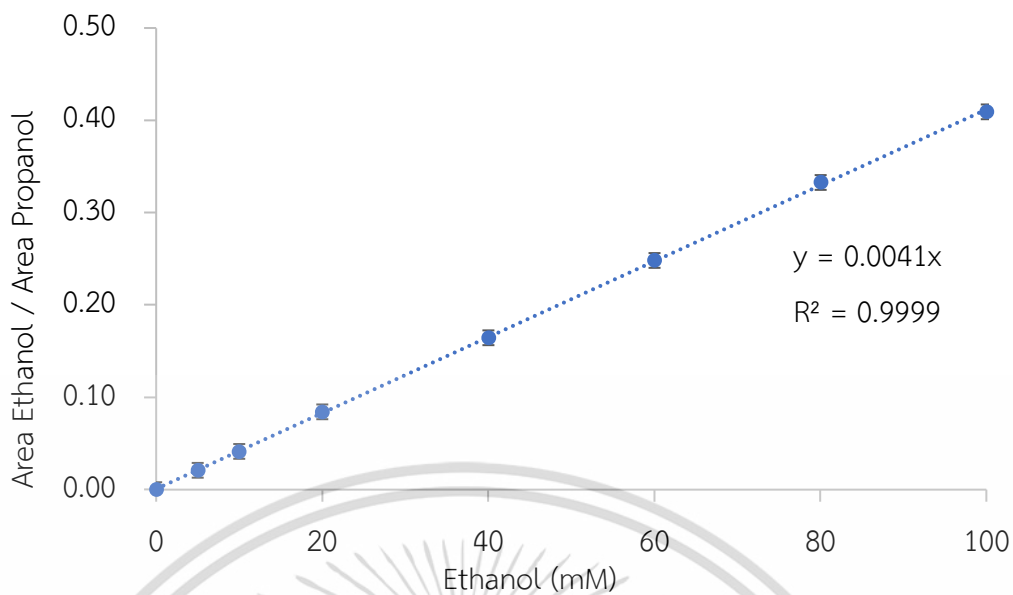
ภาคผนวก จ

การคำนวณปริมาณความเข้มข้นของเอทานอล

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานโพรพานอล (N-propanol) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรเป็นสารละลายมาตรฐาน
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลให้มีความเข้มข้น 10-100 มิลลิโมลาร์
3. ใส่สารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นในขวดแก้วขนาด 2 มิลลิลิตร พร้อมปิดฝาขวด
4. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลจะใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-2014, Shimadzu) ต่อกับ Auto Injector (AOC-20i)
5. ใช้คอลัมน์ DB-1 (Agilent J&W GC Column) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 5 ไมครอน อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ใช้ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด FID (Flame Ionization Detector) โดยปรับอุณหภูมิเท่ากับ 180 องศาเซลเซียส Sampling rate เท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของตำแหน่งฉีดสาร (Injector) เท่ากับ 150 องศาเซลเซียส ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นก๊าซตัวพา
6. นำพื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area) ของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลต่อโพรพานอลในแต่ละความเข้มข้นซึ่งกำหนดให้เป็นแกน y และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเอทานอลเป็นแกน x

วิธีการวิเคราะห์เอทานอลในตัวอย่าง

1. วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างโดยผสมสารละลายโพรพานอลร้อยละ 1 โดยปริมาตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร
2. วิเคราะห์ดังสภาวะข้างต้นจากนั้นนำเอาอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลในสารตัวอย่างต่อโพรพานอลมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอล



รูปที่ จ-1 กราฟมาตรฐานเอทานอล



รูปที่ จ-2 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของเอทานอลที่ได้จากการวิเคราะห์จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

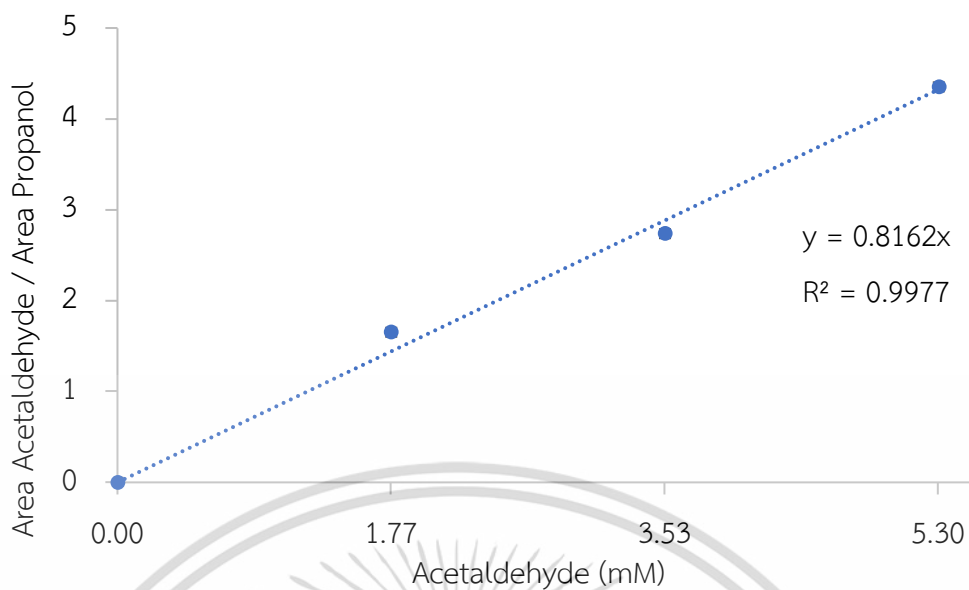
ภาคผนวก ฉ

การคำนวณปริมาณความเข้มข้นของอะซีทัลดีไฮด์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานโพรพานอล (N-propanol) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรเป็นสารละลายมาตรฐาน
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานอะซีทัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น 1.7 3.5 และ 5.3 มิลลิโมลาร์
3. ใส่สารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นในขวดแก้วขนาด 2 มิลลิลิตร พร้อมปิดฝาขวด
4. การวิเคราะห์ปริมาณอะซีทัลดีไฮด์จะใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-2014, Shimadzu) ต่อกับ Auto Injector (AOC-20i)
5. ใช้คอลัมน์ DB-1 (Agilent J&W GC Column) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 5 ไมครอน อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ใช้ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด FID (Flame Ionization Detector) โดยปรับอุณหภูมิเท่ากับ 180 องศาเซลเซียส Sampling rate เท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของตำแหน่งฉีดสาร (Injector) เท่ากับ 150 องศาเซลเซียส ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นก๊าซตัวพา
6. นำพื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area) ของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของอะซีทัลดีไฮด์ต่อโพรพานอลในแต่ละความเข้มข้นซึ่งกำหนดให้เป็นแกน y และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเอทานอลเป็นแกน x

วิธีการวิเคราะห์อะซีทัลดีไฮด์ในตัวอย่าง

1. วิเคราะห์ปริมาณอะซีทัลดีไฮด์ในตัวอย่างโดยผสมสารละลายโพรพานอลร้อยละ 1 โดยปริมาตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร
2. วิเคราะห์ดังสภาวะข้างต้นจากนั้นนำเอาอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของอะซีทัลดีไฮด์ในสารตัวอย่างต่อโพรพานอลมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของอะซีทัลดีไฮด์



รูปที่ ฉ-1 กราฟมาตรฐานอะซีทัลดีไฮด์



รูปที่ ฉ-2 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของอะซีทัลดีไฮด์ที่ได้จากการวิเคราะห์
จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทรานฟอร์ม

1. Luria-Bertani broth (LB broth)

| | |
|-----------------|---------|
| Tryptone | 10 กรัม |
| Yeast-extract | 5 กรัม |
| Sodium chloride | 10 กรัม |

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 1 ลิตรและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Luria-Bertani agar (LB agar)

| | |
|-----------------|---------|
| Tryptone | 10 กรัม |
| Yeast-extract | 5 กรัม |
| Sodium chloride | 10 กรัม |
| Agar | 15 กรัม |

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น Agar ในน้ำกลั่นจนละลายเป็นเนื้อเดียว จากนั้นจึงเติม Agar แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 1 ลิตรและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมการเตรียมเจลอะกาโรส

1. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5X TAE
2. เติมผงอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์
3. นำมาผสมกัน
4. ให้ความร้อนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Acetate-EDTA

1. สารละลาย 50X TAE 1 ลิตร

| | |
|--|---------------|
| - ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base) | 242 กรัม |
| - กรดอะซิติก (CH_3COOH) | 57.1 กรัม |
| - อีดีทีเอ (EDTA) 0.5 M | 100 มิลลิลิตร |
2. นำ Tris-base มาละลายในน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร
3. เติมอีดีทีเอ และกรดอะซิติกลงในสารละลาย
4. ปรับ pH เป็น 8.0
5. จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น
6. นำสารละลาย 50X TAE เจือจาง 1000 เท่าให้มีความเข้มข้น 0.5X TAE ด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ณ

รายชื่อสายพันธุ์สาหร่ายในคลังหน่วยวิจัย

ตารางที่ ณ-1 รหัสและรายชื่อของสาหร่ายสีเขียวในคลังหน่วยวิจัยพลังงานชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

| รหัส | สายพันธุ์ของสาหร่าย |
|------|------------------------------|
| C | CUJR01 |
| D | CUJR03 |
| E | CUJR06 |
| F | CUJR08 |
| G | CUJR04 |
| H | G2 |
| I | G4 |
| J | <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 |
| K | <i>Chlorella</i> sp. LT |
| L | PK |
| M | <i>Scenedesmus</i> 005(25.2) |
| N | <i>Scenedesmus</i> 006(B10) |
| O | SK |
| P | <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 |
| Q | <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

| | |
|----------------------|--|
| ชื่อ | นางสาวรชนีกร กลิ่นสาลี |
| วัน เดือน ปีเกิด | 29 กันยายน 2540 |
| ที่อยู่ปัจจุบัน | บ้านเลขที่ 57/1 หมู่ 1 ตำบลท่าเรือ อำเภอท่าเรือ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13130 |
| ประวัติการศึกษา | (2563) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) (2565) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) |
| ทุนการศึกษาที่ได้รับ | - |
| ผลงานทางวิชาการ | Klinsalee, R. Pim-on, P. Yaemkaew, P. and Assavasirijinda, N. 2020. Study of neutralizing agent tolerance on <i>Bacillus coagulans</i> DSM1 for lactic acid production. published in ASEAN Bioenergy and Bioeconomy Conference 2020 proceeding Klinsalee, R. Maneeruttanarungroj, C. 2021. Biohydrogen production from screened green algae of <i>Chlorella</i> sp. KLSc61 strain under ethanol induction. published in The 6 th International Conference on Food and Applied Bioscience 2022 proceeding Pewnual, T. Jampapetch, N. Saladtook, S. Raksajit, W. Klinsalee, R. and Maneeruttanarungroj, C. (2022). Response of green alga <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 under potassium deprivation: a new promising strategy for hydrogen production. Journal of Applied Phycology. Pages 811–819 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้