

การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว  
*Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125  
ภายใต้สภาวะที่มีแสง

HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN ALGA  
*Chlamydomonas reinhardtii* CC-125  
UNDER LIGHT CONDITION

กิตติพัฒน์ วาริชนันทน์  
ณภัทร ต่วนศรีแก้ว  
ณัฐนนท์ ชินชูศักดิ์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2558

การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว  
*Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125  
ภายใต้สภาวะที่มีแสง

HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN ALGA  
*Chlamydomonas reinhardtii* CC-125  
UNDER LIGHT CONDITION

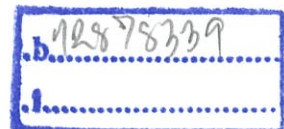


กิตติพัฒน์ วาริชนันท์  
ณภัทร ต่วนศรีแก้ว  
ณัฐนนท์ ชินชูศักดิ์

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน.....  
วัน,เดือน,ปี.....

148973

1.8 S.A. 2560



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2558

HYDROGEN PRODUCTION BY GREEN ALGA  
*Chlamydomonas reinhardtii* CC-125  
UNDER LIGHT CONDITION

KITTIPHAT WARICHANAN  
NAPHAT TUANSRIKEAW  
NATTANON CHINCHUSAK

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงการพิเศษ      การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*  
 สายพันธุ์ CC-125 ภายใต้สภาวะที่มีแสง  
 Hydrogen Production By Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*  
 CC-125 Under Light Condition

ชื่อนักศึกษา                    นายกิตติพัฒน์ วาริชนันท์ รหัสนักศึกษา 55051060  
                                          นายณภัทร ต่วนศรีแก้ว    รหัสนักศึกษา 55051082  
                                          นายณัฐนนท์ ชินชูศักดิ์   รหัสนักศึกษา 55051088

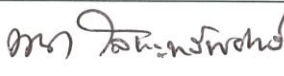
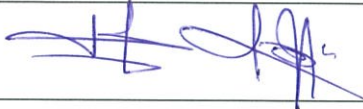

ปริญญา                            วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา                            ชีววิทยา

ปีการศึกษา                      2558

อาจารย์ที่ปรึกษา                ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้  
 โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขา  
 เทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2558

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> สายพันธุ์ CC-125 ภายใต้สภาวะที่มีแสง
ชื่อนักศึกษา	นายกิตติพัฒน์ วาริชนันท์ รหัสนักศึกษา 55051060 นายณภัทร ต่วนศรีแก้ว รหัสนักศึกษา 55051082 นายณัฐนนท์ ชินชูศักดิ์ รหัสนักศึกษา 55051088
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พุกักษ์

### บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานหมุนเวียนชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถผลิตโดยสาหร่ายหลายชนิด สาหร่ายสีเขียวต้นแบบ *Chlamydomonas reinhardtii* สามารถผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศและมีแสง โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กบริเวณกระตุ้น (Fe-Fe hydrogenase) งานวิจัยนี้คัดเลือกสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในบรรดา 5 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ดั้งเดิม 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. reinhardtii* CC-124 และ CC-125 และสายพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. reinhardtii* CC-4147, CC-503 และ CC-3806 และนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน จากการทดลองพบว่า *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ  $4.86 \pm 0.36$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 คือ บ่มเซลล์ในอาหาร TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ที่มีโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 1.74 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ  $5.82 \pm 0.5$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

คำสำคัญ : *Chlamydomonas reinhardtii* การขาดซัลเฟอร์ ไฮโดรเจน

Title	Hydrogen Production By Green Alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-125 Under Light Condition
Students	Mr.KITTIPHAT WARICHANAN Student ID 55051060 Mr.NAPHAT TUANSRIKEAW Student ID 55051082 Mr.NATTANON CHINCHUSAK Student ID 55051088
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2015
Advisor	Asst.Prof.Dr.Saranya Phunpruch

### Abstract

Hydrogen is one of renewable energy sources that can be produced by many algae. The model green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* is able to produce H<sub>2</sub> via photosynthetic pathway using Fe-Fe hydrogenase enzyme under anaerobic condition in the light. In this study, the highest H<sub>2</sub>-producing *C. reinhardtii* strain was selected from two wild type strains (*C. reinhardtii* CC-124 and CC-125) and three mutant strains (*C. reinhardtii* CC-4147, CC-503 and CC-3806). The optimum condition for H<sub>2</sub> production by the selected strain was subsequently investigated. The result showed that among 5 strains *C. reinhardtii* CC-125 gave the highest H<sub>2</sub> production rate with  $4.86 \pm 0.36 \mu\text{molH}_2 \text{ mgchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . The optimum condition for H<sub>2</sub> production by *C. reinhardtii* CC-125 was incubation cells in TAP-S medium containing 1.74 mM sodium acetate under the light intensity of  $40 \mu\text{molE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at 25°C. Under optimum condition, H<sub>2</sub> production rate by *C. reinhardtii* CC-125 was the highest with  $5.82 \pm 0.5 \mu\text{molH}_2 \text{ mgchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

**Keywords:** *Chlamydomonas reinhardtii*, S-deprivation, Hydrogen

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเล่มนี้สำเร็จลงได้ด้วย ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษย์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำและให้ข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัยตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ มาโดยตลอดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในการอบรมให้ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำด้านต่างๆ ตลอดเวลาของการศึกษาในสถาบันฯ

ขอขอบคุณพี่น้องวิทยุ ที่มีความตั้งใจในการช่วยให้เบิกสารที่ใช้ในการทดลอง ทำให้เกิดผลสำเร็จในงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล ที่ให้ความช่วยเหลือ ปรึกษาในทุกเรื่อง

ประโยชน์และคุณค่าของงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่ บิดา มารดา ครูอาจารย์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้สั่งสอนอบรมมาจากอดีตจนปัจจุบันตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุดท้ายนี้พวกเราหวังว่า โครงการพิเศษเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียว

กิตติพัฒน์ วาริชนันท์

ณภัทร ต่วนศรีแก้ว

ณัฐนนท์ ชินชูศักดิ์

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการพิเศษ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 ไฮโดรเจน.....	4
2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน.....	4
2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล.....	4
2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า.....	5
2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี.....	5
2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต.....	5
2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจน.....	6
2.3.1 แบคทีเรีย (Bacteria).....	6
2.3.1.1 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสง (Phototrophic bacteria).....	6
2.3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมัก (Dark fermentation bacteria).....	6
2.3.2 ไชยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria).....	6
2.3.3 สาหร่ายสีเขียว (Green algae).....	6
2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว.....	7
2.5 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว.....	8
2.6 สาหร่ายสีเขียว.....	9
2.7 สาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	10
2.7.1 <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ CC-124.....	12
2.7.2 <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ CC-125.....	12

2.7.3 <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ CC-4147 หรือ FUD7 ( <i>psbA</i> deletion).....	12
2.7.4 <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ CC-503 หรือ cw92.....	12
2.7.5 <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ CC-3806 หรือ sac8.....	12
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	13
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>14</b>
3.1 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง.....	14
3.2 สารเคมี.....	14
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย.....	14
3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	14
3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์.....	15
3.2.4 ก๊าซมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน.....	15
3.3 อุปกรณ์.....	15
3.4 วิธีการทดลอง.....	17
3.4.1 เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> บนอาหารแข็ง.....	17
3.4.2 เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> ในอาหารเหลว.....	17
3.4.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> .....	17
3.4.4 ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> .....	17
3.4.5 ศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์.....	18
3.4.6 วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> .....	18
ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน	
3.4.7 วิธีการศึกษาสภาวะการขาดซัลเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	19
3.4.8 ศึกษาอายุเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	21
3.4.9 ศึกษาความเข้มข้นของอะซีเตทที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	22
3.4.10 ศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	22
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>23</b>
4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> .....	23
5 สายพันธุ์	
4.2 ผลศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> 5 สายพันธุ์.....	25
4.3 ผลการคัดเลือกของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> ที่มีศักยภาพ.....	27
ในการผลิตไฮโดรเจน	
4.4 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ.....	30
สาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ที่คัดเลือก	

4.4.1 ผลการศึกษาสภาวะการขาดซัลเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ.....	30
สำหรับสาย C. reinhardtii สายพันธุ์ CC-125	
4.4.2 ผลการศึกษาอายุเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาย C. reinhardtii สายพันธุ์ CC-125.....	31
4.4.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นอะซีเตทที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ.....	32
สำหรับสาย C. reinhardtii สายพันธุ์ CC-125	
4.4.4 ผลการศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ.....	33
สำหรับสาย C. reinhardtii สายพันธุ์ CC-125	
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>36</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	36
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	36
เอกสารอ้างอิง.....	37
ภาคผนวก.....	41
ภาคผนวก ก.....	42
ภาคผนวก ข.....	43

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 สาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> ที่ใช้ในการศึกษา.....	14
3.2 สมภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์หองค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ.....	19
เทอร์มอลคอนดักติวิตีทีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph Thermal Conductivity Detector (GC-TCD))	
3.3 สูตรอาหาร TAP-S แต่ละแบบ.....	20
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว <i>C. Reinhardtii</i> ทั้ง 5 สายพันธุ์.....	23
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า	
4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลได้ของไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว.....	32
<i>C. reinhardtii</i> CC-125 ที่มีอายุเซลล์ 12, 36 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ในอาหาร TAP-S	
ภายหลังการไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนและบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง.....	8
2.2 วัฏจักรชีวิตของ <i>Chlamydomonas</i> .....	11
4.1 ค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของสาหร่ายสีเขียว.....	26
<i>C. reinhardtii</i> ที่ช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงต่างๆ	
4.2 ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เวลาของ.....	26
การเพาะเลี้ยงต่างๆ	
4.3 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เวลาของ.....	27
การเพาะเลี้ยงต่างๆ	
4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจน ที่ช่วงเวลาต่างๆ (ภายหลังการไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน) .....	28
ของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> 5 สายพันธุ์ ในอาหาร TAP (ก)	
อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) (ข) และ	
อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) (ค)	
4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> 5 สายพันธุ์.....	30
ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)	
และ อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N)	
ภายหลังการให้ก๊าซอาร์กอนและบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	
4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ CC-125 ในอาหาร.....	31
TAP-S แบบต่างๆ ภายหลังการให้ก๊าซอาร์กอนและบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	
4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนภายหลังการไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนและบ่มเป็นเวลา.....	33
2 ชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ CC-125 ใน	
อาหาร TAP-S ที่ความเข้มข้นอะซีเตตต่างๆ โดยใช้อาหาร TAP	
ที่มีอะซีเตตเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ เป็นอาหารควบคุม	
4.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนภายหลังการให้ก๊าซอาร์กอนและบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง .....	35
ของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ CC-125 ในอาหาร TAP-S	
ความเข้มข้นอะซีเตต 1.74 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ	
ก กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของไฮโดรเจน.....	43

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการพิเศษ

มนุษย์จำเป็นต้องใช้พลังงานในการทำกิจกรรมต่างๆ เพื่อดำรงชีวิต เช่น การใช้พลังงานในการคมนาคมขนส่ง การใช้พลังงานในการผลิตกระแสไฟฟ้า โดยแหล่งพลังงานสำคัญที่ใช้ในการทำกิจกรรมต่างๆ คือ พลังงานจากซากดึกดำบรรพ์หรือน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งเป็นพลังงานที่เกิดจากซากพืช ซากสัตว์ที่เสียชีวิตและตะกอนต่างๆ ทับถมกันเป็นชั้นๆ อยู่ตลอดเวลาหลายล้านปีจนกระทั่งแปรสภาพเป็นเชื้อเพลิง เนื่องจากประชากรมนุษย์เพิ่มขึ้นทุกปีอย่างต่อเนื่อง ทำให้ความต้องการในการใช้พลังงานของมนุษย์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้พลังงานจากซากดึกดำบรรพ์ลดลงอย่างรวดเร็วและใกล้จะหมดไปในอนาคต ด้วยเหตุนี้ หน่วยงานด้านพลังงานจึงต้องแสวงหาพลังงานทดแทนขึ้นมาใหม่ พลังงานทดแทนที่น่าสนใจ ได้แก่ พลังงานลม พลังงานน้ำ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานน้ำขึ้นน้ำลง พลังงานคลื่น พลังงานความร้อนใต้พิภพ เชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นต้น

เชื้อเพลิงชีวภาพเป็นพลังงานหมุนเวียนและสะอาด การใช้เชื้อเพลิงชีวภาพช่วยลดปัญหาก๊าซเรือนกระจกได้ ในปัจจุบันโลก ใช้ประโยชน์จากเชื้อเพลิงชีวภาพน้อยมาก นักวิทยาศาสตร์จึงทำการวิจัย ค้นคว้าเพื่อนำเชื้อเพลิงชีวภาพมาใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น นั่นคือ การพัฒนาการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากการหมักจุลินทรีย์ เช่น การผลิตเอทานอลจากสาหร่าย (John และคณะ, 2011) การผลิตมีเทนจากสาหร่าย (Yang และคณะ, 2011) การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย (Kruse และ Hankamer, 2010) เป็นต้น

พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพชนิดหนึ่ง เมื่อนำมาเผาไหม้จะให้ความร้อนและพลังงานออกมา หรือสามารถนำมาทำปฏิกิริยาเคมีเกิดเป็นกระแสไฟฟ้าในเซลล์เชื้อเพลิง ประโยชน์ของพลังงานไฮโดรเจน เช่น สามารถนำมาใช้ในการคมนาคม ผลิตกระแสไฟฟ้า อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ เป็นต้น พลังงานไฮโดรเจนผลิตได้จากเชื้อเพลิงจากซากดึกดำบรรพ์ แหล่งพลังงานหมุนเวียน และจากพลังงานนิวเคลียร์ โดยเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนมี 3 เทคโนโลยีหลัก ได้แก่ (1) กระบวนการความร้อนเคมี (Thermo-chemical process) คือ การใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน ชีวมวล เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตไฮโดรเจน และจะได้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ มีเทน และน้ำเป็นผลพลอยได้ (2) กระบวนการแยกน้ำด้วยไฟฟ้า (Electrolysis process) คือ การใช้ไฟฟ้าในการแยกโมเลกุลของน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน (3) กระบวนการชีวเคมี (Biochemical process) คือ การนำจุลินทรีย์ เช่น สาหร่าย แบคทีเรีย ฯลฯ มาผลิตไฮโดรเจนโดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงหรือกระบวนการหมัก

สาหร่ายสามารถนำแสงอาทิตย์มาใช้ในการสังเคราะห์แสงได้อย่างรวดเร็ว สามารถเพาะเลี้ยงได้เป็นจำนวนมากโดยไม่ยุ่งยาก (กระทรวงพลังงาน, 2550) มีศักยภาพในการเพิ่มจำนวนได้สูง (อาภารัตน์, 2551) ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยและไม่กระทบต่อการปลูกพืชเกษตรอื่น ๆ สาหร่ายแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ตามกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและแหล่งคาร์บอน คือ (1) สาหร่ายที่สามารถเจริญแบบโฟโตออโตโทรฟิค (Photoautotrophic cultivation) ซึ่งจะใช้แหล่งพลังงานจากแสงและคาร์บอนจากอนินทรีย์คาร์บอน เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) และ (2) สาหร่ายที่สามารถเจริญแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟิค (Photoheterotrophic cultivation) จะใช้แหล่งพลังงานจากแสงและคาร์บอนจากอินทรีย์คาร์บอน เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก เป็นต้น โครงการพิเศษนี้นำสาหร่ายสีเขียวมาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการชีวเคมี โดยสาหร่ายสีเขียวจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างอย่างง่าย สามารถสร้างอาหารได้เองโดยอาศัยพลังงานจากธรรมชาติผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตจัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Chlorophyta) มีคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บีเป็นรงควัตถุ สาหร่ายสีเขียวที่นิยมนำมาผลิตไฮโดรเจน คือ สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*

สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม มีอายสปอต (Eye spot) และมีแฟลกเจลลา 2 เส้น สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สามารถผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ (Ghirardi และคณะ, 1997) การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* แบ่งได้เป็น 2 กระบวนการ คือ (1) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยการทำงานของระบบแสงสอง (PSII-dependent) แสงจะกระตุ้นให้อิเล็กตรอนในศูนย์กลางระบบแสงหนึ่งและแสงสองหลุดออกมา จากนั้นระบบแสงสองจะทำหน้าที่แตกตัวน้ำ (Photolysis) ได้ออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอนออกมา อิเล็กตรอนจากการแตกตัวของน้ำจะเคลื่อนที่ผ่านพลาสโตควิโนน (Plastoquinone) ไซโตโครม (Cytochrome) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) ไปที่ระบบแสงหนึ่ง และส่งต่อไปยังเฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ในสภาวะการผลิตไฮโดรเจน อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินจะเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตอนโดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Melis และ Happe, 2001; Esquivel และคณะ, 2011; Grossman และคณะ, 2011) (2) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยไม่อาศัยการทำงานของระบบแสงสอง (PSII-independent) เป็นการนำอิเล็กตรอนจากการย่อยสลายสารภายในเซลล์ เช่น แป้ง มาใช้ในการผลิตไฮโดรเจน (Kruse และ Hankamer, 2010; Esquivel และคณะ, 2011; Lecler และคณะ, 2011)

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ แบ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม ได้แก่ *C. reinhardtii* CC-124 และ *C. reinhardtii* CC-125 และสายพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ (1) สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-4147 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกำจัดยีน *psbA* (Minagawa และ Crofts, 1994) ยีน *psbA* ถอดและแปลรหัสโปรตีน D1 ที่อยู่ในระบบแสงสอง เมื่อระบบแสงสองไม่มีโปรตีน D1 จะทำให้การแตกตัวของน้ำและการผลิตออกซิเจนลดลง เมื่อออกซิเจนที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสลดลง จะส่งผลให้มีการผลิต

ไฮโดรเจนมากขึ้น (2) สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-503 มีลักษณะการกลายพันธุ์ คือ ไม่มีผนังเซลล์ (Voigt และคณะ, 1997) การที่ไม่มีผนังเซลล์จะทำให้การปลดปล่อยไฮโดรเจน ออกนอกเซลล์ได้มาก (3) สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-3806 มีลักษณะการกลายพันธุ์ คือ ขาดยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์เอริลซัลฟาเทส (Arylsulfatase) เมื่อสาหร่ายขาด เอนไซม์นี้ สาหร่ายจะไม่สามารถสลายซัลฟาไทด์ (Sulfatide) หรือ Cerobroside-3-sulfate ให้เป็น Cerebroside และซัลเฟต ทำให้ไม่มีซัลเฟตหลงเหลือในเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เซลล์เข้าสู่สภาวะขาด ซัลเฟอร์ได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยเหตุนี้ คาดว่าจะทำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูง ขึ้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อคัดเลือกสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิม CC-124 และ CC-125 และสายพันธุ์กลาย CC-4147, CC-503 และ CC-3806
- 2) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่คัดเลือก

## 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

- 1) นำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-124, CC-125, CC-4147, CC-503 และ CC-3806 จาก Chlamydomonas Resource Center มาศึกษาการเจริญเติบโตในอาหาร Tris acetate phosphate (TAP)
- 2) คัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ที่มีศักยภาพการผลิตไฮโดรเจน โดย การศึกษาในอาหาร TAP ปราศจากแหล่งไนโตรเจน และ TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์
- 3) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่ คัดเลือก โดยการแปรผันอาหาร TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์แบบต่างๆ ศึกษาอายุเซลล์ ศึกษาความเข้มข้นของอะซิเตท และศึกษาความเข้มข้น

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ที่มีศักยภาพในการผลิต ไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในบรรดา 5 สายพันธุ์
- 2) สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่คัดเลือก

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ไฮโดรเจน

จากการที่ในปัจจุบันน้ำมันเชื้อเพลิงใกล้จะหมดลง ทำให้น้ำมันเชื้อเพลิงมีมูลค่าสูงขึ้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจโลก ด้วยเหตุนี้ หน่วยงานต่างๆ จึงต้องพยายามแสวงหาพลังงานทดแทนขึ้นมาใหม่ โดยจะต้องเป็นพลังงานที่สะอาด ปลอดภัย และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานทดแทนเหล่านี้ ได้แก่ พลังงานน้ำ พลังงานลม พลังงานแสงอาทิตย์ และพลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกชนิดหนึ่งที่สำคัญต่ออนาคต เป็นพลังงานสะอาด ยั่งยืน สามารถหมุนเวียนนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เมื่อทำการเผาไหม้ไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อเผาไหม้ไฮโดรเจนในอากาศจะผลิตออกไซด์ของไนโตรเจน โดยไม่ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ซึ่งจัดเป็นก๊าซเรือนกระจกที่สำคัญ

ไฮโดรเจนอะตอมเป็นธาตุลำดับแรกในตารางธาตุ มีสัญลักษณ์ธาตุ คือ H และมีเลขอะตอมเท่ากับ 1 ภายใต้ความดันบรรยากาศมาตรฐาน อุณหภูมิห้อง ไฮโดรเจนจะมีสถานะเป็นก๊าซที่มี 2 อะตอม และมีอิเล็กตรอนชั้นนอกสุดหรือเวเลนซ์อิเล็กตรอนตัวเดียว ไฮโดรเจนสามารถพบได้ในสารประกอบอินทรีย์ทุกตัวและในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด นอกจากนี้ ไฮโดรเจนจัดเป็นธาตุที่เบาที่สุดในสภาวะปกติจะกระจายในอากาศเนื่องจากเบากว่าอากาศมาก ไฮโดรเจนจะไม่มีสี ไม่มีกลิ่น

ก๊าซไฮโดรเจนมีค่าออกเทน (ค่าความต้านทานการน็อคของเครื่องยนต์: antiknock quality) สูงถึง 120 โดยเชื้อเพลิงที่มีค่าออกเทนสูงจะทำให้เกิดการเผาไหม้เชื้อเพลิงที่สมบูรณ์ เครื่องยนต์เดินเรียบไม่สะดุด ทำให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อเทียบกับพลังงานอื่นๆ ไฮโดรเจนจึงเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ พลังงานไฮโดรเจนยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทดแทนกับพลังงานที่ต้องใช้พลังงานดั้งเดิม เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับครัวเรือน เครื่องยนต์สันดาปภายใน เครื่องกังหัน และเครื่องไอพ่น เป็นต้น (Bak และคณะ, 2002)

### 2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถแบ่งได้เป็น 4 กระบวนการ ดังนี้

#### 2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติ โดยกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (Steam reforming) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับไอน้ำ โดยอาศัยพลังงานความร้อน ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

และก๊าซไฮโดรเจน ข้อเสียของกระบวนการนี้คือ ก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากสารตกค้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เผาไหม้ไม่สมบูรณ์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เป็นต้น

### 2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า เป็นวิธีการที่ใช้กระแสไฟฟ้าแยกโมเลกุลของน้ำโดยตรง (Water electrolysis) ทำให้ได้ไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอม โดยอาศัยอิเล็กโทรด (Electrode) 2 ขั้วที่ตรงข้ามกัน คือ อิเล็กโทรดขั้วบวก (Anode) และอิเล็กโทรดขั้วลบ (Cathode) วิธีการเตรียม คือ จุ่มอิเล็กโทรดลงในน้ำที่ทำให้มีความเป็นด่างมากขึ้น โดยการเติมสารพวกอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte) เช่น กรดซัลฟิวริก หรือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป ไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบและออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วบวก วิธีนี้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต แต่ต้องอาศัยกระแสไฟฟ้าสูงถึง 90 กิโลวัตต์ มีการสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำ และจะต้องทำในสภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่า 2,500 องศาฟาเรนไฮต์

### 2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี (Thermochemistry) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจน โดยการใช้สารประกอบปรอทโบรมด์และแคลเซียมในกระบวนการผลิต วิธีนี้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยอาศัยความร้อนสูงอุณหภูมิประมาณ 200 ถึง 780 องศาเซลเซียส ข้อดีของกระบวนการนี้คือ สามารถนำความร้อนของทางปฏิกรณ์นิวเคลียร์มาผลิตไฮโดรเจนได้ โดยพลังงานทั้งหมดจะถูกนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด และผลผลิตที่ได้สามารถแยกออกได้ง่าย แต่มีข้อเสีย คือ เกิดปัญหามลพิษจากการใช้สารประกอบโลหะหนักอัน ได้แก่ ปรอท และโบรมด์

### 2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต

การผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่าไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen) เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด ยกตัวอย่าง เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสง แบคทีเรีย สาหร่าย และไซยาโนแบคทีเรีย เป็นต้น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิตไฮโดรเจนได้โดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสง แบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก สาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียใช้แสงและน้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจน และไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Kosaric และ Lyng, 1988)

## 2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจน

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการชีวภาพมี 3 ชนิด ดังนี้

### 2.3.1 แบคทีเรีย (Bacteria)

#### 2.3.1.1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Phototrophic bacteria)

แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถสังเคราะห์แสง โดยไม่ต้องออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Anoxygenic phototrophic bacteria) แบคทีเรียในกลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ (1) แบคทีเรียสีม่วงไม่สะสมกำมะถัน (Non-sulfur purple bacteria) (2) แบคทีเรียสีม่วงที่สะสมกำมะถัน (Sulfur purple bacteria) (3) แบคทีเรียสีเขียวที่สะสมกำมะถัน (Green sulfur bacteria) แบคทีเรียในกลุ่มนี้ผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยการใช้สารประกอบซัลไฟด์ ซัลเฟอร์ ไทโอซัลเฟต สารประกอบอินทรีย์หรือโมเลกุลไฮโดรเจนเป็นสารให้อิเล็กตรอน

#### 2.3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมัก (Dark fermentation bacteria)

แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถหมักน้ำตาลหรือแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น เพื่อผลิตตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับใช้ในการผลิตไฮโดรเจน แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum* และ *Escherichia coli* เป็นต้น

### 2.3.2 ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโปรคาริโอตที่สังเคราะห์แสง ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Oxygenic phototropic prokaryote) ไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ และมีกระบวนการสังเคราะห์แสงและชนิดของคลอโรฟิลล์เหมือนสาหร่ายสีเขียวและพืช กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียคล้ายกับสาหร่าย โดยผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์แสง แต่ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนได้ และตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ ได้แก่ *Anabaena* sp. และ *Calothrix* sp. เป็นต้น

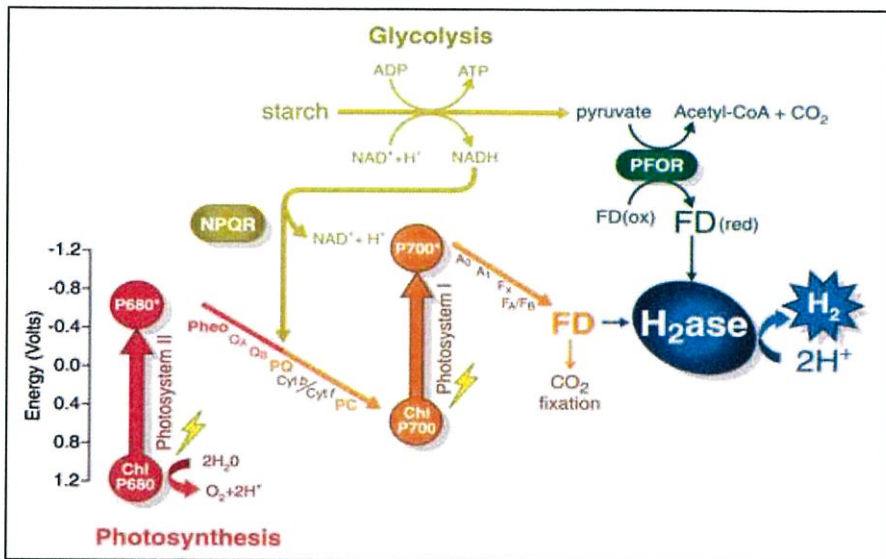
### 2.3.3 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการปรับตัวที่ไม่มีออกซิเจนทั้งในที่มืดและที่มีแสง การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสง เรียกว่า Photohydrogen production สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. เป็นต้น จากกระบวนการสังเคราะห์แสงที่มีการผลิตก๊าซออกซิเจน ออกซิเจนที่เกิดขึ้นจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง จากสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการพัฒนาและนำมาผลิตก๊าซไฮโดรเจน เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวเพาะเลี้ยงได้ง่ายโดยสามารถเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปและโฟโตเฮเทโรโทรป นอกจากนี้ ในการผลิต

ไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายจะใช้เพียงน้ำและแสงที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

## 2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ โดยใช้เพียงแสงและน้ำ ในการผลิตไฮโดรเจนผ่านการสังเคราะห์ด้วยแสงที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิดทั้งคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง แล้วส่งพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center) ซึ่งอยู่ภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ เมื่อโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ได้รับพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้นและพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนนี้ให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เมื่อมีพลังงานในรูปของแสงมาตกกระทบในบริเวณระบบแสงสอง (PSII) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สูงสามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ระบบแสงสองจะถูกกระตุ้นให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ควิโนนซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Q: Primary electron acceptor of PSII) อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (PQ: Plastoquinone) ต่อมา เมื่อน้ำมีการแตกตัวออกหรือที่เรียกว่า Water splitting ได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงสอง ไปแทนที่อิเล็กตรอนที่คลอโรฟิลล์ที่สูญเสียไปในระบบ จากนั้น อิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนนจะถูกส่งต่อไปยังไซโตโครมบี 6 เอฟ (Cytb<sub>6</sub>f: Cytochrome b<sub>6</sub>f) พลาสโตไซยานิน (PC: Plastocyanin) และเข้าไปยังระบบแสงหนึ่ง (PSI) ระบบแสงหนึ่งจะประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อระบบแสงหนึ่งถูกกระตุ้นจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Primary electron acceptor of PSI) และเมื่อมีโปรตอนหรือแสงมากระตุ้นคลอโรฟิลล์ภายในระบบแสงหนึ่ง คลอโรฟิลล์จะปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่เฟอร์รีดอกซิน (Fd: Ferredoxin) จะไปรวมตัวกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนขึ้น ดังรูปที่ 2.1 (Melis และ Happe, 2001) ที่กล่าวมาข้างต้น คือ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนผ่านทางระบบแสงสอง (PSII-dependent) อย่างไรก็ตามสาหร่ายสีเขียวยังสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยไม่ผ่านระบบแสงสอง โดยอิเล็กตรอนที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนได้มาจากการย่อยสลายสารภายในเซลล์ เช่น แป้ง เป็นต้น



รูปที่ 2.1 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง  
ที่มา: Posewitz, 2009

## 2.5 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase: acceptor oxidoreductase, EC 1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99.1) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นไฮโดรเจน และเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ดังสมการที่ 1.1



Stephenson และ Stickland (1931) บัญญัติศัพท์ “hydrogenase” ขึ้นเป็นครั้งแรกหลังการค้นพบการผลิตไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมทิลีนบลู (Methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต โดยสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

- 1) Unidirectional หรือ Uptake hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน
- 2) Bidirectional หรือ Reversible hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

นอกจากนี้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถแบ่งตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้เป็น 3 ชนิด (Schulz และคณะ, 1998) ดังนี้

- 1) ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (NiFe-hydrogenase)
- 2) ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (Fe-hydrogenase)
- 3) ไฮโดรจีเนสที่ไม่พบโลหะใดเป็นองค์ประกอบในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (Metal-free hydrogenase)

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวเป็นเอนไซม์ชนิดที่บริเวณกระตุ้นประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็กเท่านั้น เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย มีรายงานการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* (Gaffron และ Rubin, 1942), *Chlamydomonas reinhardtii* (Healey, 1970), *Chlorella fusca* (Kessler, 1974) และ *Chlamydomonas moewusii* (Healey, 1970) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 48 กิโลดาลตัน โดยมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนในสาหร่ายสีเขียวประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสประกอบด้วย 1 หน่วยย่อย ที่มีบริเวณกระตุ้นหรือบริเวณ H-cluster ประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็ก 2 อะตอม และจะจับเข้ากับซัลเฟอร์ในกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) และทำหน้าที่เป็น Fe-S cluster นอกจากนี้อะตอมของเหล็กที่อยู่ตรงกลางของบริเวณนี้จะจับกับซิสเทอีนแล้ว ยังจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ และไซยาไนด์อีกด้วย (Maness และคณะ, 2009)

## 2.6 สาหร่ายสีเขียว (ยูวติ พีรพรพิศาล, 2546)

สาหร่ายสีเขียวแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ สาหร่ายสีเขียวที่พบในทะเลซึ่งมีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายทั้งหมด สาหร่ายทะเลมักจะพบบริเวณน้ำตื้นตามแนวชายฝั่ง แต่จะมีบางชนิดที่พบในระดับความลึกถึง 300 ฟุต ที่แสงสามารถส่องถึง อีกชนิดหนึ่ง คือ สาหร่ายน้ำจืด ซึ่งมีประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายทั้งหมด สาหร่ายที่อยู่ในน้ำจืดจะเจริญอยู่ในน้ำตื้นหรือน้ำลึก บางชนิดขึ้นอยู่บนก้อนหิน หวาย โคลน เปลือกหอย บนพืช สัตว์ หรืออาจเจริญอยู่ในพืชก็ได้ สาหร่ายสีเขียวจะเจริญแตกต่างกันตามสภาพอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มแสง และความสมบูรณ์ของอาหาร

สาหร่ายสีเขียวมีรงควัตถุที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ที่ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ที่ประกอบด้วย แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ ซึ่งเป็นรงควัตถุชนิดเดียวกันที่พบในพืชชั้นสูง ผนังเซลล์ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น (แต่บาง Class ก็ไม่มีผนังเซลล์ มีเยื่อหุ้มเซลล์แทน) ผนังชั้นนอกประกอบด้วยสารจำพวกเพคติน ในขณะที่ผนังชั้นในเป็นสารจำพวกเซลลูโลส สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีหนวด (Flagella) ซึ่งพบเฉพาะในสาหร่ายที่เคลื่อนไหวได้ หนวดมีลักษณะเรียบคล้ายเส้นหรือเป็นวง ถ้ามีหนวดมากกว่า 1 เส้น ความยาวของหนวดจะเท่ากันทุกเส้น สาหร่ายที่มีหนวดจะมีออร์แกเนลล์ที่มีสีเขียวกว่าตา (Eye spot or Stigma) ซึ่งทำหน้าที่รับแสงแล้วส่งไปยังหนวด

สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างหลายแบบที่มีทั้งเซลล์เดี่ยว (Unicellular) อยู่รวมกลุ่มเป็นโคโลนี (Colony) และเป็นเส้นสาย (Filament) สาหร่ายสีเขียวมีนิวเคลียส 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 อัน ผลผลิตจากการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวเป็นอาหารสะสมประเภทแป้ง และสะสมแป้งในส่วนของเซลล์ที่เรียกว่า ไพเรโนอิด (Pyrenoid) โดยแป้งประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพคติน

วัฏจักรชีวิตของสาหร่ายสีเขียวมี 2 แบบ คือ แบบแฮพลอนติก (Haplontic type) เป็นการลดจำนวนโครโมโซม ซึ่งเกิดในระยะไซโกตเพื่อสร้างสปอร์ พบใน Order Volvocales และแบบดิพลอมาติก (Diplomatic type) เป็นการเพิ่มจำนวนโครโมโซม ซึ่งเกิดในระยะสร้างแกมมาต พบในบางสกุลของ Order Chlorococcales การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวมีทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการรวมกันของแกมมาต ซึ่งมีทั้งแบบ Isogamy, Anisogamy และ Oogamy ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีทั้งแบ่งเซลล์ การสร้างสปอร์ และการสร้างอะคินิต (Akinete) เป็นต้น

## 2.7 สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*

โครงการพิเศษที่สนใจศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* โดยสาหร่ายสีเขียวชนิดนี้จัดอยู่ใน

Domain: Eukaryota

Kingdom: Plantae

Division: Chlorophyta

Class: Chlorophyceae

Order: Chlamydomonadales

Family: Chlamydomonadaceae

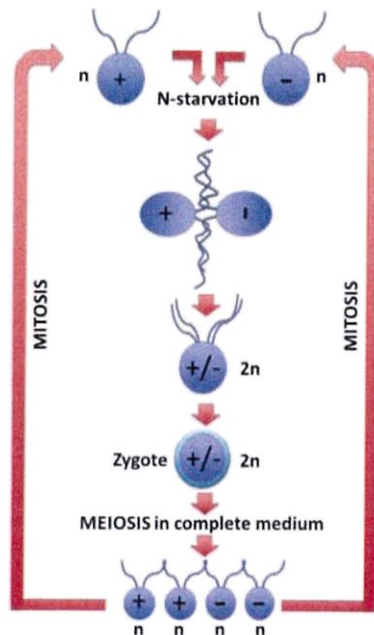
Genus: *Chlamydomonas*

Species: *C. reinhardtii*

สาหร่าย *C. reinhardtii* เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวที่พบได้ในดินและน้ำ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร และสามารถเคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลลา 2 เส้น ผนังเซลล์ของ *C. reinhardtii* ประกอบไปด้วย Hydroxyproline glycoprotein เป็นส่วนมาก มีคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วย มีไพเรโนอิดขนาดใหญ่ และมีอายสปอตทำหน้าที่ในการรับแสง

*C. reinhardtii* มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุศาสตร์ จึงมักใช้เป็นต้นแบบของสาหร่ายสีเขียว ส่วนหนึ่งมาจากความสะดวกในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากสามารถนำ *C. reinhardtii* มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง *C. reinhardtii* สามารถเจริญเติบโตโดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน (Photoautotrophic) หรือใช้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในรูปของอะซีเตทในอาหารเลี้ยงโดยมีแสง (Mixotrophic) หรือไม่ต้องมีแสง (Heterotrophic) ก็ได้ *C. reinhardtii* สามารถเจริญได้ทั้งในที่มืดและที่สว่าง

สำหรับสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* มีวัฏจักรแสดงในรูปที่ 2.2 โดยทั่วไป เซลล์จะอยู่ในสภาพแฮพลอยด์ แต่ละเซลล์จะมีแบบการผสมพันธุ์เป็น Mating type + (mt +) หรือ Mating type - (mt -) อย่างไม่อย่างหนึ่งตลอดชีวิต เซลล์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศได้ โดยเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ขาดแหล่งไนโตรเจน เซลล์จะเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (Gametogenesis) เซลล์จะกลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (Gamete) โดยแต่ละเซลล์จะมีการสร้าง Mating ring ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนแอกติน (Actin) อยู่ใต้เยื่อหุ้มเซลล์ หลังจากนั้น เซลล์จะหลั่ง Agglutinin ซึ่งเป็นสารจำพวกไกลโคโปรตีน เพื่อกระตุ้นการจับกันของแฟลกเจลลาระหว่างเซลล์ที่มี Mating type ตรงข้ามกัน จากนั้น เซลล์ทั้งสองจะรวมตัวกันกลายเป็นเซลล์เดียวที่มีแฟลกเจลลาร 4 สาย เมื่อแฟลกเจลลาหายไป เซลล์จะสร้างผนังเซลล์ที่มีความหนาเป็นพิเศษเพื่อปกป้องไซโกตซึ่งอยู่ในรูปดิพลอยด์ เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม ไซโกตจะแบ่งเซลล์ไมโอซิส เกิดเป็นเซลล์แฮพลอยด์ 4 เซลล์ซึ่งแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสต่อไป (Harris, 2001)



รูปที่ 2.2 วัฏจักรชีวิตของ *Chlamydomonas*

ที่มา: อัญชลี ศิริขจรกิจ, 2011

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้สนใจศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* 5 สายพันธุ์ ดังนี้

### 2.7.1 สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-124

สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 หรือ 137c มี Mating type - เป็นสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิมที่แยกได้จากเมือง Amherst รัฐ Massachusetts ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1945 โดย G.M. Smith (Pröschold และคณะ, 2005)

### 2.7.2 สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125

สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 หรือ 137c มี Mating type + เป็นสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิมที่แยกได้จากเมือง Amherst รัฐ Massachusetts ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1945 โดย G.M. Smith และเป็นสายพันธุ์เดิมของสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์กลาย CC-503 หรือ cw92 Mating type + (Pröschold และคณะ, 2005)

### 2.7.3 สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-4147 หรือ FUD7 (*psbA* deletion)

สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-4147 มีที่มาจาก Jacqueline Girard-Bascou สถาบัน Institut de Biologie Physico-Chimique ประเทศฝรั่งเศส ในเดือนมกราคม ค.ศ. 2007 *C. reinhardtii* CC-4147 FUD7 มี Mating type + ต้องการอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน และเป็นสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกำจัดยีน *psbA* (Minagawa และ Crofts, 1994) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีน D1 ที่มีความสำคัญต่อระบบแสงสอง เมื่อมีการกำจัดยีน *psbA* จะทำให้การแตกตัวของกระบวนการสังเคราะห์แสงไม่ทำงาน เมื่อน้ำไม่แตกตัว ส่งผลให้ออกซิเจนภายในเซลล์ลดลงและการผลิตไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมากขึ้น

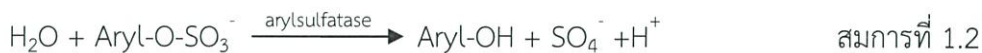
### 2.7.4 สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-503 หรือ cw92

สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-503 มีที่มาจากมหาวิทยาลัย Princeton ปี ค.ศ. 1978 สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-503 มี Mating type + เป็นสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์มาจาก *C. reinhardtii* CC-125 สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-503 มีลักษณะการกลายพันธุ์ คือ ไม่มีผนังเซลล์ (Voigt และคณะ, 1997) ซึ่งคาดว่ากรณีที่ไม่มีผนังเซลล์จะทำให้มีการปลดปล่อยไฮโดรเจนออกนอกเซลล์ได้มาก

### 2.7.5 สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-3806 หรือ sac8

สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-3806 มีที่มาจาก John Davies มหาวิทยาลัย Iowa State เดือนสิงหาคม ค.ศ. 2000 สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-3806 มี Mating type + เป็นสายพันธุ์กลายจากสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-425 โดยการปรับเปลี่ยนเมตาบอลิซึมของซัลเฟอร์ ซึ่งจะทำให้เอนไซม์เอริลซัลฟาเทส (Arylsulfatase) (ที่มา: Chlamydomonas Resource Center) เอนไซม์เอริลซัลฟาเทสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาดังสมการที่

1.2 เมื่อเอนไซม์เอริลซัลฟาเทส (Arylsulfatase) ไม่ทำงานและเซลล์มีการเจริญในสภาวะที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ ทำให้การสร้างซัลเฟตช้ากว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (John และคณะ, 1996) เมื่อการสร้างซัลเฟตซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) น้อยลง ส่งผลให้การสังเคราะห์และซ่อมแซมโปรตีน D1 ในระบบแสงสองช่วง ออกซิเจนที่มาจาก การแตกตัวของน้ำด้วยระบบแสงสองลดลง ด้วยเหตุนี้ คาดว่าจะทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงขึ้น



## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hidehiro และคณะ (2013) พบว่า การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ในอาหารที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายให้เจริญในอาหารปกติเพื่อให้ได้ชีวมวลของเซลล์สูงที่สุด ระยะที่ 2 เป็นการถ่ายโอนเซลล์จากระยะการเจริญลงในอาหารที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ สภาวะนี้จะส่งผลให้โปรตีน D1 ในระบบแสง 2 ทำงานไม่เต็มประสิทธิภาพ และมีการแตกตัวของน้ำลดลง ส่งผลให้ออกซิเจนภายในเซลล์ลดลง อีกทั้งยังทำให้การแบ่งเซลล์และการทำงานของเอนไซม์ Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) หดลง ซึ่งจะทำให้เซลล์หยุดการสะสมของแป้งในคลอโรพลาสต์ และระยะที่ 3 สาหร่ายเริ่มผลิตไฮโดรเจนโดยใช้แป้งและโปรตีนที่เหลืออยู่มาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอน

Jun และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนใน *C. reinhardtii* โดยการแปรผันความเข้มแสงตั้งแต่ 60-200 ไมโครโมลไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที ในอาหารที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ ภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ พบว่า *C. reinhardtii* ผลิตไฮโดรเจนสูงสุด คือผลิตได้ 225 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรของการเพาะเลี้ยง หรือ 2.01 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกที่มีความเข้มแสงเท่ากับ 200 ไมโครโมลไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่การผลิตไฮโดรเจนจะหยุดเมื่อความเข้มแสงเท่ากับ 300 ไมโครโมลไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เนื่องจากระบบแสงสองจะถูกยับยั้งโดยแสง (photodamage)

Hu และคณะ (2008) ในสภาวะการผลิตไฮโดรเจนโดยไม่มีแหล่งไนโตรเจน สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สามารถนำผลิตภัณฑ์และพลังงานในการสังเคราะห์ด้วยแสงมาทำการผลิตสารประกอบที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ฯลฯ ซึ่งเซลล์จะนำคาร์โบไฮเดรตที่ได้มาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนในการผลิตไฮโดรเจนได้

Benoit และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ในอาหาร Tris Acetate Phosphate (TAP) ที่มีอะซีเตทความเข้มข้น 17 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เซลล์สามารถดูดซึมสารอินทรีย์ หรืออะซีเตทไปใช้ในการเจริญและสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ ดีกว่าคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นสารอนินทรีย์ เนื่องจากอะซีเตทเป็นสารที่สลายตัวและสามารถให้พลังงานสูงแก่เซลล์ (Energetic substrate)

## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินการวิจัย

### 3.1 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง คือ สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* มีทั้งหมด 5 สายพันธุ์ โดยได้ชื่อมาจาก Chlamydomonas Resource Center ประเทศสหรัฐอเมริกา (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์	Type	Mating type	ลักษณะการกลาย
CC-124	Wild type	-	-
CC-125	Wild type	+	-
CC-4147	Mutant	+	มีการกำจัดยีน <i>psbA</i>
CC-503	Mutant	-	มีการนำผนังเซลล์ออกไป
CC-3806	Mutant	+	เมื่อเซลล์เจริญในสภาวะที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ จะไม่มีการทำงานของเอนไซม์เอริลซัลฟาเทส

ที่มา: <http://www.chlamycollection.org/>

### 3.2 สารเคมี

#### 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

อาหารสูตร Tris acetate phosphate (TAP) (ภาคผนวก ก) (Harris, 1989)

#### 3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) กรดบอริก ( $H_3BO_3$ ) (CARLO ERBA Reagents, Italy)
- 2) แกลเซียลแอซิดิกแอซิก (Glacial acetic acid,  $C_2H_4O_2$ ) (EDM Millipore, Germany)
- 3) โคบอลท์ (II) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (Fluka Chemical Corp., USA)
- 4) แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) (CARLO ERBA Reagents, Italy)
- 5) คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ) (J.T.Baker, USA)
- 6) คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) (CARLO ERBA Reagents, Italy)
- 7) ซิงค์คลอไรด์ ( $ZnCl_2$ ) (CARLO ERBA Reagents, Italy)

- 8) ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (Fluka Chemical Corp., USA)
- 9) โซเดียมอะซิเตท ( $C_2H_3O_2Na$ ) (CARLO ERBA Reagents, Italy)
- 10) โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ) (CARLO ERBA Reagents, Italy)
- 11) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Ajax Finechem, New Zealand)
- 12) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) (CARLO ERBA Reagents, Italy)
- 13) ทริซเบส (Tris-base) (Vivantis Ltd., UK)
- 14) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) (CARLO ERBA Reagents, Italy)
- 15) แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (CARLO ERBA Reagents, Italy)
- 16) แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (CARLO ERBA Reagents, Italy)
- 17) แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) (CARLO ERBA Reagents, Italy)
- 18) ฐันอาหาร (Agar) (BD Medical Technology, France)
- 19) เอทิลีนไดอะมีนเตตระแอซิติกแอซิด (Ethylene diamine tetraacetic acid , EDTA) (BDH Prolabo Chemicals, UK)
- 20) แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ( $NH_4OH$ ) (CARLO ERBA Reagents, Italy)
- 21) ไอออน (III) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) (BDH Prolabo Chemicals, UK)
- 22) ไอออน (II) ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (CARLO ERBA Reagents, Italy)
- 23) ไฮโดรคลอริก (HCl) (Ajax Finechem, New Zealand)

### 3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

อะซีโตน ( $CH_3COCH_3$ ) (Analytical grade) (Fisher Scientific, UK)

### 3.2.4 ก๊าซมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

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

## 3.3 อุปกรณ์

- 1) กระบอกตวง (Cylinder) (Kartell, Italy)
- 2) กล้องจุลทรรศน์ชนิดถ่ายภาพได้ (Nikon Eclipse Ci-L, Japan)
- 3) กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)
- 4) ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร (Vial)
- 5) เข็มฉีดยาก๊าซ (Scientific Glass Engineering, Australia)

- 6) เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD))
- 7) เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)
- 8) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)
- 9) เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
- 10) เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)
- 11) เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortechnik Z38K, Germany)
- 12) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)
- 13) เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 14) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1601, Japan)
- 15) เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)
- 16) คิวเวตต์ควอตซ์ (Quartz cuvette) (Starna Scientific, UK)
- 17) ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes) (Labnet, USA)
- 18) จานเพาะเลี้ยง (Plate) (Pyrex, USA)
- 19) ช้อนตักสาร (Spatula)
- 20) ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
- 21) ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
- 22) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 23) บีกเกอร์ (Beaker)
- 24) ปิเปตทิป (Pipette tip) ขนาดต่างๆ
- 25) พาราฟิล์มขนาด M (Parafilm) (Bemis company, USA)
- 26) ฟลาสก์ (Erlenmeyer Flask) (Pyrex, USA)
- 27) ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 28) หลอดเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge Tube)
- 29) ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) (Precicolor HBG, Germany)

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* บนอาหารแข็ง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* โดยเชื้อเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์ จากขวดเพาะเลี้ยงที่ซื้อมาจาก Chlamydomonas Resource Center ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารแข็ง TAP จากนั้น นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครอินสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3-7 วัน

#### 3.4.2 เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ในอาหารเหลว

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยเชื้อเลี้ยงจากอาหารแข็ง TAP ที่เลี้ยงไว้ข้อ 3.4.1 นำมากระจายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้น นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความเร็วในการเขย่าเป็น 120 รอบต่อวินาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครอินสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 วัน

#### 3.4.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii*

ศึกษารูปร่างลักษณะและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* โดยนำเซลล์สาหร่ายในรูปของสารละลายเซลล์ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่าง (Bright field microscope) ชนิดถ่ายภาพได้ (Nikon Eclipse Ci-L, Japan) ถ่ายภาพเซลล์ภายใต้กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า ผ่านโปรแกรม NIS-Elements

#### 3.4.4 ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii*

ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยเตรียมหัวเชื้อตามคำอธิบายในข้อ 3.4.2 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการถ่ายโอนสารละลายเซลล์จากฟลาสก์ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ล้างเซลล์ในอาหาร TAP และปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ( $OD_{750}$ ) เริ่มต้นให้เท่ากับ 0.1 ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยจะทำตัวอย่างละ 3 ข้าง จากนั้น นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความเร็วในการเขย่าเป็น 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครอินสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เก็บตัวอย่างสารละลายเซลล์ทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 78 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์ไปศึกษาความขุ่นของเซลล์โดยวัดค่า  $OD_{750}$  ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และศึกษาความหนาแน่นของเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

### 3.4.5 ศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์

สกัดคลอโรฟิลล์จากเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ด้วยตัวทำละลายอะซิโตน 90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยอัตราส่วนที่ใช้ในการสกัดคลอโรฟิลล์คือ สารละลายเซลล์ต่ออะซิโตน 90 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1:9 แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex mixer) จากนั้นนำไปปั่นในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้น นำส่วนใสตอนบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 647 และ 664 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณค่าคลอโรฟิลล์ทั้งหมดตามสมการของ Jeffrey และ Humphrey (1975) ดังนี้

$$\text{คลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = 11.93E_{664} - 1.93E_{647} \quad \text{สมการที่ 3.1}$$

$$\text{คลอโรฟิลล์ บี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = 20.36E_{647} - 5.50E_{664} \quad \text{สมการที่ 3.2}$$

$$\text{ค่าคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \text{คลอโรฟิลล์ เอ} + \text{คลอโรฟิลล์ บี}$$

### 3.4.6 วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน

การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* แบ่งเป็น 2 ระยะ

ระยะที่ 1: การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายให้ได้มวลชีวภาพสูงที่สุด

ขั้นตอนแรกจะเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ แล้วเทส่วนใสตอนบนออก ปรับปริมาตรโดยการเติมอาหาร TAP ให้ได้เซลล์เข้มข้น จากนั้น ทำการลงเชื้อ โดยการนำเซลล์เข้มข้นมาเจือจางลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ได้ค่า OD<sub>750</sub> เท่ากับ 0.1 จากนั้น นำไปปั่นบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความเร็วในการเขย่าเป็น 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครไอน์สไนด์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ระยะที่ 2: การผลิตไฮโดรเจน

การหาปริมาณไฮโดรเจนทำได้โดยเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายที่มีอายุ 36 ชั่วโมง โดยล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP, TAP ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และ TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) แล้วปรับปริมาตรด้วยอาหารแต่ละชนิดให้ได้ 5 มิลลิลิตร ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้น ฉีดก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศออกเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสาหร่ายไปปั่นบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความเร็วในการเขย่าเป็น 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครไอน์สไนด์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2, 4 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas chromatograph) ซึ่งมีสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ดังแสดงในตารางที่ 3.2 จากนั้น เลือกสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจน (ใน

หน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง) สูงที่สุด เพื่อนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจนแสดงในภาคผนวก ข

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph Thermal Conductivity Detector (GC-TCD))

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

### 3.4.7 วิธีการศึกษาสภาวะการขาดซัลเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษาสภาวะการขาดซัลเฟอร์ต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้ได้มวลชีวภาพสูงที่สุด จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายที่มีอายุ 36 ชั่วโมง โดยล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP, TAP-S แบบแทนที่แหล่งซัลเฟอร์ด้วยแร่ธาตุอื่น (TAP-S แทนที่), TAP-S แบบขาดแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S ขาด) และ TAP-S แบบเหลือแหล่งซัลเฟอร์ปริมาณน้อย (TAP-S เหลือ) โดยสูตรอาหาร TAP-S แต่ละชนิด แสดงในตารางที่ 3.3 ปรับปริมาตรเซลล์ในอาหารแต่ละชนิดให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และถ่ายในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้น ฉีดก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศออกเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความเร็วในการเขย่าเป็น 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครไอน์สไต้นต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น นำมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph)

ตารางที่ 3.3 สูตรอาหาร TAP-S แต่ละแบบ

สูตรอาหาร TAP ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย	อาหาร TAP-S	ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernicks Solution ปริมาตร 500 มิลลิลิตร	ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
1) 2X Filner's Beijernicks Solution ปริมาตร 25 มิลลิลิตร 2) โฟแทสเซียม ฟอสเฟตความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 3) Trace mineral solution ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 4) ทริซเบส (Tris-Base) ความเข้มข้น 2.42 กรัมต่อลิตร 5) แกลเซียลแอซิดิก แอซิก (Glacial Acetic Acid) หรือ อะซีเตทความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.2	1) TAP-S แบบ แทนที่แหล่ง ซัลเฟอร์	$\text{NH}_4\text{Cl}$ 8 กรัม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 กรัม $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.642 กรัม	สารละลาย Disodium EDTA 5 กรัมต่อ 400 มิลลิลิตร ที่มี pH 6.5, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.486 กรัม, $\text{ZnCl}_2$ 1.04 กรัม, $\text{H}_3\text{BO}_3$ 1.14 กรัม $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.51 กรัม, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0126 กรัม, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.073 กรัม, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.016 กรัม, สต็อก $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (สต็อกความเข้มข้น 1 โมลาร์: 6.8 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร), สต็อก $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร (สต็อกความเข้มข้น 1 โมลาร์: 8.7 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร) (ปรับ pH 7.2)
	2) TAP-S แบบ ขาดแหล่งซัลเฟอร์	$\text{NH}_4\text{Cl}$ 8 กรัม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 กรัม	สารละลาย Disodium EDTA 5 กรัมต่อ 400 มิลลิลิตร ที่มี pH 6.5, $\text{H}_3\text{BO}_3$ 1.14 กรัม, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.51 กรัม $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.073 กรัม, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.016 กรัม, สต็อก $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร (สต็อกความเข้มข้น 1 โมลาร์: 8.7 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร) (ปรับ pH 7.2)

### ตารางที่ 3.3 สูตรอาหาร TAP-S แต่ละแบบ (ต่อ)

สูตรอาหาร TAP ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย	อาหาร TAP-S	ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernicks Solution ปริมาตร 500 มิลลิลิตร	ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
1) 2X Filner's Beijernicks Solution ปริมาตร 25 มิลลิลิตร 2) โฟแทสเซียม ฟอสเฟตความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 3) Trace mineral solution ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 4) ทริซเบส (Tris-Base) ความเข้มข้น 2.42 กรัมต่อลิตร 5) แกลเซียลแอซิดิก แอซิก (Glacial Acetic Acid) หรือ อะซีเตทความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.2	3) TAP-S แบบ เหลือแหล่ง ซัลเฟอร์ปริมาณ น้อย	$\text{NH}_4\text{Cl}$ 8 กรัม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 กรัม $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.642 กรัม	สารละลาย Disodium EDTA 5 กรัมต่อ 400 มิลลิลิตร ที่มี pH 6.5, $\text{H}_3\text{BO}_3$ 1.14 กรัม, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.51 กรัม, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.016 กรัม, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.073 กรัม, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.016 กรัม, สต็อก $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร (สต็อกความเข้มข้น 1 โมลาร์: 8.7 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร) (ปรับ pH 7.2)

#### 3.4.8 ศึกษาอายุเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษาอายุเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้ได้มวลชีวภาพสูงที่สุด จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายที่มีอายุ 12, 36 และ 72 ชั่วโมง โดยล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP-S ที่แทนที่แหล่งซัลเฟอร์ แล้วปรับปริมาตรด้วยอาหาร TAP-S แทนที่ ให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้น ฉีดก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศออกเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความเร็วในการเขย่าเป็น 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครโวนส์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น นำมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas chromatograph)

### 3.4.9 ศึกษาความเข้มข้นของอะซีเตทที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษาความเข้มข้นของอะซีเตทที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้ได้มวลชีวภาพสูงที่สุด จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายที่มีอายุ 36 ชั่วโมง โดยล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของอะซีเตท 17.4 มิลลิโมลาร์, TAP-S แทนที่ ที่มีความเข้มข้นอะซีเตท 1.74, 17.4, 174 และ 1,740 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยอาหาร TAP แบบต่างๆ ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 5 มิลลิลิตร ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้น ฉีดก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศออกเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความเร็วในการเขย่าเป็น 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครโหนดต่อตารางเมตร ต่อวินาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น นำมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph)

#### 3.4.10 ศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้ได้มวลชีวภาพสูงที่สุด จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายที่มีอายุ 36 ชั่วโมง โดยล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP-S แทนที่ ที่มีความเข้มข้นอะซีเตท 1.74 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุทธิ 5 มิลลิลิตร ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้น ฉีดก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศออกเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความเร็วในการเขย่าเป็น 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 0, 40, 80 และ 120 ไมโครโหนดต่อตารางเมตร ต่อวินาที ตามลำดับ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น นำมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph)

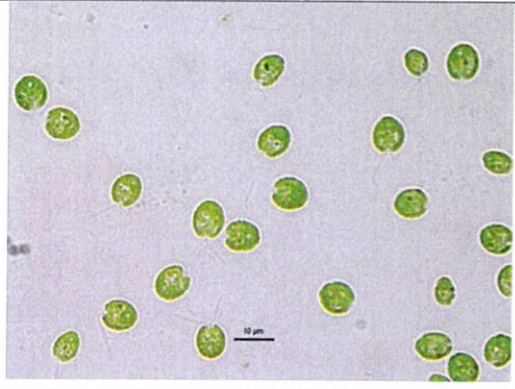
## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

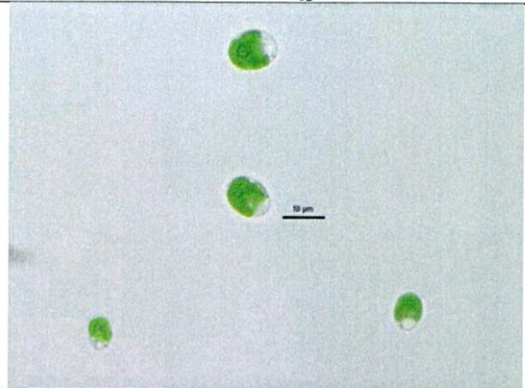
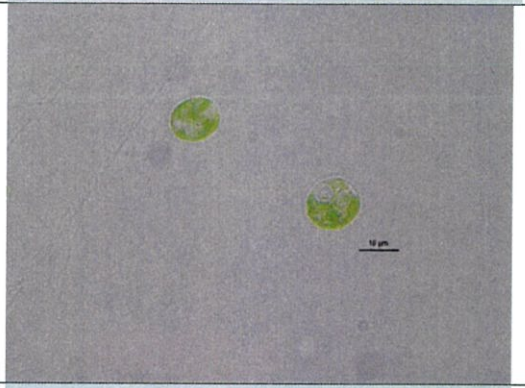
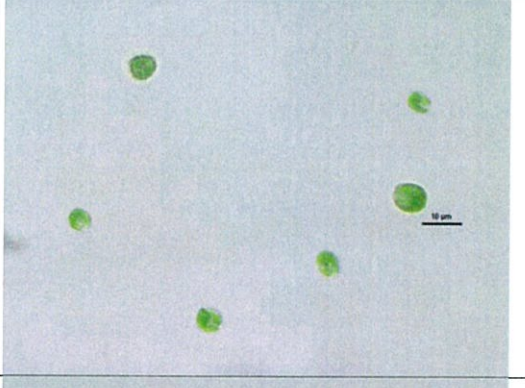
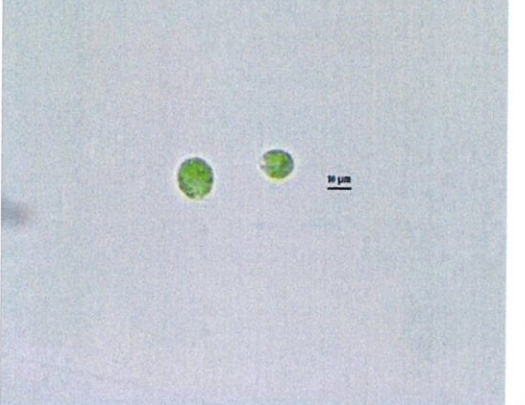
#### 4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* 5 สายพันธุ์

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-124, CC-125, CC-4147, CC-503 และสายพันธุ์ CC-3806 จาก Chlamydomonas Resource Center มาศึกษารูปร่าง ลักษณะและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ โดยส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบพื้นหลังสว่าง (Nikon Eclipse Ci-L, Japan) ที่กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า และถ่ายภาพผ่านโปรแกรม NIS-Elementsn พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิม CC-124 และ CC-125 และสายพันธุ์กลาย CC-4147 และ CC-3806 มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ เซลล์มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว สีเขียว รูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา 2 เส้น มีเม็ดแป้งกระจายทั่วเซลล์ และมีอัยสปอตสีแดง สำหรับสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-503 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลาย เซลล์จะมีลักษณะไม่ค่อยเป็นรูปร่างชัดเจนและบิดเบี้ยวเล็กน้อย เนื่องจากเป็นเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า

สายพันธุ์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ลักษณะ
CC-124		มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว สีเขียว รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา 2 เส้น มีเม็ดแป้งกระจายทั่วเซลล์

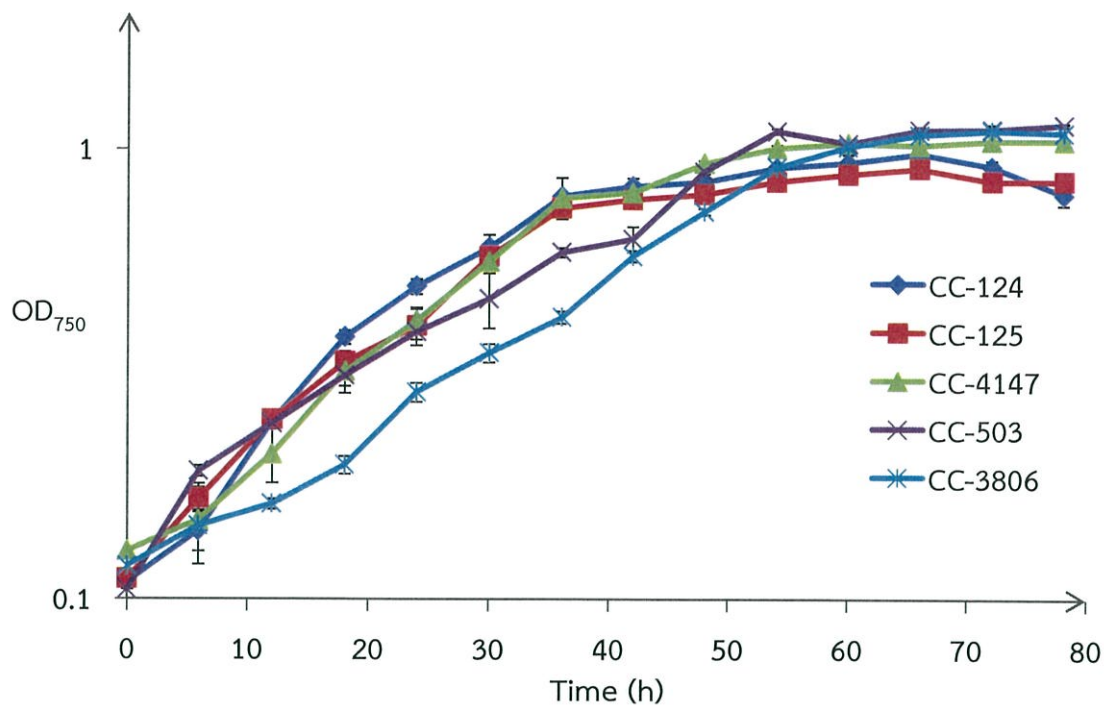
ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า (ต่อ)

สายพันธุ์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ลักษณะ
CC-125		มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว สีเขียว รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา 2 เส้น มีเม็ดแป้งกระจายทั่วเซลล์
CC-4147		มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว สีเขียวมีลักษณะเป็นวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา 2 เส้น มีเม็ดแป้งกระจายทั่วเซลล์
CC-503		มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว สีเขียว รูปร่างไม่แน่นอน เนื่องจากไม่มีผนังเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 10 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา 2 เส้น มีเม็ดแป้งกระจายทั่วเซลล์
CC-3806		มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว สีเขียวมีลักษณะเป็นวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา 2 เส้น มีเม็ดแป้งกระจายทั่วเซลล์

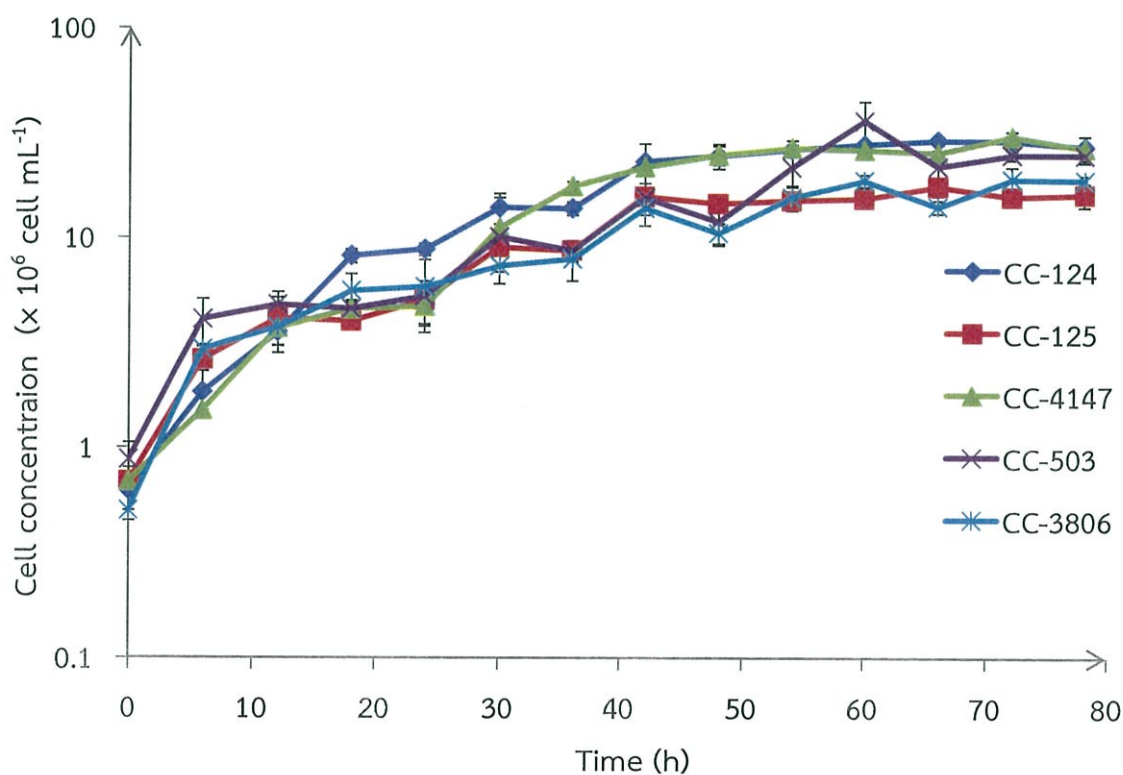
#### 4.2 ผลศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* 5 สายพันธุ์

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์ เป็นเวลา 78 ชั่วโมง ในอาหาร TAP ที่เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่าเป็น 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที วัดค่าความขุ่นของเซลล์โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร วัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และผลการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิม CC-124 และ CC-125 และสายพันธุ์กลาย CC-4147 และ CC-503 มีการเจริญเติบโตโดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรใกล้เคียงกัน เซลล์มีการเจริญเติบโตแบ่งเป็น 3 ระยะ คือ ระยะ Lag ในช่วง 0-6 ชั่วโมง ระยะ Log ในช่วง 6-34 ชั่วโมง และระยะ Stationary ในช่วง 54-78 ชั่วโมง ในขณะที่สาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-3806 มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าสายพันธุ์อื่นอย่างเห็นได้ชัด โดยจะมีระยะ lag นานถึง 12 ชั่วโมง (รูปที่ 4.1)

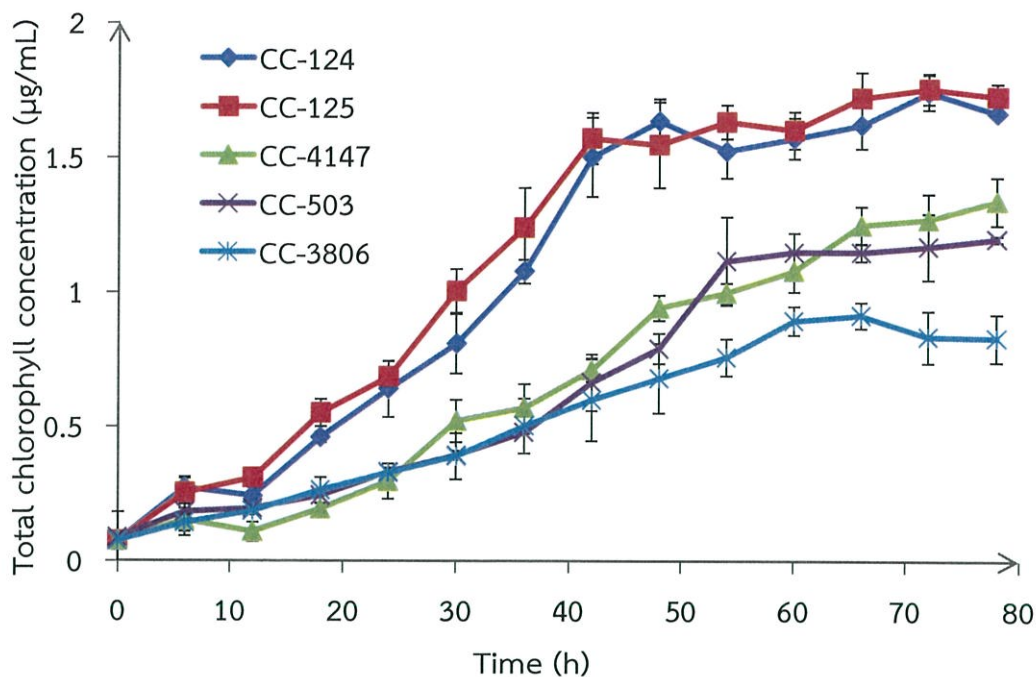
จากการวัดความหนาแน่นของเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหาร TAP พบว่า สาหร่ายทุกสายพันธุ์มีความหนาแน่นของเซลล์ที่ใกล้เคียง (รูปที่ 4.2) จากการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-124 และ CC-125 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมมีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดสูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์กลาย CC-503, CC-4147 และ CC-3806 ในทุกช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.3) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-4147 มีการกลายพันธุ์โดยกำจัดระบบแสงสองออกไป จึงมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ภายในเซลล์ลดลง ส่วนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-503 ซึ่งมีการกลายพันธุ์โดยกำจัดผนังเซลล์ออกไป อาจส่งผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ (Lili และคณะ, 2016) ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-3806 น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมเพราะเซลล์มีการกลายพันธุ์ โดยไม่มีการทำงานของเอนไซม์เอริลซิลฟาเทส ทำให้การสร้างซิลิเพตช้ากว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (John และคณะ, 1996) ส่งผลให้การสังเคราะห์โปรตีนในระบบแสงลดลง การรับแสงและปริมาณคลอโรฟิลล์จึงน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม



รูปที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ที่ช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงต่างๆ



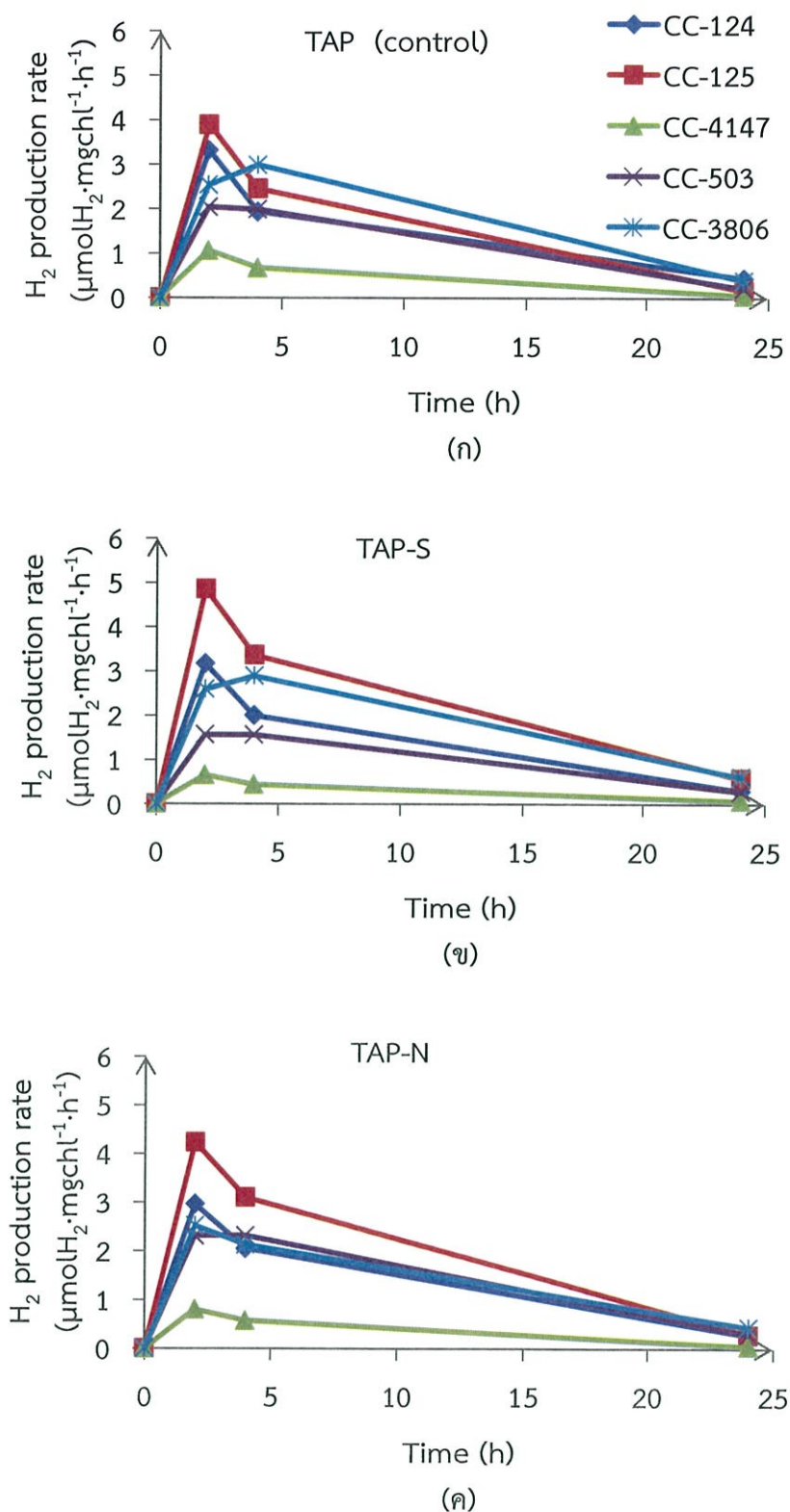
รูปที่ 4.2 ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เวลาของการเพาะเลี้ยงต่างๆ



รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของสาหร่าย *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เวลาของการเพาะเลี้ยงต่างๆ

#### 4.3 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน

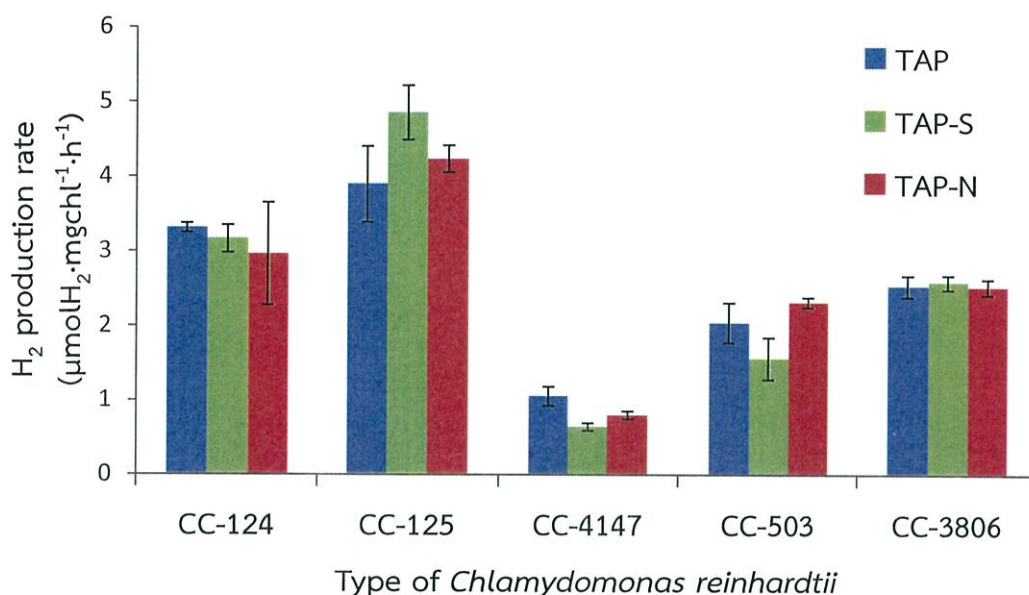
จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP, อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ในสภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครโวนส์ต่อตารางเมตรต่อวินาที จากนั้น วิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟที่ชั่วโมงที่ 2, 4 และ 24 ภายหลังจากไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน 10 นาที พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 2 ในอาหารทั้ง 3 ชนิด และอัตราการผลิตไฮโดรเจนจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจน ที่ช่วงเวลาต่างๆ (ภายหลังการไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน) ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* 5 สายพันธุ์ ในอาหาร TAP (ก) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) (ข) และ อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) (ค)

จากการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ที่เวลา 2 ชั่วโมง พบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์อื่นๆ โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $3.90 \pm 0.50$ ,  $4.86 \pm 0.36$  และ  $4.24 \pm 0.18$  ไมโครกรัมไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่า การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *C. reinhardtii* ขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์ของสาหร่าย จากการทดลองนี้ สาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิมมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ไม่ว่าจะเป็น การขาดโปรตีน D1 การขาดผนังเซลล์ และการขาดเอนไซม์เอริลซิลฟาเทส ทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง สาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์กลายทั้ง 3 สายพันธุ์ อาจมีเมตาบอลิซึมของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยที่เห็นเด่นชัด คือ ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง (รูปที่ 4.3) ซึ่งอาจส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง เมื่ออัตราการสังเคราะห์แสงลดลง ทำให้ขาดอิเล็กตรอนในระบบการสังเคราะห์แสง ส่งผลให้อิเล็กตรอนที่ได้ไม่เพียงพอสำหรับการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง

จากการศึกษาอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 ในอาหาร 3 ชนิด คือ อาหาร TAP, อาหาร TAP ที่ปราศจากไนโตรเจน (TAP-N) และ อาหาร TAP ที่ปราศจากซิลเฟออร์ (TAP-S) พบว่า สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อบ่มในอาหาร TAP-S โดยมีอัตราการผลิตเท่ากับ  $4.86 \pm 0.36$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.5) ภายใต้สภาวะที่ขาดซิลเฟออร์ สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนสูง เนื่องจากการขาดซิลเฟออร์ จะส่งผลให้โปรตีน D1 ในระบบแสงสองทำงานไม่เต็มประสิทธิภาพ และมีการแตกตัวของน้ำลดลง ซึ่งจะทำให้ออกซิเจนภายในเซลล์ลดลง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงไม่ถูกยับยั้งด้วยออกซิเจน ทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Hidehiro และคณะ, 2013) ดังนั้น จึงคัดเลือกสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป



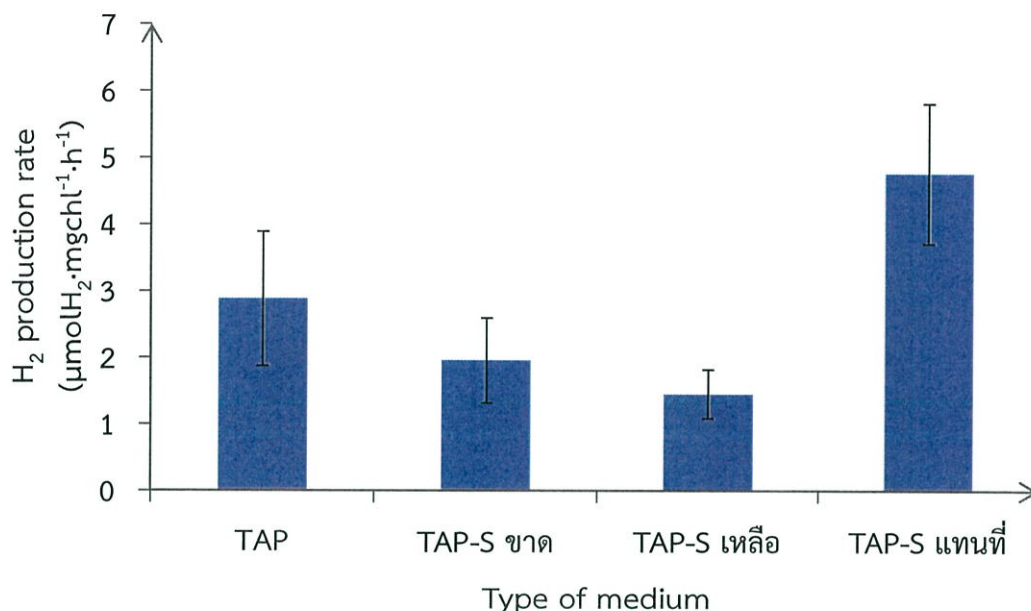
รูปที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* 5 สายพันธุ์ ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) และ อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ภายหลังจากให้ก๊าซอาร์กอนและบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

#### 4.4 ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่คัดเลือก

##### 4.4.1 ผลการศึกษาสถานะการขาดซัลเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125

จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP-S แบบแทนที่ แบบเหลือ และแบบขาดแหล่งซัลเฟอร์ (ตามวิธีในข้อ 3.4.7) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบการเขย่า 120 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิแสง 40 ไมโครไอน์สต่อตารางเมตรต่อวินาที และวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีภายหลังการไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนและบ่มไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด คือ  $4.76 \pm 1.05$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มในอาหาร TAP-S แบบแทนที่ (รูปที่ 4.6) เนื่องจากอาหาร TAP-S แบบแทนที่แหล่งซัลเฟอร์ ยังเหลือแร่ธาตุสำคัญหลายชนิดที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ อาทิเช่น เหล็กมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์แสง เป็นองค์ประกอบของโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการรับส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ และทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์อีกด้วย สังกะสีมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด ถ้าขาดไปจะทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายหยุดชะงัก เป็นต้น ด้วยเหตุนี้ สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 ที่ผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP-S แบบแทนที่ซึ่งมีการทำงานกระบวนการที่สำคัญต่อการ

ผลิตไฮโดรเจนในระดับสูง ดังนั้น จึงได้ใช้อาหาร TAP-S แบบแทนที่แหล่งซัลเฟอร์ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 ในอาหาร TAP-S แบบต่างๆ ภายหลังจากการให้ก๊าซอาร์กอนและบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

#### 4.4.2 ผลการศึกษาอายุเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 ที่มีอายุเซลล์ 12, 36 และ 72 ชั่วโมงมาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP-S แบบแทนที่แหล่งซัลเฟอร์ ภายหลังจากไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน 10 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเขย่า 120 รอบต่อ นาที ภายใต้อายุแสง 40 ไมโครอินสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 ที่มีอายุ 36 ชั่วโมงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลได้ (Yield) ของไฮโดรเจนมากที่สุด เท่ากับ  $2.89 \pm 0.27$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมงและ  $20.13 \pm 1.88$  มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรของอาหารเพาะเลี้ยง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) เนื่องจากการผลิตไฮโดรเจนนั้นใช้อิเล็กตรอนและโปรตอนเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา อิเล็กตรอนที่ใช้ส่วนใหญ่ได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์แสง สาหร่ายที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง จะมีการสังเคราะห์แสงสูงที่สุด เนื่องจากเป็นอายุเซลล์ที่อยู่ในระหว่างการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ ทำให้ต้องมีการสังเคราะห์แสงมากเพื่อผลิต

คาร์โบไฮเดรตเก็บไว้ในเซลล์ เซลล์อายุ 36 ชั่วโมง จึงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ดังนั้น จึงนำเซลล์อายุ 36 ชั่วโมงไปใช้ในศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และ ผลได้ของไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 ที่มีอายุเซลล์ 12, 36 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ในอาหาร TAP-S แบบแทนที่ภายหลังการไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนและบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

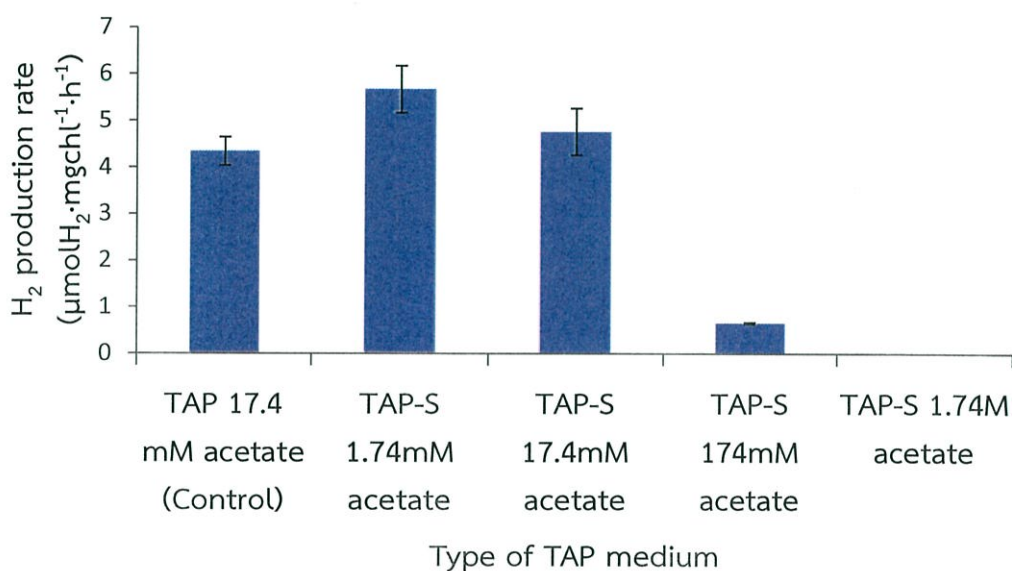
อายุเซลล์ (ชั่วโมง)	อัตราการผลิตไฮโดรเจน ( $\mu\text{molH}_2 \cdot \text{mgchl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	ผลได้ (yield) ของไฮโดรเจน ( $\text{mLH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \text{ culture}$ )
12	0.93±0.46	10.71±1.31
36	2.89±0.27	20.13±1.88
72	1.31±0.15	12.57±1.48

#### 4.4.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นอะซีเตทที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125

จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 ที่มีอายุ 36 ชั่วโมงมาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP-S แบบแทนที่แหล่งซัลเฟอร์ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของอะซีเตท 1.74, 17.4, 174 และ 1,740 มิลลิโมลาร์ โดยมีอาหาร TAP ที่มีซัลเฟอร์ปกติและมีอะซีเตทเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์เป็นอาหารควบคุม ภายหลังการไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน 10 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเขย่า 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ พบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-S ที่มีความเข้มข้นอะซีเตท 1.74 มิลลิโมลาร์ หรือ 0.1 เท่าของอะซีเตทที่ใช้ในสูตรอาหาร TAP ดั้งเดิม ซึ่งจะทำให้มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $5.67 \pm 0.50$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง แต่อัตราการผลิตจะค่อยๆ ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะซีเตท และจะไม่พบการผลิตไฮโดรเจนเมื่อมีอะซีเตทเข้มข้น 1.74 โมลาร์ ในอาหาร (รูปที่ 4.7)

อะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอนที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* เนื่องจากเป็นสารที่สลายตัวและให้พลังงานได้ง่าย (Benoit และคณะ, 2010) อะซีเตทมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของระบบแสงสอง โดยมีรายงานว่าอะซีเตททำให้ระบบแสงสองรับพลังงานแสงได้มากขึ้นในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* (Thomas และคณะ, 2013) มีผลทำให้สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* เจริญเติบโตได้ดี มีแหล่งอิเล็กตรอนจากการทำงานของระบบแสงสองมากขึ้น ทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น นอกจากนี้ มีการรายงานว่าอะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอนสำคัญ

ที่ทำให้สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ผลิตไฮโดรเจนสูงมากที่สุด (Kosourov และคณะ, 2003, 2007; Fouchard และคณะ, 2005; Kamp และคณะ, 2008) และ 40 ชั่วโมงแรกของการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์สำหรับสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* จะใช้อะซิเตทอย่างรวดเร็ว (Kosourov และคณะ, 2003; Fouchard และคณะ, 2005) ความเข้มข้นของอะซิเตทซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนหรือซับสเตรทนั้นมีความสำคัญมากต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย ถ้ามีซับสเตรทมากเกินไปจะทำให้เกิด การยับยั้งโดยซับสเตรท (Substrate inhibition) หรือถ้าใช้น้อยเกินไป เซลล์อาจจะใช้ในการเจริญเติบโตก่อนที่จะนำมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจน ทำให้คาร์บอนไม่เพียงพอต่อการผลิตไฮโดรเจน ดังนั้น ในการทดลองต่อไป จะใช้อาหาร TAP-S ที่มีความเข้มข้นอะซิเตท 1.74 มิลลิโมลาร์ ในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 ต่อไป



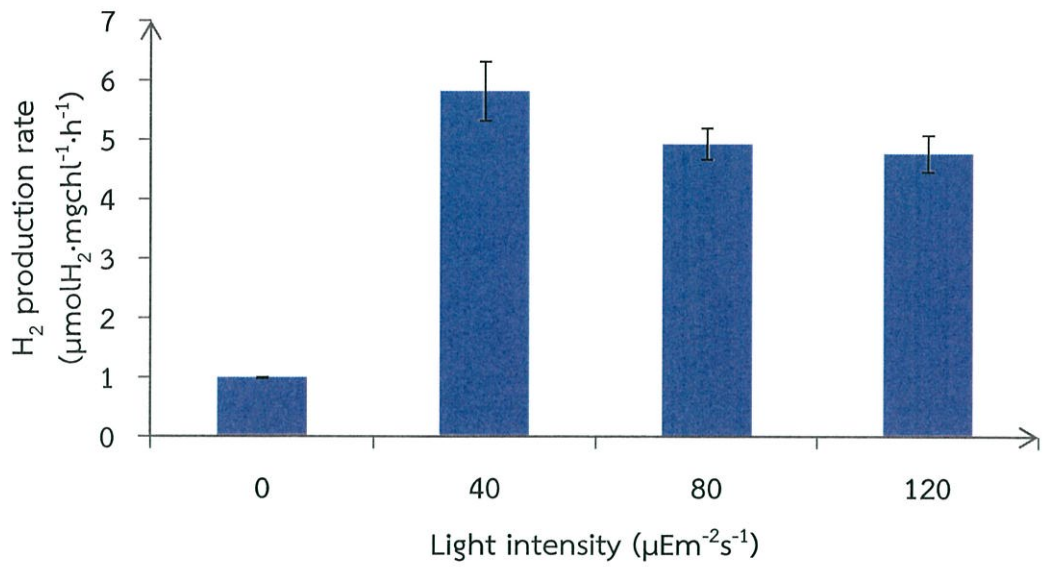
รูปที่ 4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนภายหลังการไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนและบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 ในอาหาร TAP-S ที่ความเข้มข้นอะซิเตทต่างๆ โดยใช้อาหาร TAP ที่มีอะซิเตทเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ เป็นอาหารควบคุม

#### 4.4.4 ผลการศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125

จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 ที่มีอายุ 36 ชั่วโมงมาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP-S ที่มีความเข้มข้นของอะซิเตท 1.74 มิลลิโมลาร์ โดยภายหลังการไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน 10 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเขย่า 120 รอบต่อนาที ภายใต้การแปรผันความเข้มแสง 0, 40, 80 และ 120 ไมโครอินสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ตามลำดับ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ พบว่า ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครอินสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที สาหร่าย

สีเซีย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด คือ  $5.82 \pm 0.50$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.8)

แสงเป็นพลังงานที่ใช้ในการกระตุ้นให้อิเล็กตรอนจากระบบแสงสองหลุดออกมา ส่งผลให้น้ำเกิดการแตกตัวได้อิเล็กตรอนโดยระบบแสงสอง อิเล็กตรอนจากการแตกตัวของน้ำเคลื่อนย้ายไปสู่ระบบแสงหนึ่งผ่านตัวรับอิเล็กตรอนหลายตัว จนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย คือ เฟอร์รีดอกซิน ในสภาวะการผลิตไฮโดรเจน อิเล็กตรอนจะถูกนำไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ความเข้มแสงมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเซีย *C. reinhardtii* ภายหลังจากไล่อากาศ สาหร่ายสีเซีย *C. reinhardtii* จะเข้าสู่สภาวะที่ไม่มีอากาศโดยสมบูรณ์ และนำไปบ่มภายใต้แสงทันทีส่งผลให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานผลิตไฮโดรเจนได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ ความเข้มแสงยังมีผลต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ ซึ่งจะเพิ่มขึ้นในช่วง 24 ชั่วโมงแรก (Jun และคณะ, 2006) ทำให้มีอิเล็กตรอนที่มากจากการแตกตัวของน้ำโดยระบบแสงสองมีมากขึ้น ส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้นเมื่อมีความเข้มแสงมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ถ้าความเข้มแสงสูงเกินไปจนถึงระดับหนึ่งจะทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง เพราะความเข้มแสงมากขึ้นมีผลทำให้ซัลเฟตภายในเซลล์ลดลง (Jun และคณะ, 2006) และในสภาวะที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์จะส่งผลให้มีออกซิเจนลดลง ซึ่งมาจากการเปลี่ยนแปลงของสารตัวกลางในศูนย์กลางระบบแสงสอง (Melis, 2002) สารตัวกลางในระบบแสงสองเปลี่ยนแปลงมาจากโปรตีน D1 ถูกทำลายโดยแสงเนื่องจากไม่มีกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ เมทไทโอนีน (Methionine) และซิสเทอีน (Cysteine) ทำให้เซลล์ไม่มีประสิทธิภาพพอที่จะสามารถซ่อมแซมระบบแสงสองได้ นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบว่า ความเข้มแสงสูงจะทำให้อัตราการแตกตัวของน้ำได้ออกซิเจนสูงขึ้น (Wykoff และคณะ, 1998) ซึ่งส่งผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสลดลง ในส่วนของการบ่มเซลล์ในสภาวะไม่มีอากาศในที่มืด (Dark fermentation) สาหร่ายสีเซีย *C. reinhardtii* ยังสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ เพราะเซลล์จะใช้น้ำตาลที่สะสมภายในเซลล์เป็นแหล่งอิเล็กตรอนในการผลิตไฮโดรเจน (Wang และคณะ, 2008)



รูปที่ 4.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนภายหลังการให้ก๊าซอาร์กอนและบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 ในอาหาร TAP-S ความเข้มข้นอะซีเตท 1.74 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

1) จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เซลล์ของสาหร่ายทั้ง 5 สายพันธุ์มีลักษณะโดยรวมคล้ายคลึงกัน คือ มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว สีเขียว รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา 2 เส้น มีเม็ดแป้งกระจายทั่วเซลล์ และมีอายุสปีดสีแดง โดยมีเพียงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-503 ที่มีลักษณะไม่ค่อยเป็นรูปร่างชัดเจนเนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ปราศจากผนังเซลล์

2) จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์ สรุปได้ว่า *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์มีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน แต่สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิมมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงกว่าสายพันธุ์กลายในทุกช่วงเวลาทำการเพาะเลี้ยง

3) จากการคัดเลือกสายพันธุ์ของสีเขียว *C. reinhardtii* ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด สรุปได้ว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิม CC-125 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $4.86 \pm 0.36$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

4) สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 คือ อายุเซลล์ 36 ชั่วโมง บ่มในอาหาร TAP-S แบบแทนที่แหล่งซัลเฟอร์ ที่มีความเข้มข้นของอะซิเตท 1.74 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลอินสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบการเขย่า 120 รอบต่อนาที โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $5.82 \pm 0.50$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเทียบกับสภาวะปกติ พบว่า *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นร้อยละ 20

### 5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 เพิ่มเติม เช่น pH อุณหภูมิ และแหล่งคาร์บอน เป็นต้น

## เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงพลังงาน. 2550. ไบโอดีเซล สาหร่ายจะกลายเป็นทอง. สืบค้นเมื่อ 16 กันยายน 2552 จาก:  
<http://www.energyfantasia.com/ef4/pedia/pediashow.php?show=399>.
- ยุวดี พิรพรพิศาล. 2546. สาหร่ายวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- อภารัตน์ มหาจันทร์. 2551. พลังสาหร่าย พลังอนาคต. สืบค้นเมื่อ 16 กันยายน 2552 จาก:  
[http://www.adeq.or.th/web/news/news\\_env\\_detail.php?id=18](http://www.adeq.or.th/web/news/news_env_detail.php?id=18).
- อัญชลี ศิริขจรกิจ. 2011. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*Chlamydomonas reinhardtii*) กับงานวิจัยทางพันธุศาสตร์. Thai J. Genet. 4(1) : 9-21.
- Bak, T., Nowotny, J., Rekas, M. and Sorrell, C. C. 2002. Photo-electrochemical hydrogen generation from water using solar energy. Materials-related aspects. Int. J. Hydrogen Energy. 27:991-1022.
- Benoit D., Jeremy P., Gwendoline C., Jean Francois C., Guillaume C., Jack L. 2010. Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. International journal of hydrogen energy. 35:10741-10749.
- Esquivel MG, Amaro HM, Pinto TS, Fevereiro PS, Malcata FX. 2011. Efficient H<sub>2</sub> production via *Chlamydomonas reinhardtii*. Trends Biotechnol. 29:595-600.
- Fouchard, S., Hemschemeier, A., Caruana, A., Pruvost, J., Legrand, J., Happe, T., Peltier, G., Cournac, L., 2005. Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6199–6205.
- Gaffron, H. and Rubin, J. 1942. "Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae." J. Gen. Physiol. 26: 219-240.
- Ghirardi ML, Togasaki RK, Seibert M. 1997. Oxygen sensitivity of algal H<sub>2</sub>-production. Appl Biochem Biotechnol. 63:141-51.
- Grossman AR, Catalanotti C, Yang W, Dubini A, Magneschi L, Subramanian V, et al. 2011 Multiple facets of anoxic metabolism and hydrogen production in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. New Phytol. 190:279-88.
- Harris, E.H. 1989: The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, San Diego, 780pp.
- Harris, E.H. 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52: 363-406.

- Healey, F.P. 1970. The mechanism of hydrogen evolution in *Chlamydomonas moewusii*. *Plant Physiol.* 45: 153-159.
- Hidehiro S., Hajime M., Masaharu K., Kazuhito I. 2013. Photobiological hydrogen production: Bioenergetics and challenges for its practical application. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews.* 17:1-25.
- Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *J. Plant.* 54 (4), pp. 621–639
- Jeffrey S.W. and Humphrey G.F. 1975. New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c<sub>1</sub> and c<sub>2</sub> in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP).* Bd. 167, S. 191-194.
- John P.D., Fitnat H.Y., Arthur G. 1996. Sac1, a putative regulator that is critical for survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur deprivation. *The EMBO Journal* vol. 15 no. 9 pp. 2150-2159.
- John R.P., Anisha G.S., Nampoothiri K.M., Pandey. 2011. A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresour Technol.* 102: 186-93.
- Jun P.K., Chang D.K., Tai H.P., Mi S.K., Sang J.S. 2006. Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture. *International journal of Hydrogen Energy.* 31:1585-1590.
- Kamp, C., Silakov, A., Winkler, M., Reijerse, E.J., Lubitz, W., Happe, T. 2008. Isolation and first EPR characterization of the [FeFe]-hydrogenases from green algae. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 410–416.
- Kessler, E. 1974. Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genera *Ankistrodesmus* and *Scenedesmus*. *Arch. Microbiol.* 113: 143-144.
- Kosaric, N. and Lyng, R.P. 1988. Microbial production of hydrogen. In: Rehm, H. J. [Eds], *Biotechnology Vol. 6b (special microbial process)*. VCH. Pp. 101-134.
- Kosourov, S., Seibert, M., Ghirardi, M.L. 2003. Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived H<sub>2</sub>-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *Plant Cell Physiol.* 44, 146–155.
- Kruse O, Hankamer B. 2010. Microalgal hydrogen production. *Curr Opin Biotechnol.* 21: 238-43.
- Lecler R, Godaux D, Vigeolas H, Hilgsmann S, Thonart P, Franck F, et al. 2011. Functional analysis of hydrogen photoproduction in respiratory-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int J Hydrogen Energy.* 36:9562-70.
- Lili Xu, Dezhi Li, Quanxi Wang, Shuangxiu Wu. 2016. Improved hydrogen production and biomass through the co-cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* and

- Bradyrhizobium japonicum*. International journal of hydrogen energy. 41: 9276-9283.
- Maness, P.C., Yu, J., Eckert, C. and Ghirardi, M.L. 2009. Photobiological hydrogen production prospects and challenges: Efforts to scale up the capacity of green algae and cyanobacteria to use sunlight to convert water into hydrogen gas for energy use. *Microbe*. 6(4): 275-280.
- Melis, A. and Happe, T. 2001. Hydrogen production: green algae as a source of energy. *Plant Physiol*. 3: 740-748.
- Melis A. Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. 2002. *Int J Hydrogen Energy*; 27: 1217–28.
- Minagawa J, Crofts AR. 1994. A robust protocol for site-directed mutagenesis of the D1 protein in *Chlamydomonas reinhardtii*: A PCR-spliced *psbA* gene in a plasmid conferring spectinomycin resistance was introduced into a *psbA* deletion strain. *Photosynth Res* 42:121-131.
- Posewitz, M.C., Dubini, A., Meuser, J.E., Seibert, M. and Ghirardi, ML. 2009. Hydrogenases, hydrogen production and anoxia. In *Organellar and Metabolic Processes*, edn 2. Edited by Stern DB. In *The Chlamydomonas Sourcebook*, Vol. 2. Edited by Harris EE. *The Chlamydomonas Sourcebook*. Vol. 2 Academic Press. 217-246.
- Pröschold T, Harris EH, Coleman AW. 2005. Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 170:1601-1610.
- Schulz, R., Schnackenberg, J., Stangier, K., Wünschiers, R., Zinn, T. and Senger, H. 1998. Light-dependent hydrogen production of the green algae. In: Zaborsky et al. [Eds], *BioHydrogen*. Plenum Press, New York.
- Stephenson M, Stickland LH. 1931. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *Biochem J*. 25(1):205–214.
- Thomas R., Arezki S., Anja Krieger-L. 2013. Acetate in mixotrophic growth medium affects photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* and protects against photoinhibition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1827; 1183–1190.
- Voigt J, Hinkelmann B, Harris EH. 1997. Production of cell wall polypeptides by different cell wall mutants of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbiol Res* 152:189-198.

- Wang SP, Cao YC, Li ZJ, Yang YY, Chen SW. 2008 The relationship between bacteria and microalgae in water environment and its practical application. *South China Fish Sci*; 4(1): 76-80.
- Wykoff D.D., Davies J.P., Melis A., and Grossman A.R. 1998. The Regulation of Photosynthetic Electron Transport during Nutrient Deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*. 117: 129–139.
- Yang ZM, Guo RB, Xu XH, Fan XL, Luo SJ. 2011 Hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgal biomass residues. *Int J Hydrogen Energy*. 36: 3465-70.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris acetate phosphate (TAP)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

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

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

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

แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

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

เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	2.2	กรัม
กรดบอริก ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.51	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.016	กรัม
โซเดียมโมลิเบตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.073	กรัม
โคบอลตคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.016	กรัม

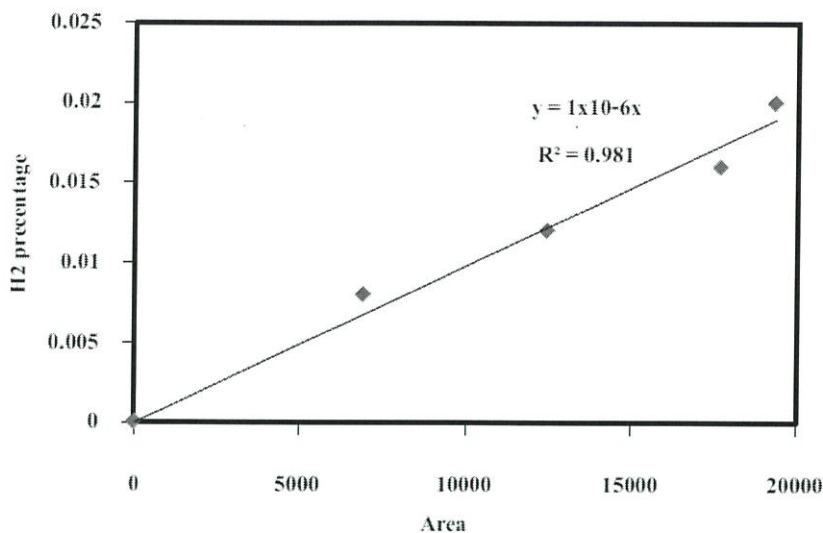
ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารละลายจะมีสีเหลืองเขียว เปลี่ยนเป็นสีม่วง หลังจากนั้น เติมสารตามด้านล่าง ตามลำดับ

20 ml 1M stock โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (1M stock: 6.8 กรัม /50มิลลิลิตร)

30 ml 1M stock ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (1M stock: 8.7 กรัม /50 มิลลิลิตร)

(ปรับพีเอช 7.2) สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น 1.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร

## ภาคผนวก ข



รูปที่ ก กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของไฮโดรเจน

### วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

- 1) นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ (%) จากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ข)
- 2) นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละมาเปรียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร
- 3) นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาเปรียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิโมล โดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาณไฮโดรเจน 1 มิลลิโมล
- 4) นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมงจะได้ ปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมง
- 5) นำปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมงที่ได้มาหารปริมาณคลอโรฟิลล์จะได้หน่วยเป็น ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง