รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย : การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์

กิจกรรม : รวบรวม พัฒนาสายพันธุ์ สารสำคัญ และผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร

3. ชื่อการทดลอง : การศึกษาเทคโนโลยีเบื้องต้นในการผลิตไบโอเอทานอลจากสาหร่ายขนาดเล็ก

รหัสการทดลอง : 03-07-54-01-01-00-09-56

4. คณะผู้ดำเนินงาน

นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นางสาวภรณี สว่างศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ สำนักวิจัยผู้เชี่ยวชาญ

การศึกษาเทคโนโลยีเบื้องต้นในการผลิตไบโอเอทานอลจากสาหร่ายขนาดเล็ก

Preliminary technology for the production of bio-ethanol from microalgae.

นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล[1/] นางสาวภรณี สว่างศรี[1/]
นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ[1/] นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์[2/]

บทคัดย่อ

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่ได้รับความนิยมในการนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพสำหรับในอนาคต ศักยภาพของสาหร่ายกับชีวมวลจากพืชที่ให้เซลลูโลส พบว่าสาหร่ายมีศักยภาพสูงกว่าเนื่องจากไม่ใช่พืชอาหาร สามารถย่อยสลายได้เร็ว จัดเป็นพลังงานจากพืช หรือพลังงานสะอาด ขณะที่ชีวมวลจากพืชมีโครงสร้างทำลายยากทำให้มีของเสียหลงเหลือจากกระบวนการผลิต ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตน้ำมันหรือเอทานอลในสาหร่ายก็ขึ้นอยู่กับชนิด สภาวะในการเลี้ยง กระบวนการย่อยสลาย และการหมักให้ได้เอทานอล การทดลองนี้ได้ศึกษาเทคโนโลยีเบื้องต้นในการผลิตไบโอเอทานอลจากสาหร่ายขนาดเล็ก เริ่มดำเนินการตั้งแต่ปี 2556-2557 โดยคัดเลือกตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจากธรรมชาติที่มีแป้งสูง คือสายพันธุ์ *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) เลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์ Bold's Basal medium และสามารถคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณแป้งสูงจากการโคลนยีน waxy (*Wx* gene) เข้าสู่ pChlamy_3 vector และถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ได้ในอาหารเหลวสังเคราะห์ TAP medium เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล ซึ่งสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด สามารถเจริญเติบโตได้ภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงสลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง มีอัตราการเจริญเติบโตในระยะ log phase ในช่วงวันที่ 5-10 ที่ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 7-8 และวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต พบว่าสาหร่ายที่ได้รับการถ่ายยีน (*Wx* gene) *Chlamydomonas reinhardtii* (AWx1) และ *C. pyrenoidosa* (ADOA4) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุดเท่ากับ 77.05 และ 74.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ สำหรับปริมาณกลูโคส พบว่า *C. pyrenoidosa* (ADOA4) มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 5.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำ *C. pyrenoidosa* (ADOA4) ไปหมักเปรียบเทียบกับพืชพลังงาน 3 ชนิด ได้แก่ หญ้าเนเปีย ต้นเลา และ อ้อยพลังงาน ที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพ Pre-treatment ของเนื้อเยื่อพืชด้วยด่าง (NaOH) 20 เปอร์เซ็นต์ และล้างน้ำจนกระทั่งปรับ pH ตัวอย่างให้เป็นกลาง จากนั้นย่อยสลายเซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลส ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส ความเข้มข้น 30 unit/เอนไซม์ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง และเติมยีสต์ จากนั้นนำไปหมักในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า *C. pyrenoidosa* (ADOA4) มีการย่อยสลายเร็วที่สุดตั้งแต่วันที่ 1 และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 2.259 mg/ml ซึ่งสาหร่ายที่คัดเลือกได้ดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบอีกทางเลือกหนึ่งของพืชพลังงานทดแทนที่เตรียมพร้อมไว้ใช้ในอนาคต

- รหัสโครงการวิจัย 03-07-54-01-01-00-09-56

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

[2/] สำนักผู้เชี่ยวชาญ

คำนำ

สาหร่ายเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสภาพแวดล้อมของโลกและความเป็นอยู่ของมนุษย์ เป็นส่วนหนึ่งของต้นทางห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศน์ เป็นตัวการในการรักษาสมดุลทางธรรมชาติ สามารถสร้างสารพิเศษบางชนิดที่มีประโยชน์และโทษต่อมนุษย์ เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างอาหารได้ด้วยตนเองโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชทั่วไปและโดยกระบวนการออโทรฟ สาหร่ายถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Procaryote และ eukaryote กลุ่ม Procaryote ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน กลุ่มนี้มีลักษณะเหมือนแบคทีเรีย ส่วนกลุ่ม eukaryote มีขนาดเล็กตั้งแต่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็นจนกระทั่งถึงขนาดใหญ่มีความยาวหลายเมตร สาหร่ายมีรูปร่างหลายแบบ อาจเป็นแบบเซลล์เดี่ยว หลายเซลล์มารวมกลุ่มกันเรียกว่าโคโลนี เป็นเส้นสายทั้งแตกแขนงและไม่แตกแขนง เป็นทัลลัสที่มีราก ลำต้นและใบคล้ายพืชชั้นสูงแต่ไม่มีระบบท่อลำเลียง ทุกเซลล์ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงเพื่อการดำรงชีวิตเหมือนๆกัน (ยุวดี, 2548 ลัดดา, 2544 ไปรมา, 2546 และ Edward and Sigee, 2010) สาหร่ายมีคลอโรฟิลล์สูง ทั้งยังอุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหารไม่ว่าจะเป็นคาร์โบไฮเดรต โปรตีน แร่ธาตุ และวิตามินหลายชนิด ที่สำคัญคือมีน้ำมันในปริมาณมาก และมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่าพืชหลายเท่า ซึ่งข้อมูลจากการศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อพื้นที่ขนาดเท่ากับพื้นที่ปลูกสบู่ดำ 1 ต้น เป็นเวลา 7 ปี สบู่ดำจะให้น้ำมันร้อยละ 25 ในขณะที่สาหร่ายให้น้ำมันมากถึงร้อยละ 1,000 ปริมาณน้ำมันนี้อาจเพียงพอกระทั่งผลิตเพื่อส่งออกต่างประเทศได้ (นิรนาม, 2552) ทำให้สาหร่ายมีศักยภาพมากต่อการผลิตพลังงานทดแทนน้ำมันดิบ ซึ่งคาดการณ์ว่าจะหมดไปภายใน 30 ปีข้างหน้า Lali (2008) และ Anonymous (2009) ได้กล่าวว่า วิวัฒนาการของการผลิตพลังงานชีวมวล (biomass) ได้มาถึงยุคที่ 4 แล้วคือ การผลิตพลังงานจากสาหร่ายหรือสาหร่ายดัดแปรพันธุกรรม น้ำมันดิบเข้ามามีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินชีวิตของมนุษย์และนับวันยิ่งมีบทบาทมากยิ่งขึ้น ทำให้เกิดวิกฤตน้ำมันและปัญหาสิ่งแวดล้อมสืบเนื่องมาจากน้ำมัน ทำให้หลายประเทศทั่วโลกพยายามคิดค้นพลังงานใหม่ๆ ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ พลังงานจากพืช หรือพลังงานสะอาดขึ้นมาทดแทนพลังงานจากน้ำมันดิบที่กำลังจะหมดไป แม้ว่าสถานการณ์ปัจจุบันราคาน้ำมันจะปรับตัวลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ความสำคัญของพลังงานทดแทนยังคงไม่แปรเปลี่ยน ซึ่งเป็นเพราะซัพพลายน้ำมันโลกที่เหลือน้อย กลายเป็นแรงผลักดันให้หลายประเทศทั่วโลกวิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทนต่อไป ในส่วนของประเทศไทยสัญญาณที่เห็นได้ชัดเจน คือ บริษัทการปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย จำกัด (มหาชน) (ปตท.) ซึ่งเป็นบริษัทน้ำมันแห่งชาติ ได้ทุ่มเงินไม่น้อยกว่าปีละ 1,000 ล้านบาท ทำการวิจัยพลังงานทดแทนโดยใช้วัตถุดิบที่ไม่ใช่พืชอาหาร การเพราะไม่ต้องการสร้างปัญหาการแย่งชิงทรัพยากร ซึ่งจะเกิดปัญหาต่างๆตามมามากมาย โดยเฉพาะจะทำให้เกิดปัญหาขาดแคลนพืชอาหารส่งผลให้ราคาผันผวนมาก และหากเปรียบเทียบศักยภาพของสาหร่ายกับชีวมวลจากพืชที่ให้เซลลูโลส เช่น มันสำปะหลัง พบว่าสาหร่ายมีศักยภาพสูงกว่า เนื่องจากไม่ใช่พืชอาหาร ตลอดจนกระบวนการผลิตมีความบริสุทธิ์ สามารถย่อยสลายได้ เป็นเทคโนโลยีที่สะอาดอย่างแท้จริง ขณะที่ชีวมวลจากพืช มีโครงสร้างทำลายยาก ทำให้มีของเสียหลงเหลือจากกระบวนการผลิต ปัญหาสำคัญของการผลิตพลังงานทดแทนจากสาหร่ายให้มีคุณภาพดีและปริมาณมาก คือ สายพันธุ์สาหร่ายที่เหมาะสมต่อการผลิต การเพาะเลี้ยง และปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Patrick *et al*., 2015) ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายให้มีแป้งสูงโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อ

นำมาผลิตเอทานอล การเก็บเกี่ยว และวิธีการย่อยสลายเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีแป้งสูงตลอดจนวิธีการหมักเพื่อนำมาผลิตเอทานอลและใช้เป็นพลังงานทดแทน เป็นเทคโนโลยีเบื้องต้นในการผลิตไบโอเอทานอลจาสาหร่ายขนาดเล็ก ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของพืชพลังงานทดแทนที่เตรียมพร้อมไว้ใช้ในอนาคต จะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตพลังงานทดแทนของไทยต่อไป

วิธีดำเนินการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer ยี่ห้อ PERKIN ELMER รุ่น MBA 2000)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง รุ่น GeneAmp@ PCR System 9700
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge)
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
5. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Incubator shaker)
6. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส
7. เครื่องแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (Electrophoresis) และตรวจสอบดีเอ็นเอบนแผ่นวุ้น ด้วยเครื่องให้กำเนิดแสงอัลตร้าไวโอเลต (Gel Documentation)
8. เครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพ (Multiparameter Bioanalytical System YSI 7100) พร้อมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกลูโคส
9. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P20 และ P2 ไมโครลิตร
10. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ chloroform : isoamyl alcohol (24:1), 10% SDS, 3M NaOAc, isopropanol, 70% ethanol, 5M NaCl, 2X CTAB และ TE buffer (ภาคผนวก)
11. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ได้แก่ ไพรเมอร์, Go Taq® Green Master Mix
12. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีนสาหร่าย GeneArt@ Chlamydomonas Engineering Kits, CloneJET™ PCR Cloning Kit , TransformAid™ Bacterial Transformation Kit, อาหารแข็ง LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal, GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Restriction enzyme *Xba*I *Nde*I *Kpn*I *Pst*I และ *Not*I
13. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis ได้แก่ 10X TBE buffer (Appendix 1) และ Molecular Weight Marker ได้แก่ GeneRuler™ 1kb DNA Ladder
14. สารเคมีที่ใช้ในแยกดีเอ็นเอจากเจลให้บริสุทธิ์ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
15. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis ได้แก่ 10X TBE buffer (ภาคผนวก 1) และ Molecular Weight Marker ได้แก่ GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

16. สารเคมีที่ใช้ในแยกดีเอ็นเอจากเจลให้บริสุทธิ์ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
17. เครื่องแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอแบบแนวราบ (Horizontal Electrophoresis Apparatus)
18. ชุดถ่ายภาพเจล และเครื่องให้กำเนิดแสงอัลตร้าไวโอเลต (UV Transiluminator)
19. เครื่องควบคุมการสั่นของคลื่น Ultrasonic (Ultrasonic Processor) ใช้สำหรับทำให้เซลล์สาหร่ายแตก รุ่น VCX130 PB (บริษัท Thermo Scientific)
20. อุปกรณ์ที่ใช้คัดเลือกและเลี้ยงสาหร่ายให้บริสุทธิ์ ได้แก่ ชั้นเลี้ยงสาหร่ายที่ควบคุมแสงได้ จานเขี่ยเชื้อ (petridish) ลูปเขี่ยเชื้อ ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)
21. อาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายสีเขียว Bold's Basal medium (ภาคผนวก 2)

<u>วิธีการ</u>

1. คัดเลือกตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กที่มีแป้งสูงจากแหล่งน้ำจืดตามธรรมชาติ และสาหร่ายที่ได้จากคลังสาหร่ายของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

คัดเลือกและเลี้ยงตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กที่มีแป้งสูงจากทดลองการคัดเลือกสาหร่ายชีวมวลขนาดเล็กเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่หมาะสมในการผลิตเอทานอล คือสายพันธุ์ *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ซึ่งมีการเจริญเติบโตได้เร็วที่สุด เลี้ยงในสภาวะความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงสลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง มีอัตราการเจริญเติบโตในระยะ log phase ในช่วงวันที่ 5-10 ที่ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 7-8 เมื่อ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุดเท่ากับ 74.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และปริมาณกลูโคสเท่ากับ 5.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รุ่งนภา และคณะ, 2556) และสาหร่ายของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ *Chloerlla vulgaris* TISTR 8580 และสายพันธุ์ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 เลี้ยงในสภาวะเช่นเดียวกับ *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4)

2. การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณแป้งสูงจากการถ่ายยีน waxy (Wx) เข้าสู่ pChlamy_3 vector และถ่ายเข้าสู่เซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สำหรับผลิตเอทานอล

ทำการโคลนยีน waxy (*Wx* gene) ที่มีขนาด 1,395 bp ที่ได้จากการศึกษา เรื่อง การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แป้ง amylose/amylopectin (รุ่งนภา และคณะ, 2553) นำยีนดังกล่าวมาใช้ประโยชน์เพื่อดัดแปลงสายพันธุ์สาหร่ายให้มีปริมาณแป้งสูง ซึ่งยีน waxy เป็นตัวควบคุมการสังเคราะห์เม็ดแป้งอมิโลส มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ในข้าว (Umemoto *et al*., 2002) ส่วนที่มีการแสดงออกของยีน waxy มีจำนวน 14 exon (ภาคผนวก 3) สามารถถ่ายลงในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งเป็นสาหร่ายชนิดที่ปัจจุบันได้มีการได้มีการถอดรหัสครบทั้งจีโนมเรียบร้อยแล้ว (Merchant *et al*., 2007) และมีชุดเวคเตอร์สำหรับการโคลนยีนแบบสำเร็จรูปขนาด 4,517 นิวคลีโอไทด์ ที่เรียกว่า GeneArt@ Chlamydomonas Engineering Kits (ภาคผนวก 3) (Life Technologies Corporation, 2003) เป็นชุดเวคเตอร์ที่เหมาะสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการตัดต่อพันธุกรรมสาหร่ายทางด้านพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuels) ทางชีวเคมี และอุตสาหกรรมด้านเอนไซม์ ดังนั้นการประยุกต์ใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อช่วย

ในการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์สาหร่ายชีวมวลให้มีแป้งสูงเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลได้ต่อไปในอนาคต ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

2.1 การทำปฏิกิริยา PCR และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR Amplification)

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ด้วยดีเอ็นเอหรือชิ้นยีน waxy (*Wx* gene) กับ Primer ที่คัดเลือกและออกแบบได้จำนวน 13 คู่ไพรเมอร์ (14 exon) รวมเป็นดีเอ็นเอสายเดียวกันโดยวิธี Nested PCR จนครบ 14 exon ซึ่งการเตรียมปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดแต่ละช่วงของสายดีเอ็นจำนวน 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารดังต่อไปนี้

- น้ำ (ddH_2O)	4	ไมโครลิตร
- Go Taq® Green Master Mix	10	ไมโครลิตร
- Primer Forward (5 ไมโครโมล)	2	ไมโครลิตร
- Primer Reverse (5 ไมโครโมล)	2	ไมโครลิตร
- DNA Template (100 นาโนกรัม)	2	ไมโครลิตร
รวม (Total)	20	ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermal Cycler (GeneAmp PCR System 9700) โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation : 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation : 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 Annealing : 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 Extension : 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
} จำนวน 30 รอบ

ขั้นตอนที่ 5 Final extension : 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ

และตั้ง 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษา (hold) ไว้ที่อุณหภูมินี้ตลอด

2.2 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่เพิ่มปริมาณได้

ตรวจสอบโดยใช้เทคนิคอิเลคโตรโฟริซิส (Electrophoresis) ใช้วุ้นอากาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใส่ 1kb DNA Ladder maker จำนวน 1 ไมโครลิตรลงในหลุมแรก ตามด้วยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 2 ไมโครลิตร จนครบทุกหลุมของแผ่นวุ้น เติม 1X TBE buffer ให้สูงกว่าหน้าแผ่นวุ้นเล็กน้อย ตั้งกระแสไฟ 150 โวลต์ นาน 40 นาที ย้อมแผ่นวุ้นด้วยเอทธิเดียมโบร์ไมด์ (ethidium bromide) แล้วนำชิ้นแผ่นวุ้นที่ได้ไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมในแผ่นวุ้น (Gel documention) จากนั้นทำความสะอาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยชุด GeneJET™ PCR Purification Kit แล้วนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์

2.3 การเชื่อมต่อชิ้นยีน (ดีเอ็นเอ) เข้ากับเวคเตอร์

นำชิ้นยีน waxy (*Wx* gene) ที่บริสุทธิ์และตรวจสอบความเข้มข้นแล้วทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ชุดโคลนของ CloneJET™ PCR Cloning Kit ปฏิกิริยาทั้งหมด 20 μl ประกอบด้วย 10 μl 2X reaction buffer, 2 μl PCR product, 1 μl DNA blunting enzyme ปรับปริมาตรให้ได้ 18 μl ด้วย water,

nuclease-free ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันและนำไปปั่น 3-5 วินาที บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมปฏิกิริยา blunting ด้วย 1 μl pJET 1.2/blunt cloning vector (50 ng/μl) และ 1 μl T4 DNAligase (5 U/μl) ผสมปฏิริยาให้เข้ากันและนำไปปั่นเป็นเวลา 3-5 วินาที จากนั้นบ่มปฏิกิริยา ligation ที่อุณหภูมิห้อง (22°C) เป็นเวลา 5 นาที (ถ้าต้องการจำนวน transformants มากๆสามารถบ่มปฏิกิริยาได้นานถึง 30 นาที) และปฏิริยา ligation ที่ได้สามารถนำไปถ่ายฝากเข้ากับเซลล์แบคทีเรียได้ทันที

2.4 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α โดยการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง LB (ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 20 กรัม Bacto Agar, pH 7.0) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นานข้ามคืน ก่อนทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียให้เตรียมอาหารแข็ง LB-Ampicillin (อาหารแข็ง LB ปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้อุณหภูมิอาหารประมาณ 50 °C เติมสารปฏิชีวนะ Ampicillin ให้ได้ความเข้มข้น 100 μg/ml) เทอาหารลงเพลทประมาณ 10-15 มิลลิลิตร หลังจากอาหารแข็งแล้ว ใส่ 100 mM IPTG จำนวน 100 ไมโครลิตร บนอาหาร และ spread plate จนผิวอาหารหนืดๆ จากนั้นเติม 50 mg/ml X-Gal จำนวน 20 ไมโครลิตร บนอาหารและ spread plate รอจนผิวหน้าอาหารแห้ง เก็บอาหาร LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal ไว้รอตัวอย่างที่ได้จากการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเริ่มด้วยการเตรียม Competent cell โดยใช้ชุดน้ำยา TransformAid™ Bacterial Transformation Kit บ่มอาหารเหลว TransformAid™ C-Medium ให้ได้อุณหภูมิที่ 37 °C ประมาณ 20 นาที จำนวน 1. 5 มิลลิลิตร สามารถใช้ได้ 2 transformations เขี่ยโคโลนีเดี่ยวๆของแบคทีเรียที่ได้จาก LB plate ที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนลงในอาหารเหลว TransformAid™ C-Medium ที่บ่มไว้แล้ว เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่ 37 °C นาน 2 ชั่วโมง ดูดตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงได้ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสเหลือแต่ตะกอนเซลล์แบคทีเรีย เตรียมน้ำยา TransformAid™ T ซึ่งได้จากการผสม T-Solution (A) และ T-Solution (B) ในอัตราส่วนที่เท่ากัน เมื่อผสมแล้วให้แช่น้ำยาบนน้ำแข็ง เติมน้ำยา TransformAid™ T จำนวน 300 μl ใส่หลอดตะกอนเซลล์แบคทีเรีย และผสมให้เข้ากัน แช่ลงบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเซลล์ให้ตกตะกอนอีกครั้งและทิ้งส่วนน้ำใส เติมน้ำยา TransformAid™ T จำนวน 120 μl ผสมให้เข้ากันและแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แบ่งใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 60 μl/หลอด/ตัวอย่าง และแช่บนน้ำแข็งตลอด หลังจากเตรียม competent cell ได้แล้วนำปฏิกิริยา ligation ที่เตรียมไว้แล้วจำนวน 2.5 μl ใส่ลงในหลอด competent cell ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไป spread บนอาหารแข็ง LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal ที่เตรียมไว้ บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นานข้ามคืน และคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้น insert ของยีน เพื่อนำไปใช้สกัดพลาสมิดต่อไป

2.5 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

นำโคลนที่ได้รับการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB- Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 12-16 ชั่วโมง สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการใช้ชุดสกัด

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit ดูดตัวอย่างเซลล์แบคทีเรีย 1-5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดเล็กปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส ได้ตะกอนเซลล์แบคทีเรีย เติม Resuspension Solution จำนวน 250 μl ผสมตัวอย่างให้เข้ากันโดยใช้ pipette ดูดขึ้นลง เติมน้ำยา Lysis Solution จำนวน 250 μl ผสมตัวอย่างให้เข้ากันโดยการ invert ประมาณ 4-6 ครั้ง เติมน้ำยา Neutralization Solution จำนวน 350 μl ผสมตัวอย่างให้เข้ากันโดยการ invert ประมาณ 4-6 ครั้ง นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดน้ำใสไว้ และทิ้งตะกอนเซลล์ ประกอบคอลัมน์ GeneJET™ และดูดน้ำใสใส่ตรงกลางคอลัมน์ ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นล้างพลาสมิดดีเอ็นเอที่ติดกับคอลัมน์ด้วยน้ำยา Wash Solution 2 รอบๆ ละจำนวน 500 μl ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนที่รองรับได้ และปั่นคอลัมน์เปล่าอีก 1 นาที ตั้งให้คอลัมน์แห้งประมาณ 10 นาที ย้ายคอลัมน์ประกอบกับหลอดทดลองใหม่ขนาดเล็กปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร เติมน้ำยา Elution buffer จำนวน 30 μl แล้วตั้งไว้ประมาณ 2 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที และนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

2.6 การหาลำดับเบสของยีนที่ได้รับการถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

เตรียมพลาสมิดที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และคู่ไพรเมอร์ พร้อมทำปฏิกิริยา Cycle sequencing เพื่อตรวจสอบลำดับเบสของยีน waxy (Wx) โดยวิธีถอดรหัสพันธุกรรมที่ได้ถ่ายฝากเข้าสู่เวคเตอร์แล้ว

2.7 การเชื่อมต่อชิ้นยีน (ดีเอ็นเอ) เข้ากับเวคเตอร์สาหร่าย pChlamy_3 Vector

นำชิ้นยีน waxy (Wx) ที่บริสุทธิ์และตรวจสอบความเข้มข้นแล้วทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ชุดโคลน GeneArt Chlamydomonas Engineering Kits พร้อมกับชุดเวคเตอร์ pChlamy_3 Vector โดยเตรียมปฏิกิริยา ligation ดังนี้

PCR product (*Wx* gene)	6	ไมโครลิตร
10X Ligation buffer	1	ไมโครลิตร
pChlamy_3 Vector (0.5 µg/µl)	1	ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase (4.0 units)	1	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

นำปฏิกิริยา ligation ที่ได้ไปบ่มที่ 14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำไปถ่ายฝากเข้ากับเซลล์แบคทีเรีย คัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นสอดแทรกของยีนโดยวิธี Blue White colony screening นำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

2.8 ตรวจสอบชิ้นยีนจากพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

คัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่อยู่บริเวณ multiple cloning site ของเวคเตอร์ pChlamy_3 และเอนไซม์ที่นำมาใช้ต้องไม่ตรงกับลำดับเบสในชิ้นส่วนของยีนจากแผนภาพของเวคเตอร์ pChlamy_3 (ภาคผนวก 3)

ซึ่งเอนไซม์ที่คัดเลือกนำมาตรวจสอบมีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *Xba*I *Nde*I, *Kpn*I, *Pst*I และ *Not*I ซึ่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการตัดเอนไซม์ มีดังนี้

ddH_2O	15	ไมโครลิตร
10X buffer	2	ไมโครลิตร
DNA Plasmid	2	ไมโครลิตร
FastDigest enzyme	1	ไมโครลิตร
รวม	20	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันเบาๆแล้วนำไปปั่น Spin down บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และตรวจสอบโดยวิธีอิเลคโตรโฟรรีซีส บนแผ่นวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

2.9 ถ่ายยีนที่ได้เข้าสู่เซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii*

เตรียมตัวอย่างเซลล์สาหร่ายชุด GeneArt Chlamydomonas Engineering Kits จากตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส แช่บนน้ำแข็งให้ละลาย ดูดตัวอย่างทั้งหมดใส่เพลท จากนั้นเติมอาหาร TAP medium 4 ml แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสงที่ 50 uE $m^{-2}s^{-1}$ ตั้งไว้ประมาณ 3-6 วัน และเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 rpm วันที่ 3 นำไปวัดค่าความขุ่นที่ OD750 ได้ค่าเท่ากับ 0.6 นำไปเลี้ยงในฟลาสต์ 125 ml จากนั้นเติมอาหาร TAP medium อีก 40 ml แล้วเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ต่อที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสงที่ 50 uE $m^{-2}s^{-1}$ และเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลาอีก 20-24 ชั่วโมง

2.10 ถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์สาหร่าย *C. reinhardtii* โดยวิธี Electroporation

2.10.1 วัดความเข้มข้นของเซลล์สาหร่ายที่ค่า OD750 ให้มีค่าความขุ่นอยู่ระหว่าง 0.3-0.5 ซึ่งเลี้ยงภายใน 24 ชั่วโมง

2.10.2 เก็บเซลล์ 15 ml ปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งน้ำใสและเก็บเซลล์ตะกอนไว้

2.10.3 เติมสารละลายซูโครส TAP-40 mM ผสมให้เข้ากันกับตะกอนเซลล์สาหร่ายโดยใช้ไปเปตดูดขึ้นลงเบาๆที่อุณหภูมิห้อง

2.10.4 เติมพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ถ่ายฝากยีนเข้าไปแล้วจำนวน 2 µg ผสมกับเซลล์สาหร่ายให้เข้ากันเบาๆ

2.10.5 ดูดตัวอย่างทั้งหมด 250 µl ใส่ใน cuvette ที่ใช้กับเครื่อง Electroporation โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที

2.10.6 ตั้งโปรแกรมสำหรับถ่ายยีนกับเครื่อง Electroporation ที่ Voltage = 600 V , Capacity = 50 V , Resistance = infinity (µF)

2.10.7 ผสมตัวอย่างใน cuvette เบาๆ แล้วนำไปใส่ใน cuvettte chamber แล้วถ่ายยีนตามโปรแกรมที่ตั้งไว้

2.10.8 เติมสารละลายซูโครส TAP-40 mM 150 ul ดูดใส่หลอด 1.5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.10.9 เตรียมอาหารแข็งที่มี Hygromycin แล้วนำตัวอย่างที่ได้ spred บนเพลท นำไปบ่มในตู้ growth chamber ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสงที่ 50 uE $m^{-2}s^{-1}$ ตั้งบ่มไว้ประมาณ 5 วัน

2.10.10 คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการถ่ายฝากยีนไปตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR ไพรเมอร์โปรโมเตอร์ที่ใช้ในการทำ PCR คือ

Forward (Hsp70A-Rbc S2 promoter) = 5´ GCA AGC AGT TCG CAT GCA 3´

Reverse (B2-tubulin promoter) = 5´ GCT CGC CCT GGA GCG GCA TCG 3´

การเตรียมปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดจำนวน 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารดังต่อไปนี้

- น้ำ (ddH_2O)	11	ไมโครลิตร
- dNTPs Mix (4 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
- Primer Forward (5 ไมโครโมล)	2	ไมโครลิตร
- Primer Reverse (5 ไมโครโมล)	2	ไมโครลิตร
- DNA Template (100 นาโนกรัม)	2	ไมโครลิตร
รวม (Total)	20	ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermal Cycler (GeneAmp PCR System 9700) โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation : 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation : 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 Annealing : 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 Extension : 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
} จำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 5 Final extension : 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ
และตั้ง 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษา (hold) ไว้ที่อุณหภูมินี้ตลอด

2.11 เพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายที่ได้รับการถ่ายฝากยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์การสังเคราะห์แป้ง amylose/amylopectin (*Wx* gene)

นำเซลล์สาหร่ายที่ได้รับการถ่ายฝากยีนแล้วนำมาตรวจสอบหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตและหาปริมาณกลูโคส เปรียบเทียบกับสาหร่ายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (*Wx* gene)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (คาร์โบไฮเดรทและกลูโคส) ในเซลล์สาหร่าย

3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรท

นำเซลล์สาหร่ายที่ตกตะกอนได้ในข้อ 5 ชั่งตัวอย่างละ 0.5 กรัม ใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์สาหร่ายแตกโดยใช้เครื่อง Ultrasonic Processor และหาปริมาณาร์โบไฮเดรต ตามวิธีการของ (Borowitzka, 1991) โดยชั่งตัวอย่างสาหร่าย 1 กรัม ใส่หลอดแก้ว และทำสาหร่ายให้เป็นเนื้อเดียวกันโดย

การเติม 1M H_2SO_4 จำนวน 2 มิลลิลิตร และไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer นำไปใส่หลอด centrifuge ขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย 1M H_2SO_4 ให้ได้ 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ตั้งที่อุณหภูมิห้องให้เย็น และนำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำใสเก็บไว้เพื่อวัดหาปริมาณคาร์โบไฮเดรทปรับความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรทในน้ำใสไม่เกิน 50 ไมโครกรัม (เริ่มต้นอาจจะเจือจางดูดน้ำใส 0.1-05 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ได้ 2 มิลลิลิตร) เตรียม standard glucose ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัม และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันโดยการ vortex เติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้นทันทีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็นประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร และนำมาคำนวณหาค่าคาร์โบไฮเดรทกับค่า standard curve

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส

วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ กรรมวิธีคือ กลูโคสของสาหร่าย 5 ไอโซเลท ทำการวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพ (Multiparameter Bioanalytical System YSI 7100) จากนั้นนำมาผลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งที่ได้

4. ทดสอบกระบวนการหมักสาหร่ายชีวมวลที่ได้กับตัวอย่างพืชที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการเลี้ยงและเพิ่มปริมาณสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติ *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) เพื่อเป็นตัวแทนในการนำมาทดสอบผลิตเอทานอล เนื่องจากผลวิเคราะห์ที่ได้จากข้อ 3 มีปริมาณกลูโคสสูงสุด เปรียบเทียบกับตัวอย่างพืชที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ หญ้าคิงเนเปีย ต้นเลา และ อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) ที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพ Pre-treatment ของเนื้อเยื่อพืชด้วยด่าง (NaOH) 20 เปอร์เซ็นต์ และล้างน้ำจนกระทั่งปรับ pH ตัวอย่างให้เป็นกลาง จากนั้นย่อยสลายเซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลส ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส ความเข้มข้น 30 unit/เอนไซม์ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง และเติมยีสต์ จากนั้นนำไปหมักในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นระยะเวลา 5 วัน และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ทุกวัน

<u>ระยะเวลา</u>

เดือน ตุลาคม 2554 – กันยายน 2556

<u>สถานที่ดำเนินการ</u>

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ต.รังสิต อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

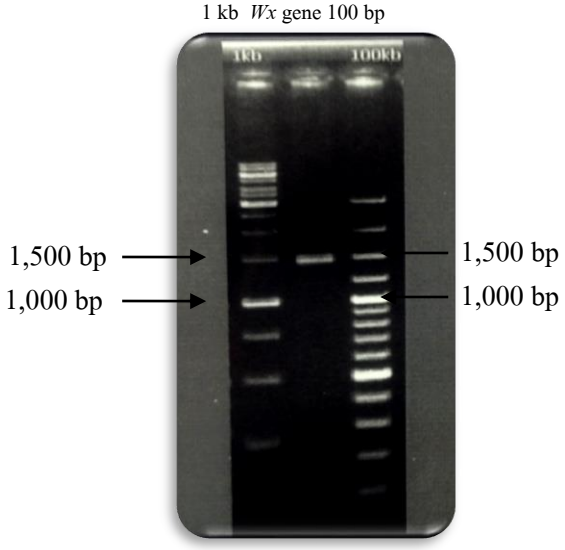
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. คัดเลือกตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กที่มีแป้งสูงจากแหล่งน้ำจืดตามธรรมชาติ และสาหร่ายที่ได้จากคลังสาหร่ายของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

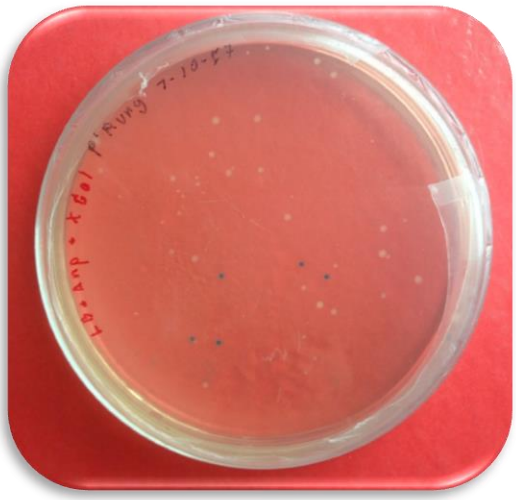
สามารถคัดเลือกและเลี้ยงสาหร่ายที่มีแป้งสูงเพื่อนำไปทดสอบในการผลิตเป็นไบโอเอทานอลได้ 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) *Chloerlla vulgaris* TISTR 8580 และ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงสลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง มีอัตราการเจริญเติบโตในระยะ log phase ในช่วงวันที่ 5-10 ที่ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 7-8 ทั้ง 3 สายพันธุ์ สอดคล้องกับการรายงานของ Patrick *et al*. (2015) ว่า pH ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายอยู่ในช่วง 7-9 Megerle and Wayne (2013) ได้ศึกษาการควบคุม pH ให้มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Chlamydomonas reinhardtii* เลี้ยงใน Bioreactor ขนาด 1.5 ลิตร ที่มีการสมดุลโดยการเติมอาหารที่มีแอมโมเนียม ไนเตรทและควบคุม pH ให้มีความพอดีต่อการเจริญเติบโต พบว่า การเติมแอมโมเนียม 0-4.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องที่ pH 7 ถ้าความเข้มข้นของแอมโมเนียมากกว่า 9 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเจริญเติบโตจะลดลงต่อเนื่อง และมีค่า pH น้อยกว่า 4 รุ่งนภา (2543) ได้ศึกษาความหลากหลายของสาหร่ายน้ำจืดในแหล่งน้ำยูโทรฟิค และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *Microcystis aeruginosa* Kutzing พบว่า M. *aeruginosa* Kutzing ที่คัดเลือกได้จาก 4 แหล่งพันธุ์ คือ แหล่งพันธุ์กรุงเทพฯ ปทุมธานี นนทบุรี และราชบุรี มีการเจริญเติบโตได้ดีเมื่อให้ช่วงแสงสว่าง : มืด เท่ากับ 16 : 8 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 70-80 μ photon $m^{-2}s^{-1}$ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเท่ากับ 9-10 นอกจากนี้ Katie (2013) ศึกษา pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *Scenedesmus quadricauda* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก ลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์หรือโคโลนี เพื่อนำมาผลิตชีวมวลสำหรับผลิตไขมันเป็นพลังงานชีวมวล พบว่า เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ NaCl 0.30 M ในอาหารที่เพาะเลี้ยง *S. Quadricauda* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับ pH 7.5-8 เจริญเติบโตถึงวันที่ 11-14 ได้มีการปรับระดับ pH สูงขึ้นเป็น 9.5 สามารถเจริญเติบโตได้ดีและพบว่าหลัง 1 เดือนจากการเริ่มเพาะเลี้ยง สาหร่ายมีการผลิตไขมันสูงที่สุดเท่ากับ 690 μg/ml

2 การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณแป้งสูงจากการถ่ายยีน waxy (*Wx* gene) เข้าสู่ pChlamy_3 vector และถ่ายเข้าสู่เซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สำหรับผลิตเอทานอล

จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ด้วยดีเอ็นเอหรือชิ้นยีน waxy (*Wx* gene) กับ Primer ที่คัดเลือกและออกแบบได้ สามารถเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอหรือชิ้นยีนในส่วนที่มีการแสดงออก (exon) ทั้ง 14 exon เป็นสายเดียวกันที่มีขนาดประมาณ 1,395 bp (ภาพที่ 1) ผลจากการเชื่อมต่อชิ้นยีน (ดีเอ็นเอ) เข้ากับเวคเตอร์ชุดโคลนของ CloneJET™ PCR Cloning Kit และถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α และคัดเลือกชิ้นที่มียีนสอดแทรกเข้ากับเวคเตอร์โดยวิธีคัดเลือกโคโลนีสีขาว (blue white colony sceening) (ภาพที่ 2)

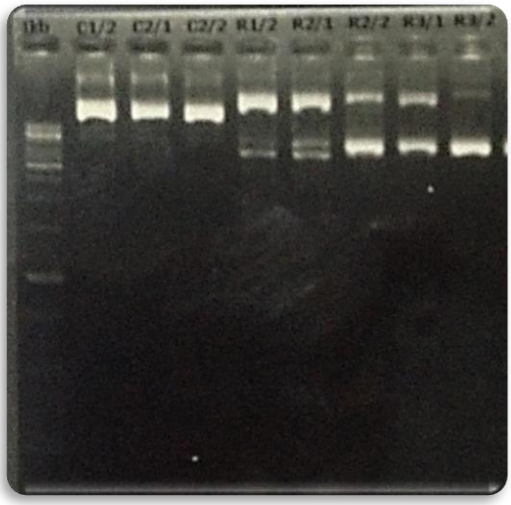


<u>ภาพที่ 1</u> ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอหรือชิ้นยีนในส่วนที่มีการแสดงออก (exon) ทั้ง 14 exon เป็นสายเดียวกันที่มีขนาดประมาณ 1,395 bp โดยที่ เลนที่ 1 = 1 kb marker, เลนที่ 2 = *Wx* gene, เลนที่ 3 = 100 bp marker



<u>ภาพที่ 2</u> การคัดเลือกชิ้นยีนที่มียีนสอดแทรกเข้ากับเวคเตอร์ CloneJET^{TM} PCR Cloning Kit โดยวิธี blue white colony sceening โดยที่โคลนีสีขาว = มีชิ้นยีนสอดแทรก โคโลนีสีน้ำเงิน = ไม่มียีนสอดแทรก

จากการคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้นยีน (ดีเอ็นเอ) สอดแทรกแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB+Ampicillin พบชิ้นโคลนที่สามารถเจริญเติบโตได้ นำมาสกัดพลาสมิดได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มียีนสอดแทรกในพลาสมิดเมื่อเทียบกับ Control เลนที่ 2-3 ซึ่งไม่มีชิ้นยีนสอดแทรก ส่วนเลนที่ 5-9 โคโลนีสีขาวที่มีชิ้นยีน (ดีเอ็นเอ) สอดแทรกลักษณะพลาสมิดเป็นแบบ super coil มีแถบดีเอ็น 2-3 แบน ประมาณ 5 kb ขึ้นไปเมื่อเปรียบเทียบกับเลนที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb marker (ภาพที่ 3)



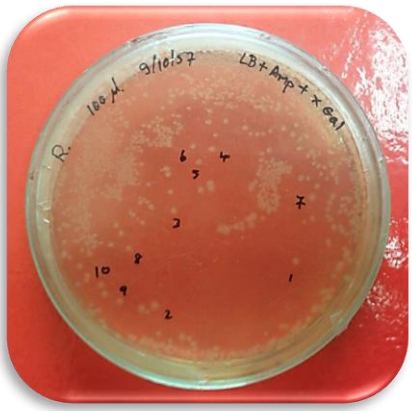
ภาพที่ 3 พลาสมิดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มียีนสอดแทรกจากโคโลนีสีขาวที่คัดเลือกได้ โดยที่ เลนที่ 1 = 1 kb marker เลนที่ 2-4 = พลาสมิด (Control) ไม่มียีนสอดแทรก เลนที่ 5-9 = พลาสมิดที่มียีนสอดแทรก

จากการนำพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนทั้งหมด 20 โคลน นำไปหาลำดับเบสพบลำดับเบสส่วนที่มีการแสดงออกของยีน (exon) มีขนาดเท่ากับ 1,395 bp และลำดับเบสตรงกับฐานข้อมูลที่เปรียบเทียบจาก GenBank (ภาพที่ 4)

```
atgtcggctc  tcaccacgtc  ccagctcgcc  acctcggccc  cggcttcggc  atcgccgaca
gggcctcaag  ccccgcagcc  ccgccggcgg  cgacgcgacg  tcgctcagcg  tgacgaccag
cgcgcgcgcg  acgcccaagc  acagcggtcg  gtgcagcgtg  gcagccggag  gttcccctcc
gtcgtcgtgt  acgccaccgg  cgccggcatg  aacgtcgtgt  tcgtcggcgc  cgagatggcc
ccctggagca  agaccggcgg  cctcggtgac  gcgaatggcc  acagggtcat  ggtgatctct
cctcggtacg  accagtacaa  ggacgcttgg  gataccagcg  ttgtggctga  gatcaaggtt
gcagacaggt  acgagagggt  gaggtttttc  cattgctaca  agcgtggagt  cgaccgtgtg
ttcatcgacc  atccgtcatt  cctggagaag  gtttggggaa  agaccggtga  gaagatctac
ggacctgaca  ctggagttga  ttacaaagac  aaccagatgc  gtttcagcct  tctttgccag
gcagcactcg  aggctcctag  gatcctaaac  ctcaacaaca  acccatactt  caaaggaact
tatggtgagg  atgttgtgtt  cgtctgcaac  gactggcaca  ctggcccact  ggcgagctac
ctgaagaaca  actaccagcc  caatggcatc  tacaggaatg  caaaggttgc  tttctgcatc
cacaacatct  cctaccaggg  ccgtttcgct  ttcgaggatt  accctgagct  gaacctctcc
gagaggttca  ggtcatcctt  cgatttcatc  gacggccgac  agggtgctca  ccgtgagccc
gtactacgcc  gaggagctca  tctccggcat  cgccagggga  gcgagctcga  caacatcatg
cggctcaccg  gcatcaccgg  catcgtcaac  ggcatggacg  tcagcgagtg  ggatcctagc
aaggacaagt  acatcaccgc  caagtacgac  gcaaccacgg  gtactggaaa  gaagaagttc
gagaagctgc  tcaagagcat  ggaggagaag  tatccgggca  agccctgtgc  ttgcgcgtcc
accggtgggc  tcgtggacac  ggtcatcgaa  ggcaagactg  gtttccacat  gggccgtctc
agcgtcgact  gcaaggtggt  ggagccaagc  gacgtgaaga  aggtggcggc  caccctgaag
cgcgccatca  aggtcgtcgg  cacgccggcg  tacgaggaga  tggtcaggaa  ctgcatgaac
caggacctct  cctggaaggg  gcctgcgaag  aactgggaga  atgtgctcct  gggcctgggc
gtcgccggca  gcgcgccggg  gatcgaaggc  gacgagatcg  cgccgctcgc  caaggagaac
gtggctgctc  cttga  1,395 bp
```

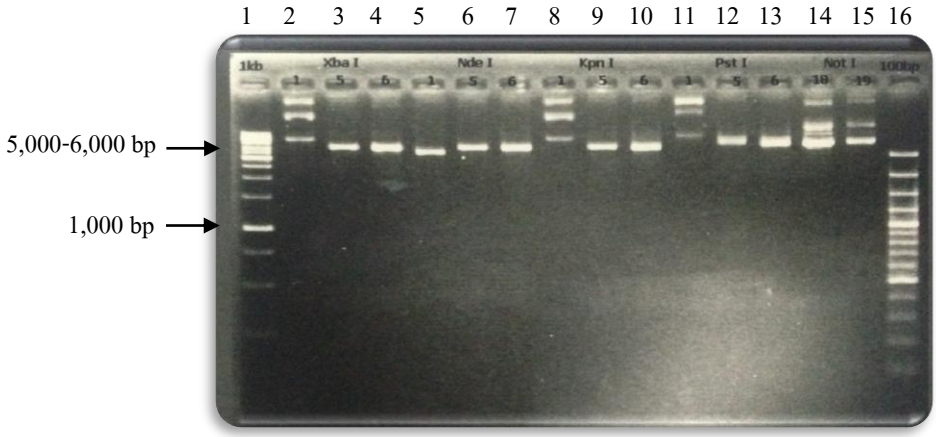
ภาพที่ 4 ลำดับเบสส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Waxy (*Wx* gene) มีขนาดเท่ากับ 1,395 bp

ผลจากการเชื่อมต่อชิ้นยีน (ดีเอ็นเอ) เข้ากับเวคเตอร์สาหร่าย pChlamy_3 Vector ชุดโคลนของ GeneArt Chlamydomonas Engineering Kits และถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α และคัดเลือกชิ้นที่มียีนสอดแทรกเข้ากับเวคเตอร์โดยวิธีคัดเลือกโคโลนีสีขาว (blue white colony sceening) (ภาพที่ 5)



<u>ภาพที่ 5</u> การคัดเลือกชิ้นยีนที่มียีนสอดแทรกเข้ากับเวคเตอร์ pChlamy_3 โดยวิธี blue white colony sceening โดยที่โคลนีสีขาว = มีชิ้นยีนสอดแทรก

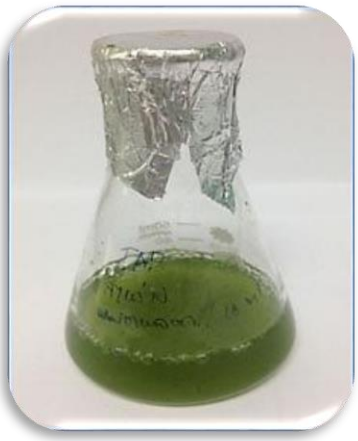
จากการคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้นยีน (ดีเอ็นเอ) สอดแทรกแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB+Ampicillin พบชิ้นโคลนที่สามารถเจริญเติบโตได้ นำมาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ได้แก่ *Xba*I *Nde*I, *Kpn*I, *Pst*I และ *Not*I ผลที่ได้พบว่าเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิดสามารถตัดชิ้นส่วนของพลาสมิดได้ขนาดประมาณ 5,912 bp (ขนาดเวคเตอร์เท่ากับ 4,517 bp รวมกับชิ้น Wx gene ขนาด 1,395 bp เท่ากับ 5,912 bp) ตรงกับที่มีชิ้นยีนสอดแทรกดังเลนที่ 3-4 ตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I เมื่อเทียบกับเลนที่ 2 (uncut) เลนที่ 6-7 ตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I เลนที่ 9-10 ตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I เลนที่ 11-12 ตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I เลนที่ 14-15 ตัดด้วยเอนไซม์ *Not*I เมื่อเทียบกับเลนที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb marker ขนาดของพลาสมิดที่ตัดแล้วประมาณ 5,912 bp (ภาพที่ 6)



<u>ภาพที่ 6</u> การตรวจสอบพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ5 ชนิด ได้แก่ *Xba*I *Nde*I, *Kpn*I, *Pst*I และ *Not*I โดยที่ เลนที่ 1 = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb marker เลนที่ 2,5,8,11 = uncut เลนที่ 3-4 = ตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I เลนที่ 6-7 = ตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I เลนที่ 9-10 = ตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I เลนที่ 11-12 = ตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I เลนที่ 14-15 = ตัดด้วยเอนไซม์ *Not*I

จากการตรวจสอบพลาสมิดแล้วถ่ายยีนที่ได้เข้าสู่เซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* โดยวิธี Electroporation พบว่าที่กระแสไฟ Voltage = 1,500 V , Capacity = 50 V , Resistance = 186 μF สามารถถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* และสามารถต้านอาหารแข็ง TAP ที่มี Hygromycin ได้ (ภาพที่ 7)และสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายที่ได้รับการถ่ายฝากยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์การสังเคราะห์แป้ง amylose/amylopectin (*Wx* gene) ในอาหารเหลว TAP (ภาพที่ 8)

<u>ภาพที่ 7</u> สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ได้รับการถ่ายฝากยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์การสังเคราะห์แป้ง amylose/amylopectin (*Wx* gene) และสามารถต้านอาหารแข็ง TAP ที่มี Hygromycin



<u>ภาพที่ 8</u> สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ได้รับการถ่ายฝากยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์การสังเคราะห์แป้ง amylose/amylopectin (*Wx* gene) และสามารถต้านอาหารเหลว TAP ที่มี Hygromycin.

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (คาร์โบไฮเดรทและกลูโคส) ในเซลล์สาหร่าย

3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรท

ผลการตรวจสอบหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต พบว่า สาหร่ายที่ได้รับการถ่ายยีน (*Wx* gene) *Chlamydomonas reinhardtii* (AWx1) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุด เท่ากับ 77.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ไม่แตกต่างกับ *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 74.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ *Chlamydomonas reinhardtii* (Non Wx) *Chloerlla vulgaris* TISTR 8580 (Control 1))

และ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 (Control 2) ตามลำดับ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 54.26 49.01 และ 25.20 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส

ผลการตรวจสอบหาปริมาณกลูโคส พบว่า *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) มีปริมาณกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 5.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ *Chloerlla vulgaris* TISTR 8580 (Control 1) *Chlamydomonas reinhardtii* (AWx1) *Chlamydomonas reinhardtii* (Non Wx) และ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 (Control 2) ตามลำดับ มีปริมาณกลูโคสเท่ากับ 4.53 2.87 2.30 และ 1.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต และกลูโคส ของสาหร่ายที่ได้รับการถ่ายยีนและสาหร่ายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (*Wx* gene) เปรียบเทียบกับ Control

ชื่อตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	ปริมาณคาร์โบไฮเดรต[1/] (mg/g น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณกลูโคส[1/] (mg/ml)
Control 1	*Chloerlla vulgaris* TISTR 8580	49.01 c	4.53 b
Control 2	*Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260	25.20 d	1.84 d
ADOA4	*Chlorella pyrenoidosa*	74.05 a	5.80 a
AWx1	*Chlamydomonas reinhardtii* (*Wx* gene)	77.05 a	2.87 c
Non Wx	*Chlamydomonas reinhardtii*	54.26 b	2.30 cd
ค่าเฉลี่ย		55.91	3.47
F-test		413.57**	39.47**
CV (%)		3.2	13.1

[1/] = ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

[2/] = ในแนวตั้งอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดย DMRT

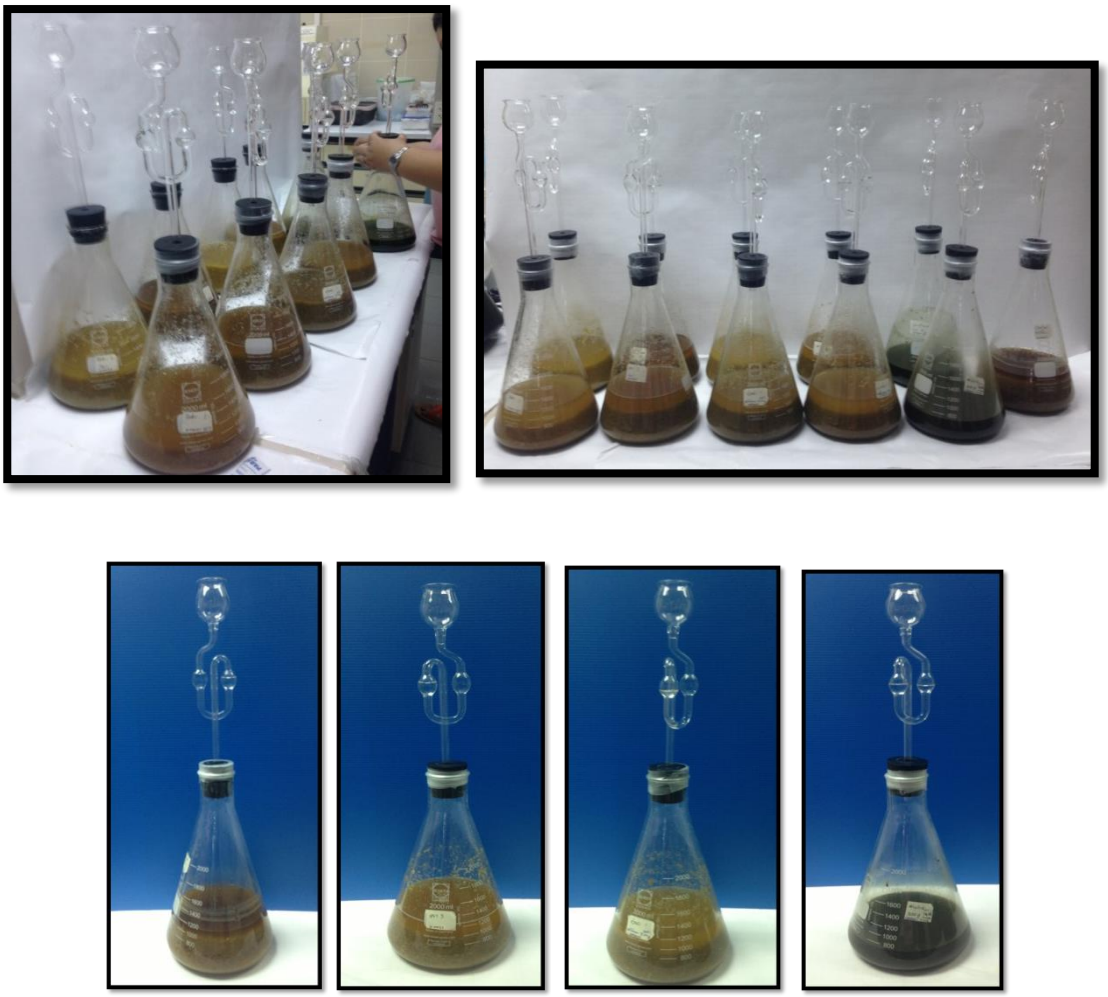
** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

4. ทดสอบกระบวนการหมักสาหร่ายชีวมวลที่ได้กับตัวอย่างพืชที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลในระดับห้องปฏิบัติการ

ผลจากการหมักสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติเปรียบเทียบกับตัวอย่างพืชที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ หญ้าคิงเนเปีย ต้นเลา และอ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) พบว่าสาหร่ายมีการย่อยสลายได้เร็วที่สุดตั้งแต่วันที่ 1 และมีค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเช่นกันเท่ากับ 2.259 mg/ml รองลงมาคือ หญ้าคิงเนเปีย ต้นเลา และ อ้อยพลังงาน มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.569 0.511 และ 0.245 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมัก *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) หญ้าคิงเนเปีย ต้นเลา และ อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) เป็นระยะเวลา 5 วัน

ตัวอย่างพืช	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)**				
	วันที่ 1	**วันที่ 2**	**วันที่ 3**	**วันที่ 4**	**วันที่ 5**
หญ้าคิงเนเปีย	0.569	0.550	0.650	0.687	0.510
ต้นเลา	0.511	0.555	0.555	0.545	0.402
อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ)	0.245	0.249	0.339	0.479	0.349
Chlorella pyrenoidosa (ADOA4)	2.259	2.184	2.112	1.980	1.955



ภาพที่ 9 การหมัก *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) หญ้าคิงเนเปีย ต้นเลา และ อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นระยะเวลา 5 วัน

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถคัดเลือกและเลี้ยงสาหร่ายที่ได้จากธรรมชาติเพื่อนำไปทดสอบในการผลิตเป็นไบโอเอทานอลได้ คือ *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต และกลูโคสสูงสุด เท่ากับ 74.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 5.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
2 สามารถคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณแป้งสูงจากการถ่ายยีน waxy (*Wx* gene) เข้าสู่ pChlamy_3 vector และถ่ายเข้าสู่เซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สำหรับผลิตเอทานอลได้ โดยมีค่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด เท่ากับ 77.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
3. การทดสอบกระบวนการหมักสาหร่ายสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติกับตัวอย่างพืชจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ หญ้าคิงเนเปีย ต้นเลา และ อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) ในระดับห้องปฏิบัติการ เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า สาหร่ายมีการย่อยสลายได้เร็วที่สุดตั้งแต่วันที่ 1 และมีค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเช่นกันเท่ากับ 2.259 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ หญ้าคิงเนเปีย ต้นเลา และ อ้อยพลังงาน ตามลำดับ

การนำไปใช้ประโยชน์

1. สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ที่ขยายและเพิ่มปริมาณได้ในสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต เลี้ยงง่าย สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อนำไปเพิ่มปริมาณและศึกษาเทคโนโลยีการผลิตเป็นไบโอเอทานอลจากสาหร่าย ซึ่งจะนำไปใช้เป็นพลังงานทางเลือกต่อไปได้ในอนาคต
2. สาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณแป้งสูงจากการถ่ายยีน waxy (*Wx* gene) เข้าสู่ pChlamy_3 vector และถ่ายเข้าสู่เซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สำหรับผลิตเอทานอลได้ ซึ่งเป็นแนวทางเบื้องต้นในการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านพลังงานทดแทน และการใช้เทคโนโลยีการผลิตเป็นไบโอเอทานอลจากสาหร่าย เพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานทางเลือกต่อไปได้ในอนาคต
3. สามารถนำเทคโนโลยีการย่อยสลายเซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลส จากเอนไซม์ และกระบวนการหมักเป็นเอทานอลจากเชื้อยีสต์ไปใช้ทดสอบกระบวนการหมักเป็นเอทานอลที่มีขนาดใหญ่และปริมาณมากขึ้นได้

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2552. “สาหร่าย” พลังงานใหม่จากโลกใต้น้ำ. *ว. สื่อพลัง.* 1: 46 - 48.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2548. สาหร่ายน้ำจืดในภาคเหนือของประเทศไทย. โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย. 361 หน้า.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2544. แพลงก์ตอนพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 851 หน้า.

ไปรมา ยงมานิตชัย. 2546. สาหร่าย. http://www.neutron.rmutphysics.com/news/index.php?option=com_content&task=view&id=2654

รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล. 2543. ความหลากหลายของสาหร่ายน้ำจืดในแหล่งน้ำยูโทรฟิค และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *Microcystis aeruginosa* Kutzing. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 188 หน้า.

รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล ภรณี สว่างศรี บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2553. การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ amylase/amylopectin content (waxy gene). รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 156-173.

รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล ภรณี สว่างศรี บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ และ หทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2556. คัดเลือกชนิดสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ที่เหมาะสมกับการผลิตเอทานอลโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล. รายงานผลงานวิจัย ปีงบประมาณ 2556 กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 26 หน้า.

Anonymous. 2009. น้ำมันในอนาคตสกัดจากสาหร่าย. Vol.19, No.1, 2 น. http://www.Green.in.th.

Bold, H.C. and M.J. Wynne. 1978. Introduction to the Algae. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 706 p.

Borowitzka, M.A. 1991. Extraction techniques. Algal Biotechnol. Lab. Murdoch University, New York. 25 p.

Edward G.B. and D.C. Sigee. 2010. Introduction to Freshwater algae : Identification and Use as Bioindicators. John Wile & Sons, Ltd. 40 p.

Gorman, D.S., and R.P. Levine. 1965. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 54, 1665-1669.

Katie, M. 2013. Optimizing Growth of Microalgae for Use as a Potential Biofuel Feedstock. Lawrence Berkeley National Laboratory. Berkeley, California. 22 p.

Lali, A. 2008. Biotechnology for next generation biofuels/bioenergy. ICS Workshop Trieste. DBT-UICT centre of energy biosciences. Institute of chemical technology. Matunga, Mumbai. 20 p.

Life Technologies Corporation. 2003. User guide : GeneArt® Chlamydomonas Engineering Kits for expression of recombinant proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. Carlsbad, California 29 p. http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/geneart_chlamy_kits_man.pdf

Megerle, L.S. and R.C.Wayne. 2013. Achieving pH control in microalgal cultures through fed-batch addition of stoichiometrically-balanced growth media. Scherholz and Curtis BMC Biotechnology. 13 : 39.

Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.M., Marechal-Drouard, L. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. Science. 318, 245-250.

Patrick L. and P. Sorgeloos. 2015. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture : Algae Growing Conditions. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. Ghent, Belgium.

Umemoto, T., Yano, M., Satoh, H. and A. Shomura, 2002. Mapping of a gene responible for the difference in amylopectin structure between japonicatype and indica-type rice varieties. Theor. Appl. Genet. 104, 1-8.

ภาคผนวก 1

TE buffer เตรียม 100 มิลลิลิตร

2 M Tris-HCl pH 8.0	500	ไมโครลิตร
0.5 M EDTA pH 8.0	200	ไมโครลิตร
เติมน้ำให้ครบ	100	มิลลิลิตร

10% SDS เตรียม 100 มิลลิลิตร

SDS	10	กรัม
น้ำ	100	มิลลิลิตร

chloroform : isoamyl alcohol (24:1)

เตรียม 250 มิลลิลิตร

chloroform	240	มิลลิลิตร
isoamyl alcohol	10	มิลลิลิตร

3M NaOAc (pH 5.2) เตรียม 1,000 มิลลิลิตร

Sodium acetate trihydraet	408.1	กรัม
น้ำ	750	มิลลิลิตร
ปรับค่า pH 5.2		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้	1,000	มิลลิลิตร

2XCTAB เตรียม 200 มิลลิลิตร

NaCl	16.36	กรัม
CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)	4	กรัม
2M Tris-HCl (pH 8.0)	10	มิลลิลิตร
0.5M EDTA	8	มิลลิลิตร
PVP-40	2	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 200 มิลลิลิตร		

5M NaCl เตรียม 1,000 มิลลิลิตร

NaCl	292.2	กรัม
เติมน้ำให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

10XTBE buffer เตรียม 1,000 มิลลิลิตร

Tris-base	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40	มิลลิลิตร

ภาคผนวก 2

ตารางผนวกที่ 2.1 อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสูตร Bold's Basal medium (Bold และ Wynne, 1978)

สารอาหาร	ความเข้มข้น
$NaNo_3$	0.025 กรัม/ลิตร
$K_2HPO_4.3H_2O$	0.075 กรัม/ลิตร
KH_2PO_4	0.175 กรัม/ลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.075 กรัม/ลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	0.025 กรัม/ลิตร
NaCl	0.025 กรัม/ลิตร
Ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA)	0.050 กรัม/ลิตร
KOH	0.031 กรัม/ลิตร
$FeSO_4$	0.050 กรัม/ลิตร
H_3BO_3	0.0114 กรัม/ลิตร
Trace element	1.000 มิลลิลิตร/ลิตร
น้ำกลั่น	999 มิลลิลิตร
pH	7.0
Trace element	
$MnCl_2.4H_2O$	0.0014 กรัม/ลิตร
$ZnSO_4.7H_2O$	0.0088 กรัม/ลิตร
MoO_3	0.0007 กรัม/ลิตร
$CuSO_4.5H_2O$	0.0016 กรัม/ลิตร
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.0005 กรัม/ลิตร
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ภาคผนวกที่ 2.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย *Chlamydomonas* สูตร TAP medium (Gorman และ Levine ,1965)

Stock solutions for 1 L of TAP media (adjust final pH to 7.0)

1M Tris base (e.g. Trizma)	20	ml
Phosphate Buffer II	1.0	ml
Solution A	10.0	ml
Hutner's trace elements	1.0	ml
Glacial acetic acid	1.0	ml

*For Tris-minimal medium omit the acetic acid and titrate the final solution to pH 7.0 with HCl

Phosphate Buffer II (for 100 ml)

K2HPO4	10.8	g
KH2PO4	5.6	g

Solution A (for 500 ml)

NH4Cl	20	g
MgSO4-7H2O	5	g
CaCl2-2H2O	2.5	g

Hutner's trace elements (Hutner *et al*., 1950)

เตรียมสารละลาย 1 ลิตร โดยผสมสารละลายตามลำดับ โดยเฉพาะสารละลาย EDTA ต้องทำให้ละลายโดยการต้ม และ FeSO4 ควรเตรียมลำดับสุดท้ายเพื่อป้องกันการเกิด oxidation

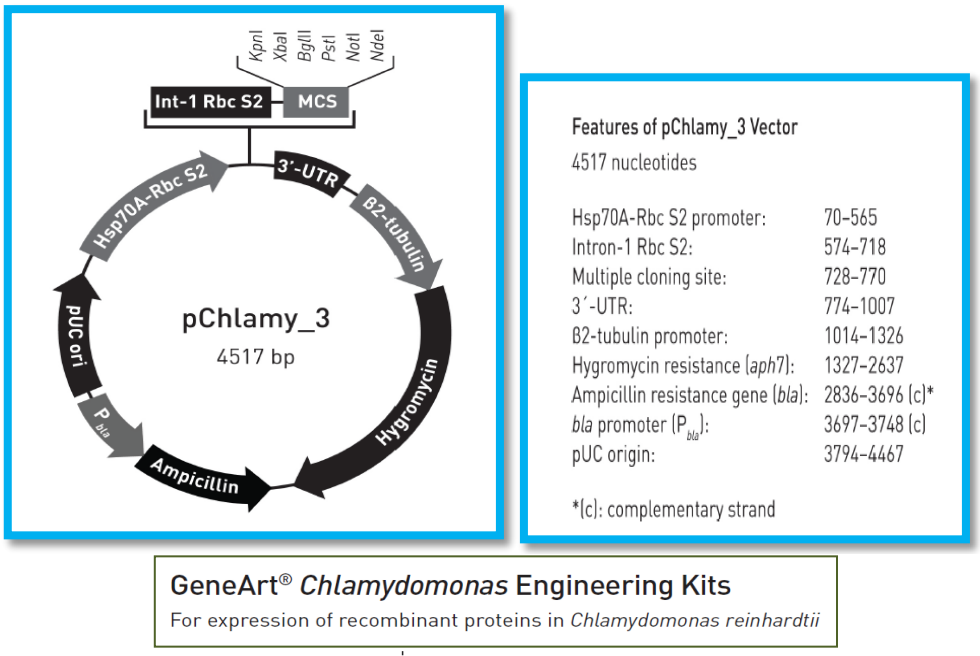
EDTA disodium salt	50 g	+ น้ำ 250 ml
ZnSO4. 7 H2O	22 g	+ น้ำ 100 ml
H3BO3	11.4 g	+ น้ำ 200 ml
MnCl2. 4 H2O	5.06 g	+ น้ำ 50 ml
CoCl2. 6 H2O	1.61 g	+ น้ำ 50 ml
CuSO4.5H2O	1.57 g	+ น้ำ 50 ml
(NH4)6Mo7O24. 4 H2O	1.10 g	+ น้ำ 50 ml
FeSO4. 7 H20	4.99 g	+ น้ำ 50 ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ยกเว้น EDTA ต้องทำละลายด้วยการนำไปต้ม จากนั้นเติม EDTA solution เมื่อผสมเข้ากันแล้วสารละลายจะเป็นสีเขียว นำตั้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงอยู่ที่ 70 องศาเซลเซียส แล้วเติม KOH (20%) ปริมาตร 85 ml จากนั้นตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 6.7 และเก็บในตู้เย็น ควรใช้ขวดสีชาหรือฟอยหุ้มป้องกันแสง

ภาคผนวก 3

ตารางผนวก 3.1 แสดงลำดับเบสเริ่มต้นและสิ้นสุดของยีน waxy บริเวณส่วนที่มีการแสดงออกขอยีน (exon) จำนวน 14 ชิ้น

ลำดับชิ้นยีน	ชิ้นส่วนของยีน exon	สายดีเอ็นเอ		ความยาว exon (bp)
		เริ่มต้น (bp)	สิ้นสุด (bp)	
1	Initial exon (ATG to 5' splice site)	1200	1260	61
2	Internal exon (3' to 5' splice site)	1298	1506	209
3	Internal exon (3' to 5' splice site)	1649	1729	81
4	Internal exon (3' to 5' splice site)	1836	1934	99
5	Internal exon (3' to 5' splice site)	2031	2120	90
6	Internal exon (3' to 5' splice site)	2220	2283	64
7	Internal exon (3' to 5' splice site)	2376	2476	101
8	Internal exon (3' to 5' splice site)	2568	2677	110
9	Internal exon (3' to 5' splice site)	2858	3041	184
10	Internal exon (3' to 5' splice site)	3577	3639	63
11	Internal exon (3' to 5' splice site)	3875	3961	87
12	Internal exon (3' to 5' splice site)	4071	4199	129
13	Terminal exon (3' to stop codon)	4557	4673	117
14	poly-A signal (consensus: AATAAA)	4883	4888	6



ภาพผนวก 3.1 ชุดเวคเตอร์ pChlamy_3 ที่ใช้สำหรับถ่ายยีน Waxy เข้าสู่เซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas*

```
TTGAGTGAGC TGATACCGCT CGCCGCAGCC GAACGACCGA GCGCAGCGAG TCAGTGAGCG AGGAAGCGGT CGCTGAGGCT TGACATGATT   90
GGTGCGTATG TTTGTATGAA GCTACAGGAC TGATTTGGCG GGCTATGAGG GCGGGGGAAG CTCTGGAAGG GCCGCGATGG GGCGCGCGGC  180
GTCCAGAAGG CGCCATACGG CCCGCTGGCG GCACCCATCC GGTATAAAAG CCCGCGACCC CGAACGGTGA CCTCCACTTT CAGCGACAAA  270
CGAGCACTTA TACATACGCG ACTATTCTGC CGCTATACAT AACCACTCAG CTAGCTTAAG ATCCCATCAA GCTTGCATGC CGGGCGCGCC  360
AGAAGGAGCG CAGCCAAACC AGGATGATGT TTGATGGGGT ATTTGAGCAC TTGCAACCCT TATCCGGAAG CCCCCTGGCC CACAAAGGCT  450
AGGCGCCAAT GCAAGCAGTT CGCATGCAGC CCCTGGAGCG GTGCCCTCCT GATAAACCGG CCAGGGGGCC TATGTTCTTT ACTTTTTTAC  540
AAGAGAAGTC ACTCAACATC TTAAAATGGC CAGGTGAGTC GACGAGCAAG CCCGGCGGAT CAGGCAGCGT GCTTGCAGAT TTGACTTGCA  630
ACGCCCGCAT TGTGTCGACG AAGGCTTTTG GCTCCTCTGT CGCTGTCTCA AGCAGCATCT AACCCTGCGT CGCCGTTTCC ATTTGCAGGA  720
GATTCGAGGT ACCATACAGT TCTAGAGATC TCTGCAGCGG CCGCCATATG ATTCCGCTCC GTGTAAATGG AGGCGCTCGT TGATCTGAGC  810
CTTGCCCCCT GACGAACGGC GGTGGATGGA AGATACTGCT CTCAAGTGCT GAAGCGGTAG CTTAGCTCCC CGTTTCGTGC TGATCAGTCT  900
TTTTCAACAC GTAAAAAGCG GAGGAGTTTT GCAATTTTGT TGGTTGTAAC GATCCTCCGT TGATTTTGGC CTCTTTCTCC ATGGGCGGGC  990
TGGGCGTATT TGAAGCGCGA ATGTCTTTCT TGCGCTATGA CACTTCCAGC AAAAGGTAGG GCGGGCTGCG AGACGGCTTC CCGGCGCTGC 1080
ATGCAACACC GATGATGCTT CGACCCCCCG AAGCTCCTTC GGGGCTGCAT GGGCGCTCCG ATGCCGCTCC AGGGCGAGCG CTGTTTAAAT 1170
AGCCAGGCCC CCGATTGCAA AGACATTATA GCGAGCTACC AAAGCCATAT TCAAACACCT AGATCACTAC CACTTCTACA CAGGCCACTC 1260
GAGCTTGTGA TCGCACTCCG CTAAGGGGGC GCCTCTTCCT CTTCGTTTCA GTCACAACCC GCAAACATGA CACAAGAATC CCTGTTACTT 1350
CTCGACCGTA TTGATTCGGA TGATTCCTAC GCGAGCCTGC GGAACGACCA GGAATTCTGG GAGGTGAGTC GACGAGCAAG CCCGGCGGAT 1440
CAGGCAGCGT GCTTGCAGAT TTGACTTGCA ACGCCCGCAT TGTGTCGACG AAGGCTTTTG GCTCCTCTGT CGCTGTCTCA AGCAGCATCT 1530
AACCCTGCGT CGCCGTTTCC ATTTGCAGCC GCTGGCCCGC CGAGCCCTGG AGGAGCTCGG GCTGCCGGTG CCGCCGGTGC TGCGGGTGCC 1620
CGGCGAGAGC ACCAACCCCG TACTGGTCGG CGAGCCCGGC CCGGTGATCA AGCTGTTCGG CGAGCACTGG TGCGGTCCGG AGAGCCTCGC 1710
GTCGGAGTCG GAGGCGTACG CGGTCCTGGC GGACGCCCCG GTGCCGGTGC CCCGCCTCCT CGGCCGCGGC GAGCTGCGGC CCGGCACCGG 1800
AGCCTGGCCG TGGCCCTACC TGGTGATGAG CCGGATGACC GGCACCACCT GGCGGTCCGC GATGGACGGC ACGACCGACC GGAACGCGCT 1890
GCTCGCCCTG GCCCGCGAAC TCGGCCGGGT GCTCGGCCGG CTGCACAGGG TGCCGCTGAC CGGGAACACC GTGCTCACCC CCCATTCCGA 1980
GGTCTTCCCG GAACTGCTGC GGGAACGCCG CGCGGCGACC GTCGAGGACC ACCGCGGGTG GGGCTACCTC TCGCCCCGGC TGCTGGACCG 2070
CCTGGAGGAC TGGCTGCCGG ACGTGGACAC GCTGCTGGCC GGCCGCGAAC CCCGGTTCGT CCACGGCGAC CTGCACGGGA CCAACATCTT 2160
CGTGGACCTG GCCGCGACCG AGGTCACCGG GATCGTCGAC TTCACCGACG TCTATGCGGG AGACTCCCGC TACAGCCTGG TGCAACTGCA 2250
TCTCAACGCC TTCCGGGGCG ACCGCGAGAT CCTGGCCGCG CTGCTCGACG GGGCGCAGTG GAAGCGGACC GAGGACTTCG CCCGCGAACT 2340
GCTCGCCTTC ACCTTCCTGC ACGACTTCGA GGTGTTCGAG GAGACCCCGC TGGATCTCTC CGGCTTCACC GATCCGGAGG AACTGGCGCA 2430
GTTCCTCTGG GGGCCGCCGG ACACCGCCCC CGGCGCCTGA TAAGGATCCG GCAAGACTGG CCCCGCTTGG CAACGCAACA GTGAGCCCCT 2520
CCCTAGTGTG TTTGGGGATG TGACTATGTA TTCGTGTGTT GGCCAACGGG TCAACCCGAA CAGATTGATA CCCGCCTTGG CATTTCCTGT 2610
CAGAATGTAA CGTCAGTTGA TGGTACTTGC GGTATTTCAC ACCGCATCAG GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG 2700
TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT AAAAATGAAG 2790
TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT 2880
ATTTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACTACGA TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT 2970
ACCGCGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT 3060
ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG TTGCCATTGC 3150
TACAGGCATC GTGGTGTCAC GCTCGTCGTT TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT 3240
GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTCAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC 3330
ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT 3420
GCGGCGACCG AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AATACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG 3510
TTCTTCGGGG CGAAAACTCT CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTCAGCATC 3600
TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGGAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT 3690
ACTCATACTC TTCCTTTTTC AATATTATTG AAGCATTTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA 3780
CTGAGCGTCA GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAAACC 3870
ACCGCTACCA GCGGTGGTTT GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAAA 3960
TACTGTTCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC 4050
AGTGGCTGTT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC 4140
GGGGGGTTCG TGCACACAGC CCAGCTTGGA GCGAACGACC TACACCGAAC TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT 4230
TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG 4320
GTATCTTTAT AGTCCTGTCG GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG GGGCGGAGCC TATGGAAAAA 4410
CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG CTCACATGTT CTTTCCTGCG TTATCCCCTG ATTCTGTGGA 4500
TAACCGTATT ACCGCCT  4517
```

ภาพผนวก 3.2 แสดงลำดับเบสของเวคเตอร์ pChlamy_3