

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว *Chlorella* sp. KLSc59

HYDROGEN PRODUCTION OF UNICELLULAR GREEN ALGA

*Chlorella* sp. KLSc59



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2562

KMITL-2018-SC-M-012-012

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlorella* sp. KLSc59

HYDROGEN PRODUCTION OF UNICELLULAR GREEN ALGA

*Chlorella* sp. KLSc59



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ KMITL-2018-SC-M-012-012 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# HYDROGEN PRODUCTION OF UNICELLULAR GREEN ALGA

*Chlorella* sp. KLSc59



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

2019

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ KMUTL-2018-SC-M-012-012 กรุณาให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2019

FACULTY OF SCIENCE

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ลงนามในสภาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc59
ชื่อนักศึกษา	นางสาวธนพร ศิริพัฒนามงคล
รหัสประจำตัว	59605023
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เคมี)
ภาควิชา	เคมี
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์

### บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการเปลี่ยนพลังงานแสงไปเป็นพลังงานเคมีในรูปของไฮโดรเจน โดยโปรตอนและอิเล็กตรอนในเซลล์จะถูกเร่งด้วยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อเกิดเป็นไฮโดรเจนงานวิจัยนี้ได้ทำการแสดงสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว KS03 ที่แยกได้จากแหล่งน้ำจืดภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผลการติดตามยีนและการศึกษาแผนภูมิต้นไม้มของยีน 18S rDNA บ่งชี้ว่าสาหร่ายดังกล่าวถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *Chlorella* sp. จึงให้ชื่อว่า *Chlorella* sp. KLSc 59 นอกจากนี้การศึกษาการติดตามยีนไฮโดรจีเนสทั้งในระดับจีโนมิกและอาร์เอ็นเอยังไม่ประสบความสำเร็จ ต่อมาได้ศึกษาการปรับสภาวะการผลิตไฮโดรเจนโดยจะทำการปรับสภาวะเซลล์สาหร่ายภายใต้ปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นเซลล์ การบดบังของเซลล์ ปัจจัยของอากาศ ความเข้มแสง ชนิดของแหล่งคาร์บอน การขาดธาตุอาหาร ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอิทธิพลของสารรีดิวซ์ ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ที่มีค่าความความขุ่นของเซลล์ที่ 0.1 ในอาหาร TAP มีค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนอยู่ที่ 7.0-7.2 โดยทำการพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่ออกซิเจน ในสภาวะการบ่มแบบเขย่าที่ความเข้มแสง 3,800 ลักซ์ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด นอกจากนี้เมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายในอาหารเหลวโดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ หรือบ่มเซลล์ภายใต้อาหารเหลวที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ พบว่า ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้ อย่างไรก็ตามเมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายให้อยู่ในอาหารเหลวที่เติมเอทานอล ไดไทโอไนต์ หรือนิโคตินาไมด์อะดะนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนได้ สภาวะที่ดีที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ทำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้ 255.21 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ซึ่งคิดเป็นการเพิ่มผลผลิตได้ประมาณ 43 เปอร์เซ็นต์จากการตรวจพบครั้งแรก

**คำสำคัญ :** 18s rDNA การผลิตไฮโดรเจน การแสดงลักษณะ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Thesis Title</b>	Hydrogen production of unicellular green alga <i>Chlorella</i> sp. KLSc59
<b>Student Name</b>	Thanaporn Sirawattanamongkol
<b>Student ID</b>	59605023
<b>Degree</b>	Master of Science (Chemistry)
<b>Department</b>	Chemistry
<b>Year</b>	2019
<b>Thesis Advisor</b>	Asst. Prof. Dr. Patchanee Charoenying
<b>Thesis Co-advisor</b>	Asst. Prof. Dr. Cherdasak Maneeruttanarungroj

### Abstract

Green algae are able to convert solar energy into chemical energy using proton and electron which are catalyzed by hydrogenase enzyme to form a molecular hydrogen. In this study, a previously isolated green alga KS03 isolated from fresh water source located in King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) was identified and characterized. The 18s rDNA phylogenetic tree determination was performed and found that this alga is belonging to *Chlorella* sp. group which later named as *Chlorella* sp. KLSc59. Moreover, the monitoring of hydrogenase gene in levels of genomic DNA and RNA was not successful in this study. Later, several parameters were optimized for enhancing hydrogen production such as cell density, cell stacking, effect of air, light intensity, carbon source, nutrients deprivation, pH, and the effect of reducing agent. The results showed that green alga *Chlorella* sp. KLSc59 culture shaking with the final-OD<sub>750</sub> of 0.1 could enhance the hydrogen production when grown in TAP with pH of 7.0-7.2 and purging with argon gas for eliminating atmospheric oxygen in head space, incubated under the light intensity of 3,800 lux. Moreover, incubation of the cells in TAP with various carbon sources and nutrient deprivations resulted in no increases of hydrogen production. However, incubation of the cells in TAP with ethanol, dithionite or NADH could enhance the hydrogen production. The optimal condition enabled cells to produce H<sub>2</sub> gas with a yield of 255.21  $\mu\text{molH}_2/\text{mg}$ . Chl, which was about 43 % increase from the beginning of culture isolation.

**Keywords** : 18s rDNA, H<sub>2</sub> production, Characterization, Green algae, *Chlorella* sp

เอกสาร KLSc59 ภาสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถดำเนินการสำเร็จลุล่วงมาได้ เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คำติชมที่เป็นประโยชน์รวมทั้งกำลังใจที่ดีจากบุคคลหลากหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชนี เจริญยิ่ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับคำแนะนำ ความรู้ที่เป็นประโยชน์ คอยให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ การตรวจทาน รวมทั้งเอาใจใส่และให้กำลังใจที่ ดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสาวรัตน์ จันทะโร ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์รวมทั้งช่วยชี้แนะ ให้คำแนะนำ ที่เป็นประโยชน์ และช่วยตรวจทานทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของการทำ วิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

กราบขอบพระคุณ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยอบรมสั่งสอน คอยให้คำแนะนำ ให้ คำปรึกษา ให้ความรักความอบอุ่น กำลังใจที่ดี ตลอดจนความอุปการะและให้การสนับสนุนมาโดย ตลอด รวมถึงเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คอยให้กำลังใจในทุกๆ เรื่อง จน สามารถทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ธนพร ศิริวัฒนามงคล

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ฎ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	5
2.1 พลังงานไฮโดรเจนพลังงานทางเลือก	7
2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน	8
2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางความร้อนเคมี	8
2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า	9
2.2.3 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการโฟโตไลซิส	10
2.3 สาหร่ายสีเขียว	14
2.3.1 รังควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว	14
2.3.2 คลอโรพลาสต์	14
2.3.3 การสืบพันธุ์	15
2.3.4 รูปร่าง	15
2.4 สาหร่ายสีเขียวคลอเรลลา ( <i>Chlorella</i> sp.)	15
2.5 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	16
2.5.1 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	16
2.5.2 กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis)	18
2.5.3 กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis)	20
2.5.4 กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark fermentation)	21
2.6 ความหมายและหลักการของเทคนิค PCR	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1	ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกลูโซพอลิเมอร์	23
2.6.2	การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR	24
2.7	ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจน	25
2.7.1	สายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน	25
2.7.2	ความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน	26
2.7.3	แหล่งของคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวและการผลิตไฮโดรเจน	27
2.7.4	การปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน	27
2.7.5	ค่า pH ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน	31
2.7.6	สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน	31
2.8	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	31
<b>บทที่ 3</b>	<b>วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>	<b>35</b>
3.1	สาหร่าย	35
3.2	อาหารเลี้ยงสาหร่าย	35
3.3	สารเคมี	36
3.3.1	สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	36
3.3.2	สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์	37
3.3.3	สารเคมีสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ในปฏิกิริยาลูกลูโซพอลิเมอร์	37
3.3.4	สารเคมีสำหรับการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า	37
3.3.5	ชุดทดสอบ (Kit)	37
3.3.6	สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส	38
3.3.7	ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน	38
3.3.8	ยาปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย	38
3.4	อุปกรณ์	38
3.5	วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวชนิดต่างๆ	39
3.5.1	การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารวุ้น	39
3.5.2	วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว	40
3.6	วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว	41
3.7	วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียว	41
3.8	วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว	42
3.8.1	วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ต่างๆ โดยทำการบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไร้อากาศ	43

3.9 การศึกษาลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว	44
3.9.1 วิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดของสาหร่ายสีเขียว	44
3.9.2 วิธีการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	44
3.9.3 วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree)	45
3.10 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลิตภัณฑ์จาก PCR	45
3.10.1 วิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	45
3.10.2 วิธีการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR	46
3.11 การแสดงลักษณะของยีนไฮโดรจีเนสที่ได้จากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่าย	46
3.11.1 วิธีการเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	46
3.11.2 วิธีการสกัด RNA บริสุทธิ์	48
3.11.3 การทำปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน	48
3.12 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะต่างๆ	49
3.12.1 วิธีการศึกษาอิทธิพลของการบดบังเซลล์ที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	49
3.12.2 วิธีการศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	50
3.12.3 วิธีการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลวที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	50
3.12.4 วิธีการศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของเซลล์ที่มีต่อก๊าซไฮโดรเจน	50
3.12.5 วิธีการศึกษาอิทธิพลของค่า pH ที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	51
3.12.6 วิธีการศึกษาอิทธิพลของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	51
3.13 วิธีการศึกษาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส	51
3.14 การวิเคราะห์ทางสถิติ	52
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล</b>	<b>53</b>
4.1 ผลการศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	53
4.2 ผลการศึกษาลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc59	56
4.2.1 ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology identification)	56
4.2.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA	56
4.2.3 การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน 18S rDNA	59
4.3 ผลการศึกษาการตามหายีนไฮโดรจีเนส	62
4.3.1 โพรเมอร์ที่ใช้ในการตามหายีนไฮโดรจีเนส	62
4.3.2 อิทธิพลของอุณหภูมิในการจับตัว ชนิดของเอนไซม์ และชนิดของบัฟเฟอร์	63
4.3.2.1 การใช้เอนไซม์ Dream Taq DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	
โดยแปรผันอุณหภูมิในการจับตัวตั้งแต่ 40-50 องศาเซลเซียส	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.2 การใช้เอนไซม์ Dream Taq DNA polymerase และเอนไซม์ RBC Taq DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยแปรผันอุณหภูมิในการจับตัวตั้งแต่ 40-60 องศาเซลเซียส	67
4.3.2.3 การใช้เอนไซม์ KAPA Taq DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	69
4.3.3 อิทธิพลของ DMSO ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR	71
4.3.4 การตามหาอินไฮโดรจีเนสในระดับ RNA	72
4.4 ผลการศึกษาการปรับสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	76
4.4.1 ผลการศึกษาอิทธิพลของการบดบังเซลล์ที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	76
4.4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	78
4.4.3 ผลการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลวที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	80
4.4.4 ผลการศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของเซลล์ที่มีต่อก๊าซไฮโดรเจน	82
4.4.5 ผลการศึกษาอิทธิพลของค่า pH ที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	87
4.4.6 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	89
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b>	94
5.1 สรุปผลการวิจัย	94
5.2 ข้อเสนอแนะ	95
<b>บรรณานุกรม</b>	96
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	102
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP	102
อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ปราศจากกรดอะซิติก	104
อาหารเลี้ยงเชื้อ TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอล	105
อาหารเลี้ยงเชื้อ TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส	106
อาหารเลี้ยงเชื้อ TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส	107
อาหารเลี้ยงเชื้อ TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นไตรโซเดียมซิเตรต	108
อาหารเลี้ยงเชื้อ TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโซเดียมไฮโดรเจนไบคาร์บอเนต	109
อาหารเลี้ยงเชื้อ TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโพแทสเซียมคาร์บอเนต	110
การเตรียมเจลอะกาโรส	112
สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Acetate-EDTA	112
ภาคผนวก ข การคำนวณปริมาณไฮโดรเจน	113
ภาคผนวก ค การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งจากค่าความขุ่นของสาหร่าย	114
ภาคผนวก ง การคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์จากค่าความขุ่นของสาหร่าย	115

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ การติดตามยีน 18S rDNA และยีนไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLS59	116
ภาคผนวก ฉ กราฟผลการทดลองในบทที่ 4 ในหน่วยของไมโครโมลไฮโดรเจนต่อน้ำหนักมิลลิกรัม เซลล์แห้ง	121
ภาคผนวก ช ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ประวัติผู้เขียน	127 130



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงการเปรียบเทียบกระบวนการทางชีวภาพที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน	12
2.1 แสดงการเปรียบเทียบกระบวนการทางชีวภาพที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน (ต่อ)	13
3.1 แสดงสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี เทอร์มอลคอนดักติวิตี ดีเทคเตอร์ (GC-TCD)	43
3.2 แสดงองค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวโดยการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	44
3.3 แสดงสภาวะที่ใช้ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	45
3.4 แสดงองค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวโดยการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	47
3.5 แสดงสภาวะที่ใช้ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	47
3.6 แสดงองค์ประกอบในปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชันของสาหร่ายสีเขียว	49
3.7 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน (Reverse Transcription)	49
ก-1 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TAP	103
ก-2 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP	104
ก-3 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP+Gly	105
ก-4 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP+Su	106
ก-5 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP+Glu	107
ก-6 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP+Cit	108
ก-7 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP+NaHCO <sub>3</sub>	109
ก-8 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP+K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	110
ก-9 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TAP ที่แปรผันการขาดธาตุอาหารต่างๆ	111
ช-1 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาผลของสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีอากาศและสภาวะที่ไร้อากาศ	127
ช-2 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาผลของช่วงความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน	128
ช-3 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสภายใต้สภาวะที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ	128
ซ-4 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova	
ของการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสภายใต้สภาวะที่เติมสารให้อิเล็กตรอนใน	
อาหารเหลว TAP	129



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพลังงาน สิ่งแวดล้อม และเศรษฐกิจ	5
2.2 แสดงการใช้พลังงานในประเทศไทย	6
2.3 แสดงกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำโดยใช้กระแสไฟฟ้า	10
2.4 แสดงกลไกการทำงานในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้วิธีโฟโตอิเล็กโตรเคมีคอล ตั้งแต่ในระดับห้องปฏิบัติการจนถึงการผลิตในอุตสาหกรรม	11
2.5 แสดงโครงสร้างมาตรฐานของเอนไซม์ที่ใช้ผลิตไฮโดรเจนโดยวิเคราะห์ด้วย X-ray	17
2.6 แสดงวิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i>	18
2.7 แสดงวิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางตรงของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i>	20
2.8 กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	24
2.9 แสดงโมเดลสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระบบปิด	29
3.1 แสดงการแยกเชื้อด้วยวิธี Streak-plate	40
3.2 แสดงการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว TAP ในตู้บ่ม	41
3.3 แสดงการนำสารแขวนลอยเซลล์มากรองผ่านกระดาษกรอง	42
3.4 แสดงการบ่มสาหร่ายสีเขียวเพื่อผลิตไฮโดรเจน	43
4.1 ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS01, KS03, <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 และ <i>Bumilleriopsis peterseniana</i>	54
4.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวแต่ละไอโซเลทภายใต้สภาวะที่มีอากาศและสภาวะที่ไร้อากาศ (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p-value < 0.05))	55
4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ KS03 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	56
4.4 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18s rDNA จากการนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรส อิเล็กโตรโฟเรซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรส	57
4.5 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของยีน 18s rDNA จากการนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรส	58
4.6 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) คำนวณระยะทางด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S ribosomal DNA ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 (◆) และสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่นๆ 32 สายพันธุ์ โดยมี	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

out group คือ ต้นอะราบิโดพซิส ตัวเลขที่ลงท้ายของสิ่งมีชีวิตในแต่ละสายพันธุ์แสดง accession number ในฐานข้อมูล NCBI	60
4.7 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่อยู่บนเอกซอน (exon) และสัญญาณ --- แสดงถึงตำแหน่งของ อินตรอน (Intron) ของยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella fusca</i>	63
4.8 แสดงการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไฮโดรจีเนส จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรส	64
4.9 แสดงตัวอย่างการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไฮโดรจีเนส จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรส	65
4.10 แสดงตัวอย่างการแยกอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไฮโดรจีเนส จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	68
4.11 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนในสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่มีการแปรผัน ชนิดของไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่	70
4.12 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่มีการแปรผันชนิด ของไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่และเติมสาร DMSO	71
4.13 แสดงคุณภาพของ RNA จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดย ใช้ 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรส	73
4.14 แสดงการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไฮโดรจีเนส จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	74
4.15 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	75
4.16 ผลของค่าความขุ่นของเซลล์ (OD <sub>750</sub> ) ของเซลล์ต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการบ่มแบบ เขย่า (A) และการบ่มแบบไม่เขย่า (B)	77
4.17 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน	79
4.18 ผลของการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน	81
4.19 ผลของการแปรผันชนิดของอาหารที่ขาดธาตุอาหารของเซลล์ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน	83
4.20 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสภาวะขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ ในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p-value < 0.05))	86
4.21 ผลของการแปรผันค่า pH เริ่มต้นในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำ การแปรผันค่า pH เริ่มต้นตั้งแต่ 5.0 ถึง 9.0	88
4.22 ผลของการแปรผันสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ ในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการ ผลิตไฮโดรเจน	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.23 ผลของการแปรผันสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ ในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน	91
4.24 ผลของการเติมตัวให้อิเล็กตรอน (เอทานอล และไดไทโอทรินอล) ในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. KLS59 (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p-value < 0.05))	93
ค-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียว (OD <sub>750</sub> ) และน้ำหนักเซลล์แห้ง	114
ง-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียว (OD <sub>750</sub> ) และปริมาณคลอโรฟิลล์	115
จ-1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03	116
จ-2 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่อยู่บนดีเอ็นเอของยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella fusca</i>	117
จ-3 แสดงการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 3 ขนาด เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอื่นๆ โดยใช้โปรแกรม BlastN	118
จ-4 แสดงตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งตรวจ	119
จ-5 แสดงการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 3 ขนาด มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอื่นๆ โดยใช้โปรแกรม BlastN	120
ฉ-1 ผลของค่าความขุ่นของเซลล์ (OD <sub>750</sub> ) ของเซลล์ต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยการบ่มแบบเขย่า (A) และการบ่มแบบไม่เขย่า (B)	121
ฉ-2 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน	122
ฉ-3 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p-value < 0.05))	122
ฉ-4 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p-value < 0.05))	123
ฉ-5 ผลของการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเลี้ยงเซลล์สาหร่าย	123
ฉ-6 ผลของการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน	124
ฉ-7 ผลของการแปรผันชนิดของอาหารที่ขาดธาตุอาหารของเซลล์ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน	124
ฉ-8 ผลของการแปรผันค่า pH เริ่มต้นในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการแปรผันค่า pH เริ่มต้นตั้งแต่ 5.0 ถึง 9.0	125
ฉ-9 ผลของการแปรผันค่า pH เริ่มต้นในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการแปรผันค่า pH เริ่มต้นตั้งแต่ 7.0 ถึง 7.5	125
ฉ-10 ผลของการแปรผันสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ ในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน	126

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ-11 ผลของการแปรผันสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ ในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการ  
ผลิตไฮโดรเจน

126



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันจำนวนประชากรบนโลกมีอัตราที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เศรษฐกิจมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และทำให้ทั่วโลกมีความต้องการทางด้านพลังงานในปริมาณมากเพื่อที่จะขับเคลื่อนธุรกิจ ส่งเสริมอุตสาหกรรม เกษตรกรรมและเศรษฐกิจ โดยที่พลังงานเชิงพาณิชย์ ได้แก่ น้ำมันสำเร็จรูป ไฟฟ้า ถ่านหิน/ลิกไนต์ และก๊าซธรรมชาติยังคงเป็นพลังงานที่ใช้มากที่สุดในประเทศไทย คิดเป็นร้อยละ 83.7 ของการใช้พลังงานขั้นสุดท้ายทั้งหมด (ศูนย์สารสนเทศข้อมูลพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2561) โดยพลังงานในเชิงพาณิชย์ส่วนใหญ่นั้นมาจากน้ำมันดิบที่เป็นเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งเป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป และต้องใช้ระยะเวลาในการเกิดน้ำมันดิบ นอกจากนี้ยังมีการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก เช่น CO<sub>2</sub> ที่มาจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิล ด้วยเหตุนี้จึงสืบค้นแหล่งพลังงานใหม่ที่เหมาะสมมาใช้เป็นพลังงานทดแทนโดยต้องเป็นพลังงานที่สะอาดและยั่งยืน

พลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen, H<sub>2</sub>) ถือได้ว่าเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่มีประสิทธิภาพสูง สะอาด และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญอย่างมากในอนาคต เนื่องจากไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเกิดการเผาไหม้ โดยมีเพียงไอน้ำเป็นผลพลอยได้ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อเพลิงอื่นๆ ที่ได้ก๊าซ CO<sub>2</sub> เป็นผลพลอยได้ (Laurinavichene. *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีความร้อนในระหว่างการเผาไหม้เท่ากับ 141.6 เมกกะจูลต่อกิโลกรัมไฮโดรเจนหรือ 12.6 เมกกะจูลต่อกิโลกรัม (Perry, 1963) จึงมีการนำก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้มาใช้เป็นเชื้อเพลิงในการเผาไหม้ และให้ความร้อนออกมา หรือใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงโดยทำปฏิกิริยาทางเคมีแล้วเกิดกระแสไฟฟ้าเพื่อใช้ในการขับเคลื่อนรถ ผลิตกระแสไฟฟ้า อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ขนาดเล็กและอื่นๆ (คู่มือความรู้ด้านพลังงานไฮโดรเจน, 2554) โดยส่วนใหญ่ใช้วิธีการจากปฏิกิริยาปฏิรูปด้วยไอน้ำจากก๊าซธรรมชาติ (natural gas steam reforming) ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ใช้ในอุตสาหกรรม แต่เนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้คือก๊าซธรรมชาติ ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงฟอสซิลอย่างหนึ่ง นอกจากนี้ยังมีการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก ด้วยเหตุนี้จึงมีการผลิตไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูงด้วยกระบวนการทางชีวภาพผ่านสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลินทรีย์ (microorganism) เช่น สาหร่ายสีเขียว (green algae) แบคทีเรีย (bacteria) โดยที่สาหร่ายสีเขียวจะมีข้อได้เปรียบกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ คือสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากการใช้พลังงานจากแสง และน้ำที่มีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งมีอยู่อย่างไม่จำกัด (ธนาภรณ์, 2560)

ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนนั้นส่วนมากจะผลิตผ่านกระบวนการผลิตแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage process) (Guan. *et al.*, 2004) โดยขั้นตอนแรก (stage I) เป็นกระบวนการเจริญเติบโตหรือกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยนำสาหร่ายมาเลี้ยงในอาหารที่มีธาตุอาหารที่จำเป็นเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์ในสภาวะที่มีแสง และมี CO<sub>2</sub> หรือมีแหล่งคาร์บอน จากนั้นจะเริ่มเข้าสู่ขั้นตอนที่สอง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(stage II) ซึ่งเป็นกระบวนการในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยระบบแสง II (photosystem II, PSII) จะนำพลังงานที่ได้จากโฟตอนมาใช้ในการแยกสลายโมเลกุลของน้ำทำให้เกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนส่งผ่านไปยังระบบแสง I (photosystem I, PSI) และตัวรับอิเล็กตรอนต่างๆ และได้ผลิตพันธะเป็น  $O_2$  หลังจากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านมายังตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย คือ โปรตีน ferredoxin แล้วส่งไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อทำการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

โดยสาหร่ายสีเขียวที่สนใจในงานวิจัยนี้คือ สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 ซึ่งเป็นสาหร่ายที่คัดแยกได้ภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยงานวิจัยของวัชรภรณ์ และคณะ (2559) ซึ่งในการทดสอบเบื้องต้นได้มีการพิสูจน์ว่าสาหร่ายสีเขียว KS03 มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการแสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและการแสดงลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว KS03 นอกจากนี้ยังสนใจศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น อันเนื่องมาจากสาหร่ายสีเขียว KS03 มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงกว่าสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นที่คัดแยกได้ภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและสาหร่ายสีเขียวที่มีในห้องปฏิบัติการเมื่อทำการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ศึกษาและยังสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย อีกทั้งยังทนต่อเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อแสดงลักษณะสายพันธุ์ของเซลล์สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03
- 2) เพื่อปรับสภาวะการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ศึกษาลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว KS03
  - 1.1 ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และขนาดของสาหร่ายสีเขียวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อระบุชื่อวิทยาศาสตร์เบื้องต้น
  - 1.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) และเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Gel electrophoresis)
  - 1.3 สร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน 18S rDNA โดยนำ 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวสปีชีส์ (species) ต่างๆ มาสร้างความสัมพันธ์กันเพื่อศึกษาลำดับความคล้ายของสาหร่ายสีเขียว KS03
- 2) ศึกษาการตามหาไฮโดรจีเนส ทั้งระดับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ
- 3) ศึกษาการปรับสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน
  - 3.1 ศึกษาอิทธิพลของการบดบังเซลล์ (cell stacking) ที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้ซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ในช่วง 0.1-0.8 จากนั้นทำการบ่มแบบวางไว้ในตู้บ่มและแบบเขย่าไว้บนเครื่องเขย่า (shaker) และวัดความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน
- 3.2 ศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ด้วยการนำสาหร่ายสีเขียวที่มีอายุ 24 ชั่วโมงที่มีค่าความขุ่นของเซลล์สุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ที่เหมาะสม จากนั้นวัดก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการบ่มเซลล์ในสภาวะที่มีการแปรผันความเข้มแสงตั้งแต่ 0-3,800 ลักซ์ และบ่มเซลล์ในสภาวะที่มีการแปรผันช่วงของความเข้มแสงตั้งแต่ 0 ลักซ์จนถึงความเข้มแสงที่ได้จากแสงอาทิตย์ที่มีค่าความเข้มแสงมากกว่า 10,000 ลักซ์ (วัดค่าความเข้มแสงเวลา 11.00-13.00 น.)
  - 3.3 ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนของสาหร่ายสีเขียวที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยนำสาหร่ายสีเขียวที่มีอายุ 24 ชั่วโมงปรับค่าความขุ่นของเซลล์สุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 จากนั้นถ่ายโอนเซลล์ลงในอาหาร TAP ที่ปราศจากอะซิเตท (TP) และอาหาร TP ที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ นำไปบ่มในตู้บ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและทำการวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน
  - 3.4 ศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของเซลล์ โดยทำการแปรผันการขาดธาตุอาหารต่างๆ ในอาหารสูตร TAP โดยเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวด้วยอาหาร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมงปรับค่าความขุ่นของเซลล์สุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารที่เลี้ยงเซลล์เป็นอาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ นำไปบ่มในตู้บ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและทำการวัดความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน
  - 3.5 ศึกษาอิทธิพลของค่า pH ในอาหารเหลว TAP เพื่อใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว ทำการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวด้วยอาหารเหลว TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารที่เลี้ยงเซลล์เป็นอาหาร TAP ที่แปรผันค่า pH ตั้งแต่ 5 จนถึง 9 และปรับค่าความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 นำไปบ่มในตู้บ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและทำการวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน
  - 3.6 ศึกษาอิทธิพลของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในอาหารเหลว TAP เพื่อใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยทำการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวด้วยอาหาร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมงปรับค่าความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารที่เลี้ยงเซลล์เป็นอาหาร TAP ที่มีการเติมสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ นำไปบ่มในตู้บ่มในสภาวะที่เหมาะสมและทำการวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

#### 4) ศึกษาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสปีชีส์ของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03
- 2) ได้ผลผลิตในการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 ที่สูงมากยิ่งขึ้น
- 3) เป็นองค์ความรู้เริ่มต้นสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับที่ขยายการผลิตที่ใหญ่ขึ้นต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภายใต้การขยายตัวของจำนวนประชากรทั่วโลก รวมถึงระบบเศรษฐกิจที่ตั้งอยู่บนพื้นฐานของอุตสาหกรรมการผลิต และการบริการนั้น พลังงานจัดว่าเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตอยู่ของทุกสรรพสิ่ง ทั้งทางด้านเศรษฐกิจ และสังคม เพราะจำเป็นต้องใช้พลังงานในทุกขั้นตอนของการดำเนินงาน ซึ่งแหล่งพลังงานพื้นฐานโดยทั่วไปที่ใช้กันมากในปัจจุบัน คือ พลังงานสิ้นเปลือง (Conventional energy) ได้แก่ พลังงานที่ได้จากน้ำมันเชื้อเพลิง ก๊าซธรรมชาติ และถ่านหิน โดยที่ความต้องการทางด้านพลังงานที่สูงขึ้นอันเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของประชากรซึ่งส่งผลให้มีการขยายตัวทางเศรษฐกิจมากขึ้น ก่อให้เกิดวิกฤตการณ์ทางด้านพลังงานในด้านปริมาณและราคา และยังส่งผลให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่สะสมในชั้นบรรยากาศซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะโลกร้อน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2557) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

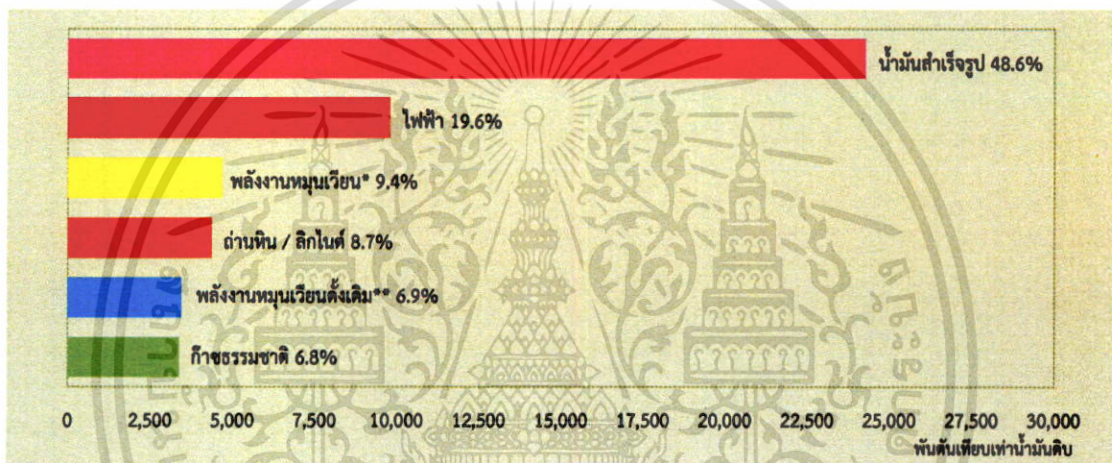


รูปที่ 2.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพลังงาน สิ่งแวดล้อม และเศรษฐกิจ  
ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน (2557)

โดยความสัมพันธ์ที่แสดงในรูปที่ 2.1 นั้นแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างเศรษฐกิจ พลังงานและสิ่งแวดล้อม นั่นคือเมื่อเศรษฐกิจของโลกดีขึ้นส่งผลให้มีการใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้นด้วย ขณะเดียวกันเมื่อมีการใช้พลังงานที่มากเกินไปจะส่งผลให้มีการปลดปล่อยของเสียที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้นอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในประเทศไทยนั้นยังคงมีการใช้พลังงานเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกับทั่วโลกตามการเจริญเติบโตของสังคมโลก โดยที่พลังงานเชิงพาณิชย์ ได้แก่ น้ำมันสำเร็จรูป ไฟฟ้า ถ่านหิน/ลิกไนต์ และก๊าซธรรมชาติยังคงเป็นพลังงานที่ใช้มากที่สุดในประเทศไทยคิดเป็นร้อยละ 83.7 ของการใช้พลังงานขั้นสุดท้ายทั้งหมด อย่างไรก็ตามน้ำมันสำเร็จรูปซึ่งประกอบด้วย น้ำมันดีเซล น้ำมันเบนซิน ก๊าซปิโตรเลียมเหลว น้ำมันเครื่องบิน น้ำมันเตา และน้ำมันก๊าด ยังคงมีการใช้ในสัดส่วนที่สูงกว่าพลังงานชนิดอื่น โดยมีการใช้ร้อยละ 48.6 ของการใช้พลังงานขั้นสุดท้ายทั้งหมด และมีการใช้ไฟฟ้า ถ่านหิน/ลิกไนต์ ก๊าซธรรมชาติ พลังงานหมุนเวียนและพลังงานหมุนเวียนดั้งเดิม ร้อยละ 19.6, 8.7, 6.8, 9.4 และ 6.9 ตามลำดับ (ศูนย์สารสนเทศข้อมูลพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2561) ดังแสดงในรูปที่ 2.2



P ตัวเลขเบื้องต้น

\* ประกอบด้วย พิน แกลป์ กากอ้อย วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ชยะ และก๊าซชีวภาพ

\*\*ประกอบด้วย พิน ถ่าน แกลป์ วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ที่ใช้ในบ้านอยู่อาศัย และอุตสาหกรรมครัวเรือน

รูปที่ 2.2 แสดงการใช้พลังงานในประเทศไทย

ที่มา : ศูนย์สารสนเทศข้อมูลพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (2560)

จากปัญหาข้างต้นที่กล่าวมาไม่ว่าจะเป็นการใช้พลังงานเชื้อเพลิงที่เพิ่มมากขึ้นตามเศรษฐกิจที่มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการใช้พลังงานฟอสซิลที่เพิ่มสูงขึ้นนี้ ส่งผลให้เกิดวิกฤตการณ์ขาดแคลนน้ำมัน อันเนื่องมาจาก เชื้อเพลิงฟอสซิลนี้เป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป และไม่สามารถสร้างขึ้นได้ภายในเวลาที่รวดเร็ว นอกจากนี้แล้วการเผาไหม้เชื้อเพลิงที่มีธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ เช่น การเผาไหม้ก๊าซธรรมชาติ น้ำมันดิบ ถ่านหินนั้นจะทำให้เกิดการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะโลกร้อนดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนี้ จึงนำมาสู่การค้นคว้า วิจัยเพื่อหาพลังงานในรูปแบบใหม่ที่จะเป็นพลังงานสะอาด ยั่งยืน และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งก็คือพลังงานหมุนเวียน (Renewable energy) อันได้แก่ พลังงานจากแสงอาทิตย์ พลังงานชีวมวล พลังงานลม เป็นต้น ในที่นี้มีพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจและตอบโจทย์คุณสมบัติต่างๆ ของพลังงานในรูปแบบใหม่ที่ต้องการ ซึ่งก็คือ พลังงานไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.1 พลังงานไฮโดรเจนพลังงานทางเลือก

ไฮโดรเจน (Hydrogen,  $H_2$ ) ถือได้ว่าเป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับการเผาไหม้ที่มีประสิทธิภาพสูง สะอาด ไม่เป็นพิษและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และได้รับการยอมรับว่าจะแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญอย่างมากในอนาคต (สร้อยญา, 2557) อันเนื่องมาจากไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดคือมีมวลอะตอมเท่ากับ 1.00794 กรัมต่อโมล และยังเป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบของน้ำซึ่งเป็นสารที่มีมากที่สุดในโลกอีกด้วย นอกจากนี้ไฮโดรเจนยังเป็นธาตุที่พบตามธรรมชาติโดยในบรรยากาศโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งไฮโดรเจนยังรวมอยู่กับโมเลกุลของสารประกอบอื่นๆ เช่น สารประกอบที่เป็นสารอินทรีย์ จำพวกไฮโดรคาร์บอน ที่เป็นสารจากผลิตภัณฑ์ทางปิโตรเลียมซึ่งเป็นสารสำคัญในการพัฒนาทางเศรษฐกิจของประเทศ ก๊าซไฮโดรเจนมีคุณสมบัติทั่วไป คือ เป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย ไม่มีเปลวไฟเวลาเผา สามารถลอยกระจายไปในอากาศได้อย่างรวดเร็วและไม่ตกค้างบนพื้นดิน เนื่องจากเป็นธาตุที่เบากว่าอากาศถึง 14 เท่า นอกจากนี้แล้ว ก๊าซไฮโดรเจนยังมีพลังงานพันธะสูงถึง 436 กิโลจูลต่อโมล (104 กิโลแคลอรีต่อโมล) ซึ่งต้องใช้พลังงานในการสลายพันธะระหว่างอะตอมเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ เช่น เพิ่มอุณหภูมิหรือใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา มี 3 ไอโซโทปขึ้นกับจำนวนโปรตอนและนิวตรอน คือ โปรเตียม (protium) ดิวเทอเรียม (deuterium) และทริเตียม (tritium) ไฮโดรเจนยังมีจุดติดไฟที่สูงที่ 570 องศาเซลเซียส มีจุดเดือดที่  $-252.87$  องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลวที่  $-259.14$  องศาเซลเซียส

ด้วยคุณสมบัติของไฮโดรเจนที่กล่าวมาข้างต้นนั้น ทำให้ไฮโดรเจนมีประสิทธิภาพในการให้พลังงานที่สูงเมื่อเทียบกับพลังงานชนิดอื่น โดยจะให้ค่าพลังงานสูงถึง 141.6 เมกกะจูลต่อการใช้ไฮโดรเจน 1 กิโลกรัม (Perry, 1963) ทำให้ไฮโดรเจนได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นตัวพาพลังงานโดยเฉพาะสำหรับเครื่องยนต์เผาไหม้ภายในของยานยนต์ประเภทต่างๆ เช่น รถยนต์ เรือยนต์ โดยให้ประสิทธิภาพสูงถึงร้อยละ 38 ซึ่งสูงกว่าของน้ำมันเบนซินที่ร้อยละ 30 (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557) นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้จากการเผาไหม้ไฮโดรเจน คือ ความร้อนและน้ำ ซึ่งไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือก๊าซเรือนกระจกที่เป็นสาเหตุของภาวะโลกร้อน หรือการเปลี่ยนแปลงของภูมิอากาศ อีกทั้งพลังงานไฮโดรเจนยังให้ความร้อนออกมา หรือใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงโดยปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งยังสามารถนำไปใช้ได้ในการผลิตกระแสไฟฟ้า อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ขนาดเล็กๆ และอื่นๆ

## 2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน

กระบวนการในการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งได้เป็น 3 กระบวนการหลักๆ ได้แก่

### 2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางความร้อนเคมี (Thermo Chemical Process)

ไฮโดรเจนนั้นสามารถผลิตได้โดยวิธีการทางเคมีโดยใช้ความร้อน ซึ่งมีแหล่งวัตถุดิบหลักเป็นสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน ชีวมวล เป็นต้น เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย ไฮโดรเจน ( $H_2$ ) คาร์บอนมอนอกไซด์ ( $CO$ ) คาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ ) น้ำ ( $H_2O$ ) และมีเทน ( $CH_4$ ) จากนั้นจะทำให้ไฮโดรเจนที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการเพิ่มเติม ซึ่งในการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางความร้อนเคมีนั้นมีหลายกระบวนการ ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (Steam Reforming) กระบวนการก๊าซซิฟิเคชัน (Gasification) เป็นต้น

ในปัจจุบันนิยมใช้กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำจากก๊าซธรรมชาติในการผลิตไฮโดรเจนเป็นกระบวนการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในเชิงพาณิชย์ รวมทั้งประเทศไทยก็มีการใช้กระบวนการนี้ในการผลิตไฮโดรเจนเช่นเดียวกัน เพื่อนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นหรือใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการทางอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งสามารถจำแนกกระบวนการทางความร้อนเคมีได้เป็น 5 รูปแบบ โดยจำแนกจากสารตั้งต้น ดังนี้

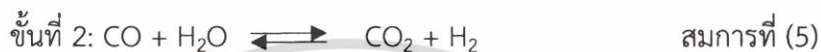
#### 1. การผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติ

จากที่กล่าวมาข้างต้น ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากวิธีนี้เป็นที่นิยมกันมาก โดยมักจะใช้ก๊าซมีเทน ซึ่งได้มาจากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบเป็นวัตถุดิบ เนื่องจากก๊าซมีเทนเป็นส่วนประกอบหลักของก๊าซธรรมชาติ เรียกกระบวนการนี้ว่า กระบวนการรีฟอร์มมิ่งมีเทนด้วยไอน้ำ (Steam Methane Reformation (SMR) ซึ่งมีขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกนำมีเทนมาทำปฏิกิริยากับไอน้ำที่อุณหภูมิสูงที่ 500-1000 องศาเซลเซียส และใช้ความดันสูงร่วมด้วย ซึ่งในขั้นตอนนี้มักมีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมด้วย เช่น นิกเกิล (Nickel, Ni) โดยในขั้นตอนแรกจะได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นร่วมกับก๊าซไฮโดรเจน จึงมีการเกิดปฏิกิริยาอวเทอร์ก๊าซชิฟต์ (Water-Gas Shift reaction, WGS) ร่วมด้วย ดังสมการที่ 1-3 (รัชนิกร, 2554)



## 2. การผลิตไฮโดรเจนจากถ่านหิน

ในการผลิตไฮโดรเจนจากถ่านหินนั้นจะสามารถผลิตได้ทั้งพลังงาน น้ำมันดิบ (Tar) ไฮโดรเจน และสารเคมีชนิดอื่น โดยมักจะใช้ปฏิกิริยาก๊าซซิฟิเคชันหรือปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบบางส่วนในการเกิดปฏิกิริยา โดยทั่วไปจำเป็นต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา มักทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงกว่า 700 องศาเซลเซียส ด้วยอากาศ ออกซิเจน หรือไอน้ำ ดังสมการที่ 4-6 (นิสิต, 2553) ซึ่งกระบวนการนี้เกิดเขม่าในปริมาณที่มากกว่าปฏิกิริยาจากสตริมรีฟอร์มมิ่ง



## 3. การผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวล

ในการผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลนี้สามารถเกิดได้ 2 กระบวนการ คือ การใช้ความร้อนในรูปของไอน้ำโดยสารชีวมวลจะถูกแยกออกเป็นก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีการให้ความดัน และการเกิดไพโรไลซิส (Pyrolysis) ซึ่งเป็นการสลายตัวด้วยความร้อนภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจน โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ กระบวนการไพโรไลซิสแบบช้า (slow pyrolysis) โดยมีการให้ความร้อนอย่างช้าๆ และมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่ากระบวนการไพโรไลซิสแบบเร็ว (fast pyrolysis) ซึ่งชีวมวล คือ วัสดุที่มาจากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เศษวัสดุที่เหลือทิ้งทางการเกษตร วัชพืช เป็นต้น

## 4. การผลิตไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงเหลว

ในการผลิตไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงเหลวหรือก็คือเชื้อเพลิงชีวมวลที่อยู่ในรูปของเหลว เช่น เอทานอล เป็นต้น ซึ่งในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงเหลวนั้นจะมีกระบวนการที่คล้ายคลึงกับการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

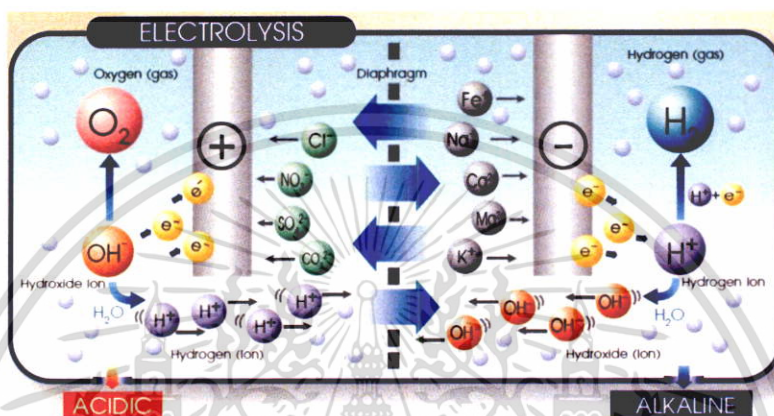
## 5. การผลิตไฮโดรเจนจากการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงในการแยกน้ำ

ในกระบวนการนี้เป็นวิธีการที่ใช้กันมานานแล้ว แต่มีการแยกสลายโมเลกุลของน้ำที่อุณหภูมิสูงถึง 500-2,000 องศาเซลเซียส เพื่อกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมี มักมีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาช่วยให้อุณหภูมิการแตกตัวต่ำลง (Dissociation Temperature) ข้อจำกัดของกระบวนการนี้ คือ ความคงทนของอุปกรณ์หรือวัสดุในกระบวนการเนื่องจากต้องทำงานที่อุณหภูมิสูง

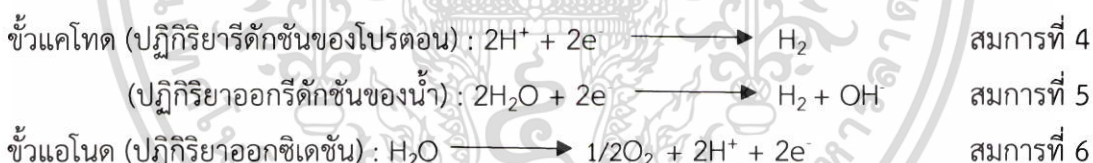
### 2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า (Electro Chemical Process)

กระบวนการนี้เป็นกระบวนการทางไฟฟ้าเคมี ซึ่งกระแสไฟฟ้านี้จะทำให้เกิดการแตกตัวของอะตอมไฮโดรเจนและอะตอมออกซิเจนออกจากกัน แล้วจะเกิดการรวมตัวกันของอะตอมที่เหมือนกันได้เป็นก๊าซออกซิเจนและก๊าซไฮโดรเจน โดยไฟฟ้าที่มาจากแหล่งกำเนิดไฟฟ้าทุกชนิด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถใช้ในกระบวนการนี้ได้ ไม่ว่าจะเป็นไฟฟ้าจากพลังงานหมุนเวียน รวมทั้งพลังงานจากนิวเคลียร์ ซึ่งจะมีการให้กระแสไฟฟ้าตรงที่ขั้วไฟฟ้าของเซลล์โดยต้องให้กระแสไฟฟ้ามากกว่าโวลต์มาตรฐานที่ปฏิกิริยาจะเกิด เพื่อให้ไอออนที่อยู่ภายในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เคลื่อนที่ไปเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วไฟฟ้า ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ซึ่งข้อได้เปรียบคือ สามารถผลิตไฮโดรเจนที่ความบริสุทธิ์สูงได้ แต่ข้อเสียเปรียบคือ มีค่าใช้จ่ายที่สูง และที่สำคัญแหล่งพลังงานไฟฟ้าควรที่จะเป็นแหล่งที่มาจากแหล่งที่ใช้แล้วสามารถเกิดขึ้นใหม่ได้อย่างเร็ว เช่น พลังงานไฟฟ้าจากแสงอาทิตย์ น้ำ และลม เป็นต้น



รูปที่ 2.3 แสดงกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำโดยใช้กระแสไฟฟ้า  
ที่มา : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557



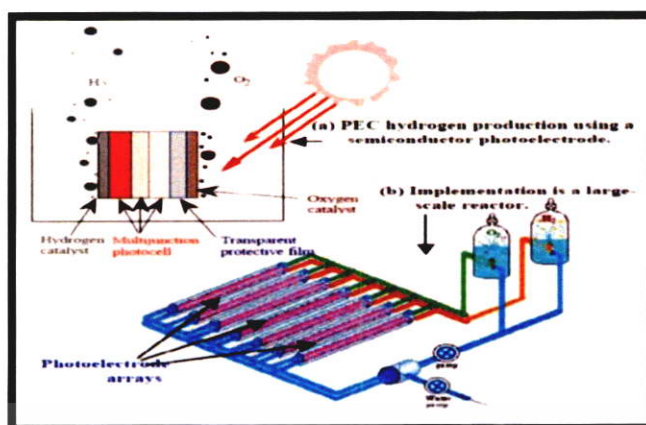
### 2.2.3 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการโฟโตไลซิส (Photolysis Process)

กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแตกตัวของโมเลกุลน้ำโดยการใช้พลังงานที่ได้จากแสงอาทิตย์ โดยที่กระบวนการนี้สามารถนำมาใช้ในระยะเวลาได้และเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเร็วมาก นอกจากนี้ยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (สร้อยญาและคณะ, 2557) ซึ่งสามารถแบ่งการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการนี้ได้เป็น 2 กระบวนการ ดังนี้

#### 1. การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีโฟโตอิเล็กโทรเคมีคอล

ในการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการนี้นั้น ทำได้โดยการใช้ปฏิกิริยาโฟโตอิเล็กโทรเคมีคอลเพื่อให้เกิดการแยกโมเลกุลของน้ำ ซึ่งจะใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงาน โดยจะเกิดการเหนี่ยวนำผ่านแผ่นเซมิคอนดักเตอร์อิเล็กโทรดที่มีการเคลือบด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้น้ำเกิดการแตกตัว โดยตัวเร่งปฏิกิริยานั้นจะทำหน้าที่ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านได้ดีขึ้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซไฮโดรเจนและออกซิเจนที่บริเวณพื้นผิวของคอนดักเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 แสดงกลไกการทำงานในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้วิธีโฟโตอิเล็กโตรเคมีคอล ตั้งแต่ในระดับห้องปฏิบัติการจนถึงการผลิตในอุตสาหกรรม

ที่มา : Eric and Richard (2000)

## 2. การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหรือจุลินทรีย์

ในกระบวนการนี้อาศัยการสังเคราะห์แสงของจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจน หรือที่เรียก การผลิตไฮโดรเจนในแบบนี้ว่า ไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen) ซึ่งจุลินทรีย์เกือบทุกชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ไม่ว่าจะเป็น สาหร่ายสีเขียว (Green algae) ไชยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) แบคทีเรียที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้ (Photosynthetic bacteria) และแบคทีเรียที่มีการหมัก (Fermentative bacteria) โดยจุลินทรีย์เหล่านี้มีความแตกต่างกันทางสรีรวิทยา (Physiology) และกระบวนการทางเมตาบอลิก ส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน และมีข้อได้เปรียบหรือเสียเปรียบแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งจากข้อมูลในตารางจะเห็นได้ว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยสาหร่ายสีเขียวนั้นมีความน่าสนใจ เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวนี้มีระบบการสังเคราะห์แสงที่รวดเร็ว ซึ่งสามารถเปลี่ยนพลังงานจากแสงอาทิตย์มาใช้ในการสังเคราะห์แสงได้รวดเร็วกว่าต้นไม้ หรือพืชชนิดอื่นๆ ส่งผลให้ไม่จำเป็นต้องใช้ค่าใช้จ่ายเพื่อการเจริญเติบโตมากจึงลดต้นทุนในการผลิตได้ อีกทั้งวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการเจริญเติบโตนั้นยังเป็นสิ่งที่มีในธรรมชาติมากมาย ซึ่งก็คือ พลังงานจากแสงอาทิตย์ และน้ำ นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นยังไม่มีการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกออกสู่บรรยากาศ และยังสามารถตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากชั้นบรรยากาศมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโต ดังนั้นในรายละเอียดต่อไปจะกล่าวเฉพาะการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากสาหร่ายสีเขียว

ตารางที่ 2.1 แสดงการเปรียบเทียบกระบวนการทางชีวภาพที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน

จุลินทรีย์	ปฏิกิริยาทั่วไป	ข้อได้เปรียบ	ข้อเสียเปรียบ
Green algae - <i>Scenedesmus obliquus</i> - <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> - <i>C. moewusii</i> - <i>Chlorella vulgaris</i> - อื่นๆ	กระบวนการแยกด้วยแสงแบบทางตรง $2\text{H}_2\text{O} + \text{light} \longrightarrow 2\text{H}_2 + \text{O}_2$ กระบวนการหมักแบบใช้แสง (Photo-fermentation) $12\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2 \longrightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{H}_2 \longrightarrow 6\text{CO}_2 + 12\text{H}_2$	- สามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากน้ำและแสง - การเปลี่ยนแสงเป็นพลังงานเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่าเมื่อเทียบกับต้นไม้อื่นๆ - สามารถลด $\text{CO}_2$ ในสิ่งแวดล้อมได้	- เกิดการยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนด้วยออกซิเจน
Cyanobacteria - <i>Synechocystis</i> PCC 6803 - <i>Anabaena variabilis</i> - <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 - <i>Cyanothece</i> sp. - อื่นๆ	กระบวนการแยกด้วยแสงแบบทางตรง $2\text{H}_2\text{O} + \text{light} \longrightarrow 2\text{H}_2 + \text{O}_2$ กระบวนการแยกด้วยแสงแบบทางอ้อม $\text{N}_2 + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- + 16\text{ATP} \longrightarrow 2\text{NH}_3 + \text{H}_2 + 16\text{ADP} + 16\text{Pi}$ $8\text{H}^+ + 8\text{e}^- + 16\text{ATP} \longrightarrow 4\text{H}_2 + 16\text{ADP} + 16\text{Pi}$ $12\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2 \longrightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{H}_2 \longrightarrow 6\text{CO}_2 + 12\text{H}_2$	- สามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากน้ำและแสง - สามารถลด $\text{CO}_2$ ในสิ่งแวดล้อมได้ - การผลิต $\text{H}_2$ ถูกแยกออกจากการผลิต $\text{O}_2$ - สามารถตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศได้	- เกิดการยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนด้วยออกซิเจน - การใช้ไปของก๊าซ $\text{H}_2$ จากการใช้เอนไซม์ Uptake hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน

ตารางที่ 2.1 แสดงการเปรียบเทียบกระบวนการทางชีวภาพที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน (ต่อ)

จุลินทรีย์	ปฏิกิริยาทั่วไป	ข้อได้เปรียบ	ข้อเสียเปรียบ
Photosynthetic bacteria - <i>Rhodobater sphaeroides</i> - <i>R. capsulatus</i> - <i>R. sulidophilus</i> - <i>Thiocapsa roseopersicina</i> - อื่นๆ	กระบวนการหมักแบบใช้แสง $\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{light} \longrightarrow 4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2$ $\text{N}_2 + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- + 16\text{ATP} \longrightarrow 2\text{NH}_3 + \text{H}_2 + 16\text{ADP} + 16\text{Pi}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สามารถใช้แสงในช่วงความยาวคลื่นที่หลากหลายได้</li> <li>- สามารถใช้วัสดุที่เป็นของเสีย เช่น หางน้ำนม ของเสียจากโรงกลั่น และอื่นๆ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ต้องใช้แสงในการผลิตไฮโดรเจน</li> <li>- มีน้ำหมักที่ทำให้เกิดปัญหามลพิษทางน้ำได้</li> </ul>
Fermentative bacteria - <i>Enterobacter aerogenes</i> - <i>Clostridium butyricum</i> - <i>Magashaera elsdenii</i> - อื่นๆ	กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 12\text{H}_2 + 6\text{CO}_2$ $\text{Pyruvate} + \text{CoA} \longrightarrow \text{acetyl-CoA} + \text{formate}$ $\text{Pyruvate} + \text{CoA} \longrightarrow \text{acetyl-CoA} + \text{CO}_2$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ตลอดทั้งวัน โดยไม่ต้องใช้แสงในกระบวนการที่ไร้ <math>\text{O}_2</math></li> <li>- สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลายได้ เช่น แป้ง เซลโลไบโอส ซูโครส และอื่นๆ</li> <li>- เกิดผลิตภัณฑ์ทางเมตาบอไลต์ที่นำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น กรดบิวไทลิก</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญเติบโต</li> <li>- มีการเกิดก๊าซ <math>\text{CO}_2</math> ขึ้น</li> <li>- มีน้ำหมักที่ทำให้เกิดปัญหามลพิษทางน้ำได้</li> </ul>

ที่มา : Khetkorn. et al. (2017)

## 2.3 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวนี้จะพบได้ทั่วไปในทุกหนทุกแห่ง ซึ่งมีการคาดการณ์ว่าสาหร่ายสีเขียวทั้งหมดนั้นกว่า 10 เปอร์เซ็นต์เป็นสาหร่ายทะเล โดยจะมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันตามอุณหภูมิของแหล่งน้ำที่อาศัย ความเข้มของแสง และความสมบูรณ์ของแหล่งอาหาร และอีก 90 เปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมดนั้นเป็นสาหร่ายที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด หรือสาหร่ายที่ขึ้นอยู่บนสภาพแวดล้อมที่เป็นอากาศก็ได้เช่นกัน โดยที่สาหร่ายสีเขียวที่อยู่ในแหล่งน้ำจืดนั้นมักอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ตื้น หรือแหล่งน้ำที่แสงสามารถส่องถึงได้ ซึ่งบางชนิดเป็นแพลงก์ตอนพืช บางชนิดก็ขึ้นอยู่ตามก้อนหิน โคลน ทราเย เปลือกหอย บนพืชหรือสัตว์บางชนิด และบางชนิดอาจพบอยู่ในหิมะหรือน้ำแข็ง ซึ่งสาหร่ายสีเขียวนี้เป็นดิวิชันที่มีสมาชิกอยู่ประมาณ 450 จินัส 7000 สปีชีส์ โดยแต่ละจินัสจะมีความแตกต่างกันไปทั้งรูปร่าง โครงสร้าง และการสืบพันธุ์ ซึ่งลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียว มีลักษณะดังนี้

### 2.3.1 รงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายสีเขียว

1. คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี
2. แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ประกอบด้วย
  - แอลฟาแคโรทีน ( $\alpha$ -carotene) เบต้าแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) และแกมมาแคโรทีน ( $\gamma$ -carotene)
  - แซนโทฟิลล์ (Xanthophyll)

### 2.3.2 คลอโรพลาสต์ (Chloroplast)

เมื่อทำการศึกษารูปร่างของคลอโรพลาสต์จะพบว่า มีลักษณะเป็นแบบกรานา (Grana chloroplast) คือ มีไทลาคอยด์เรียงกันเป็นชั้นๆ โดยมีจำนวนชั้นตั้งแต่ 2-6 อัน ซึ่งลักษณะการเรียงตัวของไทลาคอยด์จะแตกต่างกันกับพืชชั้นสูง คือ มีการเรียงตัวเป็นชั้นของไทลาคอยด์ที่ไม่สม่ำเสมอ

คลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างแตกต่างกัน ดังนี้

1. คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นแบบเกลียว (Helical or spiral chloroplast) มักพบใน *Spirogyra*
2. คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นรูปดาว (Stellate chloroplast) มักพบใน *Zygnema*
3. คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นแบบแผ่นแบนหนึ่งแผ่น (Lamella or flat plate chloroplast) มักพบใน *Mougeotia*
4. คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นแบบร่างแห (Reticulate chloroplast) มักพบใน *Oedogonium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นแบบกระบอกตวงหัวท้ายปิด (Open cylinder chloroplast) หรือคล้ายกับกำไลข้อมือของชาวเขาที่ทำจากเงินมีลักษณะเป็นแผ่นแบบกว้างรูปทรงกระบอกมีด้านเปิดอยู่หนึ่งด้าน (Snap on bracelet) มักพบใน *Ulothrix*
6. คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นแบบรูปถ้วย (Cup shaped chloroplast) มักพบใน *Chlamydomonas*

ภายในเม็ดคลอโรพลาสต์นั้นจะมีไพเรโนอิด (Pyrenoids) ซึ่งเป็นศูนย์กลางในการสังเคราะห์แป้งโดยจะมีเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์แป้ง คือ amylose synthetase ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแป้ง แต่สาหร่ายบางชนิดที่สามารถสังเคราะห์แป้งได้ก็ไม่มีไพเรโนอิด นอกจากนี้ลักษณะและจำนวนของไพเรโนอิดในสาหร่ายแต่ละชนิดจะไม่เท่ากัน ทำให้สามารถใช้เป็นหลักในการจำแนกสาหร่ายได้

### 2.3.3 การสืบพันธุ์

1. แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแบ่งออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กันในพวกสาหร่ายเซลล์เดียว แบบหักสาย (Fragmentation) สร้างสปอร์
2. แบบอาศัยเพศ โดยการคอนจูเกชัน (Conjugation) และการปฏิสนธิ (Fertilization)

### 2.3.4 รูปร่าง

สาหร่ายสีเขียวเป็นดิวิชันที่มีรูปร่างของสาหร่ายครบทั้งหมด คือ มีทั้งแบบเซลล์เดียว (unicellular) โคลนี (colony) เส้นสาย (filament) หลอดหรือท่อติดต่อกันตลอด และแบบทัลลัส (thallus) ที่เป็นเนื้อเยื่อพาราเรโนโคมา ซึ่งพวกที่เป็นแบบเซลล์เดียวหรือโคลนีมีทั้งแบบเคลื่อนไหวได้และเคลื่อนไหวไม่ได้ ส่วนพวกที่เป็นเส้นสายมีทั้งแบบที่แตกแขนงได้และแบบแตกแขนงไม่ได้ สาหร่ายสีเขียวจะมี 1 นิวเคลียส หรือในบางชนิดก็มีมากกว่า 1 นิวเคลียส ส่วนพวกที่มีหนวดจะมีออร์แกเนลล์ที่มีสี เรียกว่า ตา (eye spot or stigma) ซึ่งจะทำหน้าที่รับแสงเพื่อส่งไปยังหนวด โดยสาหร่ายสีเขียวจะไม่มีระบบท่อน้ำ ท่ออาหาร

นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายสีเขียวนั้นสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ ซึ่งจะแตกต่างไปจากสาหร่ายที่มีขนาดใหญ่ หรือในสาหร่ายทั่วไป (Macroalgae)

## 2.4 สาหร่ายสีเขียวคลอเรลลา (*Chlorella sp.*)

ในปี ค.ศ. 1890 เอ็ม ดับพลิว ไบเจอร์นิก (M.W.Beijerinck) นักจุลชีววิทยาชาวดัตช์ ได้ค้นพบ *Chlorella sp.* เป็นคนแรก ชนิดของ *Chlorella* ที่ค้นพบได้ คือ *Chlorella vulgaris* โดยชื่อ *Chlorella* นั้นมาจากภาษากรีก คำว่า คอลโรส (Chloros) ที่แปลว่า สีเขียว รวมกับภาษาละติน คำว่า เอลล่า (Ella) ที่แปลว่า เล็ก นอกจากนี้ยังเชื่อกันว่า *Chlorella sp.* อาจเป็นลูกโซ่ของจรรยาอาหาร

อย่างแรกที่เกิดในสภาพของพืชเซลล์เดี่ยวที่มีนิวเคลียสและผนังเซลล์ที่สมบูรณ์ (Kuhl and Lorenzen, 1963)

คลอเรลลาเป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 4-10 ไมโครเมตร ไม่มีแฟลกเจลลา คลอโรพลาสต์มีลักษณะเป็นรูปถ้วย หรือเป็นแผ่นอยู่ริมเซลล์ ประกอบไปด้วยคลอโรฟิลล์เอ และบี คลอเรลลาต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ แสงแดดและสารอาหารเพียงเล็กน้อยเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ในธรรมชาติมักสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างออตสปอร์จำนวน 2, 4, 6, 8 และ 16 โดยที่จำนวนของออตสปอร์ (autospore) จะมาจาก mother cell ซึ่งถูกควบคุมโดยสภาวะภายในและภายนอก (Kuhl and Lorenzen, 1963)

## 2.5 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

### 2.5.1 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase : acceptor oxidoreductase) ได้ถูกค้นพบครั้งแรกในช่วงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 และในช่วงเวลาที่ผ่านมานั้นทำให้นักวิจัยได้ทำการศึกษเอนไซม์ชนิดนี้จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้แก่ แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ซัลเฟต (Sulphate-reducing bacteria) แบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ไฮโดรเจน ( $H_2$ -oxidizing bacteria) แบคทีเรียสีม่วง (Purple bacteria) ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) และสาหร่ายสีเขียว (Green algae) เป็นต้น ในปี ค.ศ. 1931 ได้มีการบัญญัติศัพท์คำว่า “ไฮโดรจีเนส” ขึ้นโดย Stephenson และ Stickland ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ได้ถูกพบทั้งในจุลินทรีย์ที่เป็นยูคาริโอตและโพรคาริโอต โดยที่สามารถจำแนกเอนไซม์ไฮโดรจีเนสตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้ (สร้อยญา, 2549)

1. อัฟเทคไฮโดรจีเนสหรือเอนไซม์เร่งแบบทิศทางเดียว (Uptake hydrogenase or Unidirectional) โดยสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน
2. รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหรือเอนไซม์เร่งแบบย้อนกลับได้ (Reversible hydrogenase or Bidirectional) สามารถเร่งได้ทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน และเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนให้เป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

ดังสมการที่ 7



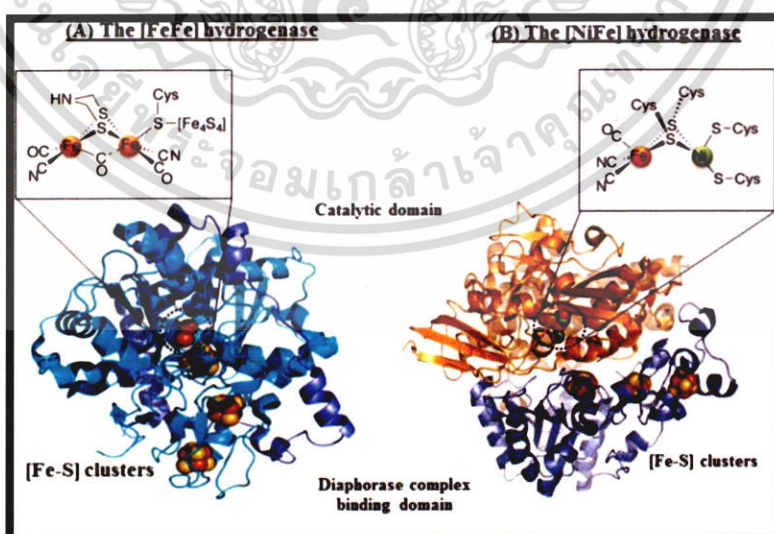
นอกจากนี้แล้ว เอนไซม์ชนิดนี้ยังสามารถจำแนกได้ตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้ (Vogt *et al.*, 2008)

1. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยเหล็กและเหล็ก ([FeFe]-hydrogenase)
2. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็ก ([NiFe]-hydrogenase)
3. ไฮโดรจีเนสที่ภายในมีเหล็กอยู่โมเลกุลเดียวเท่านั้น ([Fe]-hydrogenase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการผลิตและการใช้ไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีตัวให้หรือตัวรับอิเล็กตรอนที่เหมาะสม โดยที่สิ่งมีชีวิตต่างๆ จะใช้เอนไซม์นี้ในการควบคุมสมดุลพลังงาน ซึ่งการใช้ไฮโดรเจนจะทำให้เซลล์ทำหน้าที่ผลิตตัวรีดิวซ์สำหรับการสร้างสารโมเลกุลใหญ่ หรือนำไปใช้ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (Electron-transport chain) หรือใช้เพื่อสังเคราะห์พลังงาน ATP ในทางกลับกันนั้น เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะผลิตไฮโดรเจนเพื่อช่วยกำจัดตัวรีดิวซ์ที่มีมากเกินไป ทั้งนี้การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะขึ้นอยู่กับเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตและชนิดของเอนไซม์ (สร้อยญา, 2549)

เอนไซม์ [FeFe]-hydrogenase เป็นเอนไซม์ที่มักพบในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียว มีบริเวณเร่ง (active center; H cluster) ที่มีความพิเศษซึ่งก่อให้เกิดกิจกรรมที่มากกว่าไฮโดรจีเนสชนิดอื่นๆ กว่า 100 เท่า (Vogt *et al.*, 2008) โดยเอนไซม์ชนิดนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ทั้งการผลิตไฮโดรเจน และเร่งปฏิกิริยาการเกิดโปรตอนที่ถูกปล่อยออกจากไฮโดรเจน ซึ่งเอนไซม์ [FeFe]-hydrogenase จะประกอบไปด้วยสายพอลิเปปไทด์ 1 สาย (monomeric) หรือ 2 สาย (dimeric) และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45-50 กิโลดาลตัน (kDa) ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา (H-cluster) ประกอบด้วย [FeFe] สร้างพันธะกับสะพานซัลเฟอร์ (sulfur bridges) ส่วนของ (4Fe-4S) ที่เหลือ และมีลิแกนด์ที่ไม่ใช่โปรตีน (CN และ CO) สร้างพันธะกับอะตอมของ Fe ดังรูปที่ 2.5 นอกจากนี้ อะตอมของ Fe ยังมีซิสเทอีนเป็นลิแกนด์อีกด้วย หรือบางครั้งยังเรียกว่า Fe-S cluster หรือ HC cluster (Allakhverdiev *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตามบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากเฟอริดอกซิน (ferredoxin) นั้นมีความไวต่อออกซิเจนสูงมากซึ่งจะทำให้ยากต่อการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจน



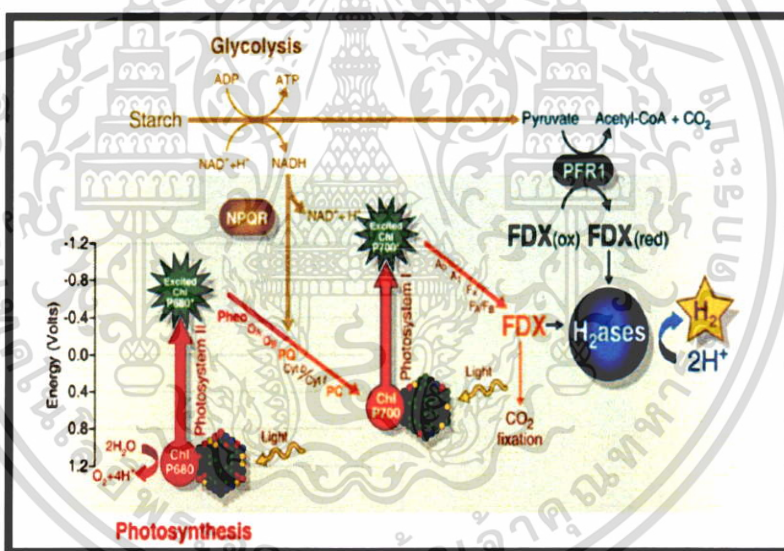
รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างมาตรฐานของเอนไซม์ที่ใช้ผลิตไฮโดรเจนโดยวิเคราะห์ด้วย X-ray

ที่มา : Khetkorn. *et al.* (2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวได้นั้นถูกค้นพบครั้งแรกโดย Harns Gaffron (Gaffron *et al.*, 1942) ซึ่งในการค้นพบครั้งนี้ส่งผลให้ได้รับความสนใจจากนักวิจัยมากมาย จนกระทั่งสามารถระบุชื่อเอนไซม์ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาดังที่ได้กล่าวไปในข้างต้น และยังสามารถอธิบายกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้อีกด้วย โดยที่สาหร่ายสีเขียวนั้นมีรงควัตถุซึ่งสามารถดูดซับพลังงานและเปลี่ยนพลังงานแสงที่ได้ไปเป็นพลังงานเคมีโดยที่เกิดขึ้นพร้อมกันกับการแตกตัวของน้ำได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจนและโปรตอน (Yilmaz *et al.*, 2016)

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้โดยผ่าน 3 กระบวนการ โดยที่ 2 กระบวนการนั้นจะเกิดในสภาวะที่มีแสง คือ กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางตรง ซึ่งไฮโดรเจนที่ได้นั้นจะมาจากอิเล็กตรอนและโปรตอนที่ได้จากการแตกตัวของโมเลกุลน้ำในระบบแสงที่ 2 ขณะที่กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางอ้อมนั้น อิเล็กตรอนและโปรตอนจะได้รับการสลายตัวของสารประกอบคาร์บอนภายในเซลล์ และกระบวนการสุดท้ายนั้นจะเกิดในสภาวะที่ไม่ใช้แสง นั่นคือ กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงวิธีการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii*

ที่มา : Dubini. *et al.* (2011)

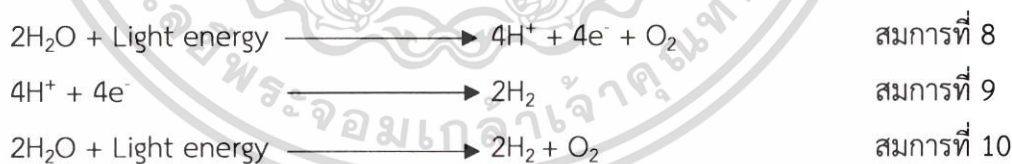
### 2.5.2 กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis)

สาหร่ายสีเขียวมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการใช้แสงซึ่งจะเกิดขึ้นที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ โดยใช้ระบบการสังเคราะห์แสงผ่านระบบแสงที่ 2 (Photosystem II, PSII) และระบบแสงที่ 1 (Photosystem I, PSI) โดยระบบแสงทั้งสองระบบนี้จะทำการเปลี่ยนพลังงานแสงอาทิตย์ไปเป็นพลังงานเคมี ซึ่งจะนำพลังงานเคมีนี้ไปใช้เพื่อทำให้น้ำเกิดการแตกตัวออกและยังใช้เป็นพลังงานในการพาอิเล็กตรอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวต่างๆ ก่อนที่จะส่งต่อไปให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตก๊าซ

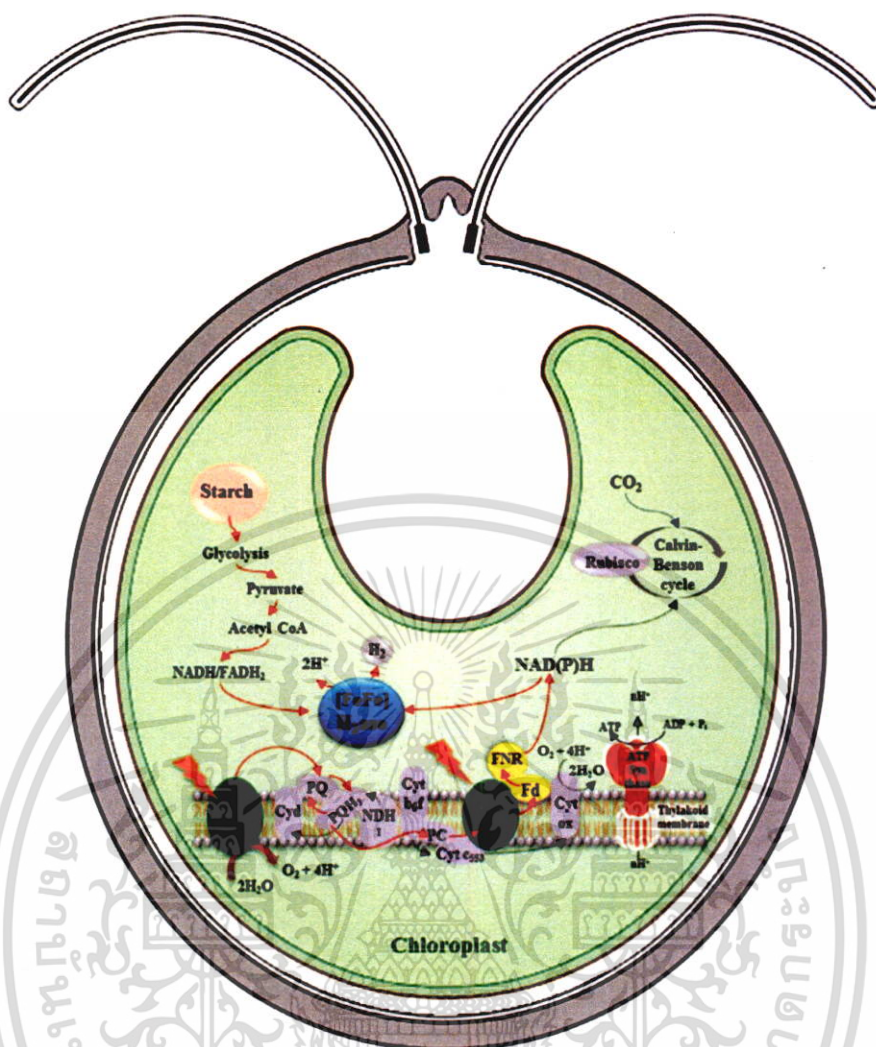
ไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้น ภายในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานที่ได้จากแสงอาทิตย์ ซึ่งก็คือ Antenna complex จะประกอบไปด้วยรงควัตถุหลายชนิดที่ทำงานร่วมกัน ได้แก่ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี แล้วทำการส่งพลังงานแสงที่ได้เข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center) ซึ่งอยู่ภายในของคลอโรฟิลล์ เอ จนกระทั่งคลอโรฟิลล์ เอ นั้นได้รับพลังงานที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม ส่งผลให้อิเล็กตรอนภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ถูกกระตุ้นให้มีพลังงานที่สูงขึ้นและพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนสู่ตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เช่นเดียวกันกับระบบแสงที่สอง (PSII) เมื่อได้รับพลังงานในช่วง 680 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม จะทำให้ระบบแสงที่สองถูกกระตุ้นให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมายังควิโนน (Q) ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก และระบบแสงที่ 2 จะเกิดการออกซิเดชันของน้ำ (สรีรญาและคณะ, 2557) ส่งผลให้โมเลกุลของน้ำมีการแตกตัว ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนที่ได้นั้นจะเข้าสู่ระบบแสงที่ 2 เพื่อไปแทนที่อิเล็กตรอนภายในคลอโรฟิลล์ที่มีการสูญเสียไปในระบบ โดยระบบจะทำการเปลี่ยนพลังงานแสงที่ได้ไปเป็นพลังงานเคมี และใช้พลังงานที่ได้ขับเคลื่อนอิเล็กตรอนผ่านตัวรับอิเล็กตรอนตัวต่างๆ ได้แก่ พลาสโตควิโนน (PQ, Plastoquinone) ไซโตโครม บี (Cytochrome b) ไซโตโครม เอฟ (Cytochrome f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) ผ่านระบบแสงที่ 1 ที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ซึ่งเมื่อระบบแสงที่ 1 ถูกแสงมากกระตุ้นคลอโรฟิลล์ภายในระบบแสงที่ 1 ทำให้คลอโรฟิลล์ปลดปล่อยอิเล็กตรอน จนมาถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย หรือเฟอร์ริดอกซิน (Ferredoxin, FDX) อิเล็กตรอนจากเฟอร์ริดอกซินจะไปรวมตัวกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.6 (Dubini *et al.*, 2011) ดังสมการที่ 8 และ 9 และแสดงปฏิกิริยารวมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงทางตรงดังสมการที่ 10



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 แสดงวิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางตรงของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii*

ที่มา : Khetkorn. *et al.* (2017)

### 2.5.3 กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis)

ในกระบวนการนี้จะขึ้นอยู่กับ NADP-plastoquinone oxidoreductase (NPQR) และระบบแสงที่ 1 เท่านั้น ซึ่งสาหร่ายสีเขียวสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ทำให้ได้คาร์โบไฮเดรต เช่น แป้งหรือน้ำตาลกลูโคส เป็นผลิตภัณฑ์ที่สะสมอยู่ในเซลล์ ดังนั้นในกระบวนการนี้จะเริ่มจากโมเลกุลของแป้งจะถูกย่อยสลายผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis) ได้เป็นไพรูเวต ส่งผลให้มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนจากกระบวนการย่อยสลายนี้ออกมาในรูป NADH โดย NPQR จะทำหน้าที่เป็นตัวพาอิเล็กตรอนส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (PQ) และส่งผ่านไปที่ตัวรับอิเล็กตรอนตัวอื่นๆ จนถูกส่งต่อไปยังระบบแสงที่ 1 เพื่อรับพลังงานอีกครั้งก่อนที่พลังงานที่ได้ส่งต่อไปยังอิเล็กตรอนที่ถูกกระตุ้นไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน ดังสมการที่ 11 และ 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ประโยชน์ของการสังเคราะห์แสงแบบทางอ้อม คือ สามารถใช้คาร์บอนจากแหล่งคาร์บอนแหล่งอื่นเพื่อให้ได้โปรตอนและอิเล็กตรอนในการสร้างไฮโดรเจน ซึ่งส่วนมากจะพบในไซยาโนแบคทีเรีย (Mathews and Wang, 2009)

#### 2.5.4 กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark fermentation)

ในกระบวนการนี้จะเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงและไร้ออกซิเจน โดยที่ไพรูเวตจะถูกออกซิไดซ์ผ่านเอนไซม์ PFR ได้เป็นอะซิติล โค เอนไซม์ เอ (Acetyl CoA) คาร์บอนไดออกไซด์ และอิเล็กตรอน ซึ่ง FDX จะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนที่ถูกปลดปล่อยออกมา และส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่วิธีนี้ยังคงให้ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่น้อยเมื่อเทียบกับอีก 2 วิธีที่กล่าวในข้างต้น (Dubini *et al.*, 2011)

## 2.6 ความหมายและหลักการของเทคนิค PCR

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน หรือ พีซีอาร์ (PCR: Polymerase chain reaction) เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย แคร์รี่ มุลลิส (Kary Mullis) ในปี 1993 โดยทั่วไปมักมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ยีนที่ต้องการ และเพิ่มขยายยีนดังกล่าว ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่า เป็นการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจในหลอดทดลอง จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า In vitro enzymatic gene amplification ปัจจุบันเทคนิค PCR ได้เข้ามามีบทบาทต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นงานในด้านเทคนิคการแพทย์ ด้านงานวิจัยชีวโมเลกุล และพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) ซึ่งหลักการพื้นฐานของเทคนิค PCR คล้ายกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ โดยใช้ดีเอ็นเอสายหนึ่งเป็นต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์พวก DNA polymerase ช่วยให้สายดีเอ็นเอยาวออกไป โดยมีการเลือกจับกับนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด คือ dATP, dGTP, dCTP และ dTTP เพื่อจับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอต้นแบบ (template) นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบต่างๆ ในการทำ PCR ได้แก่

### 1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA)

DNA ต้นแบบที่มีลำดับเบสเป้าหมายหรือดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA Target) สามารถใช้ในปฏิกิริยาของ PCR ในลักษณะ DNA สายเดี่ยวหรือ DNA สายคู่ ในกรณีที่ Template ตั้งต้นเป็น RNA จะต้องเพิ่มอีกขั้นตอน คือ การสร้างสาย complementary DNA (cDNA) โดยใช้ RNA เป็นต้นแบบหรือการทำอีกสายหนึ่งขึ้นมาเข้ากับ RNA นั้นเอง เพื่อจะเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ได้ เรียกขั้นตอนในช่วงนี้ว่า Reverse transcription (RT) โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เช่น M-MLV reverse

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

transcriptase ที่ได้จาก Moloney Murine Leukemia Virus หรือ AMV reverse transcriptase ที่ได้จาก Avian Myeloblastosis Virus ซึ่ง RT จากไวรัสทั้งสองตัวมีประสิทธิภาพในการสร้าง cDNA ที่ไม่แตกต่างกัน ในส่วนของการสร้างสาย cDNA จะใช้ไพรเมอร์ที่เป็น oligo-dT โดยจะมีอาร์เอ็นเอจำเพาะที่เป็น Poly (A)<sup>+</sup> RNA เท่านั้นที่ถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบในการสร้างสาย cDNA หรือการใช้ไพรเมอร์ Random hexamer เป็นไพรเมอร์ที่ไม่มีควมจำเพาะ สามารถจับกับอาร์เอ็นเอทุกชนิด ดังนั้น cDNA ที่เกิดขึ้นจึงมีความหลากหลายมาก หรือไพรเมอร์ที่เป็น gene specific primer (GSP) ซึ่งสามารถใช้ในการสร้างสาย cDNA ที่จำเพาะที่สุด จากนั้นนำสาย cDNA ที่สังเคราะห์ได้เข้าสู่ขั้นตอน PCR ต่อไป

## 2. ไพรเมอร์ (Primer)

เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides) สายสั้นๆ นิยมใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวประมาณ 20-24 คู่เบส มีองค์ประกอบของ G และ C ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไพรเมอร์จะเป็นตัวเริ่มต้นของการสร้าง DNA สายใหม่ในบริเวณช่วงดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนที่ต้องการ โดยทั่วไปใช้ไพรเมอร์ 2 เส้นในปฏิกิริยา PCR คือ forward primer และ reverse primer ซึ่งไพรเมอร์ที่ดีต้องมีค่า  $T_m$  (melting temperature) ของทั้งสองเส้นเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ไพรเมอร์ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมาย (target sequence) ในดีเอ็นเอต้นแบบ และควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จับกับลำดับเบสของตัวเอง

## 3. Thermostable DNA polymerase

เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้าง DNA สายใหม่หรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ในตำแหน่งยีนที่ต้องการโดยการนำ deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ได้แก่ เบส A, T, C และ G มาต่อในตำแหน่งที่ถัดจากไพรเมอร์ในแต่ละข้างด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ โดยมีความจำเพาะกับ DNA ต้นแบบ ในทิศทาง 5' → 3' (polymerase activity) นอกจากนี้เอนไซม์ยังทำหน้าที่ในการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ในบริเวณที่มีการเติมลำดับเบสไม่ถูกต้องในทิศทาง 3' → 5' (exonuclease activity) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติอีกประการหนึ่ง คือ การตรวจสอบความผิดพลาดของการสร้าง DNA สายใหม่ หรือ proofreading activity โดยเอนไซม์ที่ใช้จะต้องมีประสิทธิภาพในการทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง นิยมใช้ *Taq* DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อน คือ *Thermus aquaticus* (*Taq*) เนื่องจากมีคุณสมบัติในการทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน denature ความเข้มข้นที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 1.0-2.5 units ซึ่งถ้าความเข้มข้นมากเกินไปจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่จำเพาะขึ้น ทำให้เกิด nonspecific background มาก แต่ที่ความเข้มข้นน้อยเกินไปผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะน้อย

## 4. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)

ประกอบด้วย dATP, dGTP, dCTP และ dTTP ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ A, G, C และ T ที่ใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ PCR สายใหม่ โดยความเข้มข้นของ dNTPs ปกติจะอยู่ระหว่าง 50-200 ไมโครโมลาร์ ถ้าหากมีการใช้ dNTPs ที่ความเข้มข้นสูงเกินไป จะเกิดการต่อลำดับเบสคู่สมที่ผิดพลาด

## 5. บัฟเฟอร์ (PCR buffer)

มีส่วนช่วยให้ปฏิกิริยา PCR เกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยบัฟเฟอร์จะสอดคล้องกับชนิดของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้ โดยทั่วไปจะเตรียมบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 เท่าของที่ใช้จริง (10X) คือ ใส่บัฟเฟอร์ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมในปฏิกิริยา PCR

องค์ประกอบอื่นๆ ที่สำคัญ คือ แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ ) ซึ่งทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (co-factor) ของเอนไซม์พอลิเมอเรส และมีผลต่อประสิทธิภาพของการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปความเข้มข้นสุดท้ายของ  $MgCl_2$  ที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ 1.5 มิลลิโมลาร์ แต่สามารถปรับความเข้มข้นให้อยู่ในช่วง 1-5 มิลลิโมลาร์ได้โดยคำนึงถึงลักษณะของดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ และสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

น้ำที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน คือ ควรใช้น้ำที่ปราศจาก DNase หรือ RNase และไม่มีการปนเปื้อนอื่นๆ

นอกจากนี้ในการทำ PCR อาจมีการเติมสารเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ลงไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเฉพาะในกรณีที่ดีเอ็นเอต้นแบบมีองค์ประกอบของ G และ C มาก (GC-rich template) หรือต้องการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดยาวๆ (long PCR product) เช่น DMSO, DTT, BSA และ betaine เป็นต้น โดยที่ DMSO ใส่ลงไปเพื่อลด secondary structure ของ DNA Gelatin หรือ Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถช่วยคงสภาพของเอนไซม์ได้ (เมธี, 2561 ; Gibthai Training Center, 2561)

### 2.6.1 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

#### 1. ขั้นตอน Denaturation

เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 วินาที อย่างไรก็ตามการใช้เวลานานและอุณหภูมิที่สูงเกินไป จะทำให้นิวคลีโอไทด์และเอนไซม์สูญเสียคุณสมบัติได้ แต่ถ้าใช้เวลาน้อยและอุณหภูมิที่ต่ำเกินไป จะทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันไม่ดี ทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR ลดลง

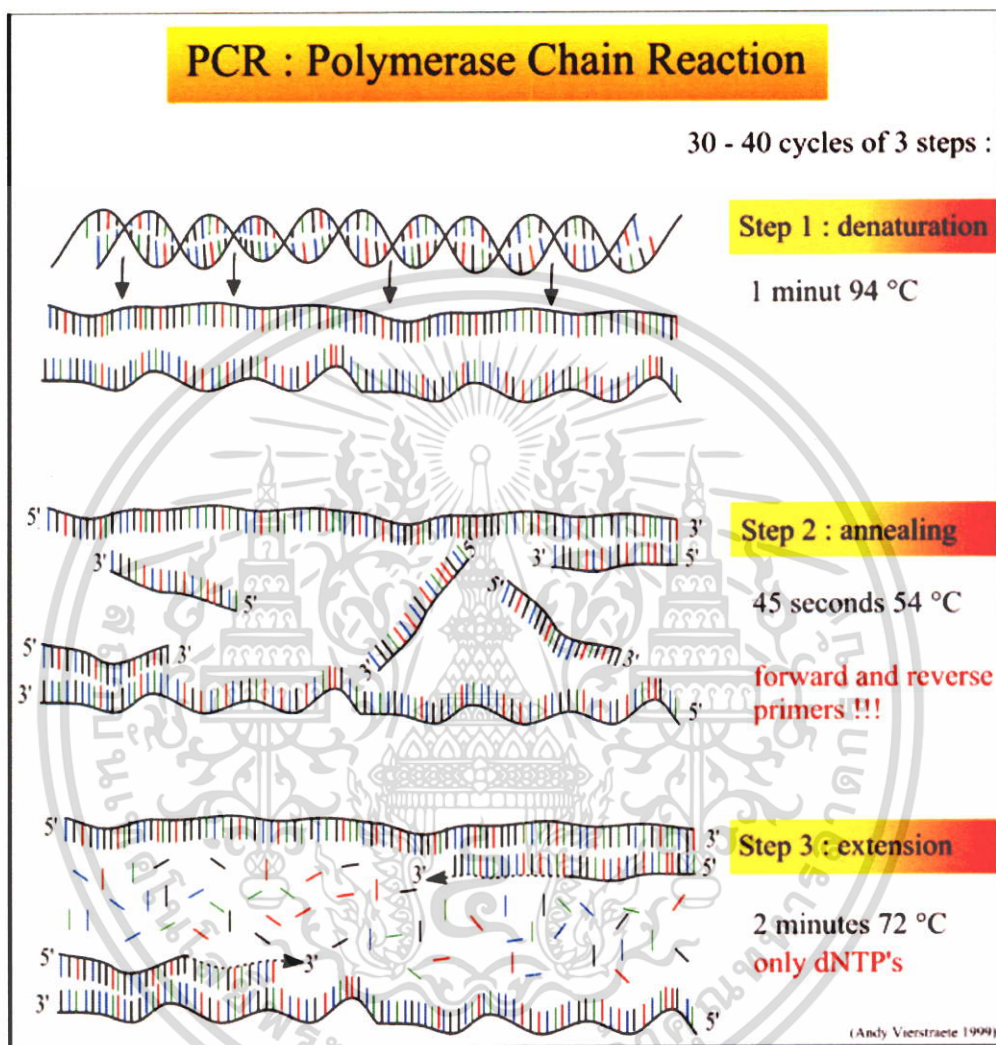
#### 2. ขั้นตอน Annealing

เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่จำเพาะเพื่อเตรียมสร้างผลิตภัณฑ์ PCR ใหม่ ในขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 55-72 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิในการจับตัวจะขึ้นอยู่กับค่า  $T_m$  ของไพรเมอร์ โดยใช้อุณหภูมิในการจับตัวที่ต่ำกว่า  $T_m$  ประมาณ 5 องศาเซลเซียส การใช้อุณหภูมิที่สูงในขั้นตอนนี้จะช่วยในการเพิ่มความจำเพาะในการจับคู่

#### 3. ขั้นตอน Extension

เป็นขั้นตอนการสร้าง DNA สายใหม่โดยเริ่มจากจุดต้นของไพรเมอร์ในแต่ละข้างของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยนำ dNTPs ต่างๆ มาต่อกันในลักษณะที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ อาศัยการทำงานเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอนไซม์พอลิเมอเรส โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ ในส่วนของเวลาที่ ใช้จะขึ้นอยู่กับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 1 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2.8 กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ที่มา: [http://www.barascientific.com/article/DNA/dna\\_4.php](http://www.barascientific.com/article/DNA/dna_4.php)

## 2.6.2 การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR

### 1. Gel electrophoresis

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาแยกตามขนาด DNA โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกขนาด DNA บน เจลอะกาโรส (agarose gel) หรือเจลพอลิอะคริลามิเด (polyacrylamide gel) เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน จากนั้นนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ดีควรให้ชั้นดีเอ็นเอที่ชัดเจน และตรงตามขนาดความต้องการ แต่ถ้ามีขนาดเล็กและแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน อาจเป็นดีเอ็นเอที่เป็นไดเมอร์ (dimer)

## 2. Nucleic acid hybridization

ในกรณีที่ดูผลจากเจลด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสไม่ชัดเจน สามารถนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรงกับแผ่น nitrocellulose หรือ แผ่น nylon แล้วนำมาทำ southern blot, dot blot หรือ slot blot โดยอาศัยตัวติดตาม (probe) ที่จำเพาะกับเบสคู่สม ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือ สารปลดรังสี จากนั้นจึงนำผลที่ได้ไปดูการจับของผลิตภัณฑ์ PCR กับตัวติดตาม

## 3. Direct sequencing

เมื่อต้องการทราบรายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือผลิตภัณฑ์ PCR ว่าถูกต้องแน่นอนหรือไม่ สามารถตรวจหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing PCR ที่เป็นสายคู่ (double strand PCR products) หรือ sequencing PCR ที่เป็นสายเดี่ยว (single stranded PCR products) (Gibthai Training Center, 2561)

## 2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจน

### 2.7.1 สายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

สาหร่ายสีเขียวในแต่ละสายพันธุ์มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น *Anabaena variabilis* strain AVM13 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจน คือ 135 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อ มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง (Happe *et al.*, 2000) *Nostoc punctiforme* strain NHM5 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจน คือ 14 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อ มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง (Lindberg *et al.*, 2002) *Synechocystis* strain PCC 6803 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจน คือ 300 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อ มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง (Baebprasert *et al.*, 2011) *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strain L159I-N230Y มีอัตราการผลิตไฮโดรเจน คือ 5.77 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง (Torzillo *et al.*, 2009) เป็นต้น อันเนื่องมาจากสาหร่ายสีเขียวแต่ละสายพันธุ์มี เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ไม่เหมือนกันดังที่กล่าวไปข้างต้น ส่งผลให้มีการเร่งปฏิกิริยาได้แตกต่างกัน

นอกจากนี้สาหร่ายสีเขียวในแต่ละสายพันธุ์ยังทนต่อโมเลกุลของออกซิเจนได้ไม่เท่ากันอีกด้วย เนื่องจากในระบบแสงที่ 2 (PSII) มีการเกิดออกซิเดชันของน้ำส่งผลให้มีการเกิดโมเลกุลของออกซิเจนขึ้นซึ่งจะมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ มีการสันนิษฐานกันว่าออกซิเจนจะไปเกาะกับอะตอมของเหล็กภายในบริเวณของ [FeFe] (double Fe subcluster) และในทางเดียวกันยังเกิดการยับยั้งแบบแข่งขันกับโปรตอนที่จะไปเกาะกับเหล็กเพื่อต้องการสร้างไฮโดรเจน ยิ่งไปกว่านั้นออกซิเจนยังมีการแสดงออกที่ไปยับยั้งการแสดงออกของยีนไฮโดรจีเนส เช่นการถอดรหัสของยีน HydA และ HyDEF3 ที่ถูกกระตุ้น (Srirangan *et al.*, 2011) ส่งผลให้สาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ไม่เท่ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสายพันธุ์ของจุลสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Tetraspora sp.* CU2551, *Bumilleriopsis peterseniana*, KS01 และ KS03 อันเนื่องมาจากสาหร่ายทั้ง 4 ชนิดนี้ได้รับการยืนยันจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Maneeruttanarungroj *et al.* (2010) และ Maswana *et al.* (2018) ได้ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora sp.* CU2551 พบว่า สาหร่ายสายพันธุ์นี้นั้นมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่า *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งถือเป็นโมเดลของการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำสาหร่ายสายพันธุ์นี้มาเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนกับสาหร่ายสีเขียว KS01 และ KS03 ซึ่งเป็นสาหร่ายที่มีการคัดแยกได้จากแหล่งน้ำจืดในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทำการคัดแยกโดย วัชรภรณ์ เสมาชัยและคณะ (2559) โดยสาหร่าย KS01 และ KS03 ได้มีการทดลองเบื้องต้นพบว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ นอกจากนี้ที่สาหร่ายทั้งสองชนิดนี้เป็นสาหร่ายที่คัดแยกได้ภายในสถาบันที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาล้วนนั้น สาหร่ายทั้งสองชนิดนี้ยังเป็นสาหร่ายสายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาลักษณะสายพันธุ์ และศึกษาสถานะในการผลิตไฮโดรเจนที่เหมาะสม จึงเป็นเหตุผลให้ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย KS01, KS03 รวมถึงสาหร่ายที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ โดยจะนำสาหร่ายที่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุดไปศึกษาในการทดลองต่อไป เพื่อศึกษาลักษณะและสถานะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน

### 2.7.2 ความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดโฟโตออโตโทรฟ (Photoautotroph) ซึ่งสามารถสังเคราะห์แสงได้ รวมถึงเปลี่ยนสารอาหารมาเป็นพลังงานเคมีได้ ซึ่งแสงนั้นเป็นปัจจัยพื้นฐานของสภาพแวดล้อมในการควบคุมการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง ความเข้มแสงที่เพียงพอจะช่วยลดพลังงานและเอทีพีผ่านการส่งผ่านอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Gabrielyan *et al.*, 2017)

จากงานวิจัยของรัตนและคณะ (2553) พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus sp.* KMITL-01 มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันทุกความเข้มแสง และเมื่อนำมาวิเคราะห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจนพบว่า ที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus sp.* KMITL-01 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ 1.353 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าแสงมีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยที่ความเข้มแสงยิ่งมาก จะยิ่งมีการเกิดอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีอิเล็กตรอนเคลื่อนที่ไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมากขึ้น จึงผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามในสถานะที่มีความเข้มแสงมากขึ้นนั้น จะก่อให้เกิดการผลิตโมเลกุลของออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งออกซิเจนเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนที่ลดลง จึงต้องมีการปรับสถานะให้เหมาะสมในสาหร่ายสีเขียวแต่ละสายพันธุ์

### 2.7.3 แหล่งของคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวและการผลิตไฮโดรเจน

สาหร่ายสีเขียวมีการเจริญเติบโตและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อาหารเหลว TAP (Tris-acetate phosphate medium) ซึ่งส่วนประกอบของอาหารเหลว TAP มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญเติบโตและใช้ในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว ซึ่งในการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนนั้นอาจส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยได้มีการศึกษาในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-01 (รัตนา, 2553) พบว่าเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว TAP และอาหารเหลว TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ นั้นมีการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจน พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-01 ในอาหารเหลว TAP ที่มีการให้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ 0.937 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าในอาหารเหลว TAP ปกติ

### 2.7.4 การปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

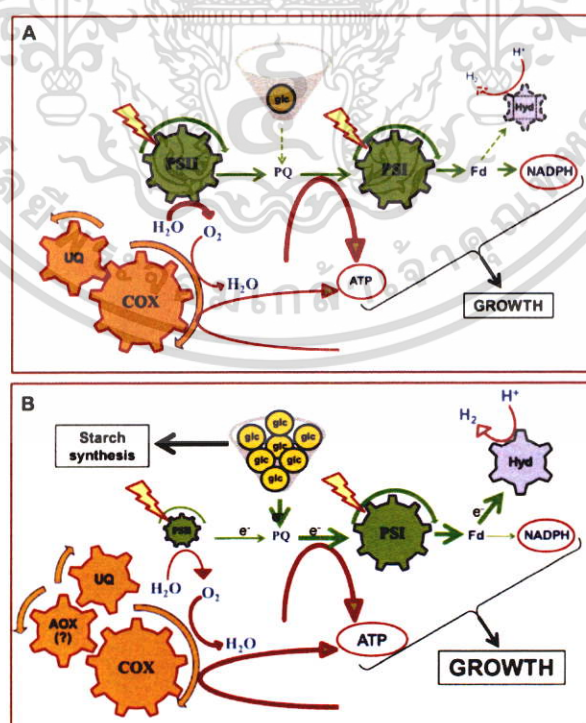
การปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ (Sulfur-deprivation) เป็นหนึ่งในรูปแบบของการศึกษาที่เข้มข้นที่สุด เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนในกระบวนการสังเคราะห์แสง (Oxygenic photo-H<sub>2</sub> production) โดยเฉพาะในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* พบว่า มีการถ่ายโอนเซลล์ *C. reinhardtii* จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีธาตุอาหารอุดมสมบูรณ์ ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ (Sulphur-limiting medium) โดยระบบจะเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจนเมื่อทำการบ่มเป็นระยะเวลามากกว่า 24 ชั่วโมง เพื่อเริ่มต้นผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีแสง การขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ (Sulphur deprivation) ทำให้เกิดการลดลงของการทำงานในระบบแสงที่ 2 แต่กระบวนการหายใจของเซลล์ (Mitochondrial respiration) ยังมีอัตราที่สูงอยู่ ดังนั้นความเข้มข้นของโมเลกุลออกซิเจนมีค่าลดลง และเกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Mckinlay *et al.*, 2010)

การที่ระบบเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจนเมื่อทำการปรับสภาวะเซลล์ *C. reinhardtii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ อันเนื่องมาจากธาตุซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโนซิสเทอีน และกรดอะมิโนเมไทโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน (Protein biosynthesis) โดยเฉพาะในการสังเคราะห์โปรตีน D1 ซึ่งเป็นโปรตีนศูนย์กลาง (Reaction center protein) ในระบบการสังเคราะห์แสง และยังมีผลในวัฏจักรของการซ่อมแซมระบบการสังเคราะห์แสง (PSII repair cycle) (Mckinlay *et al.*, 2010) ส่งผลให้มีการยับยั้งการทำงานของระบบแสงที่ 2 บางส่วนนั้น ทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง (Oxygenic photosynthesis) ลดลง ขณะที่อัตราการหายใจของเซลล์ยังเท่าเดิม ซึ่งการที่ทั้งสองระบบนี้มีอัตราการเกิดที่ไม่เท่ากัน ส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลของทั้งสองระบบ กล่าวคือ ปริมาณออกซิเจนที่เกิดขึ้นในระบบแสงที่ 2 มีปริมาณน้อยกว่าปริมาณออกซิเจนที่นำไปใช้ในกระบวนการหายใจของเซลล์ ระบบเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

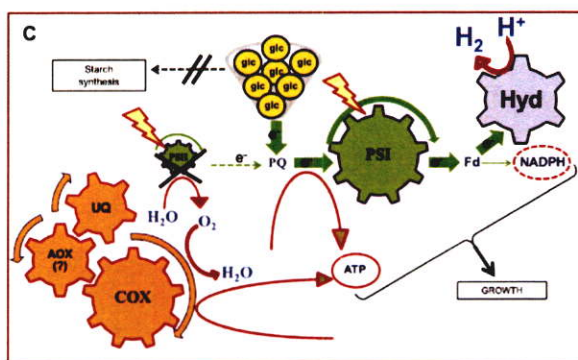
จึงเริ่มเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจน ส่งผลให้มีการเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสแสดงออกถึงความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

การปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียม (Potassium-deprivation) ได้มีการศึกษาในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* (Papazi *et al.*, 2014) ซึ่งในการปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุโพแทสเซียมนี้มีการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีธาตุอาหารสมบูรณ์ เนื่องมาจากการขาดธาตุโพแทสเซียมมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนส่งผลให้มีการทำงานของระบบแสงที่ 2 ลดน้อยลงจากการที่โปรตีน D1 ลดน้อยลง เพราะอัตราการหมุนเวียนนั้นเร็วกว่าโปรตีนตัวอื่นๆ ในไทลาคอยด์ ดังนั้นในสภาวะที่ขาดธาตุโพแทสเซียมนี้ส่งผลให้อัตราการเกิดออกซิเจนลดลงจากการทำงานของของระบบแสงที่ 2 ซึ่งมีการเกิดออกซิเจนน้อยกว่าการใช้ออกซิเจนในการหายใจของเซลล์ นำไปสู่การสร้างสภาวะไร้ออกซิเจนในระบบปิดซึ่งเกิดการกระตุ้นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน

นอกจากนี้โพแทสเซียมบางส่วนยังสามารถถูกแทนที่ได้โดยโซเดียมในกระบวนการหลักทางชีวเคมี ส่งผลให้ระบบยังคงทำงานได้อยู่ แต่โซเดียมไม่สามารถแทนที่โพแทสเซียมในกระบวนการที่เปลี่ยนกลูโคสไปเป็นแป้งได้ ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่เพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุโพแทสเซียมผ่านวิถีในระบบแสงที่ 2 ที่เป็นอิสระ เนื่องจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคสถูกนำไปใช้ในการให้อิเล็กตรอนไปยังสระพลาสโตควิโนน (Plastoquinone-pool) ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้นระบบแสงที่ 1 และมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่มากขึ้น (Papazi *et al.*, 2014)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 แสดงโมเดลสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระบบปิด

- (A) การเลี้ยงเชื้อ *Scenedesmus* ในสภาวะออโตโทรป (Autotrophic cultures)  
 (B) การเลี้ยงเชื้อ *Scenedesmus* ในสภาวะมิกโซโทรป (Mixotrophic cultures)  
 (C) การเลี้ยงเชื้อในสภาวะมิกโซโทรป (Mixotrophic cultures) ภายใต้การขาดโพแทสเซียม

ที่มา : Papazi. et al. (2014)

การเลี้ยงเชื้อ *Scenedesmus* ในสภาวะออโตโทรป (Autotrophic cultures) ซึ่งได้อิเล็กตรอนมาจากการแตกตัวของน้ำจากปฏิกิริยาในระบบแสงที่ 2 (PSII) โดยอิเล็กตรอนจะถูกถ่ายโอนอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงผ่าน PQ-pool PSI และ Fd ก่อนที่จะนำไปใช้ในการเกิด NADPH

การเลี้ยงเชื้อ *Scenedesmus* ในสภาวะมิกโซโทรป (Mixotrophic cultures) ซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยที่กระบวนการหายใจของเซลล์ (Respiration oxygen) มีการใช้ออกซิเจนมากกว่าออกซิเจนที่ผลิตได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthetic oxygen) จึงนำไปสู่สภาวะไร้ออกซิเจน แล้วจึงเกิดการกระตุ้นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้ผลิตไฮโดรเจน กลูโคสสำรองถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์แป้ง และผลิตชีวมวลเพิ่มขึ้นซึ่งจะจำกัดกระบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคสซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดวิถีในระบบแสงที่ 2 ที่เป็นอิสระ

การเลี้ยงเชื้อในสภาวะมิกโซโทรป (Mixotrophic cultures) ภายใต้การขาดโพแทสเซียมทำให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่มากขึ้น ในสภาวะที่ขาดธาตุโพแทสเซียมก่อให้เกิดสภาวะที่ไร้ออกซิเจนเร็วกว่าชุดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นตัวควบคุม เนื่องจากเกิดการยับยั้งการทำงานของระบบแสงที่ 2 ที่แข็งแรงมาก ในทางตรงกันข้าม เซลล์ที่ขาดธาตุโพแทสเซียมไม่มีความสามารถในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นแป้ง นำไปสู่การไหลของอิเล็กตรอนที่เพิ่มขึ้นในระบบแสงที่ 2 ที่เป็นอิสระระดับของกลูโคสที่สูงขึ้นทำให้มีการลดลงอิเล็กตรอนใน PQ-pool ซึ่งมีอิเล็กตรอนส่วนเกินที่มาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคส จึงเกิดการกระตุ้นที่มากขึ้นในระบบแสงที่ 1 และเกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่มากขึ้น

การปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารฟอสฟอรัส (Phosphorus-deprivation) ได้มีการศึกษาในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* และ *Chlorella sp.* โดยเมื่อมีการถ่ายโอนเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุฟอสฟอรัสนั้นระบบจะเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจนเมื่อทำการบ่มเป็นเวลาที่มากกว่า 100 ชั่วโมงในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* (Batyrova et al., 2012) และทำการบ่มเป็นเวลาที่มากกว่า 300 ชั่วโมง ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* (Batyrova et al., 2015) หลังจากนั้นจะเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนขึ้น

เมื่อทำการปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุฟอสฟอรัสนั้น ระบบจะเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจน เนื่องจาก ฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) หรือในดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งการขาดธาตุฟอสฟอรัสจะส่งผลให้การแบ่งเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ลดลง และอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์นั้นลดลง อันเนื่องมาจากมีระดับตัวกลางที่ลดลงในวัฏจักรรีดักทีฟเพนโทสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) ทำให้เกิดการลดลงของระดับตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายส่งผลให้การถ่ายโอนอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง นอกจากนี้ การที่เซลล์ขาดธาตุฟอสฟอรัสยังส่งผลให้ระบบแสงที่ 2 (PSII) มีพลังงานกระตุ้นไม่เพียงพอในการเกิดออกซิเดชันของน้ำ เนื่องจากประสิทธิภาพของการเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานกระตุ้น (Quantum efficiency) แต่โปรตีนในระบบแสงนั้นลดลง ส่งผลให้ระบบการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเกิดขึ้นได้น้อยลง และในเวลาต่อมาอาจมีการยับยั้งระบบแสงบางส่วน (Wykoff et al., 1998) ทำให้การบ่มเริ่มเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงเกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ แต่การยับยั้งระบบแสงที่ 2 ด้วยการขาดธาตุฟอสฟอรัสนั้นจะเกิดได้ช้ากว่าการขาดธาตุซัลเฟอร์ (Batyrova et al., 2012)

การปรับสภาวะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารไนโตรเจน (Nitrogen-deprivation) ได้มีการศึกษาในสาหร่ายจุลสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora sp.* CU 2551 (Maneeruttanarungroj et al., 2010) ซึ่งในการปรับสภาวะเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora sp.* CU 2551 ที่ขาดธาตุอาหารไนโตรเจนนั้น มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่สูงกว่าในสภาวะที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีธาตุอาหารไนโตรเจนสมบูรณ์ เนื่องจากธาตุไนโตรเจนนั้นเป็นองค์ประกอบหลักของ DNA เช่นเดียวกับกับธาตุฟอสฟอรัส อีกทั้งยังเป็นองค์ประกอบหลักของกรดอะมิโนทุกชนิดอีกด้วย ซึ่งกรดอะมิโนมีบทบาทที่สำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน การแบ่งเซลล์ และวัฏจักรในการซ่อมแซมระบบแสงที่ 2 ในกระบวนการสังเคราะห์แสง (PSII Repair cycle) ดังนั้น เมื่อสาหร่ายสีเขียวอยู่ในสภาวะเช่นนี้ กระบวนการต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นจะหยุดทำงานลง ส่งผลให้มีการยับยั้งการทำงานของระบบแสงที่ 2 บางส่วน มีปริมาณออกซิเจนลดลง ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานได้ดีขึ้น (Wykoff et al., 1998)

### 2.7.5 ค่า pH ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

ค่า pH ของอาหารเลี้ยงสาหร่ายเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญ ซึ่งอิทธิพลของค่า pH ไม่เพียงแต่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงสาหร่าย แต่ยังส่งผลต่ออายุขัยของสาหร่ายอีกด้วย ซึ่งในการทำงานของเซลล์ในสาหร่ายสีเขียว เช่น การนำคาร์บอนไดออกไซด์เข้าเซลล์นั้น ค่า pH จะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการละลายของคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้การดูดซึมไอออนอื่นๆ รวมถึงการดูดซึมสารอาหารต่างๆ การทำงานของเอนไซม์ส่วนมากภายในเซลล์ และผนังเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงล้วนได้รับผลกระทบจากการแปรผันของค่า pH ภายนอกเซลล์หรือค่า pH จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งค่า pH ที่มีความเป็นกรดจะเปลี่ยนแปลงความสามารถในการนำสารอาหารเข้าเซลล์และกระบวนการทำงานของเซลล์ ขณะที่ค่า pH ที่มีความเป็นเบสนั้นจะลดความสามารถในการจับคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่แยกได้ แต่โดยส่วนมากนั้นจะให้ pH อยู่ในช่วง 6-10 ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว โดยที่สาหร่ายที่มีสปีชีส์เดียวกันนั้นยังมีการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันได้และไม่ได้มีการระบุว่สาหร่ายในแต่ละสปีชีส์จะมีค่า pH ที่เหมาะสมเท่ากัน (Chia *et al.*, 2017)

### 2.7.6 สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

โดยธรรมชาตินั้นสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเป็นแหล่งของอิเล็กตรอนที่ดีของตัวรับอิเล็กตรอนใดๆ มีบางงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสอาจทำหน้าที่ควบคุมสภาวะของอิเล็กตรอนโดยสภาวะรีดอกซ์ ได้มีการศึกษาในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 โดยการเติมสาร  $\beta$ -mercaptoethanol ซึ่งเป็นสารที่ให้อิเล็กตรอนลงในอาหารเหลว TAP พบว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่มีค่าสูงสุด คือ 0.42 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) เนื่องจากว่าสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนนั้นสามารถให้อิเล็กตรอน และอิเล็กตรอนเหล่านี้สามารถถูกถ่ายโอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอนต่างๆ ภายในกระบวนการสังเคราะห์แสง ส่งผลให้มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปที่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสและเกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Abeliovich และคณะ (1978) ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรปในที่มืด และมีการให้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วทำการเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรป ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีการให้คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ในสภาวะเฮเทอโรโทรปในที่มืดที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสที่ 0.01, 0.05, 0.1, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่าที่สภาวะที่มีการให้ความเข้มข้นของกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้สูงที่สุด นอกจากนี้ยังมีค่ามากกว่าในเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟถึง 5 เท่า

Guan และคณะ (2004) ได้ทำการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *P. subcordiformis* ผ่านกระบวนการ 2 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนที่สองซึ่งเป็นขั้นตอนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้น จะทำการบ่มภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ และทำการบ่มภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจน พบว่าสาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงถึง 13 เท่าเมื่อทำการเทียบกับการบ่มภายใต้สภาวะที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์

Tsygankov และคณะ (2006) ได้ทำการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *C. reinhardtii* โดยทำการบ่มภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ ซึ่งในตอนแรกทำการบ่มสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อขาดอะซิเตทหรือสารประกอบอินทรีย์ และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ความเข้มแสงที่ต่ำ (25 ไมโครโวนส์ต่อตารางเมตรต่อวินาที) สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้  $56.4 \times 10^{-3}$  ลูกบาศก์เมตรต่อลูกบาศก์เมตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ( $m^3 / m^3$  culture) อันเนื่องมาจากออกซิเจนที่เกิดขึ้นได้ถูกใช้ไป ส่งผลให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น แต่เมื่อทำการเปลี่ยนอาหารให้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ และทำการเพิ่มความเข้มแสงเป็น 110–120 ไมโครโวนส์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ซึ่งพบว่ามีการผลิตออกซิเจนที่สูงขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลง

Maneeruttanarungroj และคณะ (2010) ได้ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากบ่อน้ำจืดตามธรรมชาติที่จังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงนั้นสามารถระบุชนิดได้คือ *Tetraspora* ในการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ของยีน 18S rRNA แสดงให้เห็นว่าเป็นสาหร่ายสีเขียวและระบุสายพันธุ์ได้เป็น *Tetraspora* sp. CU2551 ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 นั้นมีปริมาณคลอโรฟิลล์ คือ 0.96 – 3.43 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์นี้สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองได้เป็นสองเท่าเมื่อเจริญเติบโตในอาหารเหลว TAP (Tris-acetate-phosphate) โดยใช้เวลาที่สั้นที่สุดเมื่อทำการบ่มภายใต้ความเข้มแสง 48–92 ไมโครโวนส์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส นอกจากนี้สาหร่ายสีเขียวยังมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มค่า pH จาก 5.75 ไปยัง 9.30 เมื่อทำการเติม 0.5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol ในอาหารเหลว TAP สามารถกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มเป็น 2 เท่า ในขั้นการผลิตไฮโดรเจนนั้นเมื่อทำการบ่มภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดทั้งธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์พบว่าเพิ่มการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในอัตราที่สูงถึง 17.3–61.7 ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ( $\mu\text{mol}/\text{mg Chl A}/\text{h}$ ) หรือ 423–1511 ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัม ซึ่งเป็นอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ ทำให้สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 นั้นเป็นโมเดลที่น่าสนใจสำหรับกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chien และคณะ (2012) พบว่าสาหร่ายสีเขียวสามารถเปลี่ยนพลังงานแสงไปเป็นพลังงานทางชีวภาพ (Solar-to-H<sub>2</sub>) ได้ โดย H<sup>+</sup> และ e<sup>-</sup> ถูกเร่งด้วยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในคลอโรพลาสต์ เพื่อเกิดเป็นไฮโดรเจน ยีนไฮโดรจีเนสถูกถอดรหัส (transcription) และทำงานภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนหรือสภาวะอาหารที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ งานวิจัยนี้ได้เพิ่มระดับการแสดงออกของยีนไฮโดรจีเนสให้สูงขึ้น (Homologously overexpress hydA) ให้สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. DT (DT) ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะอาหารที่มีธาตุซัลเฟอร์ โดยนิวคลีโอไทด์ของจีโนมิกดีเอ็นเอบางส่วน (Genomic DNA) และ cDNA ในช่วงที่มีการถอดรหัส (coding region) ของไฮโดรจีเนส ถูกนำมาหาลำดับและนำมาโคลน ในยีนไฮโดรจีเนส (hydAc) ใส่เข้าไปในพลาสมิด ทำให้สามารถทำงานได้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน DT ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจีโนมด้วยพลาสมิดที่ส่งเข้า ส่งผลให้มีชิ้นส่วนของ hydAc ในจีโนมิกดีเอ็นเอนี้ด้วย ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะอาหารที่มีธาตุซัลเฟอร์พบการถอดรหัส RNA ของ hydAc และยังพบการแสดงออกของโปรตีน HydA ในสาหร่าย DT ที่มีการตัดต่อทางพันธุกรรมอีกด้วย ส่งผลให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพิ่มขึ้น 7-10 เท่าเมื่อเทียบกับสาหร่าย DT ที่ไม่ได้มีการตัดต่อทางพันธุกรรมภายใต้สภาวะเดียวกัน

Tamburic และคณะ (2012) พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* มีความสามารถในการผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนซึ่งเป็นพลังงานที่สะอาดและใช้แล้วไม่หมดไป ผ่านกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำโดยใช้แสง การผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้นภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนซึ่งทำได้โดยการบ่มภายใต้สภาวะที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ ในกระบวนการผลิตต้องทำการแยกถังเพาะเลี้ยง (Photobioreactors) สำหรับในขั้นตอนของการเจริญเติบโตของสาหร่ายและในขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจน ส่งผลให้มีค่าใช้จ่ายมากขึ้นและต้องใช้พลังงานอย่างมากในการเปลี่ยนถ่ายโดยอาศัยการปั่นเหวี่ยง จุดประสงค์ของงานนี้เพื่อแสดงว่าทั้ง 2 กระบวนการนี้สามารถเกิดในถังเพาะเลี้ยงเดียวกันได้ โดยทำการศึกษาปริมาณการใช้ซัลเฟต อะซิเตท อัตราการดูดซึ่มซัลเฟตและอะซิเตทในระหว่างการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่ให้แสงต่างกัน เพื่อทำการปรับปรุงความเข้มข้นของซัลเฟตและอะซิเตทเริ่มต้นเพื่อให้สารอาหารเหล่านี้หมดไปในเวลาที่แน่นอนที่ความหนาแน่นของสาหร่ายสูงสุด วิธีการควบคุมสารอาหาร (Nutrient control method) นี้ช่วยให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้เต็มที่และเข้าสู่โหมดการผลิตไฮโดรเจนได้เองโดยไม่ต้องใช้เทคนิคในการแยกอาหารเหลว อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนถูกวัดโดย Membrane-inlet mass spectrometry (MIMS) นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีการควบคุมสารอาหารโดยปรับปรุงความเข้มข้นของซัลเฟตเริ่มต้นนั้นมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดซึ่งสูงกว่าวิธีการเจือจางและวิธีการปั่นเหวี่ยง คือ 1.30 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง และให้ผลผลิต คือ 112.7 มิลลิลิตรต่อลิตร

Papazi และคณะ (2014) กล่าวว่าไฮโดรเจนถูกพิจารณาว่าเป็นพลังงานที่เหมาะสมในอนาคต และคาดว่าจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจทั่วโลก ความสามารถของสาหร่ายสีเขียวในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนถูกค้นพบเมื่อ 74 ปีก่อน ได้ทำการทดลองอยู่หลายครั้งเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งวิธีที่เพิ่มความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เป็นที่รู้จักกันดี คือ ทำการบ่มในเอกสารที่เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญัตินั้นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะที่ขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ แต่วิธีการนี้มีการเพิ่มอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ไม่ยั่งยืน ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการบ่มสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียม ซึ่งโพแทสเซียมนั้นสามารถใช้แทนที่โซเดียมได้บางส่วนในกระบวนการหลักทางชีวเคมี ส่งผลให้ระบบยังคงทำงานได้ อย่างไรก็ตาม โซเดียมไม่สามารถใช้แทนที่โพแทสเซียมในกระบวนการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นแป้งได้ ซึ่งเป็นข้อเท็จจริงที่ทำให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นผ่านวิถีในระบบแสงที่ 2 (PSII) และจากอิเล็กตรอนที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคสซึ่งจะถูกนำมาใช้ในการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้ยังมีการยับยั้งการผลิตออกซิเจน เนื่องจากไม่เกิดการกระตุ้นในระบบแสงที่ 2 (PSII) จึงทำให้ระบบเริ่มเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจน ส่งผลให้มีการกระตุ้นในระบบแสงที่ 1 (PSI) เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการถ่ายโอนอิเล็กตรอนไปที่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมากขึ้น และเกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน

Scoma และคณะ (2017) รายงานว่าสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวหลากหลายสปีชีส์ เช่น *Chlamydomonas reinhardtii* จะมีเอนไซม์ [FeFe]-hydrogenase ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน โดยอิเล็กตรอนจะถูกถ่ายโอนอิเล็กตรอนผ่านตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง ดังนั้นภายใต้สภาวะที่จำเพาะ สาหร่ายจะสามารถใช้แสงในการสร้างโมเลกุลไฮโดรเจนได้ ซึ่งเป็นเส้นทางที่ยั่งยืนในการสร้างพลังงานเชื้อเพลิงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันมักจะทำการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย *C. reinhardtii* ภายใต้อาหารที่ขาดธาตุอาหารหลัก เช่น ขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ ส่งผลให้มีการควบคุมการเกิดโมเลกุลออกซิเจนในกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งในการตอบสนองต่อการปรับตัวให้ชินกับสภาพแวดล้อมใหม่นี้ ทำให้เอนไซม์ [FeFe]-hydrogenase ที่ไว (sensitive) ต่อออกซิเจนนั้นกลายเป็นเอนไซม์ที่กระตือรือร้น (active) และทำหน้าที่เป็นแอ่งเก็บอิเล็กตรอน เพื่อเป็นทางเลือกในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการบ่มเซลล์ *C. reinhardtii* ในอาหารที่มีการขาดธาตุซัลเฟอร์ เพื่อที่จะตรวจสอบการนำไฮโดรเจนเข้าเซลล์ (uptake  $H_2$ ) ในถังเพาะเชื้อ (Photobioreactors) ที่ต่างกัน ในปริมาณของเฟสที่เป็นก๊าซ (gas phase) ที่แตกต่างกัน ทั้งในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่องหรือในสภาวะที่มีมืด พบว่ามีการนำไฮโดรเจนเข้าเซลล์มากขึ้น หลังจากทำการบ่มเป็นระยะเวลาในสภาวะที่มีแสงเช่นเดียวกันกับในสภาวะที่มีมืด โดยในการบ่มในที่มืดนั้น จะทำให้การนำไฮโดรเจนเข้าเซลล์เกิดขึ้นได้ช้า เมื่อเติมเอนไซม์ฟอสโฟไรโบส ไคเนส (Phosphoribulose kinase) ที่เป็นตัวยับยั้ง Glycolaldehyde ซึ่งเป็นตัวที่เชื่อมต่อกับเมตาบอลิซึมในคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate metabolism)

## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 สาหร่าย

1. สาหร่ายสีเขียว KS03 ที่ทำการคัดแยกโดย วัชรภรณ์ เสมาชัยและคณะ (2559)
2. สาหร่ายสีเขียว *tetraspora* sp. CU2551 ที่ทำการคัดแยกโดย  
เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์และคณะ (2554)
3. สาหร่ายสีเขียว KS01 ที่ทำการคัดแยกโดย วัชรภรณ์ เสมาชัยและคณะ (2559)
4. สาหร่ายสีเขียว *Bumilleriopsis peterseniana* ที่ทำการคัดแยกโดย  
ปัญญารักษ์ รุ่งนุรักษ์และคณะ (2558)

### 3.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย

1. อาหาร TAP (Tris-acetate phosphate medium) pH 7.2
2. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารแคลเซียม หรือ TAP-Ca
3. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียม หรือ TAP-K
4. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารไนโตรเจน หรือ TAP-N
5. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารแมกนีเซียม หรือ TAP-Mg
6. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ หรือ TAP-S
7. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารฟอสฟอรัส หรือ TAP-P
8. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารเหล็ก หรือ TAP-Fe
9. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารแมงกานีส หรือ TAP-Mn
10. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารสังกะสี หรือ TAP-Zn
11. อาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารคอปเปอร์ หรือ TAP-Cu
12. อาหาร TAP ที่ปราศจากกรดอะซิติก หรือ TP
13. อาหาร TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอล หรือ TP+Gly
14. อาหาร TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส หรือ TP+Su
15. อาหาร TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส หรือ TP+Gu
16. อาหาร TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นไตรโซเดียมซิเตรต หรือ TP+Cit
17. อาหาร TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโซเดียมไฮโดรเจนไบคาร์บอเนต หรือ TP+NaHCO<sub>3</sub>
18. อาหาร TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโพแทสเซียมคาร์บอเนต หรือ TP+K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 สารเคมี

#### 3.3.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีโนมีเทน (Tris-base) (CARLO ERBA, India)
2. แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (LOBALO Chemie, India)
3. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (LOBALO Chemie, India)
4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Ajax Finechem Pty, Australia)
5. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (LOBALO Chemie, India)
6. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (LOBALO Chemie, India)
7. เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ ( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (LOBALO Chemie, India)
8. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (LOBALO Chemie, India)
9. กรดบอริก ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) (LOBALO Chemie, India)
10. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (LOBALO Chemie, India)
11. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (LOBALO Chemie, India)
12. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (CARLO ERBA, India)
13. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (LOBALO Chemie, India)
14. แอมโมเนียมโมลิบเดต ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (LOBALO Chemie, India)
15. กรดอะซิติก ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (CARLO ERBA, India)
16. โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ) (LOBALO Chemie, India)
17. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (LOBALO Chemie, India)
18. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
19. โซเดียมซัลเฟต ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
20. แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (LOBALO Chemie, India)
21. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (CARLO ERBA, India)
22. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) (LOBALO Chemie, India)
23. อะการ์ อะการ์ (Agar Agar Bacto) (S D fine-chem limited: SDFCL, India)
24. กลีเซอรอล ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ )
25. ซูโครส ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ )
26. กลูโคส ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )
27. ไตรโซเดียมซิเตท ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) (Fisher Scientific, USA)
28. โซเดียมไฮโดรเจนไบคาร์บอเนต ( $\text{NaHCO}_3$ ) (CARLO ERBA, India)
29. โพแทสเซียมคาร์บอเนต ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30. เมทิลไวโอลोजีน (Methylviologen)
31. ไดไทโอไนท์ (Dithionite)
32. เบต้า-เมอแคปโทเอทานอล ( $\beta$ -mercaptoethanol)
33. นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ (NADH)

### 3.3.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

- เมทานอล ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )

### 3.3.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

1. ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotide triphosphate, dTPs)
2. เอนไซม์ DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific, USA), เอนไซม์ *RBC Taq* DNA polymerase (RBC Bioscience) และเอนไซม์ *KAPA Taq* DNA polymerase (KAPA Biosystems)
3. ไพรมเมอร์ (18S Forward primer, 18S Reverse primer, HydAF primer, HvF1 primer, HvF2 primer, HydAR primer, HvR1 primer and HvR2 primer) (Maneeruttanarungroj. *et al.*, 2010)
4. บัฟเฟอร์ 10X DreamTaq Green (Thermo Scientific, USA), บัฟเฟอร์ A และ บัฟเฟอร์ B (KAPA Biosystems)

### 3.3.4 สารเคมีสำหรับการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า

1. อะกาโรส (Agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
2. ชุดน้ำยา SERVA DNA Stain G (SERVA Electrophoresis GmbH, Germany)
3. สารละลาย 6X loading buffer
4. สารละลาย 50X Tris-acetate-EDTA
5. ดีเอ็นเอมาตรฐาน (KAPA DNA Ladder) (KAPA Biosystems, USA)

### 3.3.5 ชุดทดสอบ (Kit)

- ชุดทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR (FavorPrep™ GEL/ PCR Purification Kit) (FAVORGEN biotech corp., Taiwan)
- ชุดสกัด RNA บริสุทธิ์ (FavorPrep™ Plant Total RNA Purification Mini Kit) (FAVORGEN biotech corp., Taiwan)

### 3.3.6 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

1. เมทิลไวโอลเจนไฮเดรต 98 เปอร์เซ็นต์ ( $C_{12}H_{14}Cl_2N_2 \cdot H_2O$ ) (ACROS Organics™, China)
2. โซเดียมไดไฮโอไนต์ ( $Na_2S_2O_4$ ) (Sigma-Aldrich, USA)
3. ไทรทอน เอ็กซ์ 100 (Triton X-100) (ACROS ORGANICS, USA)

### 3.3.7 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

1. ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาร์กอน (PraxAir, Thailand)
2. ก๊าซอาร์กอนที่มีความบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์ (PraxAir, Thailand)

### 3.3.8 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

1. แอมพิซิลลิน (Ampicillin Sodium Salt) (VWR Life science, Strongsville USA)
2. กานาไมซิน (Kanamycin) (THAI MEIJI PHAMACEUTICAL, Thailand)

## 3.4 อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glassware)
2. ไมโครปิเปตต์ (Pipet-lite xls, Rainin Mettler Toledo, Switzerland)
3. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
4. เข็มเขี่ยเชื้อแบบกลม (loop)
5. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
6. ขวดแก้ว (Gas-tight vial) ขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร จุกยาง และที่ครอบฝาแบบอะลูมิเนียม
7. แผ่นให้ความร้อน (Hot plate)
8. เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph)
9. ตู้บ่มแบบเขย่าและควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
10. เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer)
11. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow)
12. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) (JS Research INC, Korea)
13. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
14. แผ่นเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน
15. ชุดกรองสำหรับเครื่อง HPLC
16. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Micro centrifuge) (Thermo Fisher, Germany)
18. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge) (Thermo Fisher, Germany)
19. เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Thailand)
20. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
21. คิวเวต (Semi-micro cuvette, path length 10 mm)
22. กระบอกฉีดยา (Syringe) และเข็มฉีดยา (Hypodermic needle) (Nipro, Thailand)
23. ตัวล็อกเข็มฉีดยา (Syringe valve push button, luer lock) (Sigma-Aldrich, USA)
24. หลอดเซนติฟิวก์พลาสติกและฝาปิด ขนาด 1.5, 15 และ 50 ml (Centrifuge tube with screw cap)
25. หลอดพีซีอาร์ (PCR Tube)
26. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Thermal Cycler) (Biometra)
27. ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipment) (BIO-RAD, USA)
28. ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (Gel documentation) (Major science, Taiwan)
29. ชุดสกัดสารพันธุกรรม (PCR Purification Kit) (FAVORGEN, Biotech Corp)
30. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Berner)

### 3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิด

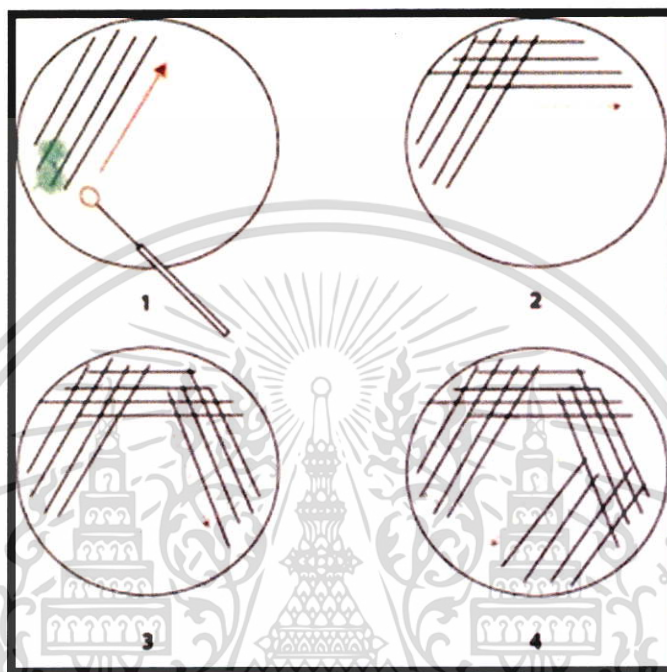
#### 3.5.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารร่วน

ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารร่วนนั้นต้องทำโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ภายในตู้ปลอดเชื้อ เพื่อช่วยในการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ และลดข้อผิดพลาดในการเลี้ยงเชื้อได้ ขั้นตอนแรกต้องทำการเตรียมอาหารร่วน TAP โดยเติม 1.5 เปอร์เซ็นต์อะการ์ อะการ์ ลงในอาหาร TAP นำไปใส่ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค จากนั้นนำอาหารร่วนที่ได้เทลงในจานเลี้ยงเชื้อ รอกจนกระทั่งอาหารร่วนแข็งตัว แล้วใช้ห้วงเขี่ยเชื้อทำการถ่ายเชื้อโดยใช้เทคนิค Streak-plate ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

นำห้วงเขี่ยเชื้อมาลนไฟจนกระทั่งปลายลวดร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดอยู่ในห้วงเขี่ยเชื้อ รอให้เย็น จากนั้นแตะตัวอย่างสาหร่ายและซิด (Streak) ลงบนจานเพาะเชื้อ โดยซิดให้อยู่ในแนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น ซึ่งในระนาบแรกนั้นจะมีเชื้อของสาหร่ายสีเขียวอยู่หนาแน่นที่สุด หลังจากนั้นนำห้วงเขี่ยเชื้อมาลนไฟอีกรอบหนึ่ง เพื่อฆ่าเชื้อที่ยังติดอยู่ให้หมด แล้วซิดเชื้อต่อจากรอยลากในระนาบแรกเพียงครั้งเดียว และซิดให้อยู่ในแนวระนาบที่สองให้ติดต่อกัน 4-5 เส้นอีกครั้ง โดยรอยซิดของเชื้อ

ในระนาบที่สองต้องไม่ทับกับรอยขีดของเชื้อในระนาบแรกอีก หลังจากนั้นทำเช่นเดียวกับในระนาบที่สองจนกระทั่งครบทั้งงานเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 3.1

นำงานเพาะเลี้ยงที่ขีดเชื้อแล้วไปบ่มที่ตู้บ่มที่มีอุณหภูมิคงที่ที่ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 3,800 ลักซ์ โดยทำการบ่มจนกระทั่งได้สาหร่ายเป็นโคลนเดี่ยวๆ ขึ้นบนอาหารวัน TAP



รูปที่ 3.1 แสดงการแยกเชื้อด้วยวิธี Streak-plate

ที่มา : <http://vle.du.ac.in/mod/book/print.php?id=9251&chapterid=13560>

### 3.5.2 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว

ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว (broth) นั้นควรทำโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ภายในตู้ปลอดเชื้อเช่นเดียวกัน เริ่มจากนำหัวเชื้อเข้ามาลนไฟให้ลวดที่ปลายร้อนจนเป็นสีแดงก่อน ทิ้งให้เย็น จากนั้นเขี่ยสาหร่ายสีเขียวจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อจุ่มลงไปในช่วงชมพูขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีกรลนไฟตรงบริเวณปากขวด แล้วจึงใส่อาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมกานาไมซินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ปิดจุกขวดด้วยสำลี จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 3800 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยเซลล์ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm เป็นเวลา 4 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นใส่อาหารเหลว TAP ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากัน ซึ่งจะได้ starter เพื่อใช้เป็นสาหร่ายตั้งต้นในการเลี้ยงจุลชีพสาหร่ายให้เจริญเติบโตและผลิตไฮโดรเจนในสภาวะต่างๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 แสดงการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว TAP ในตู้บ่ม  
ที่มา : ธนาภรณ์ (2559)

### 3.6 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว

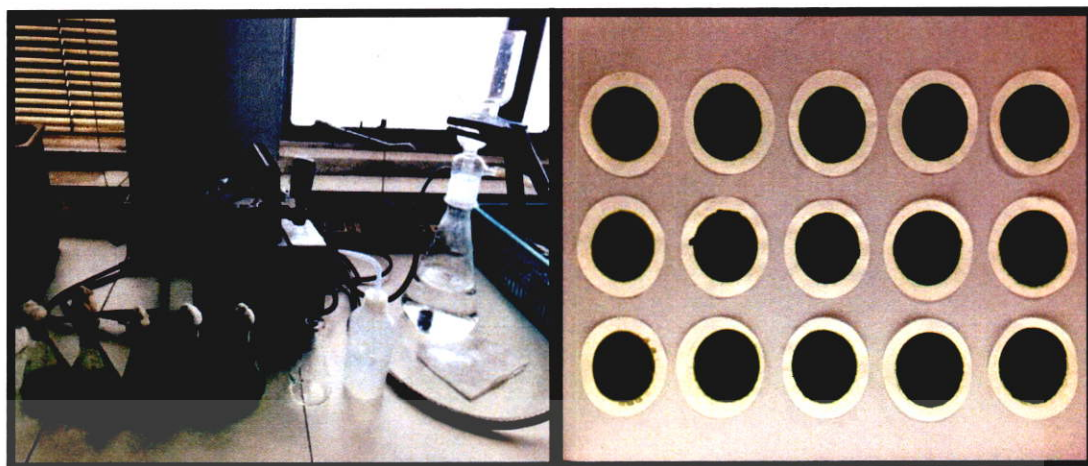
นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP โดยมีการแปรผันค่าความขุ่นสุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ในแต่ละหลอด ที่มีการเติมเมทานอลปริมาตร 900 ไมโครลิตรทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปบ่มในที่มืดอย่างน้อย 2 ชั่วโมง แล้วนำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 และ 650 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ (Lee and Shen, 2004)

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ (a+b)} = (4.0 \times A_{665}) + (25.5 \times A_{650}) \times 10 \quad \text{สมการที่ 3.1}$$

### 3.7 วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียว

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว TAP โดยมีการแปรผันค่าความขุ่นสุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.8 (ตามวิธีในข้อ 3.5.2) แต่เปลี่ยนปริมาตรอาหารเหลว TAP จาก 50 มิลลิลิตรเป็น 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์มากรองผ่านชุดกรอง HPLC โดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ซึ่งกระดาษกรองที่ใช้ทั้งก่อนการกรองและหลังการกรองนั้นต้องนำไปอบที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส แล้วปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ทำการชั่งน้ำหนักกระดาษกรองจนน้ำหนักที่ได้มีค่าคงที่ และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งนั้นสามารถหาได้จาก

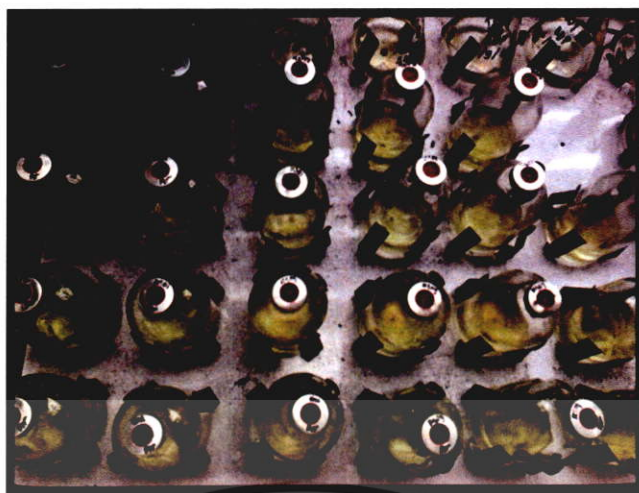
$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)} = \text{น้ำหนักกระดาษกรองหลังกรอง} - \text{น้ำหนักกระดาษกรองก่อนกรอง}$$



รูปที่ 3.3 แสดงการนำสารแขวนลอยเซลล์มากรองผ่านกระดาษกรอง

### 3.8 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดลูกผสมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร (ตามวิธีในหัวข้อ 3.5.2) โดยนำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้มาทำการปั่นตกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm เป็นเวลา 4 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำการกระจายเซลล์สาหร่ายในอาหารเหลว TAP หลังจากนั้นปิเปตต์สารแขวนลอยเซลล์ 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวด gas-tight vial ขนาด 100 มิลลิลิตร ปิดขวดด้วยยางและฝาปิดอะลูมิเนียม โดยขั้นตอนทั้งหมดต้องทำภายในตู้ปลอดเชื้อเช่นเดียวกัน จากนั้นทำการบ่มเพื่อให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนในตู้อบ สำหรับการบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) สามารถนำเข้าสู่ตู้อบได้เลย แต่ในกรณีที่บ่มในสภาวะที่ไร้อากาศ (anaerobic condition) ต้องทำการไล่อากาศออกโดยพ่นก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปบ่มในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3800 ลักซ์ ทำการตรวจวัดก๊าซไฮโดรเจนได้โดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี โดยใช้เข็มเก็บก๊าซดูดก๊าซบริเวณส่วนบนของขวด (head space) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการตรวจวัดก๊าซไฮโดรเจน แสดงดังตารางที่ 3.1 หลังจากนั้นนำพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้จากโครมาโตแกรมมาคำนวณการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย โดยเทียบกับก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน แสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ค



รูปที่ 3.4 แสดงการบ่มสาหร่ายสีเขียวเพื่อผลิตไฮโดรเจน

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

พารามิเตอร์	สถานะในการเดินระบบ
Carrier Gas	Argon flow rate 30 mL/min (99.999% purity)
Column	- Pack column 1.5 m X 1.0 mm - Molecular sieve 5A mesh 80/100
Detector	Thermal conductivity detector (TCD)
Temperature Program	- Injector temperature: 100 °C - Oven temperature: 40 °C - Detector temperature: 200 °C

### 3.8.1 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ต่างๆ โดยทำการบ่มในสถานะที่มีออกซิเจนและสถานะที่ไล่อากาศ

นำสาหร่ายสีเขียว KS03, *tetraspora* sp. CU2551, *Bumilleriopsis peterseniana* และ KS01 มาทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ตามวิธีที่ 3.5.2) จนเซลล์สาหร่ายมีอายุ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาวัดค่าความขุ่นสุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ให้เท่ากับ 0.1 โดยใช้เครื่องยูวี-วิชิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ (ตามวิธี 3.7) โดยทำการบ่มในแบบที่มีออกซิเจนและในแบบที่ไล่อากาศ ทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนทุกๆ 6 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.9 การศึกษาลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว KS03

#### 3.9.1 วิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และขนาดของสาหร่ายสีเขียวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อระบุชื่อวิทยาศาสตร์

ทำการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว (ตามวิธีในหัวข้อ 3.5.2) จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้มาทำการส่องกล้องโดยการปิเปตสารแขวนลอยเซลล์มา 2 ไมโครลิตร ลงในแผ่นสไลด์ ปิดแผ่นใสปิดสไลด์ (cover slip) ลงบนแผ่นสไลด์ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นหยดน้ำมันลงบนแผ่นใสปิดสไลด์ และทำการส่องกล้องจุลทรรศน์จากกำลังขยาย 4x ค่อยๆ ปรับความชัด และปรับกำลังขยายจนถึงกำลังขยายสูงสุด คือ 100x โดยเมื่อปรับกำลังขยายที่ 100x ควรให้ปลายเลนส์กล้องกำลังขยาย 100xแตะกับน้ำมันบนแผ่นสไลด์และทำการปรับเลื่อนเพื่อหาเซลล์สาหร่าย

#### 3.9.2 วิธีการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ซึ่งมีการใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ 18S rDNA F1 (5'-CAGCAGCCGCGGTAATT-3') และไพรเมอร์ 18S rDNA R1 (5'-CATCTAAGGGCATCACAGACC-3') (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) และใช้เอนไซม์ *DreamTaq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมีองค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้มีการตั้งโปรแกรมไว้ ดังแสดงในตารางที่ 3.3 แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 3.2 แสดงองค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวโดยการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
แม่แบบดีเอ็นเอ (DNA template); เซลล์สาหร่าย	2.00
ไพรเมอร์ 18S rDNA F1 (10 มิลลิโมลาร์)	2.00
ไพรเมอร์ 18S rDNA R1 (10 มิลลิโมลาร์)	2.00
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (10 มิลลิโมลาร์)	2.00
เอนไซม์ <i>DreamTaq</i> DNA polymerase 5 U/ $\mu$ l	0.25
10X <i>DreamTaq</i> DNA polymerase buffer	5.00
น้ำกลั่น	36.75
<b>ปริมาตรสุทธิ</b>	<b>50.00</b>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 แสดงสภาวะที่ใช้ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial Denaturation	95.0	1 นาที
Denaturation	95.0	20 วินาที
Annealing	40.0-50.0	20 วินาที
Extension	72.0	90 วินาที
Final Extension	72.0	5 นาที

### 3.9.3 วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree)

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งตรวจที่ MacroGen Sequencing and Oligo DNA Service; GIBTHAI A 3N HOLDING COMPANY มาเปรียบเทียบกับยีน 18S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI ด้วยการใช้โปรแกรม Blastn จากนั้นนำข้อมูล 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวชนิดต่างๆ มาจัดลำดับความคล้าย (DNA alignment) ด้วยโปรแกรม MUSCEL พร้อมคำนวณระยะทางโดยใช้วิธี Neighbor-joining (NJ) เพื่อแสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree)

## 3.10 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลิตภัณฑ์ PCR

### 3.10.1 วิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดย ชั่งอะกาโรส 0.7 กรัมแล้วเติมบัฟเฟอร์ Tris-Acetate-EDTA (0.5XTAE) (ภาคผนวก ก) 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดลูกขมฟู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าเล็กน้อย จากนั้นให้ความร้อนโดยนำเข้าไมโครเวฟจนสารละลายเดือด นำออกมาเขย่าให้ความร้อนซ้ำอย่างช้าๆ จนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทั้งไว้จนสารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ใส่ชุดน้ำยา SERVA DNA Stain G ปริมาตร 1.5 ถึง 2.0 ไมโครลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นเทใส่แม่พิมพ์แล้วเสียบหัวลงแม่พิมพ์ รอจนกระทั่งเจลแข็งตัว แล้วนำเจลที่แข็งตัววางลงบนอ่าง (Chamber) เทบัฟเฟอร์ 0.5X TAE ลงในอ่างจนกระทั่งท่วมเจล ดึงหัวออกจากแม่พิมพ์ เปิดตสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานและดีเอ็นเอตัวอย่างลงไปในแต่ละหลุมของเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

### 3.10.2 วิธีการทำให้บริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ PCR

หลังจากที่ได้วิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จึงนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดทำให้บริสุทธิ์ของซิง PCR (FavorPrep™ GEL/ PCR Purification Kit) ด้วยการตัดชิ้นเจลบริเวณที่ส่องพบแถบดีเอ็นเอใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมนั้ฟเฟอร์ FADF ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ต่อชิ้นเจลปริมาณ 300 มิลลิกรัม) แล้วนำหลอดเซนตริฟิวจ์ไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส จนกระทั่งชิ้นเจลละลาย นำมาวางที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปิเปตต์สารละลายใส่ในหลอดที่มีคอลัมน์ FADF นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที ล้างคอลัมน์ โดยการปิเปตต์บัฟเฟอร์ Wash ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวทิ้งแล้วปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าที่ความเร็วรอบ 18,000 เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าของเหลวออกจากคอลัมน์จนหมด จากนั้นย้ายคอลัมน์ FADF ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ ปิเปตต์บัฟเฟอร์ Elution ปริมาตร 40 ไมโครลิตรลงคอลัมน์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000 xg เป็นเวลา 1 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์

เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์แล้วนำสารละลายไปวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ตามวิธีในหัวข้อ 3.10.1) อีกรอบ เพื่อตรวจสอบว่ายังพบแถบของดีเอ็นเออยู่ตรงบริเวณเดิมก่อนทำการส่งตรวจเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์แล้วไปส่งตรวจที่ MacroGen Sequencing and Oligo DNA Service; GIBTHAI A 3N HOLDING COMPANY เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

## 3.11 การแสดงลักษณะของยีนไฮโดรจีเนสที่ได้จากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่าย

### 3.11.1 วิธีการเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยมีการใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด 6 ชนิด คือ ไพรเมอร์ที่เป็น forward primer 3 ชนิดและ reverse primer 3 ชนิด (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) โดยไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิดนี้เป็น degenerate primer ได้แก่

ไพรเมอร์ HydAF (5'-CRCTGCCCATGTTCCACCAG-3')

ไพรเมอร์ Hvf1 (5'-CTVACCATYATGGAGGAR-3')

ไพรเมอร์ Hvf2 (5'-TGCCCATGTTCCACCA-3')

ไพรเมอร์ HydAR (5'-GCCACRTAGTGBGTGTGCAG-3')

ไพรเมอร์ Hvr1 (5'-CKSCTGSCGCTTCTG-3')

และไพรเมอร์ Hvr2 (5'-ACRTAGTGDGTGTGCAG-3')

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น ไพรมเมอร์ทั้ง 6 ชนิดนี้สามารถเข้าคู่กันเพื่อจับกับเบสคู่สมในดีเอ็นเอต้นแบบได้ทั้งหมด 9 แบบ คือ HydAF/ HydAR, HydAF/ Hvr1, HydAF/ Hvr2, Hvf1/ HydAR, Hvf1/ Hvr1, Hvf1/ Hvr2, Hvf2/ HydAR, Hvf2/ Hvr1 และ Hvf2/ Hvr2 และมีการแปรผันเอนไซม์ DNA polymerase และบัฟเฟอร์ โดยมีองค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งได้มีการตั้งโปรแกรมไว้ ดังแสดงในตารางที่ 3.5 แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

**ตารางที่ 3.4** แสดงองค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวโดยการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
แม่แบบดีเอ็นเอ(DNA template); เซลล์สาหร่าย	1.00
ไพรมเมอร์ Hvf1, Hvf2 และ HydAF (10 มิลลิโมลาร์)	6.00
ไพรมเมอร์ Hvr1, Hvr2 และ HydAR (10 มิลลิโมลาร์)	6.00
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (10 มิลลิโมลาร์)	2.00
เอนไซม์ DNA polymerase 5 U/ $\mu$ l	0.25
10X buffer	5.00
น้ำกลั่น	29.75
<b>ปริมาณสุทธิ</b>	<b>50.00</b>

**หมายเหตุ:** เอนไซม์และบัฟเฟอร์ที่ใช้เปลี่ยนตามแต่ละสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่ เอนไซม์ Dream Taq DNA polymerase, เอนไซม์ RBC Taq DNA polymerase และเอนไซม์ KAPA Taq DNA polymerase

**ตารางที่ 3.5** แสดงสภาวะที่ใช้ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial Denaturation	95.0	2 นาที
Denaturation	95.0	30 วินาที
Annealing	40.0-50.0	30 วินาที
Primer Extension	72.0	2 นาที
Final Extension	72.0	5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ PCR แล้วนำไปวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (ตามวิธีในหัวข้อ 3.10.1) แล้วจึงนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดบริสุทธิ์ขึ้น PCR (FavorPrep™ GEL/ PCR Purification Kit) (ตามวิธีในหัวข้อ 3.10.2)

หลังจากที่ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (ตามวิธีในหัวข้อ 3.10.1) อีกรอบ เพื่อตรวจสอบว่ายังพบแถบของดีเอ็นเออยู่ตรงบริเวณเดิมก่อนทำการส่งตรวจเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

### 3.11.2 วิธีการสกัด RNA บริสุทธิ์

นำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ ผู้วิจัยได้แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด โดยนำเซลล์สาหร่ายมาปั่นเก็บเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ประมาณ 100 มิลลิกรัม ผสมรวมกับ 500 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ FARB ของชุดสกัดอาร์เอ็นเอที่เติมเบต้าเมอแคปโตเอทานอล (FavorPrep™ Plant Total RNA mini kit) และ เม็ดบีดแก้ว (glass bead) บ่มในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ผนังเซลล์สาหร่ายเสียหายไปบางส่วน นำไปปั่นวอเท็กซ์ (Vortex) ด้วยความแรงเพื่อทำให้เซลล์แตก โดยแปรผันเวลาในการวอเท็กซ์เซลล์ คือ ปั่น 30 วินาที และ 5 นาที แทนชุด A และ ชุด B ตามลำดับ จากนั้นปีเปตต์ของผสมไปยังคอลัมน์ของชุดอุปกรณ์ (Filter Column) เพื่อกรองตะกอนออกโดยการปั่นเหวี่ยง 18,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ปีเปตต์สารละลายส่วนใสลงหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ เติมเอทานอลในสารละลายส่วนใสเพื่อให้อาร์เอ็นเอตกตะกอน โดยนำไปวอเท็กซ์ด้วยความแรง ก่อนถ่ายโอนสารลงคอลัมน์ใหม่ (FARB mini column) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 18,000 xg เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้าง (wash buffer) 1 และ 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ 750 ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงและเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นชะเมมเบรนของคอลัมน์ (FARB mini column) ด้วย RNase-free ddH<sub>2</sub>O ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที ก่อนทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 18,000 xg เป็นเวลา 1 นาทีเพื่อสกัด RNA จากนั้นเปลี่ยนอาร์เอ็นเอที่ได้ให้กลายเป็น cDNA ซึ่งนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบของปฏิกิริยา PCR เพื่อตามหาฮีนไฮโดรจีเนสต่อไป

### 3.11.3 การทำปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน

นำสารละลาย RNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59 ที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน (Reverse Transcription) เพื่อเปลี่ยน RNA ให้กลายเป็น cDNA ดังแสดงองค์ประกอบในปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชันในตารางที่ 3.6 และตารางที่ 3.7 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน

ตารางที่ 3.6 แสดงองค์ประกอบในปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน (Reverse Transcription) ของสาหร่ายสีเขียวโดยการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
แม่แบบอาร์เอ็นเอ (RNA template)	1.00 และ 5.00
RNase Inhibitor (20 U/μl)	1.00
Oligo dT (10 ไมโครโมลาร์)	0.50
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (10 มิลลิโมลาร์)	4.00
เอนไซม์ M-MuLV Reverse transcriptase	1.00
10X buffer	5.00
น้ำ RNase free	Up to 20
ปริมาตรสุทธิ	20.00

**หมายเหตุ:** เติมน้ำประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชันบนน้ำแข็ง

ตารางที่ 3.7 แสดงสถานะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน (Reverse Transcription) เพื่อสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ของสาหร่ายสีเขียวโดย

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

### 3.12 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะต่างๆ

#### 3.12.1 วิธีการศึกษาอิทธิพลของการบดบังเซลล์ (cell stacking) ที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียว (จากผลข้อ 3.7.1) มาทำการเพาะเลี้ยง (ตามวิธีที่ 3.5.2) จนเซลล์สาหร่ายมีอายุ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาวัดค่าความขุ่นสุดท้าย โดยทำการแปรผันค่าความขุ่นเซลล์สุดท้ายตั้งแต่ 0.1 จนถึง 0.8 โดยใช้เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (ตามวิธี 3.7) โดยทำการบ่มในในสภาวะที่ไล่อากาศ (จากผลข้อ 3.7.1) ในตู้บ่มแบบวางนิ่งและแบบเขย่า ทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนทุกๆ 6 ชั่วโมง

### 3.12.2 วิธีการศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียวมาทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ตามวิธีที่ 3.5.2) จนเซลล์สาหร่ายมีอายุ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาวัดค่าความขุ่นสุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ให้เท่ากับ 0.1 (จากผลข้อ 3.7.2) โดยใช้เครื่องยูวี-วิชิเบล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย (ตามวิธี 3.7) โดยทำการบ่มในสภาวะที่ไล่อากาศในตู้บ่มแบบเขย่า (จากผลข้อ 3.7.1) โดยมีการวัดการแปรผันความเข้มแสงตั้งแต่ 0 จนถึงความเข้มแสงที่ได้จากแสงอาทิตย์ จากนั้นทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนทุกๆ 6 ชั่วโมง

### 3.12.3 วิธีการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลวที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียวมาทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ตามวิธีที่ 3.5.2) จนเซลล์สาหร่ายมีอายุ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาวัดค่าความขุ่นสุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ให้เท่ากับ 0.1 (จากผลข้อ 3.7.2) โดยใช้เครื่องยูวี-วิชิเบล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร จึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย (ตามวิธี 3.7) โดยทำการบ่มในสภาวะที่ไล่อากาศ ในตู้บ่มแบบเขย่า (จากผลข้อ 3.7.1) ในอาหารเหลวที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ อาหาร TAP ที่ปราศจากกรดอะซิติก (TP) อาหาร TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอล (TP+Glycerol) อาหาร TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส (TP+Sucrose) อาหาร TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส (TP+Glucose) อาหาร TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นไตรโซเดียมซิเตรต (TP+Trisodiumcitrate) อาหาร TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโซเดียมไบคาร์บอเนต (TP+Sodiumbicarbonate) อาหาร TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโพแทสเซียมคาร์บอเนต (TP+Potassiumcarbonate) และ อาหาร TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกรดอะซิติก (TP+acetic, TAP) acid (ภาคผนวก ก) โดยให้มีจำนวนโมลของคาร์บอนอะตอมเท่ากัน คือเท่ากับ 35 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร (คำนวณจากจำนวนโมลของคาร์บอนในกรดอะซิติกความเข้มข้น 17.5 มิลลิโมลาร์ในอาหารเหลว TAP) จากนั้นทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

### 3.12.4 วิธีการศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของเซลล์ที่มีต่อก๊าซไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียวมาทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ตามวิธีที่ 3.5.2) จนเซลล์สาหร่ายมีอายุ 24 ชั่วโมง ทำการปั่นเก็บเซลล์โดยล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาวัดค่าความขุ่นสุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ให้เท่ากับ 0.1 โดยใช้เครื่องยูวี-วิชิเบล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย (ตามวิธี 3.7) โดยทำการบ่มในอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ คือ อาหาร TAP ที่ขาดธาตุแคลเซียม (TAP-Ca) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุแมกนีเซียม (TAP-Mg) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ (TAP-S) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(TAP-P) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุเหล็ก (TAP-Fe) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุแมงกานีส(TAP-Mn) อาหาร TAP ที่ขาดธาตุสังกะสี (TAP-Zn) และ อาหาร TAP ที่ขาดธาตุคอปเปอร์ (TAP-Cu) (ภาคผนวก ก) ทำการบ่มในสภาวะที่มีโล่อากาศ ในตู้บ่มแบบเขย่า จากนั้นทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนทุกๆ 6 ชั่วโมง

### 3.12.5 วิธีการศึกษาอิทธิพลของค่า pH ที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียวมาทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ตามวิธีที่ 3.5.2) จนเซลล์สาหร่ายมีอายุ 24 ชั่วโมง ทำการปั่นเก็บเซลล์โดยล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วทำการบ่มในอาหารเหลว TAP ที่ทำการแปรผันค่า pH ตั้งแต่ 5 จนถึง 9 จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาวัดค่าความขุ่นสุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ให้เท่ากับ 0.1 โดยใช้เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว (ตามวิธี 3.7) ในสภาวะที่มีโล่อากาศในตู้บ่มแบบเขย่า จากนั้นทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนทุกๆ 6 ชั่วโมง

### 3.12.6 วิธีการศึกษาอิทธิพลของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียวมาทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ตามวิธีที่ 3.5.2) จนเซลล์สาหร่ายมีอายุ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาวัดค่าความขุ่นสุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ให้เท่ากับ 0.1 โดยใช้เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว (ตามวิธี 3.7) โดยทำการบ่มในอาหารเหลว TAP ที่ทำการเติมสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ได้แก่ เอทานอล (Ethanol) ไดไทโอทรียออล (Dithiothreitol) ไดไทโอไนท์ (Dithionite) เบต้า-เมอแคปโทเอทานอล ( $\beta$ -mercaptoethanol) นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (NADH) ในสภาวะที่มีโล่อากาศ ในตู้บ่มแบบเขย่า โดยทำการแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0 จนถึง 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนทุกๆ 6 ชั่วโมง

### 3.13 วิธีการศึกษาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (ดัดแปลงจาก Batyrova *et al.*, 2559)

ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสนั้น ทำได้โดยการวัดการผลิตไฮโดรเจนได้จากสารละลายเมทิลไวโอลเจนที่ถูกรีดิวซ์ด้วยสารละลายโซเดียมไดไทโอไทด์ โดยมีปริมาตรของผสมทั้งหมดที่ใช้ไปในการทำปฏิกิริยา คือ 2 มิลลิลิตร ในขั้นตอนการทดลองนั้นจะเริ่มจากการเตรียมสารละลายเมทิลไวโอลเจนที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และสารละลายทรูทอน เอ็กซ์ 100 (Triton X-100) ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (โดยมวลต่อปริมาตร) ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นทำการเติมเมทิลไวโอลเจนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสารละลายไทรทอน เอ็กซ์ 100 ปริมาตร 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เข็มฉีดยาที่มีตัวลือกวาล์ว ฉีดเข้าไปในขวด vial ที่มีปริมาตร 13 มิลลิลิตร จากนั้นทำการไร้ออกซิเจนด้วยการพ่นก๊าซอาร์กอนลงในขวด vial เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการเติมสารละลายโซเดียมไดไทโอไนท์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร เข้าไปผสมในขวด vial สารละลายจะเปลี่ยนสีเป็นสีม่วงน้ำเงินเข้ม ซึ่งแสดงว่าสารพร้อมใช้งานแล้ว ต่อมาจะเริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยการเติมสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายสีเขียว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการไล่ก๊าซออกซิเจนด้วยการพ่นอาร์กอนแล้ว ทำการบ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง แล้ววัดปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ ซึ่งหน่วยของการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะถูกคำนวณออกมาในหน่วยของไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัม น้ำหนักแห้งต่อนาที ( $\mu\text{molH}_2/\text{mg dry wt}/\text{min}$ )

### 3.14 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ทางสถิตินั้นทำได้โดยการใช้โปรแกรม SPSS statistic version 23 (SPSS software, New York, USA) ทำการออกแบบชุดการทดลองเป็นแบบปัจจัยเดียว (experimental design CRD) โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี one way ANOVA และวัดค่าความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี Duncan ด้วยการตั้งสมมติฐาน  $H_0$  เมื่อ  $p\text{-value} > 0.05$  คือ มีอย่างน้อย 1 ปัจจัยที่มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และจะปฏิเสธสมมติฐาน  $H_0$  และยอมรับสมมติฐาน  $H_1$  เมื่อ  $p\text{-value} < 0.05$  คือ มีอย่างน้อย 1 ปัจจัยที่มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

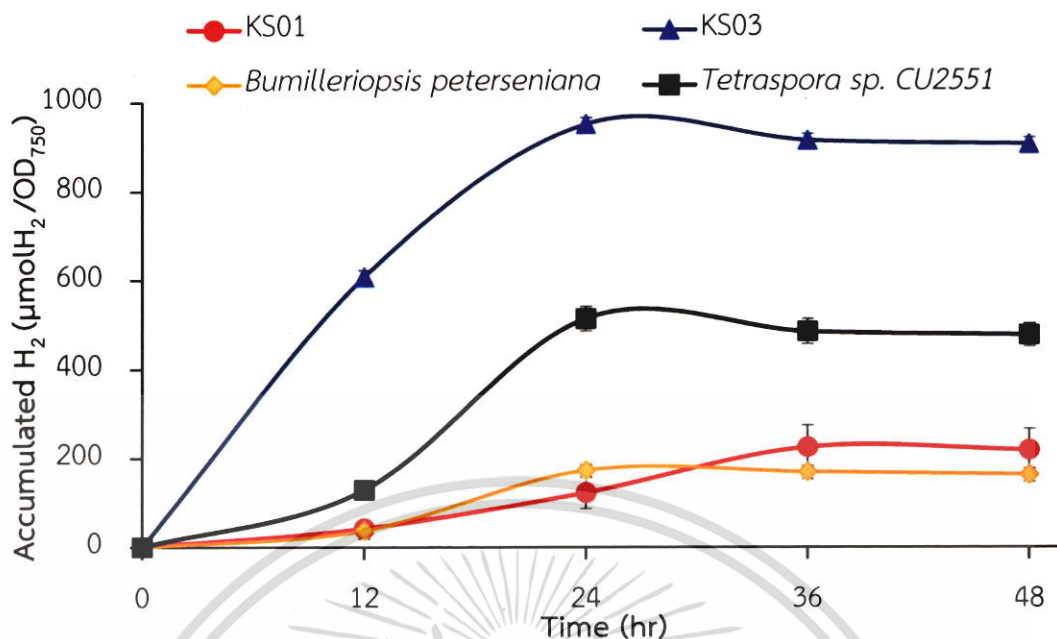
## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อต่อยอดการใช้ประโยชน์จากการมีสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวหลายสายพันธุ์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยจะทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุดในห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการศึกษาลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวและศึกษาผลของอิทธิพลต่างๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ อิทธิพลของการบดบังของเซลล์ อิทธิพลของความเข้มแสง อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน อิทธิพลของการขาดธาตุอาหาร อิทธิพลของค่า pH และอิทธิพลของการเติมสารที่ให้อิเล็กตรอน

#### 4.1 ผลการศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

จากการศึกษาของวัชรภรณ์ และคณะ (2559) ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำแบบสุ่มจากแหล่งน้ำจืดภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทั้งสิ้น 6 แหล่ง ได้แก่ แหล่งน้ำบริเวณคณะเทคโนโลยีการเกษตร (KS) แหล่งน้ำบริเวณคณะวิทยาศาสตร์ (VY) แหล่งน้ำบริเวณคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม (KR) แหล่งน้ำบริเวณคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ (TP) แหล่งน้ำบริเวณอาคารเรียนรวมพระเทพ (PT) และแหล่งน้ำบริเวณคณะวิศวกรรมศาสตร์ (VV) ในระหว่างเดือนสิงหาคม ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 จากนั้น นำตัวอย่างน้ำมาทำการคัดแยกเชื้อสาหร่ายที่พบในน้ำให้บริสุทธิ์และทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP สามารถคัดแยกเชื้อเบื้องต้นได้ 5 ไอโซเลท คือ สาหร่าย KS01, KS02, KS03, VY01 และ VY02 และนำสาหร่ายทั้ง 5 ไอโซเลทมาผลิตก๊าซไฮโดรเจน เบื้องต้นพบว่า สาหร่ายไอโซเลท KS01 และ KS03 มีความสามารถสูงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จะเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ KS01, KS03 ที่คัดแยกโดยวัชรภรณ์ และคณะ (2559) รวมถึงสาหร่ายสีเขียวที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ *Tetraspora sp.* CU2551 และ *Bumilleriopsis peterseniana* โดยจะทำการเลี้ยงสาหร่ายที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น (initial OD<sub>750</sub>) ประมาณ 0.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่าย จากนั้นย้ายเซลล์ลงสู่อาหารใหม่และปรับความเข้มข้นเริ่มต้นให้เป็น 0.1 อีกครั้ง นำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้บรรจุลงขวด gas-tight vial ฟันไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน จากนั้นบ่มด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาทีภายใต้ความเข้มแสง 3,800 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ทำการตรวจวัดก๊าซไฮโดรเจนในช่วงเวลาต่างๆ ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.1



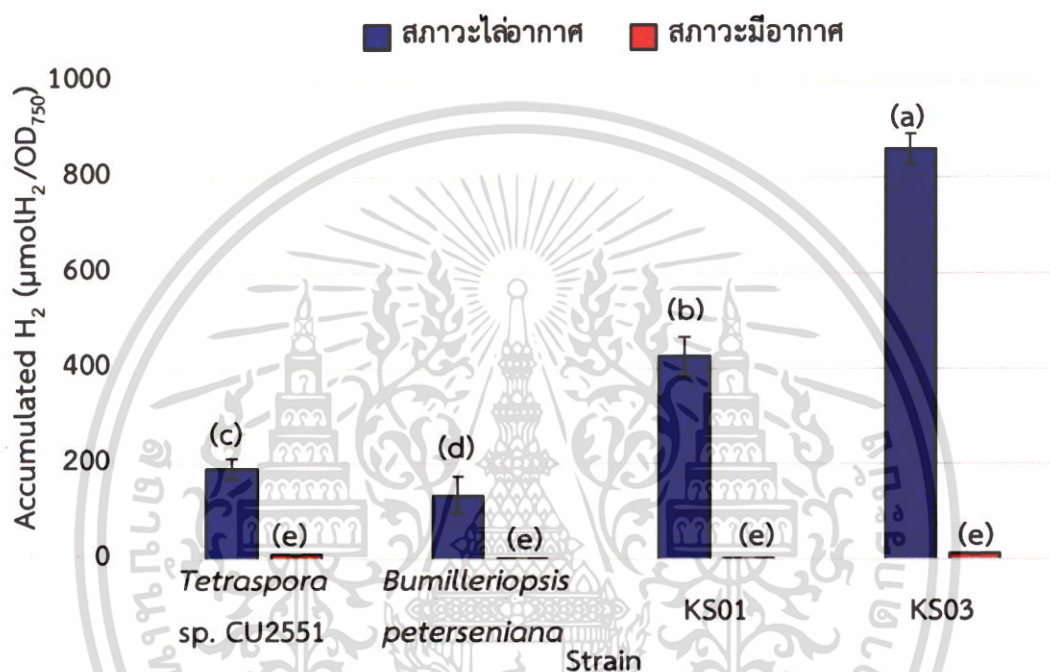
รูปที่ 4.1 ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS01, KS03, *Tetraspora sp. CU2551* และ *Bumilleriopsis peterseniana*

การทดสอบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS01, KS03, *Tetraspora sp. CU2551* และ *Bumilleriopsis peterseniana* พบว่า สาหร่ายสีเขียว KS03 มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุดคิดเป็น 949.7 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่นของเซลล์ ( $OD_{750}$ ) เมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียว KS01, *Tetraspora sp. CU2551* และ *Bumilleriopsis peterseniana* มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมคิดเป็น 121.9, 514.5 และ 172.1 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่นของเซลล์ ( $OD_{750}$ ) ในช่วงเวลาเดียวกัน ทำให้ทราบว่าสาหร่ายสีเขียว KS03 มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 2, 5.5 และ 8 เท่าเมื่อทำการเทียบกับสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora sp. CU2551*, *Bumilleriopsis peterseniana* และ KS01 ตามลำดับ

งานวิจัยของ Maneeruttanarungroj, et al. (2010) และ Maswana, et al. (2018) พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora sp. CU2551* มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ อีกทั้งยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งเป็นโมเดลในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวอีกด้วยเมื่อเปรียบเทียบในสถานะเดียวกัน

จากรูปที่ 4.1 พบว่า สาหร่ายสีเขียว KS03 มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวไอโซเลทอื่นๆ ที่มีในห้องปฏิบัติการ และเพื่อเป็นการยืนยันว่าสาหร่ายสีเขียว KS03 มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีกว่าสาหร่ายสีเขียว ไอโซเลทอื่น ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวแต่ละไอโซเลทภายใต้ สภาวะที่มีอากาศ และ สภาวะที่ไร้อากาศ โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแต่ละไอโซเลทในขวดรูปชมพู่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(stage I) ทำการวัดค่าความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final OD<sub>750</sub>) ให้เท่ากับ 0.1 และปิเปตต์สารแขวนลอยเซลล์ 5 มิลลิลิตรไปยังขวด gas-tight vial ขนาด 13 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการแปรผันสภาวะในการบ่ม คือ บ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (aerobic condition) และบ่มภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศ (anaerobic condition) โดยการพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่ออกซิเจน เป็นเวลา 5 นาที ตรวจวัดก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวแต่ละไอโซเลทภายใต้สภาวะที่มีอากาศและสภาวะที่ไร้อากาศ (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p$ -value < 0.05))

ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ไอโซเลทมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำการบ่มภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศ โดยที่สาหร่ายสีเขียว KS03 มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมสูงที่สุดคือ 858.096 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่นของเซลล์ (OD<sub>750</sub>) เมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวไอโซเลทอื่นๆ แต่เมื่อบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ พบว่าสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ไอโซเลทมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้น้อยมาก ซึ่งปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากในสภาวะที่มีอากาศนั้น มีปริมาณออกซิเจนสะสมอยู่มาก ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Cohen *et al.*, 2017)

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือก สาหร่ายสีเขียว KS03 ภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศมาศึกษาชนิดและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 ผลการศึกษาลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59

การแสดงลักษณะสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว KS03 จะศึกษาใน 2 ลักษณะ คือ การสังเกต สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และวิธีการติดตามหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

### 4.2.1 ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology identification)



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ KS03 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของเซลล์สาหร่ายสีเขียว KS03 (รูปที่ 4.3) ที่ทำการตัดแยกจากแหล่งน้ำจืดในบริเวณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พบว่า เซลล์สาหร่ายมีขนาดประมาณ  $5 \pm 0.5$  ไมโครเมตร มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม ซึ่งมีความคล้ายกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เซลล์มีรูปร่างกลมหรือเป็นรูปไข่ คลอโรพลาสต์มักอยู่ด้านข้าง หรือเป็นรูปถ้วย มีขนาดเล็กมากประมาณ 2-12 ไมโครเมตร (สร้อยญา, 2553) และมีความแตกต่างกันกับสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่แม้จะมีรูปร่างกลมแต่มักอยู่รวมเป็นกลุ่ม ตั้งแต่ 2-4 เซลล์ โดยเซลล์ส่วนใหญ่ถูกบรรจุอยู่ในถุงใสหรือ sheath (เชิดศักดิ์และคณะ 2554)

### 4.2.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

เซลล์สาหร่ายสีเขียว KS03 ถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) โดยการเติมองค์ประกอบต่างๆ เพื่อใช้ในการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังแสดงในตารางที่ 3.2 ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ 18S rDNA F1 (5'-CAGCAGCCGCGTAATT-3') และ ไพรเมอร์ 18S rDNA R1 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(5'-CATCTAAGGGCATCACAGACC-3') (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) และใช้เอนไซม์ *DreamTaq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยทำการแปรผันอุณหภูมิในการจับตัว (annealing temperature) คือ 41, 43.2 และ 48 องศาเซลเซียส จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยทำการโหลดผลิตภัณฑ์ PCR และ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ลงในแต่ละหลุม (well) ของเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18s rDNA จากการนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรส

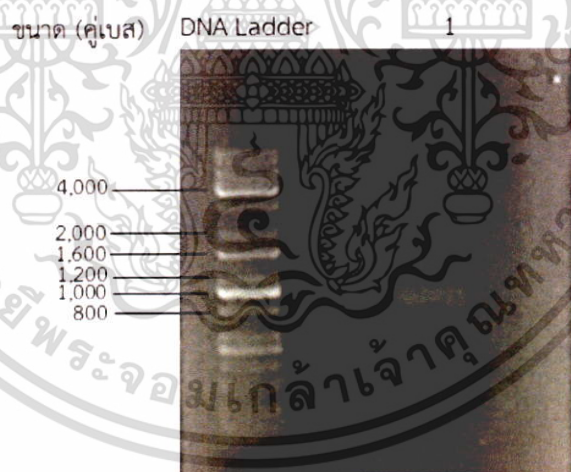
DNA Ladder: ดีเอ็นเอมาตรฐาน (KAPA Universal DNA Ladder Kit)

- 1: ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18s rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03 และใช้อุณหภูมิในการจับตัว คือ 41 องศาเซลเซียส
- 2: ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18s rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03 และใช้อุณหภูมิในการจับตัว คือ 43.2 องศาเซลเซียส
- 3: ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18s rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03 และใช้อุณหภูมิในการจับตัว คือ 48 องศาเซลเซียส

ผลการทดลอง ตรวจพบแถบผลิตภัณฑ์ PCR คาดหมายของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03 1 แถบที่หลุมหมายเลข 1, 2 และ 3 เมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดและปริมาณของ 18S rDNA ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03 มีขนาดต่ำกว่าชิ้นส่วนเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส และมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละหมายเลข เนื่องจากใช้อุณหภูมิในการจับตัวแตกต่างกัน หลุมหมายเลข 1, 2 และ 3 มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ประมาณ 30, 40 และ 60 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ดังนั้น ผู้วิจัยได้ทำการเลือกใช้อุณหภูมิ ในการจับตัว 48 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอสูงที่สุด นอกจากนี้ 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03 มีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากปรากฏแถบ 18S rDNA เพียงแถบเดียว ไม่พบ แถบไม่จำเพาะของปฏิกิริยาเช่นกัน

เมื่อทราบขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ที่ได้จากเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส และเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ขั้นต่อไป นำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำ บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำบริสุทธิ์ชิ้น PCR (FavorPrep™ GEL/ PCR Purification Kit) ดังแสดงในขั้นตอน ที่ 3.10.2 จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ บริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรส- เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสอีกครั้ง ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้ บริสุทธิ์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 1 แถบ ทำการเปรียบเทียบ ขนาดและปริมาณกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่ามีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบสและความเข้มข้นของ ดีเอ็นเอประมาณ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ก่อนทำการส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 4.5 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของยีน 18S rDNA จากการนำไปวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรส

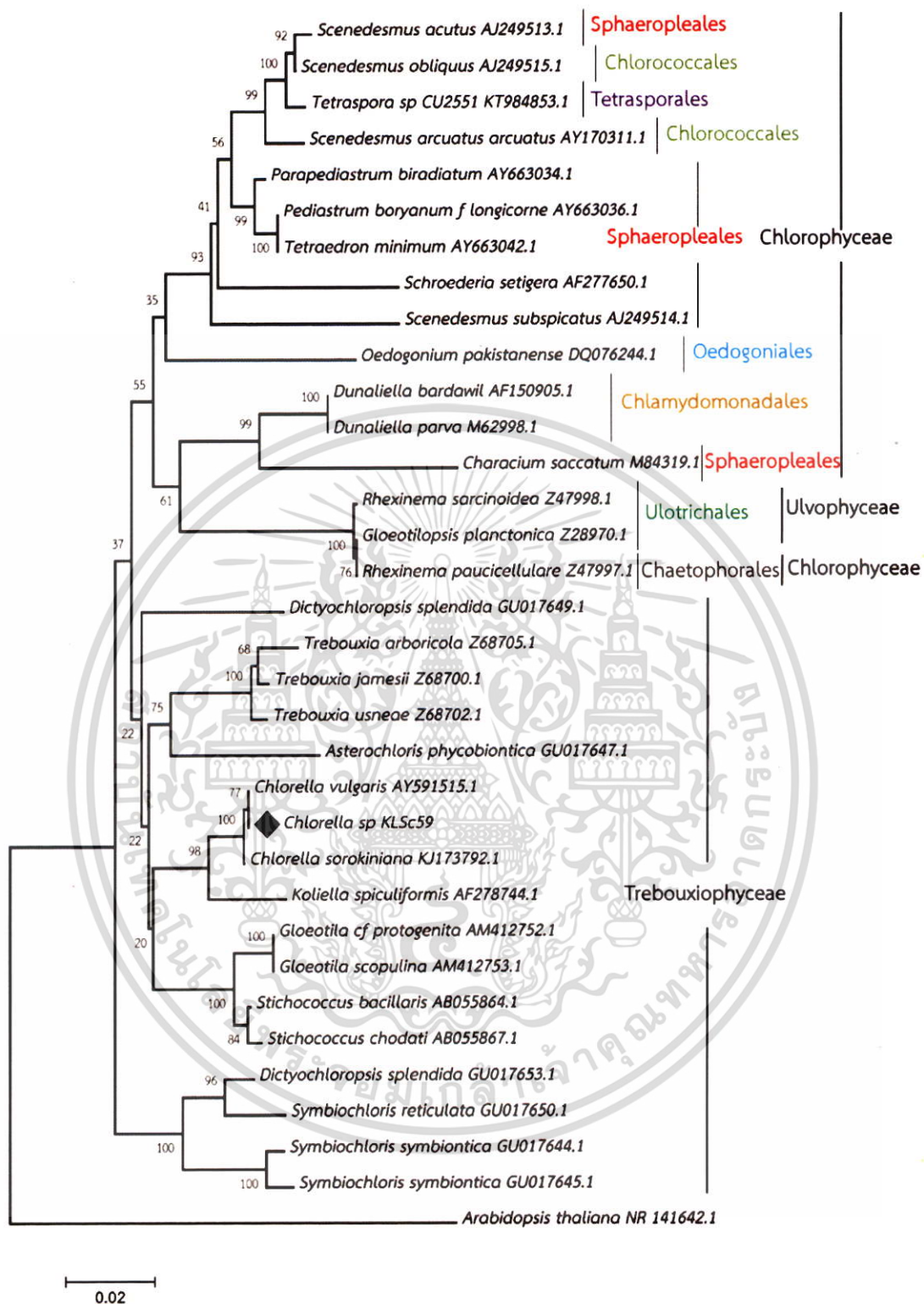
DNA Ladder: ดีเอ็นเอมาตรฐาน

1: ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 และใช้อุณหภูมิในการจับตัว คือ 48 องศาเซลเซียส

ผลของการทำการส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA พบว่ายีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03 มีขนาด 861 คู่เบส ดังแสดงในภาคผนวก จ-1

#### 4.2.3 การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน 18S rDNA

เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03 แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวและสิ่งมีชีวิตชนิดๆ อื่นที่ถูกรายงานไว้ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม BlastN ทำการคัดเลือกยีน 18S rDNA ที่มีความคล้ายกันกับยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03 จำนวนทั้งสิ้น 32 สายพันธุ์ ได้แก่ สาหร่าย *Scenedesmus acutus* AJ249513.1, *Scenedesmus obliquus* AJ249515.1, *Tetraspora* sp. CU2551 KT984853.1, *Scenedesmus arcuatus arcuatus* AY170311.1, *Parapediastrum biradiatum* AY663034.1, *Pediastrum boryanum f longicorne* AY663036.1, *Tetraedron minimum* AY663042.1, *Schroederia setigera* AF277650.1, *Scenedesmus subspicatus* AJ249514.1, *Oedogonium pakistanense* DQ076244.1, *Dunaliella bardawil* AF150905.1, *Dunaliella parva* M62998.1, *Characium saccatum* M84319.1, *Rhexinema sarcinoidea* Z47998.1, *Gloeotilopsis planctonica* Z28970.1, *Rhexinema paucicellulare* Z47997.1, *Dictyochloropsis splendida* GU017649.1, *Trebouxia arboricola* Z68705.1, *Trebouxia jamesii* Z68700.1, *Trebouxia usneae* Z68702.1, *Asterochloris phycobiontica* GU017647.1, *Chlorella vulgaris* AY591515.1, *Chlorella sorokiniana* KJ173792.1, *Koliella spiculiformis* AF278744.1, *Gloeotila cf protogenita* AM412752.1, *Gloeotila scopulina* AM412753.1, *Stichococcus bacillaris* AB055864.1, *Stichococcus chodati* AB055867.1, *Dictyochloropsis splendida* GU017653.1, *Symbiochloris reticulata* GU017650.1, *Symbiochloris symbiontica* GU017644.1 และ *Symbiochloris symbiontica* GU017645.1 โดยมีพืช *Arabidopsis thaliana* NR141642.1 เป็น outgroup จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ที่ได้ทำการคัดเลือกไว้ รวมถึงลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03 มาจัดลำดับความคล้าย (DNA alignment) โดยใช้โปรแกรม MUSCLE จากนั้นสร้างแผนภูมิต้นไม้พร้อมทั้งคำนวณระยะทางด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) ซึ่งเป็นโปรแกรมแพ็คเกจในโปรแกรม MEGA 7 และทำการ bootstrap 1,000 ครั้ง เพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) คำนวณระยะทางด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S ribosomal DNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 (◆) และสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่นๆ 32 สายพันธุ์ โดยมี out group คือ ต้นอะราบิโดพซิส ตัวเลขที่ลงท้ายของสิ่งมีชีวิตในแต่ละสายพันธุ์แสดง accession number ในฐานข้อมูล NCBI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากแผนภูมิต้นไม้ในรูปที่ 4.6 พบว่าแผนภูมิสามารถจำแนกความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวในแต่ละสายพันธุ์ โดยระยะทางระหว่างแต่ละกลุ่มของแผนภูมิต้นไม้มีความใกล้เคียงกันมาก (ระยะห่างของสเกล คือ 0.02) เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวที่อยู่ในไฟลัมหรือดิวิชัน (Phylum or Division) คลอโรไฟตา (Chlorophyta) ทั้งหมด โดยสามารถแบ่งชั้น (Class) ออกเป็น 3 กลุ่มด้วยกัน คือ Chlorophyceae, Trebouxiophyceae และ Ulvophyceae ดังนั้น ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงเล็กน้อย อาจก่อให้เกิดการแยกไปสู่อีกกลุ่มหนึ่ง ตัวเลขด้านหน้าของการแตกกิ่ง คือ ค่าความถี่หรือค่าความเชื่อมั่นในแต่ละรอบของการสร้างแผนภูมิต้นไม้ เมื่อมีค่าความถี่ 100 เปอร์เซนต์ แสดงถึงการสร้างแผนภูมิต้นไม้แต่ละรอบมีความแม่นยำในการสร้างเหมือนเดิมทั้ง 1,000 รอบ

ผลการทดลองที่ได้ในรูปที่ 4.6 แสดงว่านิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03 มีความคล้ายคลึงกับกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่า สาหร่ายสีเขียว KS03 มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* มากที่สุดโดยสังเกตจากกิ่งของแผนภูมิมีความใกล้เคียงกันที่สุด อีกทั้งกิ่งที่อยู่ถัดมา คือ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella sonokiniana* ดังนั้น ผู้วิจัยจึงแสดงลักษณะของสาหร่ายสีเขียว KS03 ที่คัดเลือกได้จากแหล่งน้ำจืดภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังว่าควรอยู่ในจีนัสของ *Chlorella* และทำการตั้งชื่อใหม่ เรียกว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 โดย KL หมายถึงสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ Sc59 คือ การคัดแยกสาหร่ายสีเขียวในปี 2559 โดยคณะวิทยาศาสตร์ ดังนั้น ในการทดลองลำดับถัดไปผู้วิจัยจะใช้ชื่อสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 แทนการเรียกสาหร่ายสีเขียว KS03

เมื่อจำแนกสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ตามหลักอนุกรมวิธานพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 จัดอยู่ในไฟลัมคลอโรไฟตา (Chlorophyta) โดยสามารถแสดงอนุกรมวิธานของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ได้ดังนี้

Domain: Eukaryota

Kingdom: Plantae

Division: Chlorophyta

Class: Trebouxiophyceae

Order: Chlorellales

Family: Chlorellaceae

Genus: *Chlorella*

### 4.3 ผลการศึกษาการตามหาฮัยนของไฮโดรจีเนส

#### 4.3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตามหาฮัยนไฮโดรจีเนส

การตามหาฮัยนไฮโดรจีเนสใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 6 เส้น โดยเป็น Forward primer 3 เส้น และ Reverse primer 3 เส้น (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) ดังแสดงในรูปที่ 4.7

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

GCGGAATTACTAGTGATAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTCGCGGGCAGGGACTCGATCAGTTGTTATGTGTTGC  
CCCGTGGTTGCAAGTAGGCACGCAGGGCGTGCAAGGCATGTTGCTGTCCGTGCAGCAGGGCCAACATCTGAGTGT  
GATTGTCCCAACACCTCAGGCCAAGCTGCCTCACTGGCAGCAGGCTCTGGATGAGCTCGCCAAGCCCAAGGAG  
AGCAGGAGGTTGATGATCGCGCAAATCGCCTCCGCTGTTGCTGTCGCTATTGCTGAGACCATTGGCTTGGCCCA  
GGAGATGTCACCATTGGGCAGCTCGTGACTGGGCTGCGTATGCTTGGCTTTGATTATGTCTTTG-----

ACACCCTGTTTGGTGCTGAC [REDACTED] GGAACGGAGCTGCTGCATCGCCTGCAGGACCATCTGG  
AGCAGCACCCCAACAAGGAGG-----

AGCACTGCCCATGTTCCACCAGTTGCTGCCCAGGCTGGGTTGCCATGGTTGAAAAGAGCAATCCTGAGCTCATCC  
CCTACCTGTTCATCTTGCAGTGCCTCAGATGATGCTTGGGGCCGTTATCAAGAACTACTATGCACAGCAGGTTG  
GAGTGCAGCCAGTGACATCTGCAACGTGTCAGTCATGCCATGCGTACCGCAAGCAGGGAGAGGCTGACCGGGAGT  
GGTTCAACACCACAGGTG-----

CAGGCCTTGCCCGTGATGTTGATCATGTGGTACTACTGCTGAGGTTGGTAAGATATTCCTGGAGCGTGGCATCA  
AGCTGAATGAGCTGCCAGAGAGCAACTTTGACAACCCCATTTGGCGAGGGCACAGGTGGTCTGCTGTTTGGCA  
CCACTGGAGGTGTCATGGAGGCAGCACTTCGCACAGTCTATGAAGTGGTGA-----

CCCAGAAGCCCATGGGTCGTGTTGACTTTGAGGAGGTGCGAGGCCTTGAAGGAATCAAGGAGGCAGAGATCACAC  
TCAAGCCAGGAGACACAGCCCATCAAAGCCTTCGCAGGAGCTGATGGGCAGGGCATCAGCCTCAAGATTGCAG  
TAGCCAATGGGCTTGGCAATGCCAAGAAGCTCATCAAGAGCCTGTGAGAGGGCAAGGCCAAGTATGATTTTCATTG  
AGGTCATGGCATGCCCTGGTGGCTGCATTGGCGGAGGCGGTCAGCCCCGAGTACTGACAAGCAGATCCTGCAGA  
AGCGCCAGCAGGCTATGTACAACCTGGATGAGCGCAGTACCATCCGCCGAGCCATGATAACCCATTCATCCAGG  
CGCTGTATGACAAGTTCCTAGGGCACCCAACAGCCACAAGGCACATGATCTG [REDACTED] AGGTG  
GAATTCAGAGGAGAAGTGAGGGACCGAGGCCGAGTGGTGTATTAGTGTAGAGCTAGGCAGCAGGGATCTGGC  
CGCATTTGGGTCGTGTTGTTGGTTCGATCAAGATATGATGAATGCTACAATCTATTTGGGTTCTTTGTAICTC  
ATTCATGACTGCTGCTTGGTGAGGTATGGGCCAGGAAGAAGCCCGCATCAATGCATGTAAGTGGTGGCTCCAC  
ATATGAACCTATCTGGATGTTTAAGGTACCTGAAACAATAGTGCATCGGCTCTGCATGGCTCAACAACCTGTCT  
TCAGAGCAGGTGATTTCCACACCATCTTGATTTACCTACCCTCTGTAGTTCAAGTGGTCAAATGAATGTCTAT  
GGCAGCTACGCCTGCAGTTCATAGTCTATGAAGTTCACCAGAGTCCATGTCCCTCATATTTTTTGTTTTATAT  
GCCTTGATTATGCCCTTGAACCATGCTCAATGCACACAAGTTGGTGCAGGACAGGGCGCATCGTACATCTCAA  
TTTTTCAGAACTTGTCAAGCAACAGCTCATGCATTGCAATCGATCATCACGTACATCCGTGCCATATTCACATG  
GTTTTGACTTGCAAATCAACCAGGCGAGTGGGTAAATGCCAGGCTGGGTGCACNTGGGCCATTTGGGCAGC  
CCTCTGTGGCGAGCTNTGCTGCAGGGCCAAGCTGAGTGCATCAGACTCAGCAGGCTGCTGCTGGCAGCTGTAGAA  
TGCTGAAAAGGGCAITCAACTACATGTCATTATAGGTTGACCTGAGACAGCCGTAAGAATATCATTTGTGTCTG  
AACTTAGTCGTCAATGTCATGCCATGATGTGTGTTTCAGGGATGGATAAGGGAGGTCCTTCCTCAATTACATGCC  
TTTTCAAGAGACTTCAATATCTGTTGTCAGTGACTGTTTGTGTTTGTCTTAATCCAGGGNTNCCAAAAA  
AAAAA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HydAF	<b>CRCTGCCCATGTTCCACCAG</b>	HydAR	<b>GCCACRTAGTGBGIGTGACG</b>
HvF1	<b>████████████████████</b>	HvR1	<b>CKSCTGSCGCTTCTG</b>
HvF2	<u>TGCCCATGTTCCACCA</u>	HvR2	<u>ACRTAGTGDGTGTGCAG</u>

**รูปที่ 4.7** แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่อยู่บนเอกซอน (exon) และสัญลักษณ์ ---- แสดงถึงตำแหน่งของอินตรอน (Intron) ของยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella fusca*

ไพรเมอร์ทั้ง 6 เส้นสามารถจับคู่ไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 9 รูปแบบที่แตกต่างกัน โดยยืนยันได้ว่าตำแหน่งไพรเมอร์ทั้ง 6 เส้นอยู่บริเวณตำแหน่งเอกซอนของยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella fusca* ทั้งหมด ดังนั้น สามารถคาดการณ์ขนาดของยีนไฮโดรจีเนสเมื่อนำไพรเมอร์มาเข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 โดยเทียบกับตำแหน่งของไพรเมอร์เข้าคู่อยู่บนเอกซอน (exon) ของยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella fusca* ดังแสดงในภาคผนวกที่ จ-2 ได้แก่

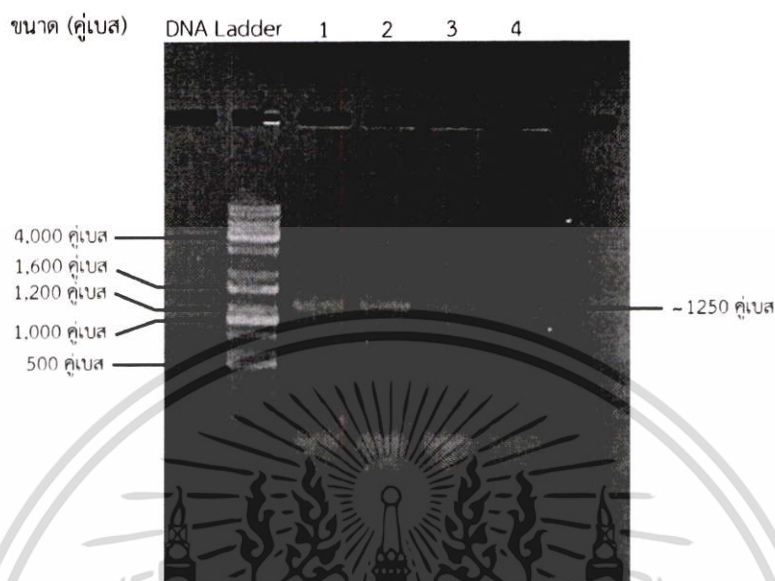
- HydAF/ HydAR มีขนาด 1,352 คู่เบส
- HydAF/ HvR1 มีขนาด 1,215 คู่เบส
- HydAF/ HvR2 มีขนาด 1,349 คู่เบส
- HvF1/ HydAR มีขนาด 1,678 คู่เบส
- HvF1/ HvR1 มีขนาด 1,541 คู่เบส
- HvF1/ HvR2 มีขนาด 1,676 คู่เบส
- HvF2/ HydAR มีขนาด 1,349 คู่เบส
- HvF2/ HvR1 มีขนาด 1,212 คู่เบส
- HvF2/ HvR2 มีขนาด 1,346 คู่เบส

#### 4.3.2 อิทธิพลของอุณหภูมิในการจับตัว ชนิดของเอนไซม์ และชนิดของบัฟเฟอร์

##### 4.3.2.1 การใช้เอนไซม์ *Dream Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยแปรผันอุณหภูมิในการจับตัวตั้งแต่ 40-50 องศาเซลเซียส

นำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 มาเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) โดยการเติมองค์ประกอบต่างๆ เพื่อใช้ในการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสดังแสดงในตารางที่ 3.4 ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ HvF2 (5'-TGCCCATGTTCCACCA-3') และไพรเมอร์ HvR2 (5'- ACRTAGTGDGTGTGCAG -3') (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) โดยใช้อุณหภูมิในการจับตัว คือ 41.0, 43.2, 45.6 และ 48.0 องศาเซลเซียส จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยโหลดผลิตภัณฑ์ PCR และ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ลงในแต่ละหลุม (well) ของเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ตรวจพบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของสายร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 1 แถบในหลุมหมายเลข 1, 2, 3 และ 4



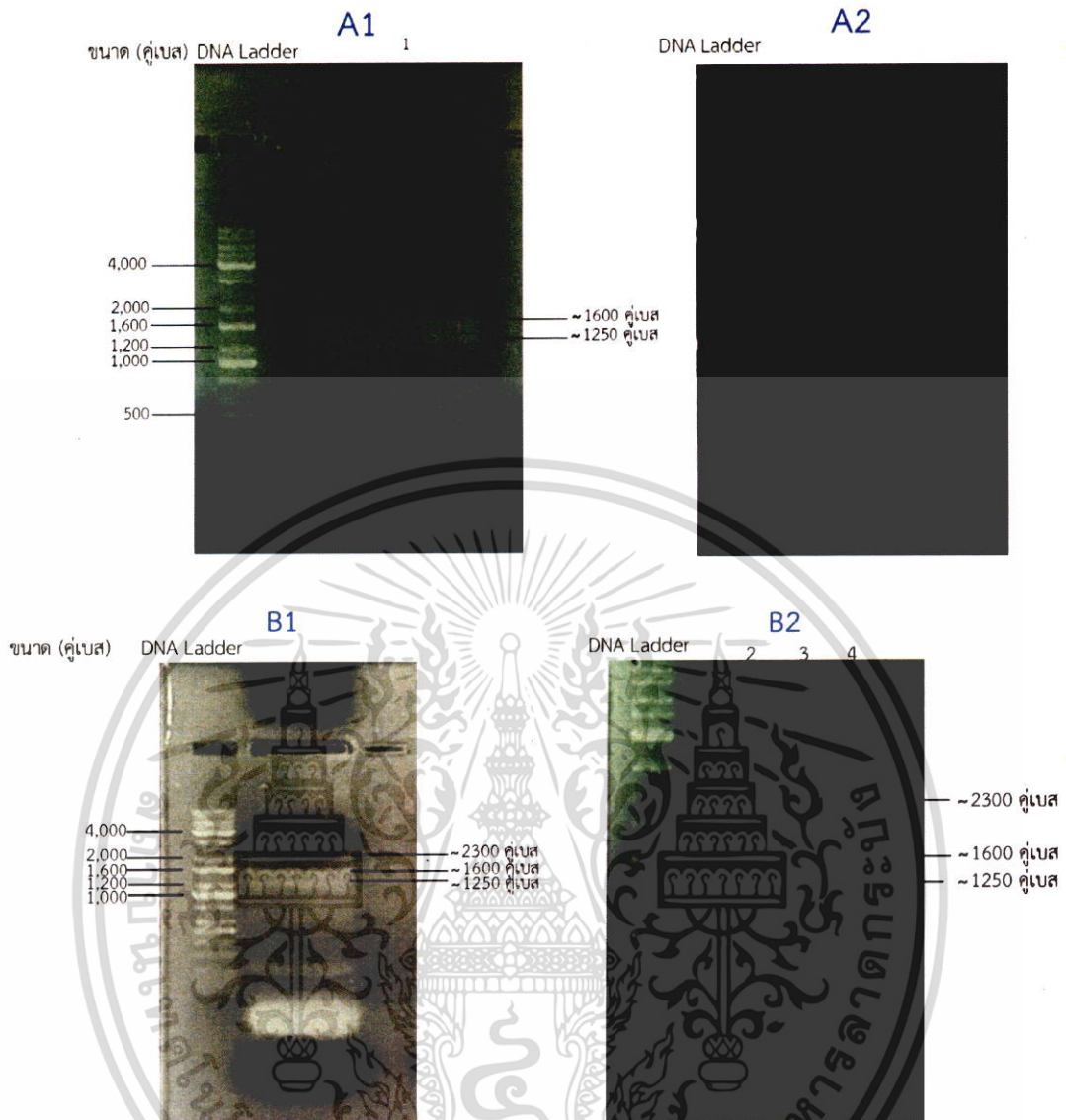
รูปที่ 4.8 แสดงการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไฮโดรจีเนส จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรส-เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรส

DNA Ladder: ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- 1: ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนของสายร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 และใช้อุณหภูมิในการจับตัวคือ 41.0 องศาเซลเซียส
- 2: ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนของสายร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 และใช้อุณหภูมิในการจับตัวคือ 43.2 องศาเซลเซียส
- 3: ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนของสายร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 และใช้อุณหภูมิในการจับตัวคือ 45.6 องศาเซลเซียส
- 4: ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนของสายร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 และใช้อุณหภูมิในการจับตัวคือ 48.0 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.8 ตรวจพบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของสายร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 1 แถบทั้ง 4 หมายเลข แสดงว่าไพรเมอร์ HvF2 และ HvR2 จับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ดีในอุณหภูมิในการจับตัวในช่วง 41.0-43.2 องศาเซลเซียส เนื่องจากเมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดและปริมาณของยีนที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า ยีนที่พบมีขนาดสูงกว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,200 คู่เบส และมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละหมายเลข โดยหลุมหมายเลขที่ 2 มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากที่สุด ดังนั้น ในการทดลองถัดไปผู้วิจัยเลือกใช้อุณหภูมิในการจับตัวที่ 43.2 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงตัวอย่างการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไฮโดรจีเนส จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรส

A1: แสดงการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน โดยมีจำนวนรอบ 30 รอบต่อ 1 ปฏิกริยาการทำ PCR

A2: แสดงการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของยีน A1

B1: แสดงการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน โดยมีจำนวนรอบ 35 รอบต่อ 1 ปฏิกริยาการทำ PCR

B2: แสดงการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของยีน B1

DNA Ladder: ดีเอ็นเอมาตรฐาน

1: ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 และใช้อุณหภูมิในการจับตัว คือ 43.2 องศาเซลเซียส

2, 3 และ 4: ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 โดยมีจำนวนรอบ 35 รอบต่อ 1 ปฏิกริยาการทำ PCR และใช้อุณหภูมิในการจับตัว

คือ 43.2 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เฉพาะในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.9 เมื่อนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 มาทำการเพิ่มปริมาณของยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยเติมองค์ประกอบต่างๆ ดังที่กล่าวไปข้างต้นพบว่า ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 เมื่อนำมาเปรียบเทียบขนาดและปริมาณของยีนที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบยีน 2 ขนาดในรูป A1 คือ มีขนาดประมาณ 1,250 และ 1,600 คู่เบส จากนั้นทำการตัดชิ้นเจลเพื่อ นำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำบริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำบริสุทธิ์ชิ้น PCR ดังแสดงในขั้นตอนที่ 3.10.2 จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสอีกครั้ง ผลที่ได้ดังแสดงในรูป A2 คือ ไม่ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของยีนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 อาจเป็นผลจากความเข้มข้นของ DNA น้อยจนเกินไปจึงไม่สามารถมองเห็นได้ในวุ้นอะกาโรส

ดังนั้นจึงทำการทดลองซ้ำจากจำนวนรอบ 30 รอบต่อ 1 ปฏิบัติการทำ PCR เพิ่มเป็นจำนวนรอบ 35 รอบต่อ 1 ปฏิบัติการทำ PCR เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอต้นแบบได้ดีขึ้น ผลที่ได้ดังแสดงในรูป B1 ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน เมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดและปริมาณกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่ามียีน 3 ขนาดโดยมีขนาดประมาณ 1,250 1,600 และ 2,300 คู่เบส แต่เมื่อทำการตัดชิ้นเจลในรูป B1 ตามขนาดต่างๆ ทั้ง 3 ขนาด ดังที่กล่าวไปเพื่อทำบริสุทธิ์ชิ้น PCR จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสอีกครั้ง ผลที่ได้ดังแสดงในรูป B2 คือ ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ทั้ง 3 ขนาด ดังนั้นจึงเลือกสารละลายที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR จากการขึ้น PCR ในรูป B1 ส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องจาก พบแถบดีเอ็นเอ 3 ขนาด ซึ่งคาดว่ายีนทั้ง 3 ขนาดนี้อาจมียีนใดยีนหนึ่งเป็นยีนไฮโดรจีเนส

หลังจากที่ทำการส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน เพื่อทราบขนาดคู่เบสของยีนและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแต่ละชิ้น จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ทั้ง 3 ชิ้นมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถูกรายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastN ผลที่ได้ คือ ชนิดดีเอ็นเอทั้ง 3 ขนาดไม่ใช่ยีนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส แต่เป็นยีนที่เป็น unknown ทั้งหมด ดังแสดงในภาคผนวก จ-3

เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้นั้นไม่ใช่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนส ต่อมาผู้วิจัยได้ทำการแปรผันพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของการเพิ่มปริมาณยีนโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน อาทิเช่น การแปรผันอุณหภูมิในการจับตัว การแปรผันชนิดของไพรเมอร์ การแปรผันชนิดของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอไรเซชัน และการแปรผันชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาเพื่อตามหายีนไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59

#### 4.3.2.2 การใช้เอนไซม์ *Dream Taq* DNA polymerase และเอนไซม์ *RBC Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยแปรผันอุณหภูมิในการจับตัว ตั้งแต่ 40-60 องศาเซลเซียส

ผู้วิจัยได้นำสายรหัสยีสต์ *Chlorella* sp. KLSc59 มาเพิ่มปริมาณยีนไฮโดรจีเนสอีกครั้งด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยเติมองค์ประกอบต่างๆ ตามวิธีดำเนินการดังแสดงในตารางที่ 3.4 แต่ทำการแปรผันชนิดของไพรเมอร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด (Maneeruttanarungroj. et al., 2010) ได้แก่

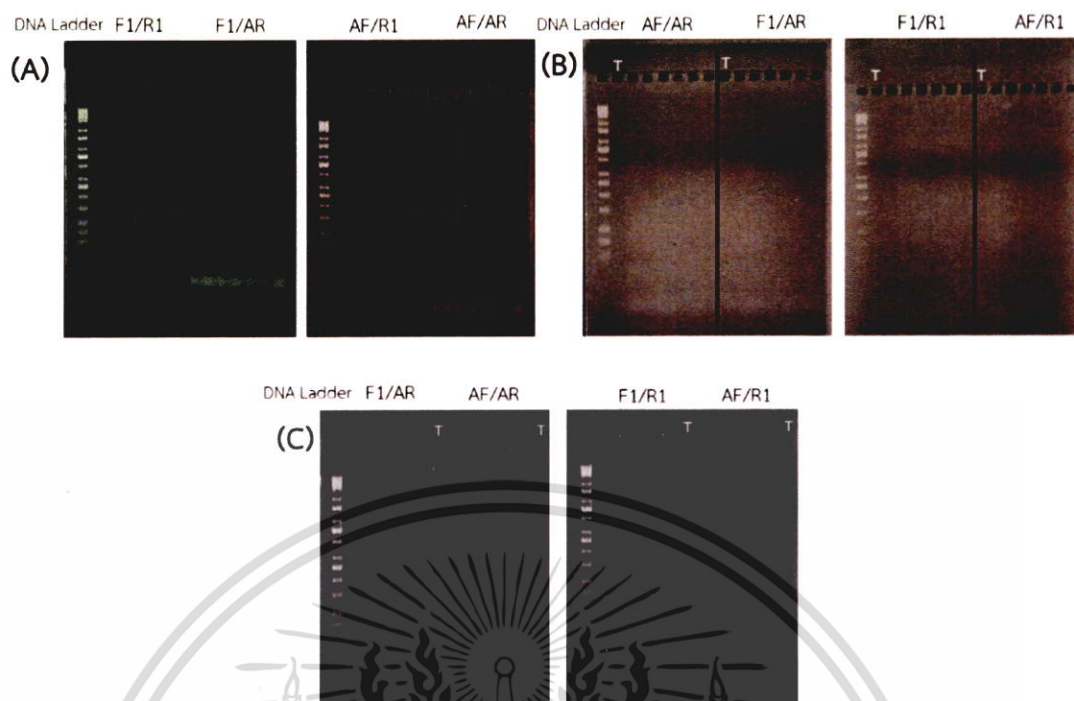
ไพรเมอร์ HydAF (5'-CRCTGCCCATGTTCCACCAG-3')

ไพรเมอร์ HvF1 (5'-CTVACCATYATGGAGGAR-3')

ไพรเมอร์ HydAR (5'-GCCACRTAGTGBGTGTGCAG-3')

ไพรเมอร์ HvR1 (5'-CKSCTGSCGCTTCTG-3')

โดยไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิดนี้มี Forward 2 เส้น คือ HvF1 และ HydAF และ reverse 2 เส้น HvR1 และ HydAR ซึ่งสามารถเข้าคู่เพื่อจับกับเบสคู่สมในดีเอ็นเอต้นแบบได้ทั้งหมด 4 แบบ คือ HydAF/ HydAR, HydAF/ HvR1, HvF1/ HydAR และ HvF1/ HvR1 นอกจากนี้ยังทำการแปรผันอุณหภูมิในการจับตัว (annealing temperature) คือ 41.9, 46.4, 51.3, 53.6, 56.0, 58.1 และ 60.0 และแปรผันชนิดของเอนไซม์ *DreamTaq* DNA polymerase (Thermo Science) และ *RBC Taq* DNA polymerase (RBC Bioscience) เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยโหลดผลิตภัณฑ์ PCR และ ดีเอ็นเอมาตรฐานลงในแต่ละหลุมของเจล นำเจลที่ได้ไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ผลที่ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 แสดงผลการแยกอย่างผลัดกัน PCR ของยีนไฮโตรจีเนส จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

รูป (A): แสดงผลผลิต PCR ของยีนโดยใช้เอนไซม์ *DreamTaq* DNA polymerase ที่มีการแปรผันไพรเมอร์และแปรผันอุณหภูมิในการจับตัว คือ 41.9, 46.4, 51.3, 53.6, 56.0, 58.1 และ 60.0 โดยเปิดผลผลิตตามลำดับอุณหภูมิ

รูป (B) และ (C): แสดงผลผลิต PCR ของยีนโดยใช้เอนไซม์ *RBC Taq* DNA polymerase ที่มีการแปรผันไพรเมอร์และแปรผันอุณหภูมิในการจับตัว (annealing temperature) คือ 46.4, 51.3, 53.6, 56.0, 58.1 และ 60.0 โดยเปิดผลผลิตตามลำดับอุณหภูมิ โดย (B) เป็นการทดสอบโดยใช้น้ำปราศจากไอออนและ (C) เป็นการทดสอบโดยใช้น้ำกลั่น

DNA Ladder: ดีเอ็นเอมาตรฐาน

T: Positive control 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

F1R1: แสดงผลผลิต PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF1/ HvR1

F1AR: แสดงผลผลิต PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF1/ HydAR

AFR1: แสดงผลผลิต PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HydAF/ HvR1

AFAR: แสดงผลผลิต PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HydAF/ HydAR

จากผลการทดลองในรูป A ไม่ปรากฏแถบผลผลิต PCR แม้ทำการแปรผันไพรเมอร์และอุณหภูมิในการจับตัวทั้ง 7 อุณหภูมิ ดังนั้นในการทดลองถัดมา (รูป B) ผู้วิจัยได้เพิ่มตัวควบคุมที่มีผลเป็นบวก (positive control) คือ ยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่ส่งมาเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่สามารถนำออกจำหน่าย หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ไพรเมอร์ 18S rDNA F1 และไพรเมอร์ 18S rDNA F2 (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) และเปลี่ยนเอนไซม์ *DreamTaq* DNA polymerase เป็นเอนไซม์ *RBC Taq* DNA polymerase จากนั้นใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน ผลที่ได้กลับไม่ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR แม้แต่บริเวณแถบของยีน 18S rDNA ที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวก จึงได้ทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง โดยทำการทดลองแบบเดียวกับรูป B แต่เปลี่ยนจากน้ำปราศจากไอออนเป็นน้ำกลั่นดังแสดงในรูป C

#### 4.3.2.3 การใช้เอนไซม์ *KAPA Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

อย่างไรก็ตามรูปที่ 4.10 ไม่พบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59 ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการแปรผันไพรเมอร์ทั้งหมด 6 ชนิด (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) โดยไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิดนี้เป็น degenerate primer คือ มีลำดับเบสบางลำดับของไพรเมอร์ที่เข้าคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบได้มากกว่า 1 คู่ ได้แก่

ไพรเมอร์ HydAF (5'-CRCTGCCCATGTTCCACCAG-3')

ไพรเมอร์ HvF1 (5'-CTVACCATYATGGAGGAR-3')

ไพรเมอร์ HvF2 (5'-TGCCCATGTTCCACCA-3')

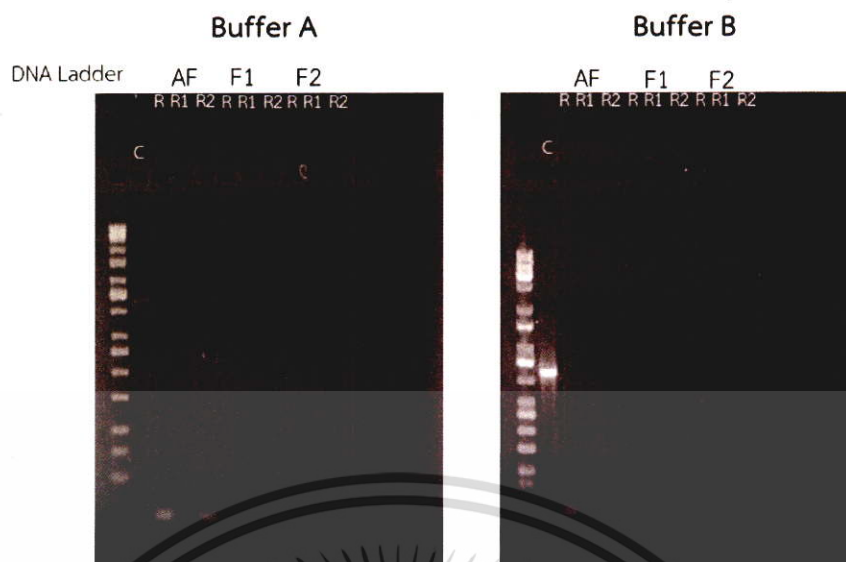
ไพรเมอร์ HydAR (5'-GCCACRTAGTG BGTGTGCAG-3')

ไพรเมอร์ HvR1 (5'-CKSCTGSCGCTTCTG-3')

และไพรเมอร์ HvR2 (5'-ACRTAGTGDGTGTGCAG-3')

ดังนั้น ไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิดโดยมี Forward 3 เส้น คือ HvF1, HvF2 และ HydAF และ reverse 3 เส้น HvR1, HvR2 และ HydAR ซึ่งสามารถเข้าคู่กันเพื่อจับกับเบสคู่สมในดีเอ็นเอต้นแบบได้ทั้งหมด 9 แบบ คือ HydAF/ HydAR, HydAF/ HvR1, HydAF/ HvR2, HvF1/ HydAR, HvF1/ HvR1, HvF1/ HvR2, HvF2/ HydAR, HvF2/ HvR1 และ HvF2/ HvR2

นอกจากนี้ ได้เปลี่ยนเอนไซม์พอลิเมอเรสเป็น *KAPA Taq* DNA polymerase (*KAPA Biosystems*) ซึ่งเอนไซม์ชุดนี้มีบัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ บัฟเฟอร์ A และ บัฟเฟอร์ B จึงทำการแปรผันบัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิดในการทดลองนี้ด้วย และใช้อุณหภูมิในการจับตัวที่ 52 องศาเซลเซียส โดยผู้วิจัยต้องการหาสาเหตุที่ทำให้ผลการทดลองก่อนหน้านี้ไม่ปรากฏแถบของยีน และเพื่อเป็นการยืนยันขั้นตอนและวิธีทำการทดลองของตัวผู้วิจัย จึงนำสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 มาทำการหಾಯีนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสด้วย ซึ่งงานวิจัยของเชตศักดิ์และคณะ (2554) ได้ทำการศึกษายีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสายพันธุ์นี้แล้ว นอกจากนี้ในชุดของผลการทดลองนี้ ยังรวมผลของตัวควบคุมเชิงบวก คือ ยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59



รูปที่ 4.11 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ที่มีการแปรผันชนิดของไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่

DNA Ladder: ดีเอ็นเอมาตรฐาน

C: Positive control 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59

AF/R: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HydAF/ HydAR

AF/R1: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HydAF/ HVR1

AF/R2: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HydAF/ HVR2

F1/R: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF1/ HydAR

F1/R1: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF1/ HVR1

F1/R2: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF1/ HVR2

F2/R: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF2/ HydAR

F2/R1: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF2/ HVR1

F2/R2: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF2/ HVR2

ผลการทดลองที่ได้ในรูปที่ 4.11 เป็นการแปรผันไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่ พร้อมกับทำการแปรผันชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณของยีนโดยเทคนิค PCR โดยมียีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 เป็นชุดควบคุม จากรูปปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 เท่านั้น โดยบัฟเฟอร์ B ทำงานได้ดีกว่าในบัฟเฟอร์ A เนื่องจากพบความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR มากกว่าในบัฟเฟอร์ A ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 แต่ไม่ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ของยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3.3 อิทธิพลของ DMSO ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR

ต่อมาได้ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับผลการทดลองในรูปที่ 11 แต่เติมสาร DMSO เพิ่มลงไปในการปฏิกิริยา เนื่องจาก DMSO หรือ Dimethyl sulfoxide เป็นสารที่ช่วยลดโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของทั้งสายดีเอ็นเอต้นแบบและดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่อาจจะเกิดขึ้น ผลที่ได้ปรากฏในรูปที่ 4.12 พบแถบผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นสมมาตรที่ไพรเมอร์ HvF1/ HVR2, HvF2/ HVR1 และ HvF2/ HVR2 โดยที่แถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ยังคงปรากฏเช่นเดิม



รูปที่ 4.12 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ที่มีการแปรผันชนิดของไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่และเติมสาร DMSO

DNA Ladder: ดีเอ็นเอมาตรฐาน

C: Positive control 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59

AF/R: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HydAF/ HydAR

AF/R1: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HydAF/ HVR1

AF/R2: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HydAF/ HVR2

F1/R: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF1/ HydAR

F1/R1: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF1/ HVR1

F1/R2: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF1/ HVR2

F2/R: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF2/ HydAR

F2/R1: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF2/ HVR1

F2/R2: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF2/ HVR2

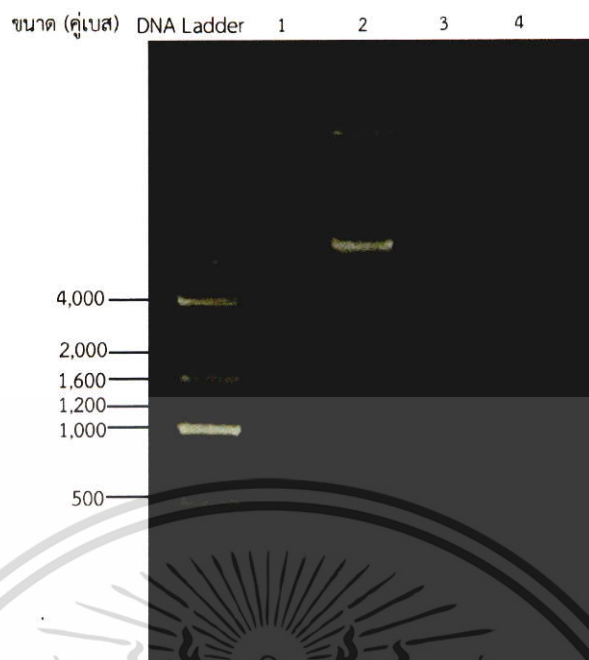
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมาเป็นการติดตามหายีนไฮโดรจีเนสในระดับจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยใช้เซลล์สาหร่ายเป็นต้นแบบสำหรับการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR อย่างไรก็ตามผลของการติดตามหายีนไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ยังไม่ประสบผลสำเร็จ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่ามีความเป็นไปได้ที่ยีนไฮโดรจีเนสอาจจะมีอินตรอนที่เป็นอุปสรรคต่อการติดตามหายีนดังกล่าว ดังนั้น จึงทำการตามหายีนไฮโดรจีเนสในระดับอาร์เอ็นเอแทน โดยจะนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้เปลี่ยนกลับเป็นดีเอ็นเอ หรือที่เรียกว่า complementary DNA (cDNA) จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

#### 4.3.4 การตามหายีนไฮโดรจีเนสในระดับ RNA

ในการทดลองนี้ได้นำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 มาสกัดอาร์เอ็นเอ จากนั้นเปลี่ยนอาร์เอ็นเอที่ได้ให้กลายเป็น cDNA ซึ่งนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบของปฏิกิริยา PCR เพื่อตามหายีนไฮโดรจีเนสต่อไป ผู้วิจัยได้แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด โดยนำเซลล์สาหร่ายมาปั่นเก็บเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ผสมรวมกับบัฟเฟอร์ FARB ของชุดสกัดอาร์เอ็นเอ (FavorPrep™ Plant Total RNA mini kit) และเม็ดบีดแก้วบ่มในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ผนังเซลล์สาหร่ายเสียหายไปบางส่วน เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นวอเทกซ์ (Vortex) ด้วยความแรงเพื่อทำให้เซลล์แตก โดยแปรผันเวลาในการวอเทกซ์เซลล์ คือ ปั่น 30 วินาที และ 5 นาที แทนด้วยชุด A และ ชุด B ตามลำดับ จากนั้นนำของผสมไปกรองโดยใช้คอลัมน์ของชุดอุปกรณ์เพื่อกรองตะกอนออกแล้วเก็บส่วนใส เติมเอทานอลในสารละลายส่วนใสเพื่อให้อาร์เอ็นเอตกตะกอน นำไปวอเทกซ์ด้วยความแรง ก่อนถ่ายโอนสารผสมลงคอลัมน์ใหม่ ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้าง (wash buffer) 1 และ 2 จากนั้นชะด้วย RNase-free ddH<sub>2</sub>O เพื่อสกัด RNA

นำสารละลาย RNA ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเพื่อตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงคุณภาพของ RNA จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสโดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรส

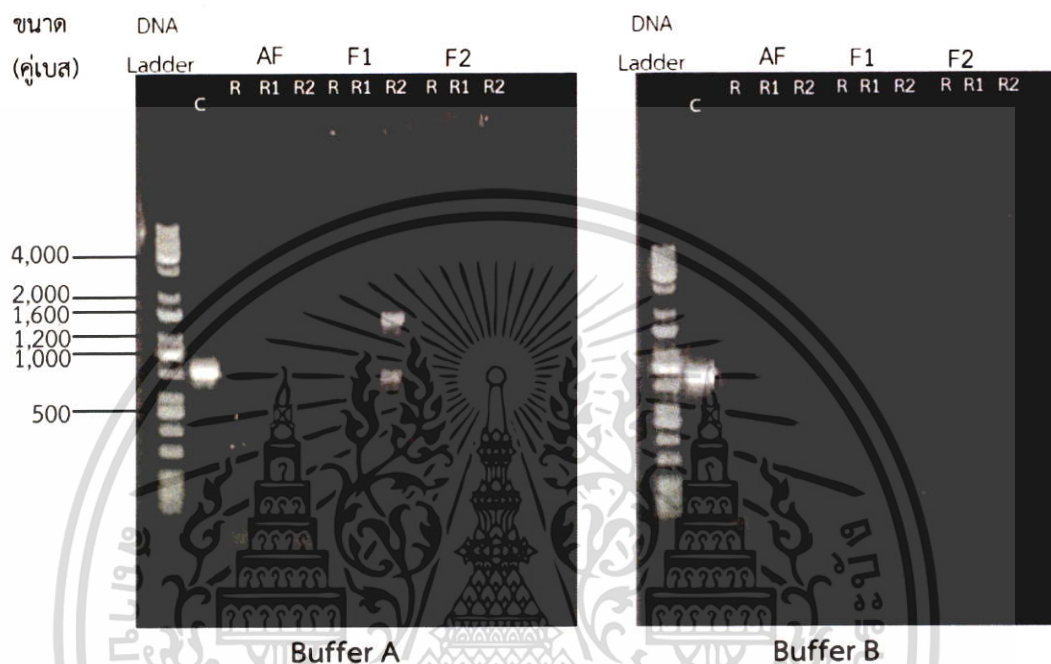
DNA Ladder: ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- 1: แถบ RNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 โดยปิเปตต์สารละลาย RNA 1 ไมโครลิตร จากชุด B
- 2: แถบ RNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 โดยปิเปตต์สารละลาย RNA 5 ไมโครลิตร จากชุด B
- 3: แถบ RNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 โดยปิเปตต์สารละลาย RNA 1 ไมโครลิตร จากชุด A
- 4: แถบ RNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 โดยปิเปตต์สารละลาย RNA 5 ไมโครลิตร จากชุด A

จากรูปที่ 4.13 จะเห็นได้ว่า RNA ที่สกัดได้มีคุณภาพที่ดี เนื่องจาก ปรากฏแถบหลัก 2 แถบ ในช่วง 1,000 ถึง 2,000 คู่เบสที่ชัดเจนในหลุมหมายเลข 2 และหลุมหมายเลข 4 เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณของดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า หมายเลข 2 มีความเข้มข้นของ RNA มากกว่าบริเวณหมายเลข 4 แสดงว่าสามารถสกัด RNA ได้ในปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อวอกเทกซีให้เซลล์แตกเป็นเวลานานขึ้น นำสารละลาย RNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ที่สกัดได้ มาทำปฏิกิริยารีเวิร์ส-ทรานสคริปชัน (Reverse Transcription) เพื่อเปลี่ยน RNA ให้กลายเป็น cDNA นำ cDNA ที่ได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการหาลำดับยีนไฮโดรจีนเนสด้วยเทคนิค PCR โดยการแปรผันไพรเมอร์ 9 คู่ ดังที่กล่าวไปข้างต้น และแปรผันบัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิด คือ บัฟเฟอร์ A และ บัฟเฟอร์ B โดยมียีน 18S

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

rDNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 เป็นตัวควบคุมเชิงบวกของปฏิกิริยานี้ ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนควบคุมทั้งในบัฟเฟอร์ A และ B นอกจากนี้ในบัฟเฟอร์ A ยังพบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ HvF1/HvR2 มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอปริมาณมากเมื่อเทียบกับบัฟเฟอร์ B



รูปที่ 4.14 แสดงการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไฮโดรจีเนส จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

DNA Ladder: ดีเอ็นเอมาตรฐาน

C: Positive control 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59

AFR: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HydAF/ HydAR

AFR1: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HydAF/ HvR1

AFR2: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HydAF/ HVR2

F1R: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF1/ HydAR

F1R1: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF1/ HvR1

F1R2: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF1/ HVR2

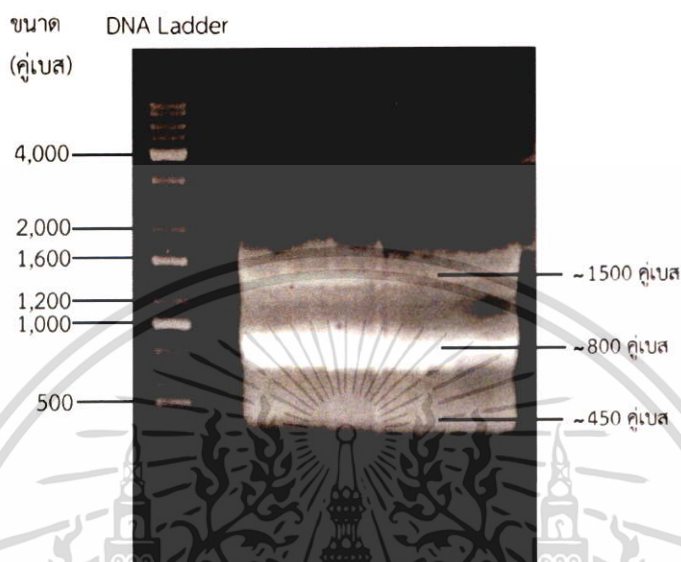
F2R: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF2/ HydAR

F2R1: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF2/ HVR1

F2R2: แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ HvF2/ HVR2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น คู่ไพรเมอร์ HvF1/HvR2 ถูกนำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปริมาตรที่สูงขึ้น และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อดูขนาดและปริมาณของชิ้นยีน จากนั้นตัดชิ้นเจลเพื่อนำไปทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในรูป 4.15



รูปที่ 4.15 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส DNA Ladder: ดีเอ็นเอมาตรฐาน

หลังจากตัดชิ้นเจลของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 3 แถบ ที่บริเวณแถบประมาณ 1,500, 800 และ 450 คู่เบส มาทำบริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำบริสุทธิ์ชิ้น PCR (FavorPrep™ GEL/ PCR Purification Kit) ดังแสดงในขั้นตอนที่ 3.10.2 จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสอีกครั้ง เพื่อทำการตรวจสอบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR 3 แถบ ที่ขนาดประมาณ 1500, 800 และ 450 คู่เบส หลังจากนั้นทำการส่งตรวจเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ PCR ทั้ง 3 แถบ หลังจากทำการส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ทำให้ทราบขนาดคู่เบสของยีนแต่ละชิ้นจากนั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ทั้ง 3 ขนาด ดังแสดงตัวอย่างในภาคผนวก จ-4 มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆ ที่ถูกรายงานไว้ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม BlastN ผลที่ได้ คือ ยีนที่พบทั้ง 3 ขนาดไม่ใช่ยีนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส แต่เป็นยีนที่เป็น unknown ดังแสดงในภาคผนวก จ-5

จากผลการทดลองทั้งหมด ทำให้สรุปได้ว่าไม่สามารถติดตามยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ทั้งในระดับ DNA หรือ RNA ดังนั้นหากมีการทดลองระดับต่อไปในการศึกษา ยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายชนิดนี้ อาจต้องทำการศึกษาในระดับโปรตีน หรือทำการศึกษา

ในระดับพันธุวิศวกรรม

#### 4.4 ผลการศึกษาการปรับสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

จากการทดลองก่อนหน้าได้ทำการศึกษากาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย 4 สายพันธุ์ ปรากฏว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 มีปริมาณไฮโดรเจนสะสมมากที่สุดเมื่อทำการบ่ม ภายใต้สภาวะโล่อากาศ ดังนั้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 จึงทำการศึกษาเพิ่มเติม ซึ่งการที่เซลล์สาหร่ายสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดี เกิดจากซบสเตรทและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสภายในเซลล์ของสาหร่าย ดังนั้นการปรับสภาวะเหล่านี้จะดูตัวแปรที่อาจส่งผลต่อปริมาณของซบสเตรท ดังแสดงในรูปที่ 2.6 ตัวแปรที่ทำการศึกษามีดังนี้ อิทธิพลของการบดบังของเซลล์ อิทธิพลของความเข้มข้น คาร์บอน อิทธิพลของการขาดธาตุอาหาร อิทธิพลของค่า pH และอิทธิพลของการเติมสารที่ให้ อิเล็กตรอน

การทดลองก่อนหน้าเป็นการหาปริมาณไฮโดรเจนสะสมในหน่วยของไมโครโมลไฮโดรเจน ต่อค่าความหนาแน่นของเซลล์ ( $OD_{750}$ ) เนื่องจากเป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 4 ไอโซเลท จากนั้นนำสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดมา ศึกษาการปรับสภาวะต่างๆ ดังนั้น ในการศึกษาต่อไปนี้จะใช้หน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัม คลอโรฟิลล์เพื่อให้ง่ายต่อการนำไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ เนื่องจากในงานวิจัยส่วนใหญ่ นิยมใช้ หน่วยของปริมาณไฮโดรเจนเป็นต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ โดยแสดงการคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์จาก ค่าความขุ่นของเซลล์สาหร่ายจากกราฟมาตรฐานดังแสดงในภาคผนวก ง

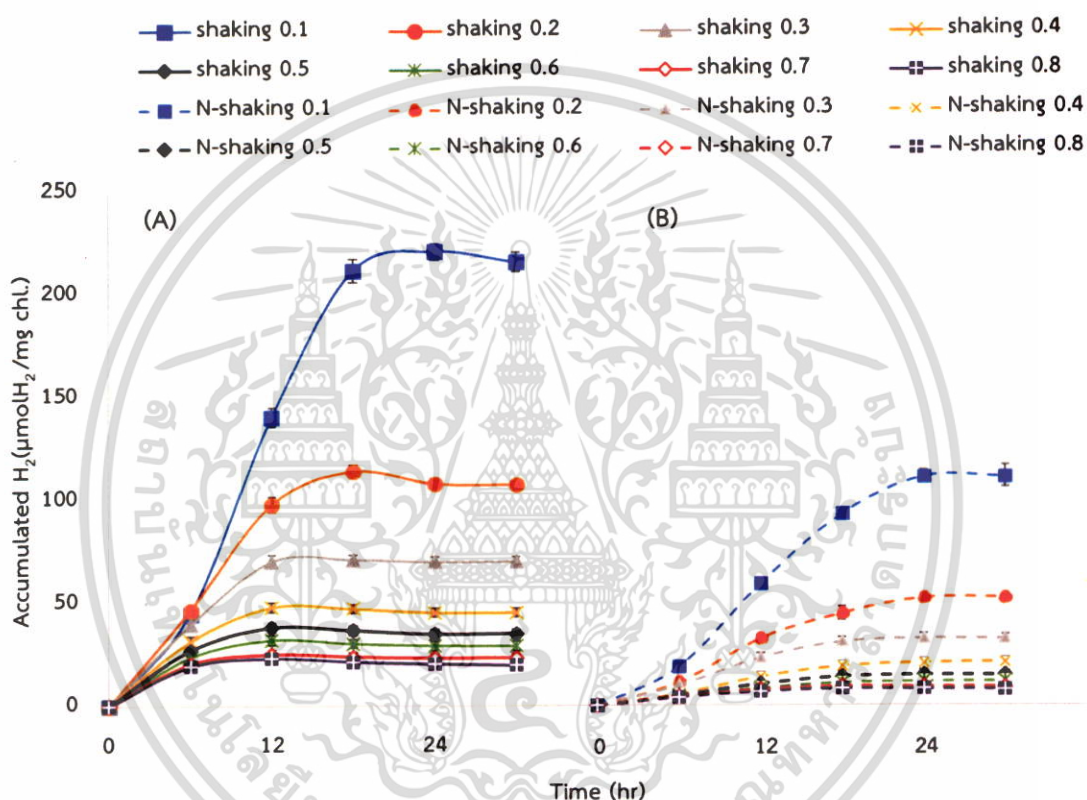
นอกจากนี้ยังแสดงปริมาณไฮโดรเจนสะสมในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์ แห่งดังแสดงในภาคผนวก ฉ และแสดงการคำนวณน้ำหนักเซลล์แห่งจากค่าความขุ่นของเซลล์สาหร่าย จากกราฟมาตรฐานดังแสดงในภาคผนวก ค

##### 4.4.1 ผลการศึกษาอิทธิพลของการบดบังเซลล์ (cell stacking) ที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

จากการทดลองที่ 4.1 ทำให้ทราบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวไอโซเลทอื่นๆ ที่มีในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาภายใต้สภาวะที่มีอากาศและสภาวะที่โล่อากาศ พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ที่บ่มภายใต้สภาวะที่โล่อากาศโดยการพ่นก๊าซอาร์กอน จะให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่สูงกว่าภายใต้สภาวะที่มีอากาศ ดังนั้นจึงเลือกสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ที่บ่มภายใต้สภาวะโล่อากาศมาทำการศึกษาต่อไป ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของค่าความขุ่นเซลล์สุดท้าย (final  $OD_{750}$ ) ของเซลล์ในขั้นการสังเคราะห์ด้วยแสง (stage I) ซึ่งคือผลของค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้น (initial  $OD_{750}$ ) ของเซลล์ในขั้นการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (stage II) และเพื่อไม่ให้เกิดความสับสน ในผลการทดลองต่อจากนี้จะสนใจเฉพาะขั้นการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (stage II) เท่านั้น ดังนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ในระยะนี้จะถูกเรียกว่า “ค่าความขุ่นของเซลล์” เท่านั้น โดยแปรผันค่าความขุ่นเซลล์ตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.8 และทำการบ่ม 2 แบบ ได้แก่ การบ่มแบบเขย่าและการบ่มแบบไม่เขย่า เป็นเวลา 6, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเครื่อง GC-TCD ผลการทดลองในรูปที่ 4.16 เกิดจากการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้งและแต่ละครั้งให้ผลที่สอดคล้องกัน พบว่าในทุกๆ สภาวะของการแปรผันค่าความขุ่นเซลล์โดยทำการบ่มแบบเขย่า (เส้นทึบ) มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ในทุกๆ สภาวะของการแปรผันค่าความขุ่นเซลล์โดยการบ่มแบบไม่เขย่า (เส้นประ) ที่ความขุ่นของเซลล์ที่เท่ากัน



รูปที่ 4.16 ผลของค่าความขุ่นของเซลล์ (OD<sub>750</sub>) ของเซลล์ต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการบ่มแบบเขย่า (A) และการบ่มแบบไม่เขย่า (B)

เนื่องจากการไม่เขย่าเซลล์จะทำให้เกิดผลของการบดบังแสงของเซลล์สำหรับตัวกันเอง กล่าวคือ เกิดการซ้อนทับของเซลล์เป็นชั้นๆ เมื่อเซลล์มีค่าความขุ่นเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้กำลังการทะลุทะลวงของแสง (penetration power) และการดูดกลืนแสงในรงควัตถุคลอโรฟิลล์นั้นลดลง ก่อให้เกิดการแตกตัวของน้ำ (water splitting) ในระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 เกิดได้น้อยลง (Kim *et al.*, 2005) ส่งผลให้ซับสเตรต (H<sup>+</sup> และ e<sup>-</sup>) ที่ใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านเอนไซม์ไฮโดรจีเนสลดลง เป็นสาเหตุให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่บ่มแบบไม่เขย่าเซลล์ลดลง ผลการทดลองลักษณะนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่นๆ อาทิเช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Tetraspora* sp. CU2551 (Maswana *et al.*, 2018), *Chlorella* sp. (Batyrova *et al.*, 2015) และ *C. reinhardtii* (Batyrova *et al.*, 2012) ดังนั้นในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเซลล์สาหร่ายสีเขียวโดยการบ่มแบบเขย่าสามารถลดการเกิดการบดบังแสงของเซลล์ได้ ส่งผลให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะการบ่มเซลล์แบบเขย่าสูงกว่าในสภาวะการบ่มเซลล์แบบไม่เขย่า

เมื่อสภาวะการบ่มที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ต่างกันของเซลล์สาหร่าย โดยจากรูปที่ 4.16 ผลของการบ่มเซลล์แบบเขย่าเมื่อแปรผันค่าความขุ่นของเซลล์ พบว่า สาหร่ายที่มีค่าความขุ่นของเซลล์ที่ 0.1 เซลล์สาหร่ายมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุดคิดเป็น 220.925 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ภายในเวลา 18 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไปเซลล์จะเริ่มมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่คงที่ เนื่องจากเซลล์ที่ค่าความขุ่นของเซลล์ 0.1 จะมีความหนาแน่นของเซลล์ต่ำและใช้สภาวะการบ่มแบบเขย่าส่งผลให้มีการลดลงของการซ้อนทับกันของเซลล์

นอกจากนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายที่มีค่าความขุ่นของเซลล์ที่ 0.2 โดยการบ่มแบบเขย่า และการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายที่มีค่าความขุ่นของเซลล์ที่ 0.1 โดยการบ่มแบบไม่เขย่า พบว่า มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมอยู่ที่ 108.062 และ 111.531 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เมื่อบ่ม 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยทั้ง 2 ค่านี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น อาจเลือกสภาวะใดสภาวะหนึ่งเพื่อนำไปศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตได้

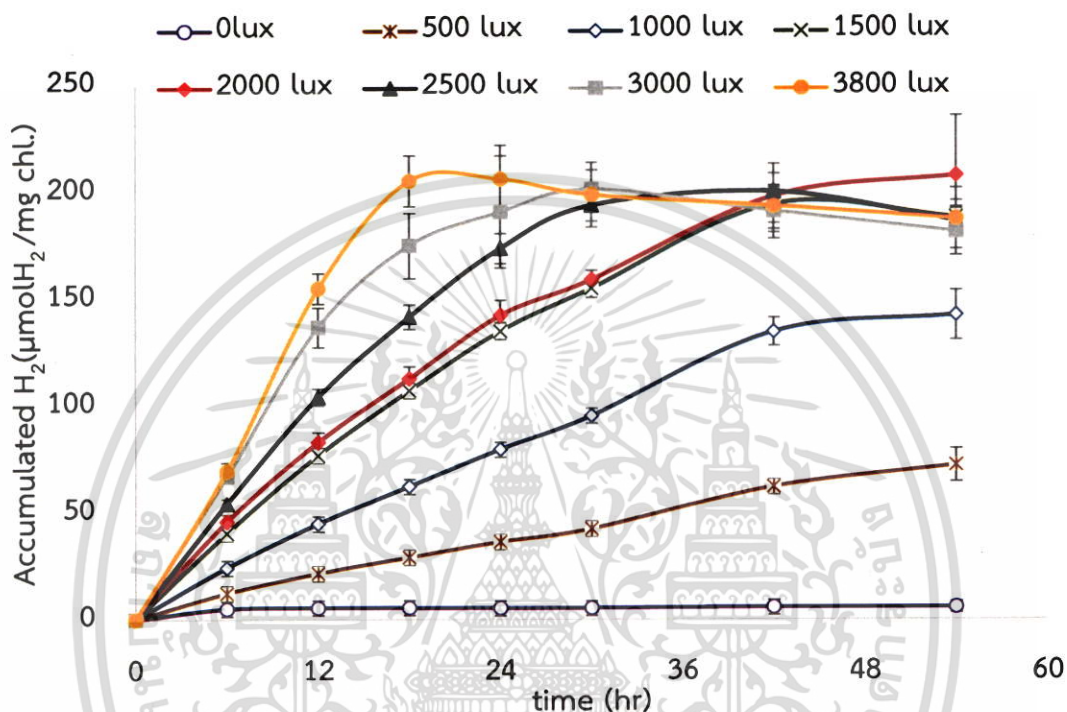
จากที่กล่าวมาทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่า เมื่อทำการบ่มแบบเขย่าโดยมีค่าความขุ่นของเซลล์คือ 0.1 จะช่วยให้เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด โดยที่ค่าความขุ่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์มีความหนาแน่นมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการบดบังแสงของเซลล์มากขึ้น ผลผลิตไฮโดรเจนจึงลดลง ดังนั้นการทดลองต่อไปจะใช้เซลล์สาหร่ายที่มีค่าความขุ่นของเซลล์ คือ 0.1 โดยบ่มแบบเขย่าตลอดทุกการทดลอง

#### 4.4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

หลังจากที่ได้ทราบค่าความขุ่นของเซลล์และการบ่มเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ต่อไปผู้วิจัยได้ทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสง โดยทำการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ในขั้นการเจริญเติบโต (stage I) จนเซลล์มีอายุ 24 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ จากนั้นปรับค่าความขุ่นของเซลล์ที่ 0.1 และถ่ายโอนสารแขวนลอยเซลล์ลงในขวด vial ทำการพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศออก นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าในสภาวะที่มีการแปรผันความเข้มแสงตั้งแต่ 0 จนถึง 3,800 ลักซ์ ในขั้นการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (stage II) หลังจากนั้นวัดก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการบ่มทุกๆ 6 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.17 เกิดจากการทำการทดลองแบบเต็มซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ล้วนแล้วแต่ให้ผลที่สอดคล้องกัน พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มแสงตั้งแต่ 0 จนถึง 3,800 ลักซ์ ซึ่งเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 18 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะค่อยๆ ลดลง อย่างคงที่เมื่อเวลาผ่านไป โดยมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุด คิดเป็น 206.17 ไมโครโมล ไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เมื่อบ่มเซลล์สำหรับภายใต้ความเข้มแสง 3,800 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเซลล์สำหรับจะมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ลดลงเมื่อความเข้มแสงลดลง



รูปที่ 4.17 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากผลการทดลองสามารถอธิบายได้จาก ความเข้มแสงส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยเมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้น อัตราการสังเคราะห์แสงของเซลล์จะมากขึ้น ดังนั้นจะมีอิเล็กตรอนและโปรตอนที่เป็นซับสเตรทมากขึ้น โดยอิเล็กตรอนที่เพิ่มมากขึ้นจากกระบวนการออกซิเดชันของน้ำในระบบการสังเคราะห์แสง 2 (PS II) จะถูกขนส่งผ่านกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (photosynthetic electron transport chain) จนถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย คือ เฟอร์ริดอกซิน (ferredoxin) ก่อนจะส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงขึ้น ในทางกลับกันความเข้มแสงที่สูงมากเกินไปก่อให้เกิด การจำกัดของแสง (light limitation) การอิ่มตัวของแสง (light saturation) หรือการยับยั้งของแสง (light inhibition) (Chia *et al.*, 2017)

เพื่อเป็นการทดสอบการอิ่มตัวของแสง จึงได้ออกแบบการทดลองโดยเพิ่มความเข้มแสงให้สูงกว่าความเข้มแสงที่สูงที่สุดในตู้บ่ม โดยเปลี่ยนจากการบ่มเซลล์สำหรับในตู้บ่มเป็นบ่มเซลล์สำหรับในพื้นที่เปิดโล่งที่แสงแดดส่องถึงโดยจะทดสอบความเข้มแสง 4 ช่วง คือ 0, 2,000-3,000, 5,000-6,000 ลักซ์และแสงอาทิตย์โดยตรงที่ไม่สามารถวัดความเข้มแสงได้เนื่องจากข้อจำกัดของอุปกรณ์ที่ใช้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัดแสงสามารถวัดแสงได้สูงสุด 10,000 ลักซ์เท่านั้น นอกจากนี้ในการทดลองนี้ยังพบข้อจำกัดบางประการ เนื่องจากแสงที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการสังเคราะห์แสงในที่นี้มาจากแสงอาทิตย์ ทำให้ไม่สามารถวัดความเข้มแสงเป็นค่าเดียวๆ ได้ เพราะโลกที่หมุนรอบดวงอาทิตย์ทำให้เมื่อเวลาในแต่ละวินาทีที่ผ่านไป แสงที่ส่องผ่านในแต่ละตำแหน่งที่ทำการบ่มเซลล์มีความเข้มแสงที่เปลี่ยนแปลงตามไปด้วย จึงต้องวัดความเข้มแสงเป็นช่วงของความเข้มแสง และบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงเท่านั้น ผลการทดลองเป็นไปดังแสดงในภาคผนวก ฉ-3 พบว่าสาหร่ายสีเขียวเริ่มเกิดการอิมตัวของแสงหรือการยับยั้งของแสง ในช่วง 2,000-3,000 ลักซ์ขึ้นไป

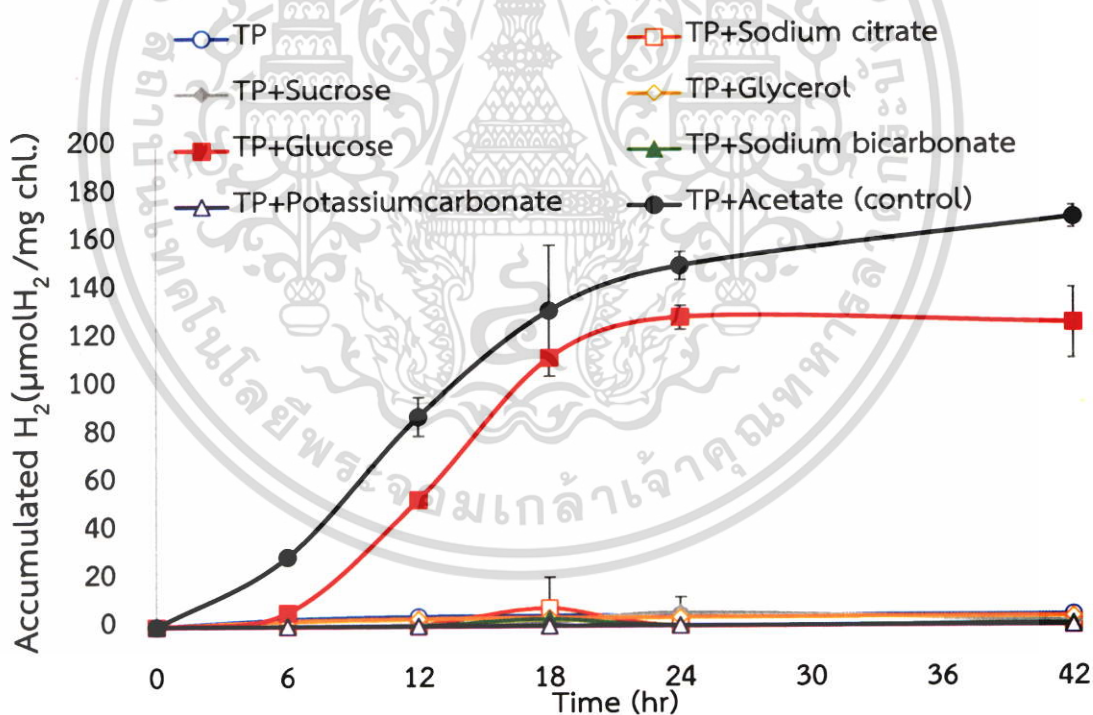
จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าความเข้มแสงที่เหมาะสมส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการปริมาณแสงที่แตกต่างกัน ดังนั้นสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 สามารถเพิ่มปริมาณไฮโดรเจนสะสมได้เมื่อบ่มที่ความเข้มแสงที่ 3,800 ลักซ์

อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันพบว่าปัญหาหลักของสาหร่ายสีเขียวที่มีผลอย่างมากในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน คือ เอนไซม์ไฮโดรจีเนส [FeFe]-hydrogenase มีความว่องไวอย่างมากต่อก๊าซออกซิเจนหรือเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเมื่อมีก๊าซออกซิเจน ซึ่งเป็นการเกิดร่วมกันภายในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในสภาวะที่มีแสง (Rajesh *et al.*, 2017 ; Guan *et al.*, 2004 ; Ghirardi *et al.*, 2014) เอนไซม์ไฮโดรจีเนส [FeFe]-hydrogenase ที่ว่องไวต่อออกซิเจนนั้นมีความท้าทายในหลายแง่มุม เช่น การถอดรหัสของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase transcription) การเจริญเติบโตเต็มที่ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (maturation) และการผลิตออกซิเจนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำ (photocatalytic activity) ล้วนแล้วแต่เป็นจุดอ่อนอย่างมากต่อการถูกยับยั้งโดยโมเลกุลออกซิเจน (Cohen *et al.*, 2017) ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว พบว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียมีความว่องไวต่อออกซิเจนมากกว่าสาหร่ายสีเขียว (Cohen *et al.*, 2017) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวในแต่ละสายพันธุ์มีความทนต่อออกซิเจนไม่เท่ากัน (Liu *et al.*, 2016)

#### 4.4.3 ผลการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลวที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

หลังจากที่ทราบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุด เมื่อสารแขวนลอยเซลล์มีความขุ่น คือ 0.1 ภายใต้สภาวะที่ไล่อากาศออกโดยการพ่นก๊าซอาร์กอน และบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า ภายใต้ความเข้มแสงที่ 3,800 ลักซ์ ต่อไปผู้วิจัยได้ทำการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยทำการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ในอาหารเหลว TAP จนเซลล์มีอายุ 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้เป็น 0.1 ทำการถ่ายโอนสารแขวนลอยเซลล์ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรแตกต่างกัน โดยการแปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว คือ อาหารเหลว TAP ที่ปราศจากอะซิเตต (TP) อาหารเหลวเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอล (TP+Glycerol) อาหารเหลว TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส (TP+Sucrose) อาหารเหลว TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส (TP+Glucose) อาหารเหลว TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นไตรโซเดียมซิเตรต (TP+Trisodiumcitrate) อาหารเหลว TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโซเดียมไบคาร์บอเนต (TP+Sodium bicarbonate) และอาหารเหลว TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโพแทสเซียมคาร์บอเนต (TP+Potassium carbonate) โดยมีอาหารเหลว TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกรดอะซิติก (TP+acetic acid, TAP) เป็นตัวเปรียบเทียบ (ภาคผนวก ก แสดงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) โดยให้มีจำนวนโมลของคาร์บอนอะตอมเท่ากัน คือเท่ากับ 35 มิลลิโมลอะตอมคาร์บอนต่อลิตร เนื่องจากคาร์บอนเป็นธาตุที่เป็นอาหารหลักที่มีความจำเป็นอย่างมากต่อการเจริญเติบโตและวิวัฒนาการของเซลล์ต่างๆ ของเซลล์สาหร่าย โดยที่สาหร่ายสามารถนำคาร์บอนไปใช้ได้ 2 ประเภท ประเภทแรก คือ คาร์บอนในรูปอนินทรีย์ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เกลือคาร์บอเนต และเกลือไบคาร์บอเนต ประเภทที่สอง คือ คาร์บอนในรูปสารอินทรีย์ เช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ และอะซิเตท โดยในสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการไฮโดรคาร์บอนแตกต่างกันไป (ลัดดา, 2543) จากนั้นทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD ทุกๆ 6 ชั่วโมง



รูปที่ 4.18 ผลของการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากผลการทดลองรูปที่ 4.18 เกิดจากการทำการทดลองแบบเดิมซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ล้วนแล้วแต่ให้ผลที่สอดคล้องกัน พบว่า ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59 เมื่ออยู่ในอาหารเหลวที่แปรผันแหล่งคาร์บอนได้ เนื่องจากสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

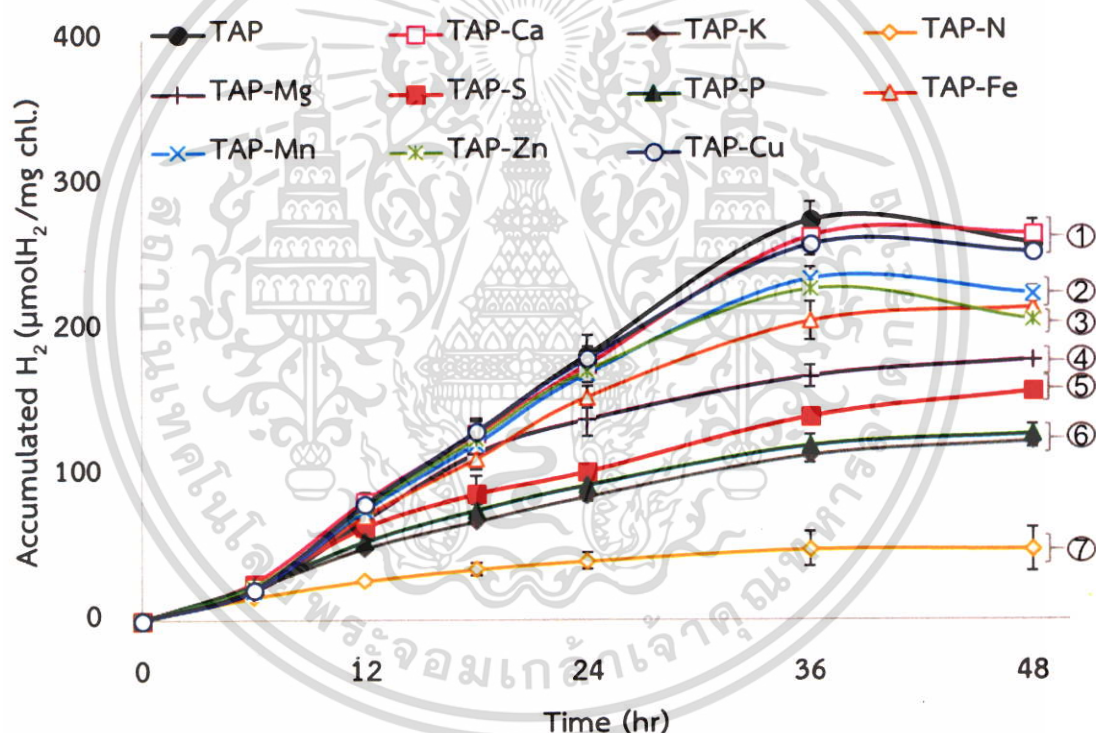
สีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เมื่ออยู่ในอาหารเหลว TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกรดอะซิติก (TP+acetic acid, TAP) และอาหารเหลว TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส (TP+Glucose) เท่านั้น ในช่วง 18 ชั่วโมงแรกเซลล์สาหร่ายจะเพิ่มความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนอย่างรวดเร็วและจะเริ่มคงที่หลังจาก 24 ชั่วโมง โดยที่แหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว TP ที่เติมกรดอะซิติก (อาหารเหลว TAP ปกติ) เซลล์มีปริมาณสะสมไฮโดรเจนสะสมสูงที่สุด คิดเป็น 149.671 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่อยู่ในอาหารเหลว TP ที่เติมกลูโคส เซลล์จะมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมน้อยกว่า คิดเป็น 128.216 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ อย่างไรก็ตามสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ไม่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ เมื่ออยู่ในอาหารเหลว TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่ทำการแปรผันชนิดอื่นๆ อาจเกิดจากโครงสร้างของสารและความมีขี้ของสารแต่ละชนิด ส่งผลให้สารแต่ละชนิดมีความสามารถในการนำเข้าสู่เซลล์ (uptake) ได้ไม่เท่ากัน โดยที่กรดอะซิติกมีคาร์บอน 2 อะตอมเป็นองค์ประกอบซึ่งมีโครงสร้างที่เล็กและมีความกะทัดรัดน้อยกว่า ทำให้มีการนำเข้าสู่เซลล์ของสาหร่ายสีเขียวได้ง่ายกว่าสารที่มีโครงสร้างใหญ่ซึ่งมีความกะทัดรัดมากกว่า เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ (คาร์บอน 6 และ 12 อะตอม ตามลำดับ) หลังจากนั้นสารเหล่านี้จะถูกสลายให้พลังงานออกมา และได้ NADH หรือ NADPH ผ่านกระบวนการแคแทบอลิซึม (Catabolism) ซึ่ง NADH หรือ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่สามารถเป็นรีดิวซ์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เมื่อเซลล์มีโปรตอนและอิเล็กตรอนมากเกินไปจะก่อให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Rattana *et al.*, 2010) นอกจากนี้มีความเป็นไปได้ว่าอิเล็กตรอนที่ได้ในรูป NADPH จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่านำมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจน ส่งผลให้เซลล์สาหร่ายที่อยู่ในอาหารเหลว TP ที่เติมแหล่งอิเล็กตรอนตัวอื่นๆนอกเหนือจากกรดอะซิติกและกลูโคสไม่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้

นอกจากนี้ยังพบว่า อะซิเตตเป็นสารที่จำเป็นต่อการยับยั้งการทำงานในระบอบแสงที่ 2 (PS II) ส่งผลให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากขึ้น และมีส่วนช่วยในการสะสมแก๊สภายในเซลล์ (Gibbs *et al.*, 1986 ; Ball *et al.*, 1990) ดังนั้นอาหารเหลวที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 คือ อาหารเหลว TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกรดอะซิติก (TP+acetic acid, TAP)

#### 4.4.4 ผลการศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของเซลล์ที่มีต่อก๊าซไฮโดรเจน

จากผลการทดลองก่อนหน้าที่ ทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 โดยบ่มสารแขวนลอยเซลล์ที่มีค่าความขุ่นของเซลล์ คือ 0.1 ฟันก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศออก หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าภายใต้ความเข้มแสงที่ 3,800 ลักซ์ ในส่วนถัดมาผู้วิจัยได้ทำการศึกษาอิทธิพลของการขาดธาตุอาหารของเซลล์ที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยทำการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเหลว TAP เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์จนเซลล์มีอายุ 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้เหมาะสม ทำการถ่ายโอนสารแขวนลอยเซลล์ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรแตกต่างกัน โดยการแปรผันชนิดของอาหารที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ ในอาหารสูตร TAP คือ อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุแคลเซียม (TAP-Ca) อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N) อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุแมกนีเซียม (TAP-Mg) อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ (TAP-S) อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P) อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุเหล็ก (TAP-Fe) อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุแมงกานีส (TAP-Mn) อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุสังกะสี (TAP-Zn) อาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุคอปเปอร์ (TAP-Cu) และอาหารเหลว TAP เป็นตัวเปรียบเทียบ (ภาคผนวก ก แสดงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ) นำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสม หลังจากนั้นวัดก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการบ่มทุกๆ 6 ชั่วโมง



รูปที่ 4.19 ผลของการแปรผันชนิดของอาหารที่ขาดธาตุอาหารของเซลล์ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

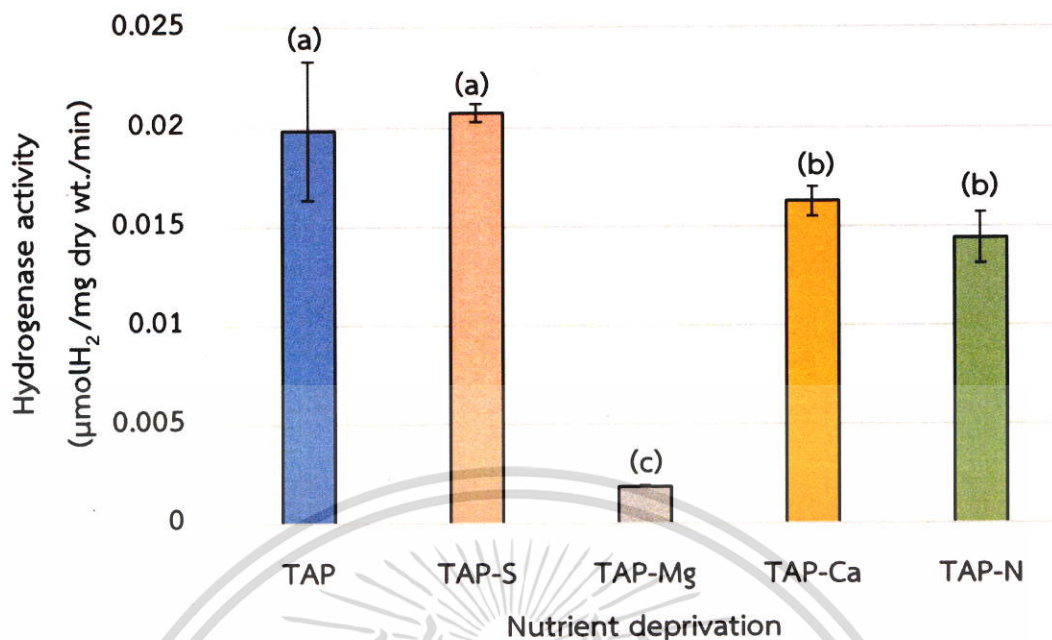
ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.19 ซึ่งเกิดจากการทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 เมื่อนำไปบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันชนิดของอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เนื่องจาก เซลล์ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่บ่มในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมน้อยกว่าหรือเท่ากับอาหารเหลว TAP ปกติทุกชนิด โดยสามารถแบ่งปริมาณไฮโดรเจนสะสมในเซลล์สาหร่ายได้เป็น 7 กลุ่มอาหาร คือ กลุ่มที่ 1 มีอัตราการผลิตก๊าซเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนเทียบเท่า TAP ได้แก่ อาหาร TAP-Ca และอาหาร TAP-Cu กลุ่มที่ 2 ได้แก่ อาหาร TAP-Mn และอาหาร TAP-Zn กลุ่มที่ 3 ได้แก่ อาหาร TAP-Fe กลุ่มที่ 4 ได้แก่ อาหาร TAP-Mg กลุ่มที่ 5 ได้แก่ อาหาร TAP-S กลุ่มที่ 6 ได้แก่ อาหาร TAP-P และอาหาร TAP-K และกลุ่มที่ 7 ได้แก่ อาหาร TAP-N เท่านั้น ในช่วง 36 ชั่วโมงแรกเซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและค่อยๆ คงที่เมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ 4, 5 และ 6 เซลล์สาหร่ายจะมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เพียง 24 ชั่วโมงแรก และค่อยๆ คงที่เมื่อเวลาผ่านไป ในส่วนของกลุ่มที่ 7 เซลล์สาหร่ายที่บ่มใน TAP-N มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้น้อยที่สุด โดยเซลล์ที่อยู่ในอาหาร TAP ปกติ อาหาร TAP-Ca, และอาหาร TAP-Cu จะให้ปริมาณมาดไฮโดรเจนสะสมที่มากที่สุด คือ 275.208, 263.843 และ 258.614 ไมโครโมล ไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ค่านี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยกลุ่มอาหารที่ 2 ถึง 7 มีปริมาณไฮโดรเจนสะสมในช่วง 84.624, 74.771, 60.829, 50.909, 42.538 และ 17.643 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเทียบกับอาหารเหลว TAP 100 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59 มีการตอบสนองต่อการขาดธาตุอาหารไม่เหมือนกับสาหร่ายชนิดอื่น อาทิเช่น สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ในอาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ (Laurinavichene *et al.*, 2006 ; Kosourov *et al.*, 2007 ; Kosourov *et al.*, 2009 ; Tsygankov *et al.*, 2006) พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนได้ เนื่องจาก ซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนซิสเทอีนและเมไทโอนีน โดยกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นองค์ประกอบสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน (Protein biosynthesis) และซ่อมแซมโปรตีน (Protein repair cycle) ซึ่งโปรตีน D1 เป็นโปรตีนที่อยู่ในระบบแสงที่ 2 (PS II) เป็นศูนย์กลางในการทำงาน (reaction center) (Melis *et al.*, 2002) หากไม่มีซัลเฟอร์จะส่งผลให้ระบบสังเคราะห์แสงที่ 2 ทำงานได้น้อยลงเนื่องจากโปรตีน D1 ไม่ทำงาน ก่อให้เกิดการยับยั้งการเกิดออกซิเจนและอิเล็กตรอนจากการออกซิเจนชั้นของน้ำ เมื่อออกซิเจนเกิดได้น้อยลงส่งผลให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานได้ดีขึ้น (Ghirardi *et al.*, 2000) จึงผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ในอาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุอาหารโพแทสเซียม สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนได้ อันเนื่องมาจากโพแทสเซียมบางส่วนสามารถแทนที่โซเดียมในกระบวนการหลักทางชีวเคมี ส่งผลให้ระบบยังคงทำงานได้เมื่อขาดโซเดียม อย่างไรก็ตามเซลล์ที่ขาดธาตุโพแทสเซียมไม่มีความสามารถในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นแป้งเนื่องจากโซเดียมไม่สามารถแทนที่โพแทสเซียมได้ นำไปสู่การไหลของอิเล็กตรอนที่เพิ่มขึ้นในระบบแสงที่ 2 ที่เป็นอิสระเนื่องจากการขาดโพแทสเซียมจะไปเร่งการสลายแป้งในภายในเซลล์ ซึ่งอิเล็กตรอนส่วนเกินที่มาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคสถูกส่งผ่านไปยังแหล่งรวมของพลาสโตควิโนโนน (plastoquinone-pool) จึงเกิดการกระตุ้นมากขึ้นในระบบแสงที่ 1 ด้วยเหตุนี้เองจึงส่งผลให้ผลผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น ภายใต้กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้ระบบแสงที่ 2 ยังถูกยับยั้งส่งผลให้มีออกซิเจนน้อยลง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงทำงานได้ดีขึ้น (Papazi *et al.*, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีความเป็นไปได้ว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 อาจเกิดความอึดตัวของแสง จากการบ่มภายใต้ความเข้มแสงที่สูงถึง 3,800 ลักซ์ เนื่องจากข้อบ่งชี้ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 อาจมาจากระบบการสังเคราะห์แสงทางตรง ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบแสงที่ 2 (PS II) และระบบแสงที่ 1 (PSI) ส่งผลให้เมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายในสภาวะที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณไฮโดรเจนสะสมได้

ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว แบ่งได้ 3 อย่าง คือ ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase activity) ปริมาณของข้อบ่งชี้และปริมาณออกซิเจน โดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีกิจกรรมในการทำงานมาก เซลล์สาหร่ายควรจะผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มาก อย่างไรก็ตามปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ยังขึ้นกับปริมาณข้อบ่งชี้ ได้แก่ อิเล็กตรอนและโปรตอนภายในเซลล์ นอกจากนี้ปริมาณออกซิเจนยังส่งผลต่อผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนอีกด้วย เนื่องจากโมเลกุลของออกซิเจนจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังนั้น ระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 จะเป็นตัวควบคุมปริมาณของอิเล็กตรอน โปรตอน และออกซิเจน กล่าวคือ ถ้าระบบแสงที่ 2 ทำงานได้ดี ส่งผลให้มีอิเล็กตรอนและโปรตอนซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมาก อย่างไรก็ตามปริมาณออกซิเจนที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสก็จะมากตามไปด้วย ในทางกลับกัน ถ้าระบบแสงที่ 2 ทำงานได้น้อย ปริมาณอิเล็กตรอนก็จะน้อย แต่ออกซิเจนที่เป็นตัวยับยั้งการผลิตก๊าซไฮโดรเจนก็จะลดลงตามไปด้วย ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคัดเลือกกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของเซลล์สาหร่ายในสภาวะที่ขาดธาตุอาหารที่แตกต่างกัน (อาหารเหลว TAP ปกติ อาหารเหลว TAP-S อาหารเหลว TAP-Ca อาหารเหลว TAP-Mg และอาหารเหลว TAP-N) โดยทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ วัดค่าความขุ่นของเซลล์ให้เท่ากับ 0.5 ถ่ายโอนเซลล์ลงในอาหารเหลว TAP ที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ (TAP-S, TAP-Ca, TAP-Mg และ TAP-N) และอาหารเหลว TAP ปกติ แล้วนำเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจน จากนั้นนำเซลล์ภายใต้สภาวะที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ ทำการพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศออก เติมเมทิลไวโอลีน ไทรทอล เอ็กซ์ 100 และไดไทโอไธด์ที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน มาบ่มในที่มืดโดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 15 นาที ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.20 จะเห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของเซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหารเหลว TAP-Ca ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเซลล์ที่บ่มใน TAP-N แต่เมื่อเซลล์ถูกบ่มในอาหารเหลว TAP-Mg จะพบการทำงานของเอนไซม์ที่น้อยที่สุด โดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 จะมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่มากที่สุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหารเหลว TAP ปกติ และ TAP-S ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.20 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสภาวะขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ (ซัลเฟอร์ แมกนีเซียม แคลเซียม และไนโตรเจน) ในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p$ -value < 0.05))

ผลของการติดตามกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 เมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดธาตุอาหารไม่สอดคล้องกับปริมาณไฮโดรเจนสะสมในรูปที่ 4.19 ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก เซลล์สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์นี้ไม่ตอบสนองต่อการบ่มในสภาวะที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ ส่งผลให้ปริมาณไฮโดรเจนที่ได้ไม่มากนัก แม้จะพบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของเซลล์ที่บ่มในอาหารเหลว TAP-S ที่สูงเท่ากับที่บ่มในอาหารเหลว TAP ก็ตาม แต่ข้อสังเกตที่เอนไซม์อาจมีปริมาณน้อย อาจเป็นผลมาจากข้อบกพร่องส่วนใหญ่ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 หรือก็คืออิเล็กตรอนและโปรตอนส่วนใหญ่นั้นมาจากการเกิดออกซิเดชันของน้ำในระบบแสงที่ 2 (PS II) ทำให้ระบบแสงที่ 2 ของเซลล์ที่อยู่ในสภาวะที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ถูกยับยั้งเนื่องจากขาดโปรตีน D1 ส่งผลให้มีอิเล็กตรอนไปป้อนเอนไซม์ไฮโดรจีเนสน้อย อิเล็กตรอนที่ได้จึงน้อยกว่าเซลล์สาหร่ายที่อยู่ในอาหารเหลว TAP ปกติที่ระบบแสงที่ 2 ภายในเซลล์ทำงานได้เต็มที่ นอกจากนี้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสของเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 อาจทนต่อออกซิเจนได้ในระดับหนึ่ง ส่งผลให้แม้จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำในระบบ PS II และได้ออกซิเจนออกมา แต่มีข้อสังเกตปริมาณมากส่งต่อไปยังเอนไซม์และเอนไซม์สามารถทำงานได้จึงเกิดผลิตภัณฑ์ไฮโดรเจนขึ้น

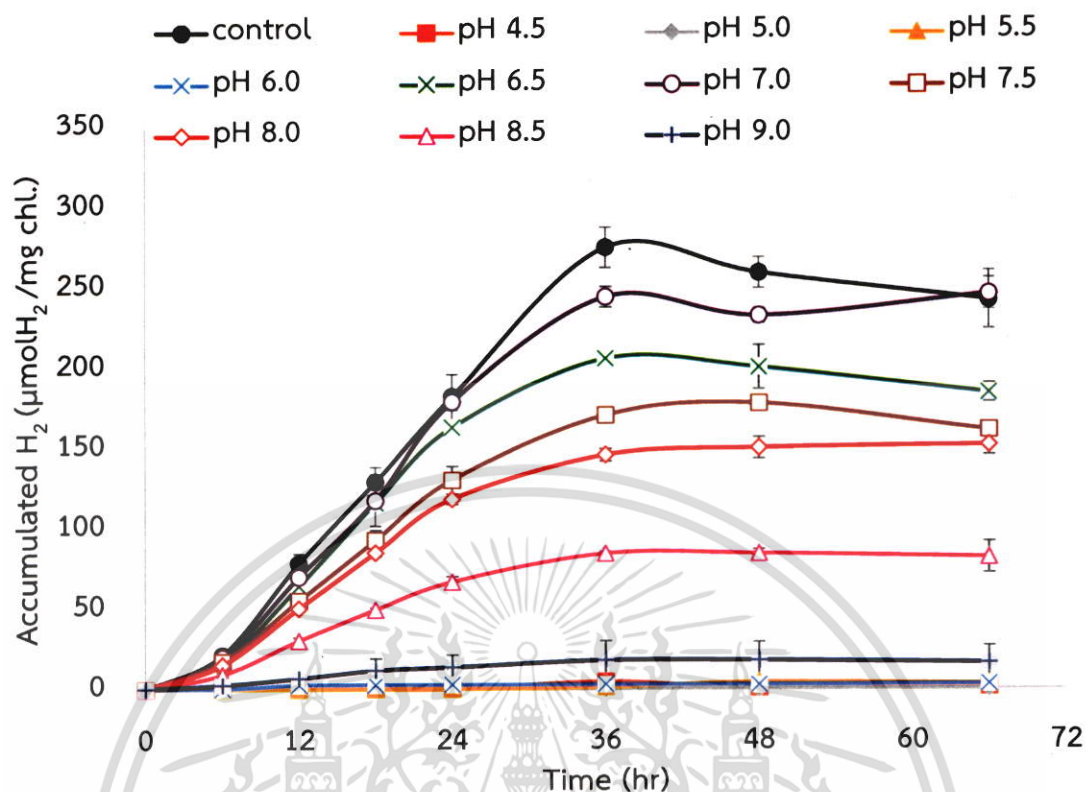
แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยส่วนใหญ่ (Scoma and Hemschemeier, 2017 ; Laurinavichene *et al.*, 2006 ; Kosourov *et al.*, 2007 ; Kosourov *et al.*, 2009 ; Tsygankov *et al.*, 2006) พบว่า เมื่อเซลล์ของสาหร่ายถูกบ่มในอาหารที่ขาดธาตุซัลเฟอร์จะส่งผลต่อระบบการเอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับว่าดีเกินไปประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์แสงที่ 2 ทำให้ออกซิเจนบางส่วนถูกยับยั้งไป (Melis *et al.*, 2002 ; Melis *et al.*, 2007) เนื่องจากในระบบสังเคราะห์แสงที่ 2 มีโปรตีนสำคัญที่สำคัญคือ โปรตีน D1 ที่เป็นศูนย์กลางในการควบคุมการทำงานโดยโปรตีนชนิดนี้จะมีการสลายตัวที่สั้น คือ จะเสียสภาพและถูกสร้างขึ้นใหม่ตลอดเวลา ซึ่งในการซ่อมแซมหรือสังเคราะห์โปรตีน D1 นั้นจำเป็นต้องใช้ซิลิเฟอร์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดอะมิโนซิสเทอีนและเมไทโอนีน ดังนั้น เมื่อเซลล์ขาดธาตุซิลิเฟอร์จึงไม่สามารถสังเคราะห์หรือซ่อมแซมโปรตีน D1 ได้ (Melis *et al.*, 2002 ; Melis *et al.*, 2007) ส่งผลให้ระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 ไม่สามารถทำงานได้ เป็นผลให้เซลล์มีอัตราการผลิตออกซิเจนน้อยกว่าอัตราการใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจ (cellular respiration) (Tsygankov *et al.*, 2006)

#### 4.4.5 ผลการศึกษาอิทธิพลของค่า pH เริ่มต้นที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* KLSc59 ต่อมาผู้วิจัยได้ทำการศึกษาอิทธิพลของค่า pH โดยเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวด้วยอาหารเหลว TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายโอนเซลล์สาหร่ายลงในอาหาร TAP ที่แปรผันค่า pH เริ่มต้นตั้งแต่ 5.0 จนถึง 9.0 และปรับค่าความเข้มข้นเซลล์ให้มีความเท่ากับ 0.1 นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่มีความเข้มแสงที่เหมาะสม คือ 3,800 ลักซ์ และวัดความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD

ผลการทดลองในรูปแบบที่ 4.21 เป็นการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ซึ่งให้ผลการทดลองที่คล้ายกัน พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* KLSc59 มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ปริมาณมากเมื่อถูกบ่มในอาหาร TAP ที่มีค่า pH เริ่มต้นในช่วง 7.0-7.2 โดยมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 36 ชั่วโมงแรก จากนั้นอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนค่อยๆ คงที่ อย่างไรก็ตาม เมื่อเซลล์สาหร่ายอยู่ในอาหารเหลว TAP ที่มีค่า pH เริ่มต้นอยู่ในสภาวะกรดอ่อน (pH 6.5) เซลล์จะเริ่มสูญเสียความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนไปบางส่วน และสูญเสียความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนไปทั้งหมดเมื่อเซลล์อยู่ในอาหารเหลว TAP ที่มีค่า pH เริ่มต้นต่ำกว่า 6.0 ในทางกลับกันเมื่อเซลล์เริ่มอยู่ในสภาวะเบส สาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* KLSc59 เริ่มสูญเสียความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเมื่อถูกบ่มในอาหารเหลว TAP ที่มีค่า pH เริ่มต้นสูงกว่า 7.5



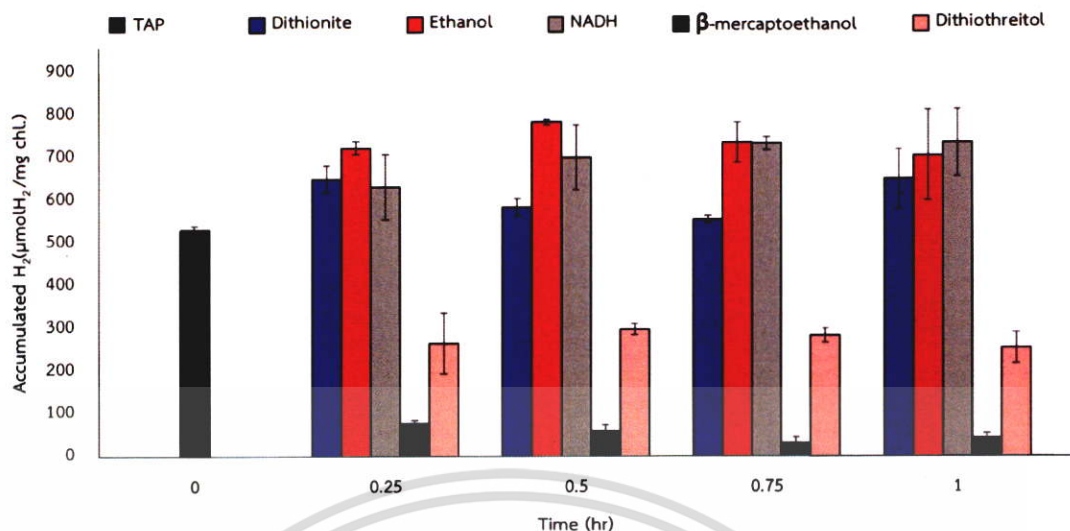
รูปที่ 4.21 ผลของการแปรผันค่า pH เริ่มต้นในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการแปรผันค่า pH เริ่มต้นตั้งแต่ 5.0 ถึง 9.0

เนื่องจากการแปรผันค่า pH เริ่มต้นในอาหารเหลว TAP ในรูปที่ 4.21 นั้นมีช่วงการแปรผันค่า pH เริ่มต้นที่กว้าง ทำให้ทราบผลของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59 ที่มีต่ออิทธิพลของค่า pH เริ่มต้นในอาหารเหลว TAP ในช่วงที่กว้าง กล่าวคือ ตั้งแต่ช่วงที่มีความเป็นกรดอ่อน (pH 4.0) จนถึงช่วงที่มีความเป็นเบสอ่อน (pH 9.0) ซึ่งค่า pH ที่มีความเป็นกรดจะมีความสามารถในการนำสารอาหารเข้าเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปหรือก่อให้เกิดความเป็นพิษของโลหะ (metal toxicity) เนื่องจากในช่วงที่ pH มีความเป็นกรดจะส่งผลให้สารประกอบโลหะบางชนิดเกิดการสลายตัวกลายเป็นไอออนของโลหะและสารละลายซัลเฟต (Sunda *et al.*, 1975) และยิ่งไปรบกวนการทำงานของเซลล์อีกด้วย ขณะที่ค่า pH ที่มีความเป็นเบสนั้นจะลดความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์และวัฏจักรของเซลล์เกิดได้ช้าลงเนื่องจาก pH ที่มีความเป็นเบสจะเพิ่มความยืดหยุ่นของผนังเซลล์ในเซลล์แม่ (mother cells) ซึ่งไปขัดขวางการแบ่งเซลล์ (Chia. *et al.*, 2017) ดังนั้น เพื่อยืนยันผลการทดลองในรูปที่ 4.21 ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาอิทธิพลของค่า pH ในอาหารเหลว TAP เพิ่มเติม โดยทำการแปรผันค่า pH เริ่มต้นในช่วงที่แคบลง คือ 7.0 ถึง 7.5 บ่มเซลล์ในสภาวะเดียวกันกับผลการทดลองในรูปที่ 4.21

จากรูปในภาคผนวกที่ ฉ-9 พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ยังคงมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากที่สุดเมื่อทำการบ่มเซลล์ด้วยอาหารเหลว TAP ที่มีค่า pH เริ่มต้นตั้งแต่ 7.0 ถึง 7.2 ดังนั้นค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 7.2 โดยที่สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีค่า pH ที่เหมาะสมแตกต่างกันขึ้นกับหลายปัจจัย อาทิเช่นสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. มีค่า pH ที่เหมาะสมคือ 6.3 (Schnackenberg *et al.*, 1993), สาหร่ายสีเขียว *Tetraselmis subcordiformis* มีค่า pH ที่เหมาะสมคือ 7.5 เช่นเดียวกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorococum littirale* (Bhosale *et al.*, 2009 ; Uneo *et al.*, 1999) ซึ่งอิทธิพลของค่า pH ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญไม่เพียงแต่เป็นส่วนหนึ่งในองค์ประกอบของสาหร่าย แต่ยังรวมถึงอายุขัยของสาหร่ายอีกด้วย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงค่า pH เพียงเล็กน้อยอาจส่งผลกระทบต่อระบบต่างๆ ทั้งระบบภายในเซลล์ของสาหร่ายเช่นกัน อาทิเช่น เซลล์สาหร่ายอาจถูกจำกัดการเจริญเติบโตเนื่องจากเกิดการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic) (Juneja. *et al.*, 2013)

#### 4.4.6 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ต่อมาผู้วิจัยได้ทำการศึกษาอิทธิพลของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในอาหารเหลว TAP และบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองที่ได้ก่อนหน้านี้ โดยเลี้ยงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ในอาหารเหลว TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ จากนั้นถ่ายโอนสารแขวนลอยเซลล์ลงในอาหารเหลว TAP ปกติและอาหารเหลว TAP ที่มีการเติมสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ คือ เอทานอล (Ethanol) ไดไทโอไทรโทล (Dithiothreitol) ไดไทโอไนต์ (Dithionite) เบต้า-เมอแคปโทเอทานอล ( $\beta$ -mercaptoethanol) นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ (NADH) โดยแปรผันความเข้มข้นของสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแต่ละชนิด ในช่วง 0.25-1 มิลลิโมลาร์ ปรับค่าความเข้มข้นเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 จากนั้นใส่อากาศออกโดยการพ่นก๊าซอาร์กอน นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า ที่ความเข้มข้นแสง 3,800 ลักซ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD



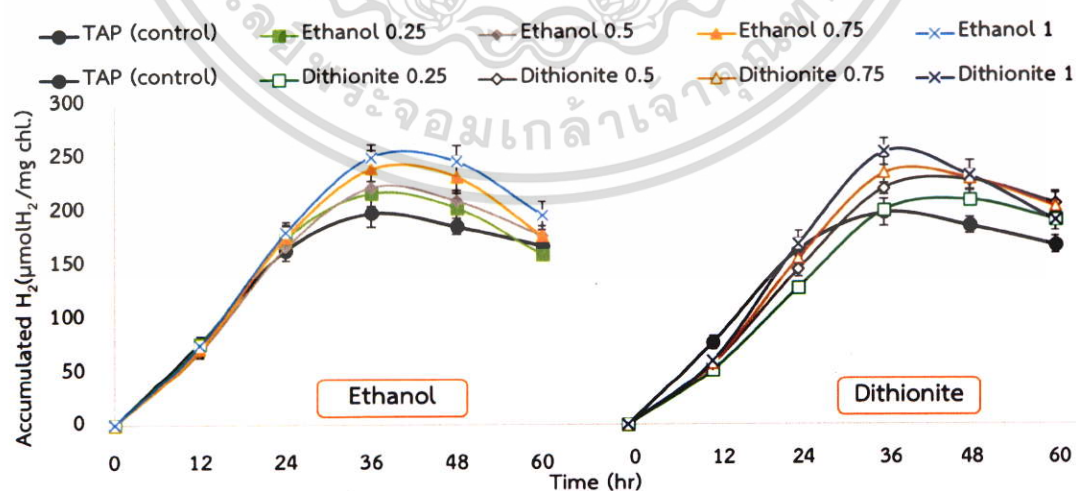
รูปที่ 4.22 ผลของการแปรผันสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ ในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.22 เกิดจากการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59 ที่บ่มในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมในเซลล์สาหร่ายแตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เซลล์สาหร่ายมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงกว่าเซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหารเหลว TAP ได้แก่ เซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหารเหลว TAP ที่เติม เอทานอล (Ethanol) ไดไทโอไนท์ (Dithionite) นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ (NADH) ซึ่งมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมเพิ่มขึ้นประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่บ่มในอาหารเหลว TAP ที่ 0 มิลลิโมลาร์และกลุ่มที่เซลล์สาหร่ายมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมน้อยกว่าเซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหารเหลว TAP ได้แก่ เซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหารเหลว TAP ที่เติม ไดไทโอทริทอล (Dithiothreitol) และเบต้า-เมอแคปโทเอทานอล ( $\beta$ -mercaptoethanol) มีปริมาณการสะสมก๊าซไฮโดรเจนลดลงถึง 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหารเหลว TAP แสดงว่า ไดไทโอทริทอลและเบต้า-เมอแคปโทเอทานอลไม่มีความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59

เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสนั้นเกี่ยวเนื่องกับความสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox balancing) กระบวนการทางชีวเคมีที่ช่วยให้สิ่งมีชีวิตรับมือกับโมเลกุลที่โดนทำลายโดยแสงอาทิตย์ (Photoprotection) และกระบวนการหมักทางเมตาบอลิซึม (Fermentative metabolism) ภายในสิ่งมีชีวิต ดังนั้นสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนถือว่าเป็นแหล่งอิเล็กตรอนที่เหมาะสมต่อตัวรับอิเล็กตรอนใดๆ (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2011) นอกจากนี้งานวิจัยของ Kruse and Hankamer (2010) ยังกล่าวถึงการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ทำหน้าที่เป็นแอ่งอิเล็กตรอน (electrom sink) ของปฏิกิริยารีดอกซ์ต่างๆ ในเซลล์ อย่างไรก็ตาม สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเป็นเอกสารที่ส่งวันไวสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาด้านนี้ เมื่อนักวิทยาศาสตร์ไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษา ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิเล็กตรอนบางชนิดไม่สามารถเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่ดีได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Maneeruttanarungroj. *et al.* (2011) และ Rattana. *et al.* (2010) ที่พบว่าเมื่อเติมสารให้อิเล็กตรอนเบต้าเมอแคปโทเอทานอลความเข้มข้นในช่วง 0.25-1.25 มิลลิโมลาร์และความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora sp.* CU2551 และ สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus sp.* KMITL-O1 ตามลำดับ ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับอาหารเหลว TAP ปกติ ในทางกลับกันเมื่อเติมสารที่ให้อิเล็กตรอนไดไทโอทรินอลความเข้มข้นในช่วง 0.25-1.25 มิลลิโมลาร์ในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora sp.* CU2551 และเติมสารให้อิเล็กตรอนไดไทโอไนท์และเมทิลไวโอลเจนความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus sp.* KMITL-O1 ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลงเมื่อเทียบกับอาหารเหลว TAP ปกติ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสารแต่ละชนิดมีโครงสร้างและสภาพขั้วที่แตกต่างกันทำให้สารบางชนิดสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้โดยซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์หรือแพร่ผ่านช่องของเซลล์ได้ และสารบางชนิดไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ อย่างไรก็ตามสารที่ให้อิเล็กตรอนบางชนิดที่เข้าสู่เซลล์ไม่ได้แต่อาจมีกลไกบางอย่างที่สามารถส่งอิเล็กตรอนเข้าสู่ภายในเซลล์ได้

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจสารในกลุ่มที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ เอทานอล (Ethanol) ไดไทโอไนท์ (Dithionite) และนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ (NADH) แต่เนื่องจาก NADH มีราคาสูง ไม่เหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม จึงนำเอทานอลและไดไทโอไนท์มาศึกษาต่อเท่านั้น เพื่อที่จะทราบเวลาที่ตีที่สุดในการบ่มเซลล์สาหร่ายให้มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมสูงที่สุด โดยบ่มเซลล์สาหร่ายที่มีค่าความขุ่นเซลล์ 0.1 ในอาหารเหลว TAP ที่เติมสารเอทานอล และไดไทโอไนท์โดยแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 0.25 ถึง 1 มิลลิโมลาร์ในตู้บ่มที่สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ได้ทุกๆ 12 ชั่วโมง

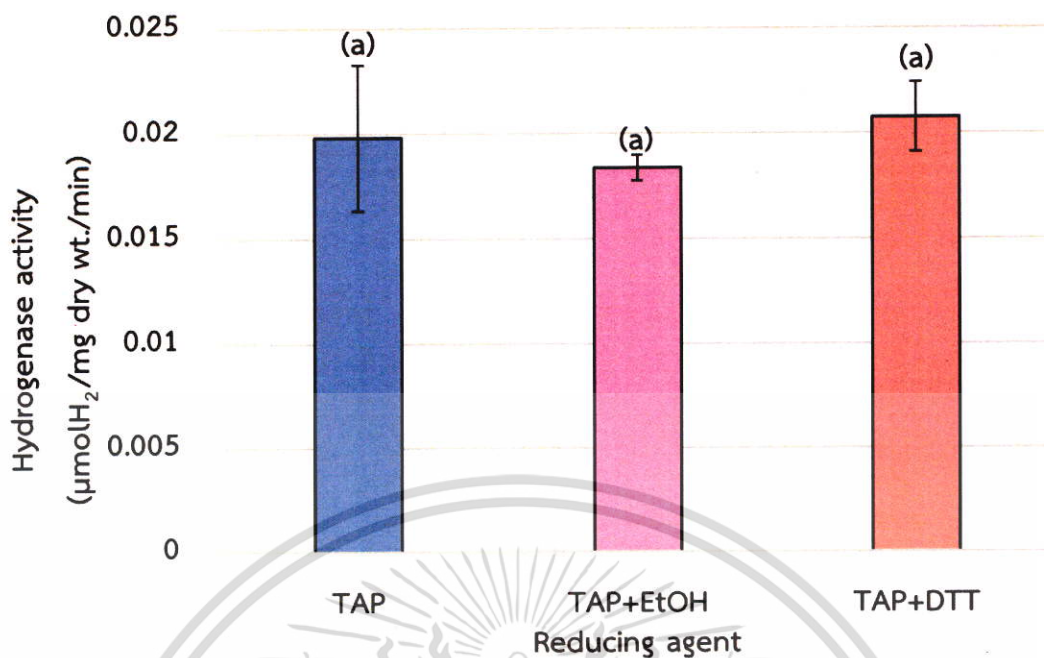


รูปที่ 4.23 ผลของการแปรผันสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ ในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.23 ทำให้ทราบระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด คือ 36 ชั่วโมงทั้งการเติมเอทานอลและไดโทโอไนท์ ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59 เมื่อเติมสารที่ให้อิเล็กตรอนทั้ง 2 ชนิด โดยเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ให้อิเล็กตรอน ส่งผลให้เซลล์สาหร่ายมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่สูงขึ้น ซึ่งในช่วงแรกเซลล์มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 36 จากนั้นเซลล์จะมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลง ดังนั้น สารที่ให้อิเล็กตรอน ได้แก่ เอทานอลสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนคิดเป็น 1.09, 1.21, 1.21 และ 1.26 เท่า ตามลำดับ ในส่วนของไดโทโอไนท์สามารถเพิ่มปริมาณไฮโดรเจนสะสมคิดเป็น 1.01, 1.11, 1.18 และ 1.28 เท่า ตามลำดับเมื่อเทียบกับอาหารเหลว TAP ปกติ ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59 เมื่อบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

จากที่กล่าวไปข้างต้น กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีอิเล็กตรอนจำนวนมากมีความเกี่ยวเนื่องกับปฏิกิริยารีดอกซ์ภายในเซลล์ นอกจากนี้ปัจจัยสำคัญของการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ยังขึ้นกับกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและซับสเตรทคืออิเล็กตรอนและโปรตอนดังที่ได้วิจารณ์ไว้ในหัวข้อ 4.4.4 แล้วนั้น ทำให้ผู้วิจัยได้ทำการติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่บ่มในอาหารเหลว TAP ที่เติมสารที่ให้อิเล็กตรอน คือ ไดโทอิทริทอลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์และเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ โดยทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ วัดค่าความขุ่นของเซลล์ให้เท่ากับ 0.5 ถ่ายโอนเซลล์ลงในอาหารเหลว TAP ที่เติมสารที่ให้อิเล็กตรอน (ไดโทอิทริทอล 1 มิลลิโมลาร์และเอทานอล 0.5 มิลลิโมลาร์) และอาหารเหลว TAP ปกติ แล้วนำเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจน จากนั้นนำเซลล์ภายใต้สภาวะที่เติมสารให้อิเล็กตรอนต่างๆ เติมเมทิลไวโอลีน ไทรทอล เอ็กซ์ 100 และไดโทโอไทด์ที่สภาวะใสอากาศ มาบ่มในที่มืดโดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 15 นาที ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.24 จะเห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของเซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหารเหลว TAP ปกติ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเซลล์ที่บ่มใน TAP ที่เติมเอทานอลและไดโทอิทริทอลเป็นตัวให้อิเล็กตรอน เพราะฉะนั้น การเติมสารให้อิเล็กตรอนในอาหารเหลว TAP ไม่ส่งผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59 ดังนั้น กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่สอดคล้องกับปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ได้ในรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.24 ผลของการเติมตัวให้อิเล็กตรอน (เอทานอล และไดไทโอทริทอล) ในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p$ -value < 0.05))

เนื่องจากปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ได้ เกิดจากปริมาณซับสเตรทและกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสตั้งที่ได้กล่าวไปก่อนหน้านี้ ดังนั้นเมื่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่า ปริมาณซับสเตรทมีผลโดยตรงกับการเกิดผลิตภัณฑ์ ซึ่งหมายความว่า เอทานอลเป็นสารที่ให้อิเล็กตรอนได้ดีและเซลล์สาหร่ายสามารถนำอิเล็กตรอนที่ได้จากเอทานอลเข้าสู่เซลล์ได้ และยังสามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณไฮโดรเจนสะสมอีกด้วย ในทางกลับกัน แม้ว่าไดไทโอทริทอลเป็นสารที่ให้อิเล็กตรอนได้ดีเช่นกันแต่เซลล์สาหร่ายไม่สามารถนำอิเล็กตรอนจากไดไทโอทริทอลมาใช้ในการเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนได้ นอกจากนี้มีความเป็นไปได้ว่าไดไทโอทริทอลอาจส่งผลกระทบต่อโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้ม ส่งผลให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมน้อยกว่าปริมาณไฮโดรเจนสะสมของเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

เมื่อทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ พบว่า สาหร่ายสีเขียว KS03 มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุดเมื่อบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่โล่อากาศ เนื่องจากในสภาวะที่มีอากาศหรือมีออกซิเจนสามารถยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว KS03 พบว่า เซลล์สาหร่ายมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม มีขนาดประมาณ  $5 \pm 0.5$  ไมโครเมตร เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และนำมาทำแผนภูมิต้นไม้ พบว่า สาหร่ายสีเขียว KS03 มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* มากที่สุด ถัดมา คือ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella sonokiniana* ดังนั้นควรจัดให้สาหร่ายสีเขียว KS03 อยู่ในจีนัสของ *Chlorella* และทำการตั้งชื่อใหม่ เรียกว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59

ไม่สามารถตามหาวิวัฒนาการของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ เนื่องจากไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

นำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 มาศึกษาในส่วนถัดไปโดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่าย โดยพบว่า ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น (initial  $OD_{750}$ ) ในขั้นการผลิตไฮโดรเจน (stage II) มีความสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากมีผลของการบดบังเซลล์มาเกี่ยวข้อง ดังนั้นที่ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ 0.1 มีความหนาแน่นของเซลล์น้อย ซึ่งสามารถเปลี่ยนค่าของความขุ่นของเซลล์เป็นความหนาแน่นของเซลล์ในหน่วยของมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ได้จากสมการเส้นตรง คือ  $y = 5.8584x$  โดยมีค่าเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัม-คลอโรฟิลล์ ซึ่งค่านี้เป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณไฮโดรเจนสะสม อีกทั้งการบ่มแบบเขย่ายังช่วยลดการเกิดการบดบังเซลล์อีกด้วย

สภาวะการบ่มเซลล์ที่มีค่าความขุ่นของเซลล์เป็น 0.1 โดยการบ่มแบบเขย่า ถูกนำมาใช้ศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสง พบว่าเมื่อความเข้มแสงมากขึ้นส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นแต่ถ้าความเข้มแสงมากไปส่งผลให้เกิดการอิมิตัวของแสง โดยสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 มีความเข้มแสงที่เหมาะสม คือ 3,800 ลักซ์

จากสภาวะที่เหมาะสมที่กล่าวไปข้างต้นถูกนำไปใช้ในการศึกษาแหล่งของคาร์บอนในอาหารเหลว TAP พบว่า ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ได้จากการแปรผันของแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการศึกษาการขาดธาตุอาหารในอาหารเหลว TAP พบว่า ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ได้จากการแปรผันการขาดธาตุอาหารในอาหารเหลว TAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนของการศึกษาค่า pH เริ่มต้นของอาหารเหลว TAP ที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการบ่มในสภาวะที่เหมาะสม พบว่า ในอาหารเหลว TAP ที่มีค่า pH เริ่มต้นในช่วง 7.0 ถึง 7.2 เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน นอกจากนี้เมื่อศึกษาสารที่ให้อิเล็กทรอนิกส์ พบว่าเมื่อเติมเอทานอล ไคโทไอน์ และนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ลงในอาหารเหลว TAP สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองของการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59 ให้ผลเป็นที่น่าพึงพอใจ ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ ดังนั้นในงานวิจัยเพิ่มเติมต่อจากนี้สามารถศึกษากิจกรรมของระบบแสงที่ 2 (PS II) และติดตามปริมาณของออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการบ่มของเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 ภายใต้สภาวะที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ เพื่อยืนยันว่าอิเล็กทรอนิกส์หลักที่ได้มาจากระบบแสงที่ 2

นอกจากนี้ ควรทำการศึกษาปริมาณเอทานอลที่ให้ปริมาณการสะสมไฮโดรเจนสูงสุด เพราะสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับเอทานอลได้ จากการเปลี่ยนเอทานอลให้เป็นไฮโดรเจน

ในส่วนของการตามหาวิวัฒนาการของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถศึกษาเพิ่มเติมในระดับโปรตีนหรือการทำพันธุวิศวกรรม

## บรรณานุกรม

- เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์. 2554. “การคัดกรองสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนและการปรับสภาพให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธนาภรณ์ มาศวรรณา. 2560. “การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอัลจินตเพื่อการผลิตไฮโดรเจน.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นิรนาม. 2560. “Pure Cultures.” [online]. Available:  
<http://vle.du.ac.in/mod/book/print.php?id=9251&chapterid=13560>
- นิสิต ต้นทิวเขษุ. 2553. “เทคโนโลยี ผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่สะอาดและยั่งยืน.” *Technology Energy*. 36: 59-62.
- ปัญญารักษ์ รุ่งนุรักษ์ ผด ไล่หัวขจรหัตถ์ และพชรพล พุกพิบูลย์. 2558. “การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำเสียโรงงานผลิตเอทานอลเพื่อการบำบัดน้ำเสียจากกากน้ำตาล.” โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิตสาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เมธี ศรีประพันธ์. 2561. *Polymerase chain Reaction (PCR) Technique*. [online]. Available : [http://www.mtc.or.th/pdf\\_que/pdf1\\_14.pdf](http://www.mtc.or.th/pdf_que/pdf1_14.pdf)
- รัชนิกร วันจันทร์. 2554. “ก๊าซไฮโดรเจน: ความคาดหวังเพื่อเป็นแหล่งพลังงานที่ยั่งยืน.” *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 16(1): 131-140
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2543. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. พิมพ์ครั้งที่ 3. (ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 1) กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 774-785.
- วัชรภรณ์ เสมาชัย วิจารณ์ ชูทอง และอดิสรณ์ รักษาศิริ. 2559. “การคัดแยกสาหร่ายในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเพื่อการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ.” โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิตสาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ศูนย์สารสนเทศข้อมูลพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2560. **สถานการณ์พลังงานของประเทศไทย**. กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน.
- ศูนย์สารสนเทศกรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2557. “**สารานุกรมพลังงานทดแทน**.” กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน.

- สร้อยญา พันธุ์พฤษ และ อรัญ อินเจริญศักดิ์. 2557. “การผลิตไบโไฮโดรเจนของสาหร่ายที่แยกได้จากนาข้าวของประเทศไทย.” คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สร้อยญา พันธุ์พฤษ. 2551. “การผลิตไบโไฮโดรเจนพลังงานทดแทนแหล่งใหม่จากสาหร่าย.” คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สร้อยญา พันธุ์พฤษ. 2549. “การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนรีเวอร์สซีเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *Aphanothece halophytica*.” คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สำนักวิจัยค้นคว้าพลังงาน. 2554. “คู่มือด้านความรู้ด้านพลังงานไฮโดรเจน.” กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน.
- Abeliovich, A. and Weisman, D. 1978. “Role of heterotrophic nutrition in growth of the alga *Scenedesmus obliquus* in high-rate oxidation ponds.” *Applied and Environmental Microbiology*. 35: 32-37.
- Allakhverdiev, S.I. Velmurugan, T. Vladimir, D.K. Sergey, K.K. Vyacheslav, V. Klimov, S.R. Dmitry, A.L. Mamoru, M. Hiroshi, N. and Robert, C. 2011. “Photosynthetic hydrogen production.” *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 11: 101-113.
- Baebprasert, W. Jantaro, S. Khetkorn, W. Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. 2011. “Increased H<sub>2</sub> production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 by redirecting the electron supply via genetic engineering of the nitrate assimilation pathway.” *Metabolic Engineering*. 13: 610-616.
- Ball, S.G. Dirick, L. Decq, A. Martiat, J.C. and Matagene, R.F. 1990. “Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*.” *Plant science*. 66 : 1-9.
- Batyrova, K. Gavrishera, A. Lvanova, E. Liu, J. and Tsygankov, A. 2015. “Sustainable hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived marine green microalgae *Chlorella* sp.” *International Journal of Molecular Sciences*. 16: 2705-2716.
- Batyrova, K.A., Tsygankov, A.A. and Kosourov S.N. 2012. “Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 37: 8834-8839
- Chia, S.R. Ong, H.C. Chew, K.W. Show, P.L. Phang, S.M. Ling, T.C. Nagarajan, D. Lee, D.J. Chang, J.S. 2017. “Sustainable approaches for algae utilisation in bioenergy production.” *Renewable Energy*. xxx: 1-15.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chien, L.F. Kuo, T.T. Liu, B.H. Lin, H.D. Feng, T.Y. Huang, C.C. 2012. "Solar-to-bioH<sub>2</sub> production enhanced by homologous overexpression of hydrogenase in green alga *Chlorella* sp. DT." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37: 17738-17748.
- Cohen, J. Kim, K. Posewitz, M. Ghirardi, M.L. Schulten, K. Seibert, M. and King, P. 2005. "Molecular dynamics and experimental investigation of H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> diffusion in [Fe]-hydrogenase" *Biochemical Society Transactions*. 33 (1) : 80-82.
- Dubini, A. 2011. "Green energy: Biofuel production from *Chlamydomonas reinhardtii*." *The Biochemical Society: Bioenergy*. 20-23.
- Eric, M. Richard, R. 2000. "Photoelectrochemical hydrogen production." 1:1-14. In **Proceeding the 2000 Hydrogen Program Review.**
- Gaffron, H. and Rubin, J. 1942. "Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae." *The Journal of General Physiology*. 26: 219-240.
- Ghirardi, M.L. Zhang, J.P. Lee, J.W., Flynn, T. Seibert, M. Greenbaum, E. and Melis, A. 2000. "Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>." *Trends Biotechnology*. 18(12) : 506-511.
- Gibbs, M. Gfeller, R.P. and Chen, C. 1986. "Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*.III: photoassimilation of acetate." *Plant Physiology*. 82 : 160-166.
- Gifthai Training Center, ผู้รวบรวม. 2561. ความรู้พื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์. [online]. Available : <http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/brdfiles/PCR%20กิบไทย.pdf>
- Guan, Y. Deng, M. Yu, X. and Zhang, W. 2004. "Two-stage photo-biological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis*." *Biochemical Engineering Journal*. 19: 69-73.
- Happe, T. Schütz, K. and Bohme, H. 2000. "Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413." *Journal of Bacteriology*. 182: 1624-1631.
- Juneja, A. Ceballos, R.M. Murthy, G.S. 2013. "Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review." *Energies*. 6 : 4607-4638.
- Khetkorn, W. Rastogi, R.P. Incharoensakdi, A. Lindblad, P. Madamwar, D. Pandey, A. Larroche, C. 2017. "Microalgal hydrogen production-A review." *Bioresource Technology*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kosourov, S.N. Patrusheva, E. Ghirardi, M.L. Seibert, M. Tsygankov, A.A. 2007. "Comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions." *Journal of Biotechnology*. 128 : 776-787.
- Kosourov, S.N. and Seibert, M. 2009. "Hydrogen photoproduction by nutrientdeprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized within thin alginate films under aerobic and anaerobic conditions." *Biotechnology and Bioengineering*. 102(1) : 50-57.
- Kruse, O. and Hankamer, B. 2010. "Microalgal hydrogen production." *Current Opinion Biotechnology*. 21 : 238-243.
- Laurinavichene, T.V. Fedorov, A.S. Ghirardi, M.L. Seibert, M. and Tsygankov, A.A. 2006. "Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37: 151-161.
- Lee, Y.K. and Shen, H. 2004. "Basic culturing techniques." In: Richmond, A. [Eds], *Handbook of microalgal culture*. IS Press. pp. 40-50.
- Lindberg, P. Schütz, K. Happe, T. and Lindblad, P. 2002. "A hydrogen-producing, hydrogenase-free mutant strain of *Nostoc punctiforme* ATCC 29133." *International Journal of Hydrogen Energy*. 27: 1291-1296.
- 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.
- 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 and Bioenergy*. 111 : 88-95
- McKinlay, J.B. and Harwood, C.S. 2010. "Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel." *Current Opinion in Biotechnology*. 21: 244-251.
- Melis, A. 2007. "Photosynthetic H<sub>2</sub> metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae)." *Planta*. 226 : 1075-1086.
- Melis, A. and Chen, H.C. 2005. "Chloroplast sulfate transport in green algae-genes, proteins and effects." *Photosynthesis Research*. 86: 299-307.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Melis, A. 2002. "Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects." *International Journal of Hydrogen Energy*. 27 : 1217-1228.
- Papazi, A. Gjindali, A.R. Kastanaki, E. Assimakopoulos, K. Stamatakis, K. Kotzabasis, K. 2014. "Potassium deficiency, a "smart" cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus*." *International Journal of Hydrogen Energy*. 39: 19452-19464.
- 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 8<sup>th</sup> International Symposium on Biocontrol and Biotechnology**. Bangkok: King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang and Nong Khai Campus: Khon Kaen University.
- Schnackenberg, J., Schulz, R. and Senger, H. 1993. "Characterization and purification of a hydrogenase from the eukaryotic green alga *Scenedesmus obliquus*." *FEBS Letters*. 327 : 21-4.
- Scoma, A. and Hemschemeier, A. 2017. "The hydrogen metabolism of sulfur deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells involves hydrogen uptake activities." *Algal Research*. 26: 341-347.
- 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.
- Sunda, W. 1975. "The Relationship between Cupric Ion Activity and the Toxicity of Copper to Phytoplankton." Ph.D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA.
- Tamburic, B. Zemichael, F.W. Maitland, G.C. Hellgardt, K. 2012. "A novel nutrient control method to deprive green algae of sulphur and initiate spontaneous hydrogen production." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37: 8988-9001.
- Tsygankov, A.A. Kosourov, S.N. Tolstygina, I.V. Ghirardi, M.L. and Seibert, M. 2006. "Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions." *International Journal of Hydrogen Energy*. 31: 1574-1584.
- 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Vogt, S. Lyon, E.J. Shima, S. 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.
- 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.
- 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.



## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP)

อาหารเหลว TAP 1 ลิตร

- เตรียมสารละลาย 1-5 ดังแสดงในตาราง ก1
- บีบอัดสารละลาย 1-5 ใส่ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
- ปรับ pH เป็น 7.2
- หลังจากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ก-1 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TAP

ลำดับที่	สารเคมี	น้ำหนักที่ใช้ในการเตรียม stock (กรัม)	ปริมาตรใช้ในการเตรียม stock (มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่ใช้ในอาหาร 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
1	ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีโนมีเทน (Tris-base)	24.20	100	10
2	แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH <sub>4</sub> Cl)	3.75	250	25
	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	1.00		
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0.50		
3	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.88	10	1
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.44		
4	เกลียวโซเดียม อีดีทีเอ (Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O)	0.5000	1	1
	ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.2200		
	กรดบอริก (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0.1140		
	แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต (MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	แอมโมเนียมโมลิบเดต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0077		
5	กรดอะซิติก (CH <sub>3</sub> COOH)	-	-	1 mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### อาหารรุ้น TAP

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

### อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ปราศจากกรดอะซิติค (TP)

#### อาหารเหลว TP 1 ลิตร

- เตรียมสารละลาย 1-4 ดังแสดงในตาราง ก2
- ปิเปตต์สารละลาย 1-4 ใส่ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
- ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- หลังจากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ตาราง ก-2 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP

ลำดับ ที่	สารเคมี	น้ำหนัก ที่ใช้ใน การ เตรียม stock (กรัม)	ปริมาณที่ใช้ ในการ เตรียม stock (มิลลิลิตร)	ปริมาณที่ ใช้ใน อาหาร 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
1	ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base)	24.20	100	10
2	แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH <sub>4</sub> Cl)	3.75	250	25
	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	1.00		
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0.50		
3	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.88	10	1
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.44		
4	เกลียวโซเดียม อีดีทีเอ (Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O)	0.5000	1	1
	ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.2200		
	กรดบอริก (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0.1140		
	แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต (MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	แอมโมเนียมโมลิบเดต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0077		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## อาหารเลี้ยงเชื้อ TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอล (TP+Gly)

### อาหารเหลว TP+Gly 1 ลิตร

- เตรียมสารละลาย 1-5 ดังแสดงในตาราง ก3
- ปิเปตต์สารละลาย 1-5 ใส่ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
- ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- หลังจากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

ตาราง ก-3 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP+Gly

ลำดับ ที่	สารเคมี	น้ำหนัก ที่ใช้ใน การ เตรียม stock (กรัม)	ปริมาตรใช้ ในการ เตรียม stock (มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่ ใช้ใน อาหาร 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
1	ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน (Tris-base)	24.20	100	10
2	แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	3.75	250	25
	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1.00		
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.50		
3	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	2.88	10	1
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.44		
4	เกลียวโซเดียม อิติทีเอ ( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.5000	1	1
	ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.2200		
	กรดบอริก ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	0.1140		
	แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.0500		
	เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.0500		
	โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.0160		
	คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.0160		
แอมโมเนียมโมลิบเดต ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.0077			
5	กลีเซอรอล (Glycerol)	-	-	1.70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## อาหารเลี้ยงเชื้อ TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส (TP+Su)

### อาหารเหลว TP+Su 1 ลิตร

- เตรียมสารละลาย 1-5 ดังแสดงในตาราง ก4
- ปิเปตต์สารละลาย 1-5 ใส่ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
- ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- หลังจากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

ตาราง ก-4 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP+Su

ลำดับ ที่	สารเคมี	น้ำหนัก ที่ใช้ใน การ เตรียม stock (กรัม)	ปริมาณใช้ ในการ เตรียม stock (มิลลิลิตร)	ปริมาณที่ ใช้ใน อาหาร 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
1	ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีโนมีเทน (Tris-base)	24.20	100	10
2	แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH <sub>4</sub> Cl)	3.75	250	25
	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	1.00		
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0.50		
3	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.88	10	1
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.44		
4	เกลียวโซเดียม อีดีทีเอ (Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O)	0.5000	1	1
	ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.2200		
	กรดบอริก (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0.1140		
	แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต (MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	แอมโมเนียมโมลิบเดต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0077		
5	ซูโครส (Sucrose)	0.3420	10	29.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## อาหารเลี้ยงเชื้อ TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส (TP+Glu)

### อาหารเหลว TP+Glu 1 ลิตร

- เตรียมสารละลาย 1-5 ดังแสดงในตาราง ก5
- ปิเปตต์สารละลาย 1-5 ใส่ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
- ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- หลังจากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

ตาราง ก-5 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP+Glu

ลำดับ ที่	สารเคมี	น้ำหนัก ที่ใช้ใน การ เตรียม stock (กรัม)	ปริมาตรใช้ ในการ เตรียม stock (มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่ ใช้ใน อาหาร 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
1	ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีโนมีเทน (Tris-base)	24.20	100	10
2	แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH <sub>4</sub> Cl)	3.75	250	25
	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	1.00		
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0.50		
3	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.88	10	1
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.44		
4	เกลียวโซเดียม อีดีทีเอ (Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O)	0.5000	1	1
	ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.2200		
	กรดบอริก (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0.1140		
	แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต (MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	แอมโมเนียมโมลิบเดต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0077		
5	กลูโคส (Glucose)	1.80	100	58.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## อาหารเลี้ยงเชื้อ TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นไตรโซเดียมซิเตรต (TP+Cit)

### อาหารเหลว TP+Cit 1 ลิตร

- เตรียมสารละลาย 1-5 ดังแสดงในตาราง ก6
- ปิเปตต์สารละลาย 1-5 ใส่ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
- ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- หลังจากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

ตาราง ก-6 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP+Cit

ลำดับ ที่	สารเคมี	น้ำหนัก ที่ใช้ใน การ เตรียม stock (กรัม)	ปริมาณใช้ ในการ เตรียม stock (มิลลิลิตร)	ปริมาณที่ ใช้ใน อาหาร 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
1	ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน (Tris-base)	24.20	100	10
2	แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH <sub>4</sub> Cl)	3.75	250	25
	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	1.00		
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0.50		
3	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.88	10	1
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.44		
4	เกลียวโซเดียม อีดีทีเอ (Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O)	0.5000	1	1
	ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.2200		
	กรดบอริก (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0.1140		
	แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต (MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0.0160		
แอมโมเนียมโมลิบเดต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0077			
5	ไตรโซเดียมซิเตรต (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	2.58	100	58.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## อาหารเลี้ยงเชื้อ TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโซเดียมไฮโดรเจนไบคาร์บอเนต (TP+NaHCO<sub>3</sub>)

### อาหารเหลว TP+NaHCO<sub>3</sub> 1 ลิตร

- เตรียมสารละลาย 1-5 ดังแสดงในตาราง ก7
- ปิเปตต์สารละลาย 1-5 ใส่ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
- ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- หลังจากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

ตาราง ก-7 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP+NaHCO<sub>3</sub>)

ลำดับที่	สารเคมี	น้ำหนักที่ใช้ในการเตรียม stock (กรัม)	ปริมาตรใช้ในการเตรียม stock (มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่ใช้ในอาหาร 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
1	ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน (Tris-base)	24.20	100	10
2	แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH <sub>4</sub> Cl)	3.75	250	25
	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	1.00		
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0.50		
3	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.88	10	1
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.44		
4	เกลือโซเดียม อีดีทีเอ (Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O)	0.5000	1	1
	ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.2200		
	กรดบอริก (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0.1140		
	แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต (MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	แอมโมเนียมโมลิบเดต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0077		
5	โซเดียมไฮโดรเจนไบคาร์บอเนต (NaHCO <sub>3</sub> )	8.4	100	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## อาหารเลี้ยงเชื้อ TP ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโพแทสเซียมคาร์บอเนต (TP+K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

### อาหารเหลว TP+ K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 ลิตร

- เตรียมสารละลาย 1-5 ดังแสดงในตาราง ก8
- ปิเปตต์สารละลาย 1-5 ใส่ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
- ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- หลังจากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

ตาราง ก-8 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TP+ K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

ลำดับ ที่	สารเคมี	น้ำหนัก ที่ใช้ใน การ เตรียม stock (กรัม)	ปริมาตรใช้ ในการ เตรียม stock (มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่ ใช้ใน อาหาร 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
1	ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีโนมีเทน (Tris-base)	24.20	100	10
2	แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH <sub>4</sub> Cl)	3.75	250	25
	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	1.00		
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0.50		
3	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.88	10	1
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.44		
4	เกลียวโซเดียม อีดีทีเอ (Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O)	0.5000	1	1
	ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.2200		
	กรดบอริก (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0.1140		
	แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต (MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.0500		
	โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	แอมโมเนียมโมลิบเดต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.0077		
5	โพแทสเซียมคาร์บอเนต (K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	13.82	100	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ก-9 แสดงองค์ประกอบของอาหารเหลว TAP ที่แปรผันการขาดธาตุอาหารต่างๆ

Medium	TAP	TAP-Ca	TAP-K	TAP-N	TAP-Mg	TAP-S	TAP-P	TAP-Fe	TAP-Mn	TAP-Zn	TAP-Cu
Tris-base	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NH <sub>4</sub> Cl	+	+	+	NaCl	+	+	+	+	+	+	+
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	+	+	+	+	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	+	+	+	+	+
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	+	NaCl	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	+	+	+	+	+	+	+	+
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	+	+	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	+	+	+	-	+	+	+	+
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Na <sub>2</sub> EDTA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	+	+	+	+	+	ZnCl <sub>2</sub>	+	+	+	-	+
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	+	+	+	+	+	FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	+	-	+	+	+
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	+	+	+	+	+	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	+	+	+	+	-
((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	+	+	+	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	+	+	+	+	+	+	+
CH <sub>3</sub> COOH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

## การเตรียมเจลอะกาโรส

- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5X TAE
- เติมนงอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์
- นำมาผสมกัน
- ให้ความร้อนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

### สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Acetate-EDTA

- สารละลาย 50X TAE 1 ลิตร
 

1. ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน (Tris-base)	242	กรัม
2. กรดอะซิติก ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	57.1	มิลลิลิตร
3. อีดีทีเอ (EDTA) 0.5 M	100	มิลลิลิตร
- นำ Tris-base มาละลายในน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร
- เติมน้ำอีดีทีเอ และกรดอะซิติกลงในสารละลาย
- ปรับ pH เป็น 8.0
- จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น
- นำสารละลาย 50X TAE เจือจาง 1000 เท่าให้มีความเข้มข้น 0.5X TAE ด้วยน้ำกลั่น

## ภาคผนวก ข

### การคำนวณปริมาณไฮโดรเจน

ในงานวิจัยนี้จะใช้ 4 เปอร์เซ็นต์ของก๊าซไฮโดรเจนในอาร์กอนเป็นสารมาตรฐานเพื่อนำมาใช้ในการคำนวณปริมาณก๊าซไฮโดรเจน โดยคำนวณจากการเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานแบบ single point calibration ซึ่งแสดงการคำนวณได้ดังนี้

- นำพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมของไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ มาเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมที่วัดได้จากขวด vial เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไฮโดรเจนในขวด vial ดังสมการด้านล่างนี้

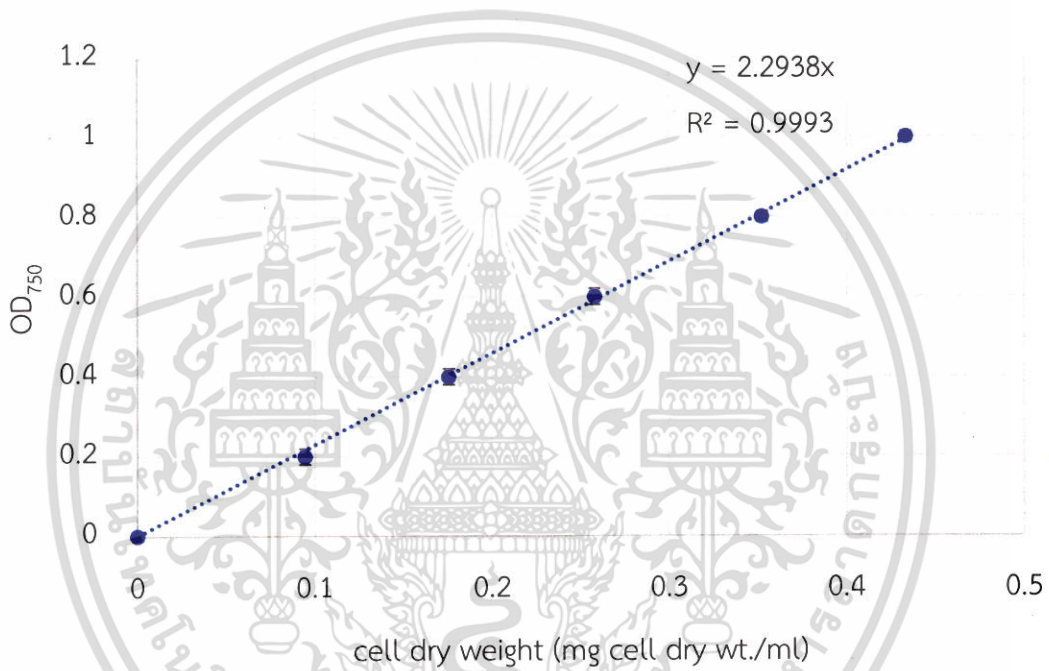
$$\%H_2 = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของ 4\% ไฮโดรเจนมาตรฐาน}} \times 4\%$$

- เมื่อได้เปอร์เซ็นต์ไฮโดรเจนในขวด vial แล้ว ทำการเปลี่ยนเปอร์เซ็นต์ให้เป็นหน่วยลิตร โดยคิดเทียบจาก head space ที่ใช้จริงในการทดลอง
- คำนวณจำนวนโมลของไฮโดรเจน โดยใช้สูตร  $PV = nRT$  (เทียบจากปริมาตรของก๊าซ ณ ความดันบรรยากาศ และที่อุณหภูมิห้อง เมื่อ  $P = 1 \text{ atm}$ ,  $R = 0.0821 \text{ L}\cdot\text{atm}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
- คำนวณปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ( $\mu\text{mol H}_2/\text{mg dry wt.}$ ) (แสดงการคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งในภาคผนวก ง) และคำนวณปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อคลอโรฟิลล์ ( $\mu\text{mol H}_2/\text{mg Chl.}$ ) (แสดงการคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งในภาคผนวก ง)

## ภาคผนวก ค

### การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งจากค่าความขุ่นของสาหร่าย

น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียว KS03 สามารถคำนวณได้จากสมการเส้นตรง  $y = 2.2938x$  โดยที่  $y$  คือค่าการดูดกลืนแสงหรือค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียว KS03 ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ( $OD_{750}$ ) และ  $x$  คือน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียว KS03 ในหน่วยมิลลิกรัม น้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตรอาหารเหลว TAP

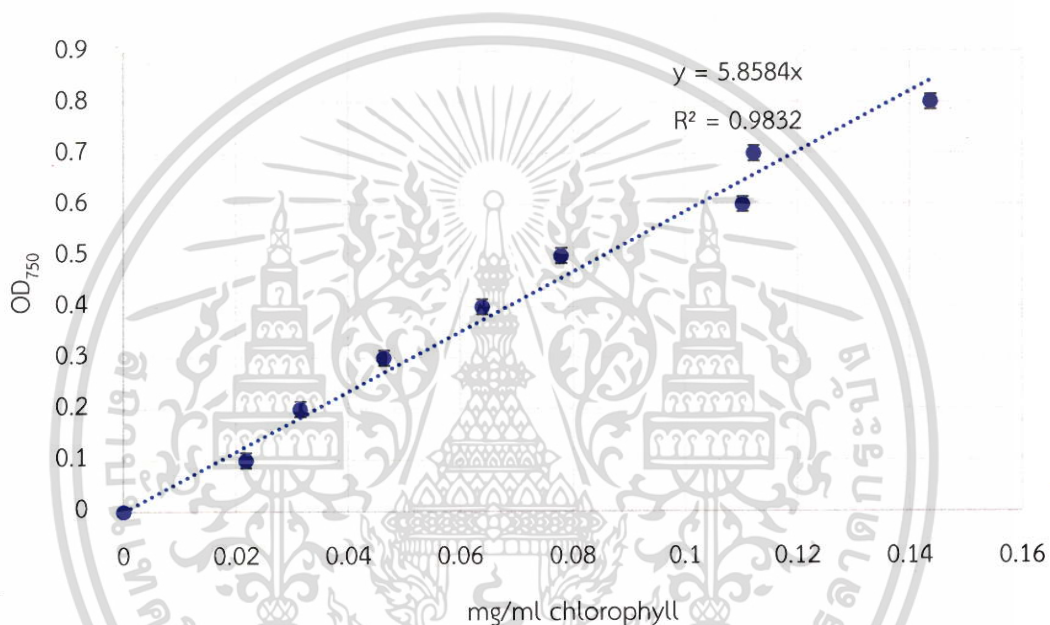


รูปที่ ค-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียว ( $OD_{750}$ ) และน้ำหนักเซลล์แห้ง

## ภาคผนวก ง

### การคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์จากค่าความขุ่นของสาหร่าย

ปริมาณคลอโรฟิลล์ (a+b) ของสาหร่ายสีเขียว KS03 ในอาหารเหลว TAP สามารถคำนวณได้จากสมการเส้นตรง  $y = 5.8584x$  เมื่อ  $y$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงหรือค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียว KS03 ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ( $OD_{750}$ ) และ  $x$  คือปริมาณคลอโรฟิลล์ (a+b) ในหน่วย มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อมิลลิลิตรอาหารเหลว TAP ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ 3.1



รูปที่ ง-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียว ( $OD_{750}$ ) และปริมาณคลอโรฟิลล์

## ภาคผนวก จ

การติดตามยีน 18S rDNA และยีนไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว

*Chlorella* sp. KLSc59

1 CGTAATTCCA GCTCCAATAG CGTATATTTA AGTTGCTGCA GTTAAAAAGC  
 51 TCGTAGTTGG ATTTTCGGGTG GGGCCTGCCG GTCCGCCGTT TCGGTGTGCA  
 101 CTGGCAGGGC CCACCTTGTT GCCGGGGACG GGCTCCTGGG CTTCACTGTC  
 151 CGGGACTCGG AGTCGGCGCT GTTACTTTGA GTAAATTAGA GTGTTCAAAG  
 201 CAGGCCTACG CTCTGAATAC ATTAGCATGG AATAACACGA TAGGACTCTG  
 251 GCCTATCCTG TTGGTCTGTA GGACCGGAGT AATGATTAAG AGGGACAGTC  
 301 GGGGGCATTG GTATTCATT GTCAGAGGTG AAATTCTTGG ATTTATGAAA  
 351 GACGAACTAC TGCGAAAGCA TTTGCCAAGG ATGTTTTTCAT TAATCAAGAA  
 401 CGAAAGTTGG GGGCTCGAAG ACGATTAGAT ACCGTCCCTAG TCTCAACCAT  
 451 AAACGATGCC GACTAGGGAT CGGCGGATGT TTCTTCGATG ACTCCGCCGG  
 501 CACCTTATGA GAAATCAAAG TTTTGGGGT CCGGGGGGAG TATGGTCGCA  
 551 AGGCTGAAAC TTAAAGGAAT TGACGGAAGG GCACCACCAG GCGTGGAGCC  
 601 TGCGGCTTAA TTTGACTCAA CACGGGAAAA CTTACCAGGT CCAGACATAG  
 651 TGAGGATTGA CAGATTGAGA GCTCTTCTT GATTCTATGG GTGGTGGTGC  
 701 ATGGCCGPTC TTAGTTGGTG GGTTCCTTG TCAGGTTGAT TCCGGTAACG  
 751 AACGAGACCT CAGCCTGCTA AATAGTCACG GTTGGCTCGC CAGCCGGCGG  
 801 ACTTCTTAGA GGGACTATTG GCGACTAGCC AATGGAAGCA TGAGGCAATA  
 851 ACAGGTCTGT G

รูปที่ จ-1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว KS03

>AJ298227.1 *Chlorella fusca* hydA gene for Fe-hydrogenase, exons 1-5

```

GCCGAATTACTAGTATAAGCACTGCTAACAACCGCAGAGTCGGGGCCAGGGACTCGATCAGTTGTTATGTGTTGCCCGTGGTTCGAAGTAC
GCACGCAGGGCGTCAAGGCATGTGCTGTCCGTGCAGCAGGGCCAAACATCTGAGTGTGATTGTCTCCAACACCTCAGGCCAAGCTGCCTC
ACTGGCAGCAGGGCTCTGGATGAGCTGCCAAGCCCAAGGAGAGCAGGAGGTTGATGATCGCGCAAAATCCGCTCCGCTGTTCTGCTGCCTATT
GCTGAGACCAATTGGCTTGGCCCCAGGAGATGTCACCAATGGGCAGCTCGTACTGGGGCTGCGTATGCTTGGCTTTGATTATGTCTTTGGTAA
GCAGCAGCATCTTGCATTACACTTGCAGTTGGTGGTGCATGCACCTAATCAGATGTTAGCCCTCTGGAACATTTTTGCCGTGTTGGTGCTT
ACCTGACCAACTGCTGCTGGTATGGCCAACTTGTGAAGCTGCGTGTGTTGGCGTTGCTACAGACACCCCTGTTTGGTGTGAC
GGAACGGAGCTGCTGCATCGCTGCAGGACCATCTGGAGCAGCACCACCAAGGAGGTGAGTAAGCCAGCTGGGTGGTCTAC
CACCAGCACCAGCTCGAGACAGCAGCTTGCATCAACACTCACAACGCTTAGCTCCTCCTTAAATGAGCGGACCAACCTGTGAGTGGCAC
CATGTACAGTGCCTCCGACCAAAGCACAGCATGGCTGTCTGCTGCTGATTGCCACATGAGTGTGTTGGCTGTTATGCAAGTGCCTGAAC
AAACTGCATATTCTGTGTCTCTGCGTTGCGACAGGAGCCACTGCCCATGTTTACCAGTTGCTGCCAGGGCTGGGTGCCATGGTTGAAA
AGAGCAATCTGAGCTCATCCCTACCTGTATCTTGAAGTCCGCTCAGATGATGCTTGGGGCCGTTATCAAGAACACTATGCACAGCAG
GTTGGAGTGCAGCCCACTGCACACTGCAACGTTGCAGTGCATGCCATGCGTACGCAAGCAGGGAGAGGCTGACCGGGAGTGGTTCAACACCAC
AGGTGGCCGAGGCACTGATCACCAGTACTGGTGTCTCCGCTGTTGTGTCAGTGTCTCTGTTAGAGGCTGGATACTCTCCAGTGCAGTGTCT
GATGCAGAGTGGCGGCTGGTGTGCAGCAGCGACCCCAAGAACACTGAGAGCTGGCAATCAATGGGCTTGGTGTCTACTGTACAGTTCCTT
TTCCTGCAGGTGCAGTACATACGGTCTGCATCAAGGCTCAAACTATGTTGGTATGATGTTGATGTTGCAATGCAAGGCTTGCAGGCTTGC
TGTTGATCATGTGGTACTACTGCTGAGGTTGGTAAGATATTCCTGGAGCGTGGCATCAAGCTGAATGAGCTGCCAGAGAGCAACTTTGACA
ACCCCATTTGGCGAGGGCACAGGTGGTGTCTGCTGTTTGGCACCAGTGGAGGTGCATGGAGGCGAGCACTTCGCACAGTCTATGAAGTGGT
AGTGGTACTGCTTCAAGTTCAGTCACTGACCAACCAAGCTACTGCAATGCATAGCCCGAGTTTCTGCCATCAATGACCTGCTTTGTAAG
TAGTGATACCTTACCAACCACCTGGTATTTGGTATCCTGGCATAGCACATGCCCTTCTCCTGCTTGGCTTATCAACCTGTTGGTCTA
TGTGTACTGCTGTGCTGCAGGTTACCCAGAAGCCATGGGTGCTGTTGACTTTGAGGAGGTGCGAGGCGCTTGAAGGAATCAAGGAGGCAGA
GATCACACTCAAGCCAGGAGACGACAGCCCATCAAAGCCTTCCGAGGAGCTGATGGCCAGGGCATCAGGCTCAAGATTGCAGTAGCCAATG
GGCTTGGCAATGCCAAGAAGCTCATCAAGAGCCTGTCAAGGGCAAGGCCAAGTATGATTTCAATGAGGTGATGGCATGCCCTGGTGGCTGC
ATTGGCGGAGGCGGTACGCCCCGAGTACTGACAAGCAGATCCCTGCAGAGGGCCAGGCTATGTACAACCTGGATGAGCGCAGTACCAT
CCGCCGAGCCATGATAACCCATTGATCCAGGCGCTGATGACAAGTCCCTAGGCGCACCAACAGCCACAGGCACATGATCTG
AGGTGGAATCCAGAGGAGAAGTCAAGAGCCTGTCAAGAGCCTGTCAAGGGCAAGGCCAAGTATGATTTCAATGAGGTGATGGCATGCCCTGGTGGCTGC
TGGTGGGTATGGCCAGGAAGAAGCCCGCATCAATGCATGTGAACTAGGTGGTCCACATATGAACCCATCTGGATGTTAAGGTACCTG
AAACAATAGTGCATCGGCTCTGCATGGCTCAACAACCTGCTCTCAGAGCAGGTGATTTCCACACCATCTTGATTTACCTACCACTCTGTAGT
TCAAGTGGTCAAATGAAATGCTATGGCAGTACGCCCTGCAGTTCATAGTCTATGAAGGTTTACCAGGATCCATGTCCCTCATATTTTTG
TTTTATATGCTTGAATATGCCCTTGAACCATGCTCAATGCACACAAGTTGGTGCAGGACAGCGGCATCGIACATCTCAATTTTCAGAA
CTTGTGAGTGGCATGGCTTATTTGACTCTTGCAGTCTGTTTACCCTTGTACTGCTTGCATGCATCTGTGTTTGGCAAGCAACAG
CTCATGCATTTGAATCGATCATCCGTACATCCGTGCCATATTCACATGGTTTTGACTTGCAAATCAACCACCAGGCAAGTGGTAAATTTGCC
AGGCTGGTGCATTTGGCCATTGGGCAGCCCTTGTGGCAGCTTGTGTCAGGCGCAAGCTGAGTGCATCAGACTCAGCAGGCTGCT
GCTGGCACTGTAGAATGCTGAAAAGGGCATTCAACTACATGTCATTATTAGTTGACCTGAGACAGCCGTAAGAATATCATTTGTGTCTGAA
CTTAGTCTCAATGCATGCCATGATGCTGTTTCCAGGATGGATAAGCGAGCTCCTTCTCAATTACATGCCTTCAAGAGACTTCAATAT
CTGTGTCAGTGAOCTTGTGTTGTTGCTTAATCCAGTGGTCTC
    
```



รูปที่ จ-2 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่อยู่บนดีเอ็นเอของยีนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella fusca*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

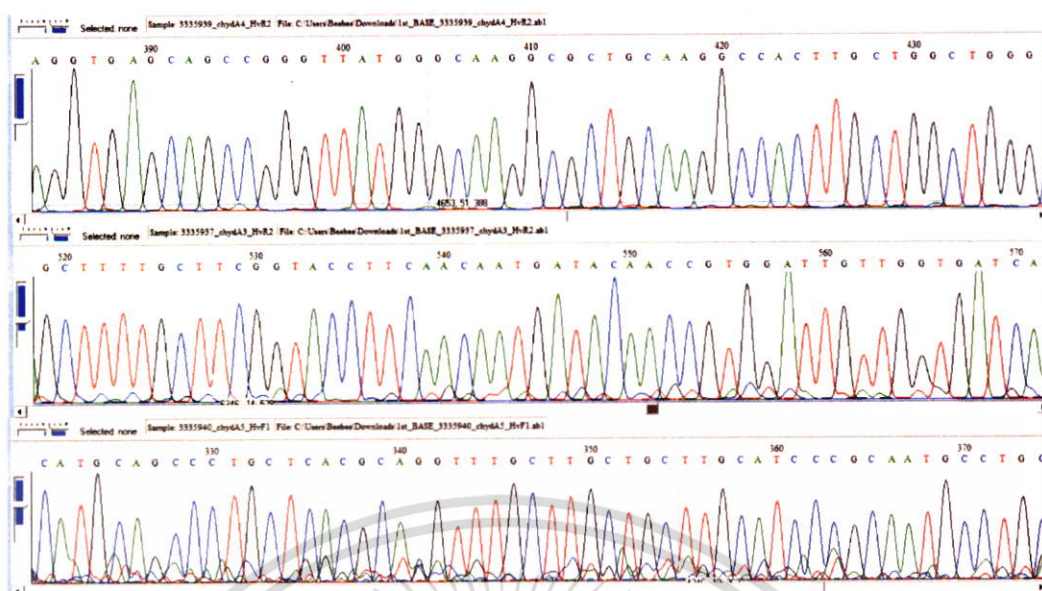
(A)

(B)

(C)

รูปที่ จ-3 แสดงการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 3 ชนิด (ประมาณ (A) 2,300, (B) 1,600 และ (C) 1,250 คู่เบส) มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอื่นๆ โดยใช้โปรแกรม BlastN

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ จ-4 แสดงตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งตรวจ

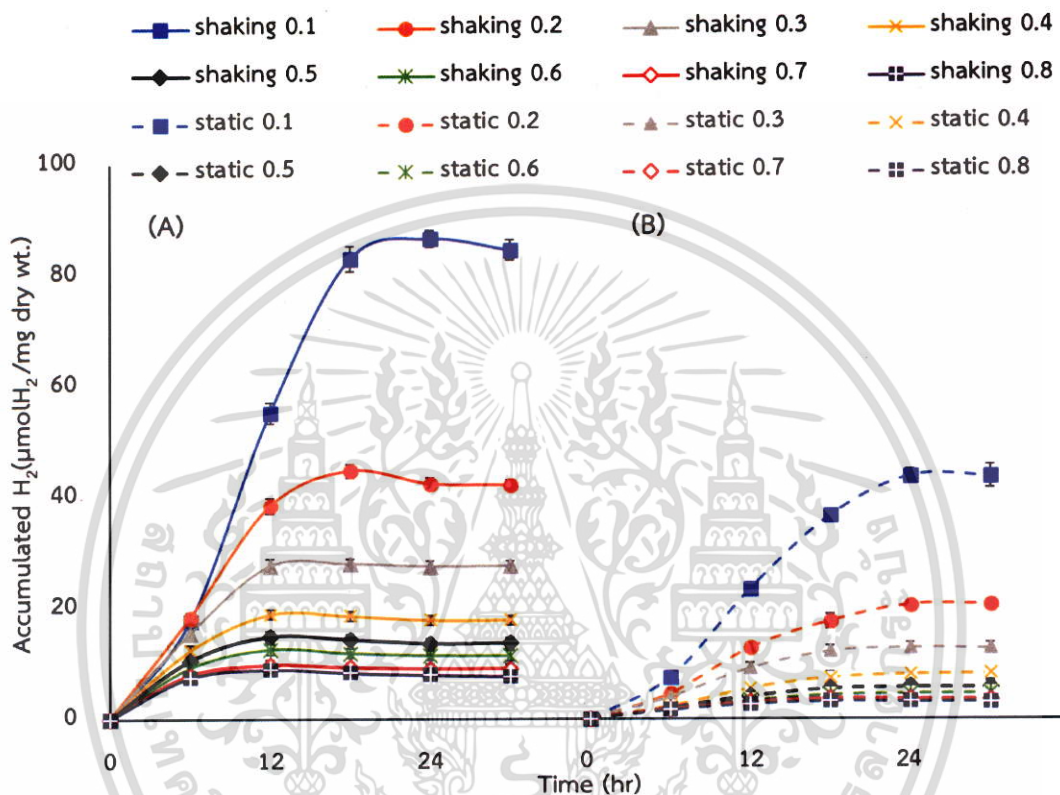


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

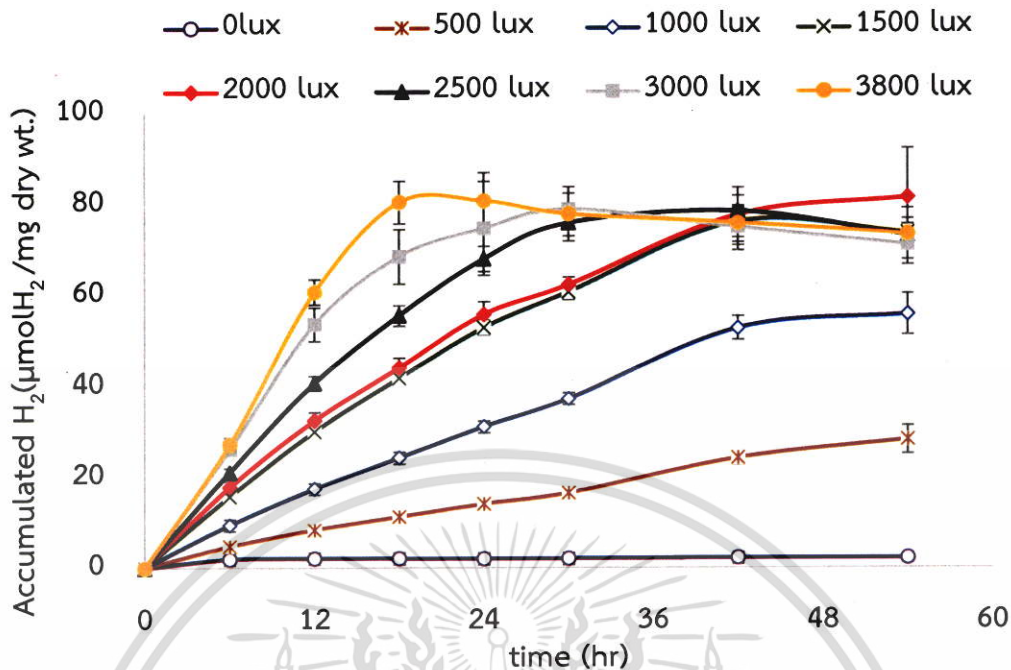


## ภาคผนวก ฉ

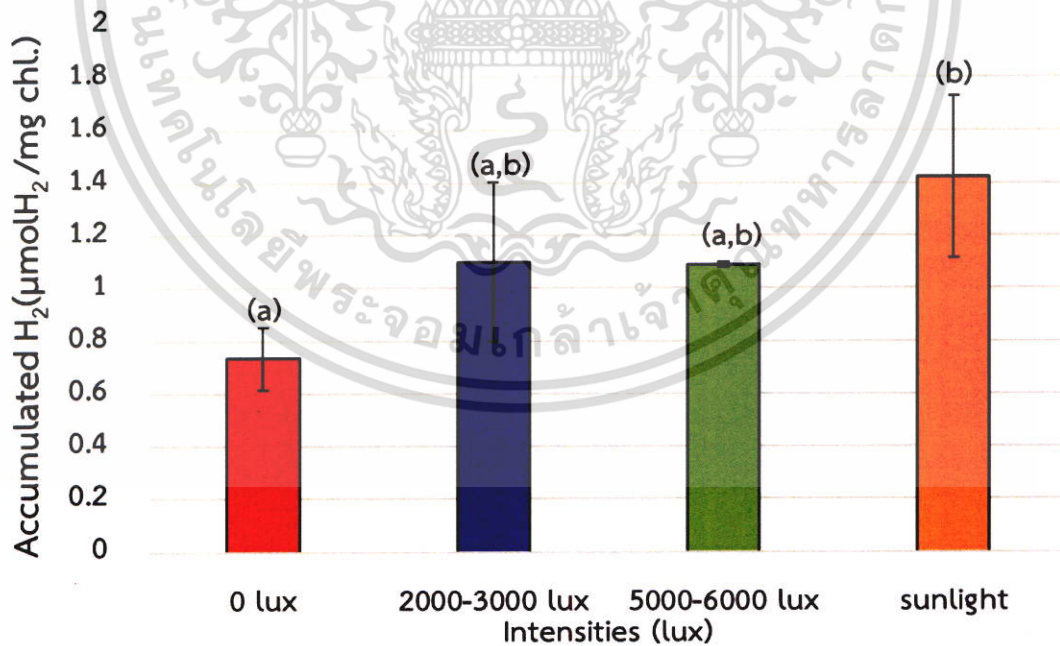
กราฟผลการทดลองในบทที่ 4 ในหน่วยของไมโครโมลไฮโดรเจนต่อน้ำหนัก  
มิลลิกรัมเซลล์แห้ง



รูปที่ ฉ-1 ผลของค่าความขุ่นของเซลล์ ( $OD_{750}$ ) ของเซลล์ต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยการบ่มแบบ  
เขย่า (A) และการบ่มแบบไม่เขย่า (B)

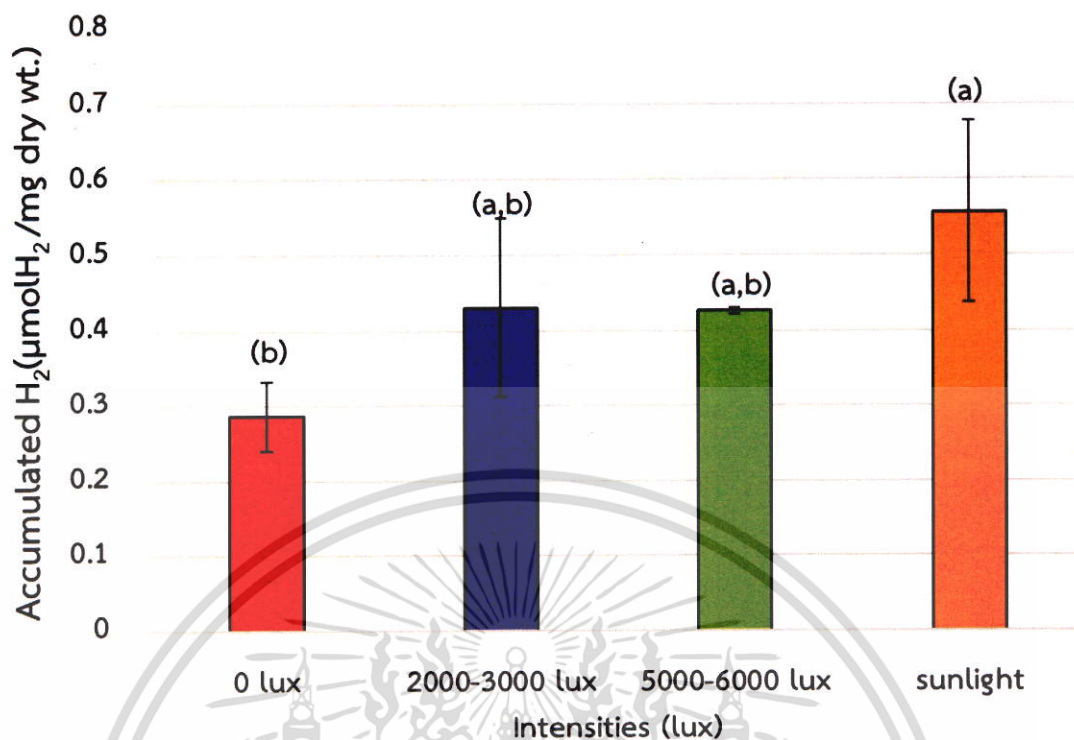


รูปที่ ๓-2 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

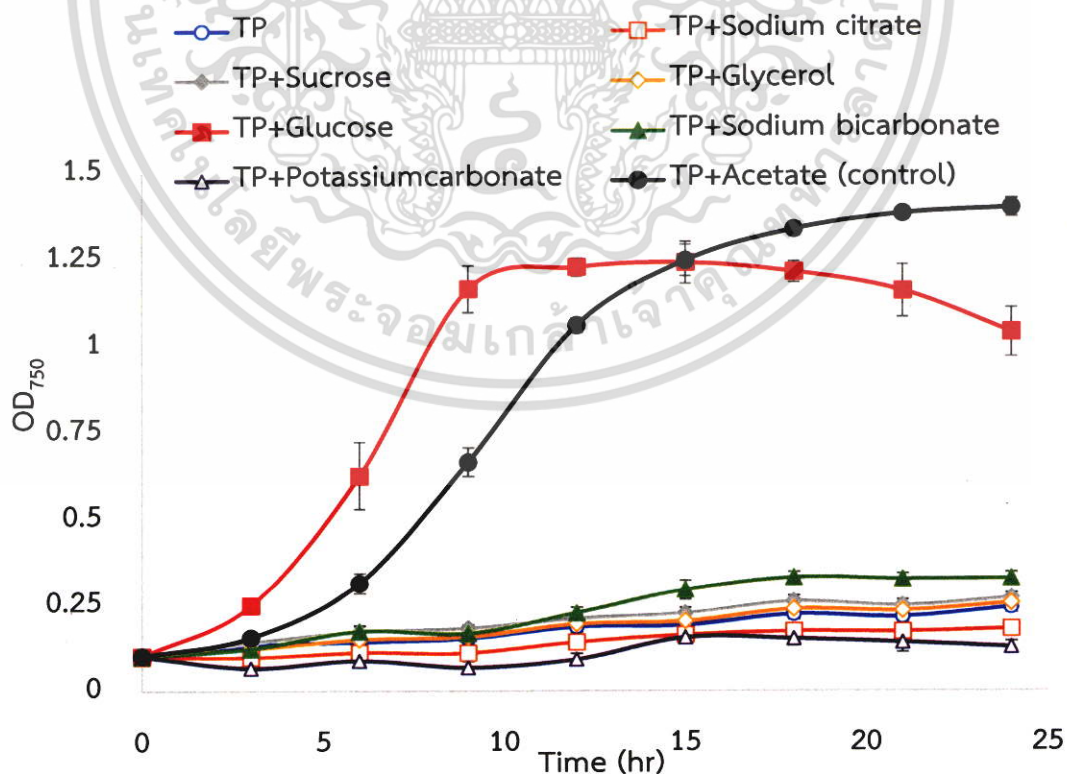


รูปที่ ๓-3 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p-value < 0.05))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

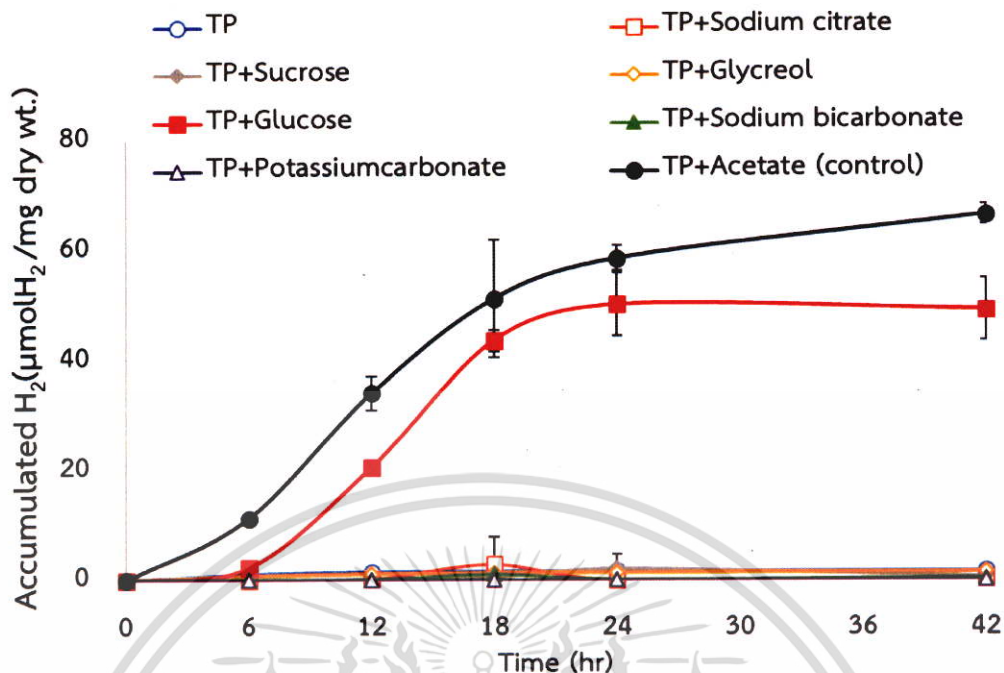


รูปที่ ๔-4 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p$ -value < 0.05))

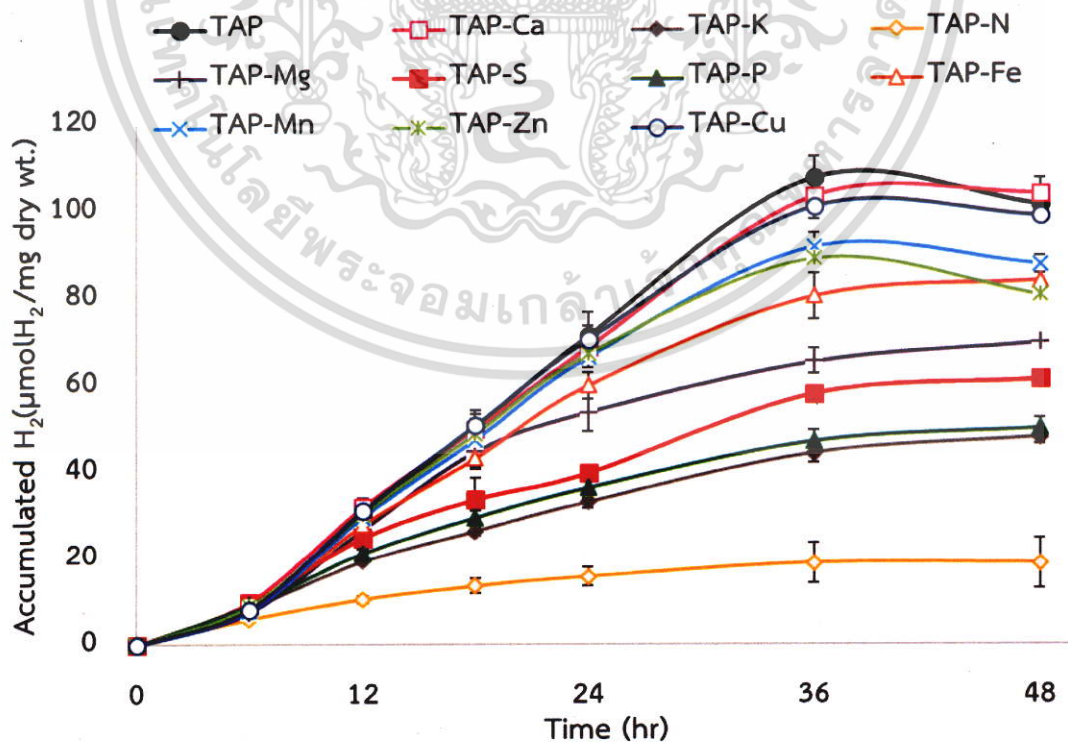


รูปที่ ๕-5 ผลของการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเลี้ยงเซลล์สาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

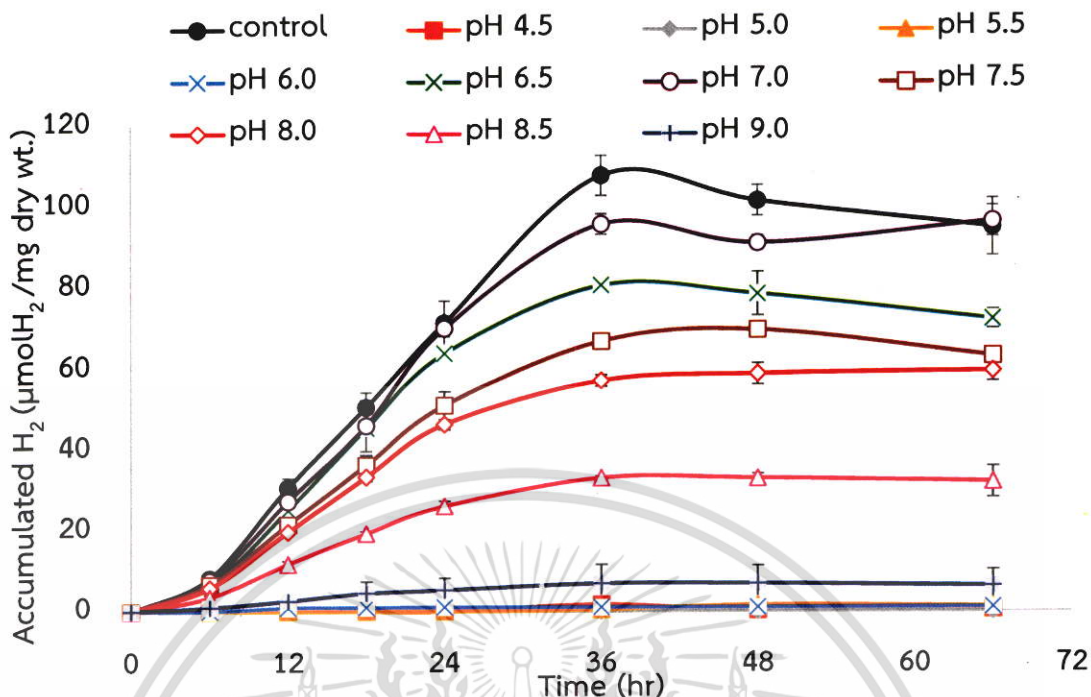


รูปที่ ๖-6 ผลของการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

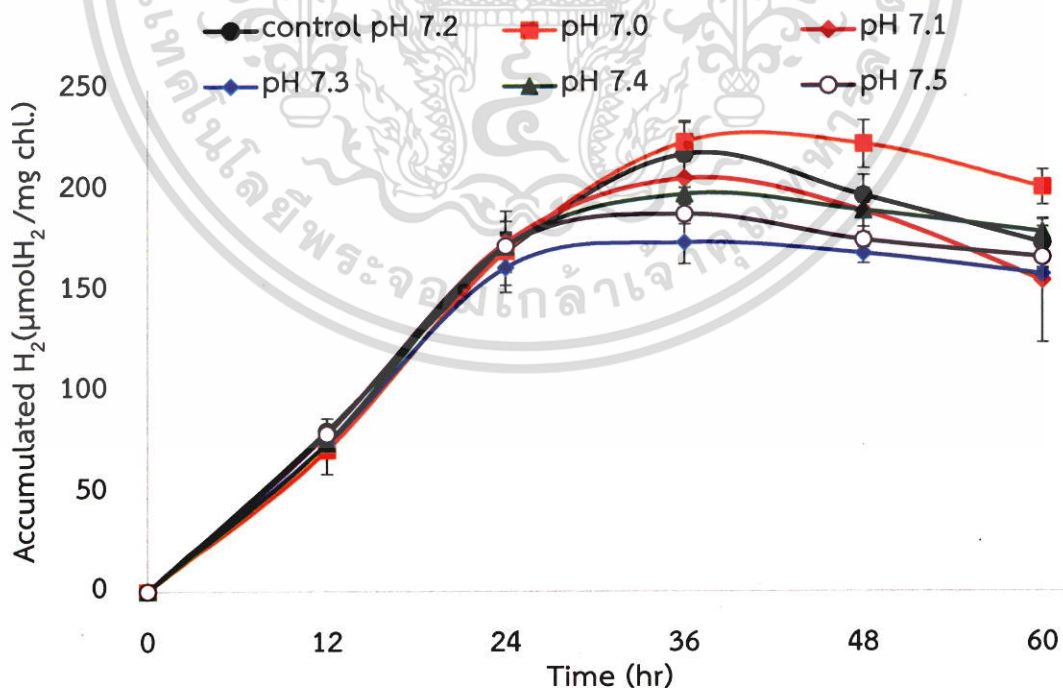


รูปที่ ๖-7 ผลของการแปรผันชนิดของอาหารที่ขาดธาตุอาหารของเซลล์ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

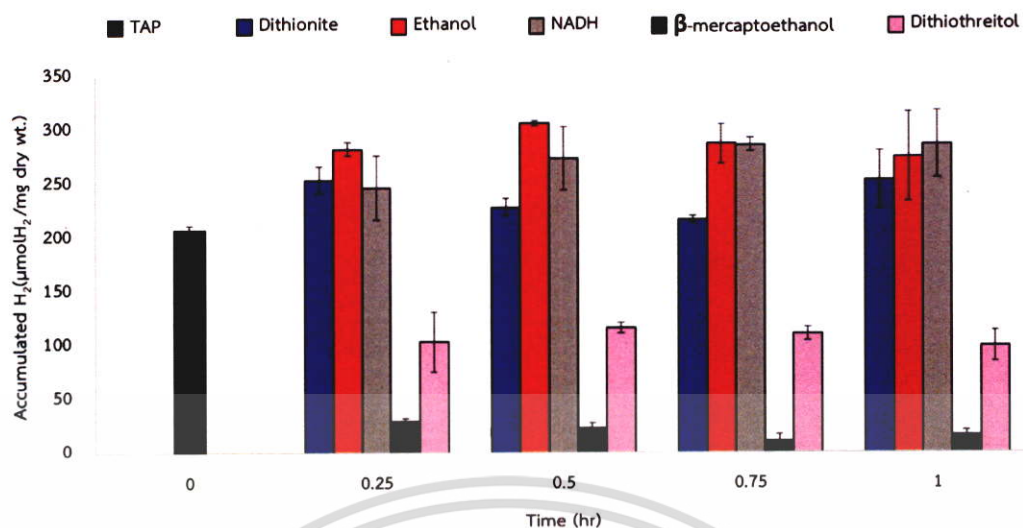


รูปที่ ๘-8 ผลของการแปรผันค่า pH เริ่มต้นในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการแปรผันค่า pH เริ่มต้นตั้งแต่ 5.0 ถึง 9.0

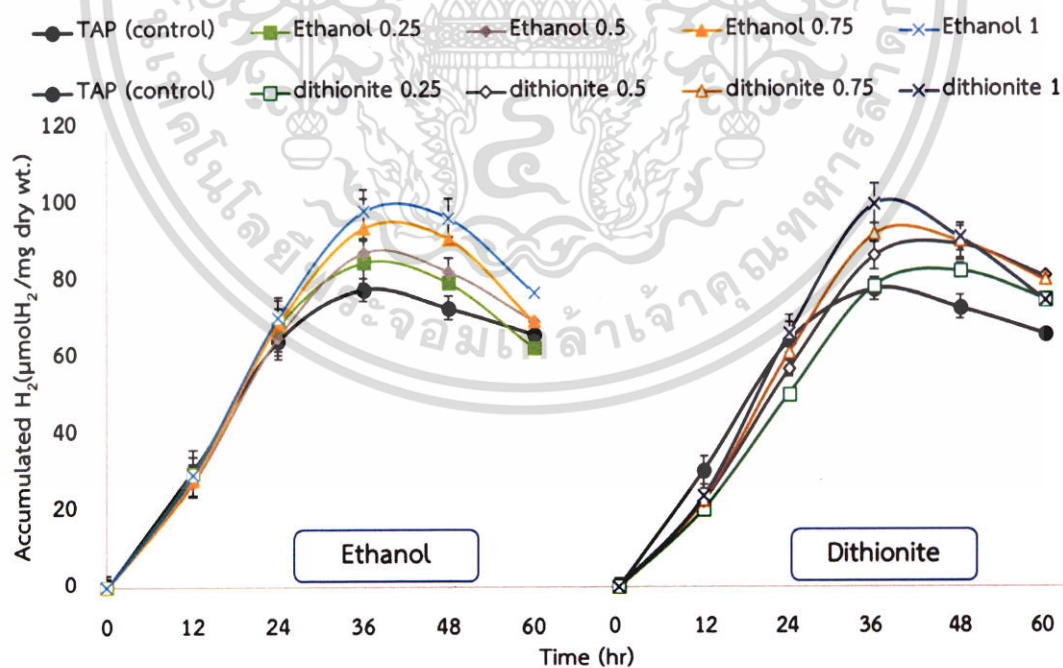


รูปที่ ๘-9 ผลของการแปรผันค่า pH เริ่มต้นในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการแปรผันค่า pH ตั้งแต่เริ่มต้น 7.0 ถึง 7.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑-10 ผลของการแปรผันสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ ในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน



รูปที่ ๑-11 ผลของการแปรผันสารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ ในอาหารเหลว TAP ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova

ชุดข้อมูลที่อยู่ในกลุ่มอักษรแตกต่างกัน คือชุดข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p\text{-value} < 0.05$ ) และชุดข้อมูลที่อยู่ในกลุ่มอักษรเดียวกัน คือชุดข้อมูลที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p\text{-value} < 0.05$ )

ตารางที่ ข-1 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาผลของสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic condition) และสภาวะที่ไร้อากาศ (anaerobic condition) (รูปที่ 4.2)

#### Hydrogen production from strains of alga

Duncan<sup>a</sup>

Stain	N	subset for alpha = 0.05				
		e	d	c	b	a
<i>Bumilleriopsis peterseniana</i> with air	3	2.304329				
KS01 with air	3	2.453606				
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551 with air	3	11.134634				
KS03 with air	3	14.304307				
<i>Bumilleriopsis peterseniana</i> with Ar	3		134.739236			
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551 with Ar	3			190.613430		
KS01 with Ar	3				424.867701	
KS03 with Ar	3					858.09643
Sig	3	0.587	1	1	1	1

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-2 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาผลของช่วงความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน (ภาคผนวก ฉ-3)

### Hydrogen production from vary range of intensities

Duncan<sup>a</sup>

Light intensity	N	Subset for alpha = 0.05	
		b	a
0 lux	3	0.287096	
5000 - 6000 lux	3	0.426196	0.426196
2000 - 3000 lux	3	0.430691	0.430691
sunlight	3		0.556826
Sig.	3	0.091	0.118

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ข-3 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสภายใต้สภาวะที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ (รูปที่ 4.20)

### Hydrogenase activity

Duncan<sup>a</sup>

Medium	N	subset for alpha = 0.05		
		c	b	a
TAP-Mg	3	0.00187395		
TAP-N	3		0.01437743	
TAP-Ca	3		0.01624903	
TAP	3			0.01982359
TAP-S	3			0.02072854
Sig.	3	1.000	0.210	0.531

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-4 ผลที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสภายใต้สภาวะที่เติมสารให้อิเล็กตรอนในอาหารเหลว TAP (รูปที่ 4.24)

### Hydrogenase activity

Duncan<sup>a</sup>

Medium	N	subset for alpha = 0.05
		a
TAP+Ethanol	3	0.01836948
TAP	3	0.01982359
TAP+Dithiothreitol	3	0.02073511
Sig.	3	0.262

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวธนพร ศิริพัฒนามงคล
วัน เดือน ปีเกิด	12 กรกฎาคม 2536
ที่อยู่ปัจจุบัน	419/5 ถนนฉลອງกรุง 1 ซอยเก๊กงาม 1 แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	2559 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีอุตสาหกรรม เกรดเฉลี่ย 3.21 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2562 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี เกรดเฉลี่ย 3.87 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการศึกษา ระดับบัณฑิตศึกษา
ผลงานทางวิชาการ	Sirawattanamongkol, T. and Maneeruttanarungroj, C. 2018. “The optimization of biohydrogen production from green alga KS03.” EE505-EE600. in <b>Proceeding of the Pure and Applied Chemistry International Conference 2018</b> . Songkhla: The 60 <sup>th</sup> Anniversary of His Majesty the King’s Accession to the Throne International Convention Center.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้