



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพโดย
ไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis*

Potential for biohydrogen production by
cyanobacteria *Spirulina platensis*

โดย

อ.ดร.วุฒินันท์ รักษาจิตร

คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พฤษภาคม 2555

สัญญาเลขที่ MRG5380025

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพโดย
ไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis*
Potential for biohydrogen production by
cyanobacteria *Spirulina platensis*

ผู้วิจัย

อ.ดร.วุฒินันท์ รักษาจิตร

คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ปี 2553 (MRG5380025) ภายใต้ความร่วมมือของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.), สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (มว.9.53) ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ที่ให้คำแนะนำงานวิจัย คำปรึกษาในการดำเนินการทดลองและการตีพิมพ์วารสาร ขอขอบคุณ Assoc. Prof. Dr. Pirkko Mäenpää และ Assoc. Prof. Dr. Kirsi Lehto Department of Biochemistry and Food Chemistry, Laboratory of Molecular Plant Biology, Turku, Finland ที่ให้คำแนะนำและแก้ไข Manuscript ขอขอบคุณนายคมสัน สัจจะสถาพร ที่ช่วยเหลือในการจัดหาอุปกรณ์การทดลอง ขอขอบคุณคณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสิ่งอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย ขอขอบคุณคุณแพมมาลา อุทะนุต์ ที่ให้ความช่วยเหลือเรื่องข้อมูลและเอกสารเกี่ยวกับทุน ขอขอบคุณครอบครัวรักษาจิตรและเพื่อนๆทุกคนครับ

อ.ดร.วุฒินันท์ รักษาจิตร
ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3
Abstract	5
บทคัดย่อ	6
Executive summary	7
บทนำ	9
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	13
วิธีการทดลอง	14
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	18
สรุปผลการทดลอง	36
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	40

Abstract

Project Code : MRG5380025

Project Title : Potential for biohydrogen production by cyanobacteria *Spirulina platensis*

Investigator : Dr. Wuttinun Raksajit, Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University

E-mail Address: cvtwnr@ku.ac.th

Project Period : 2 years

The potential for H₂ production which varies among different cyanobacterial species depends on several external factors. The filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005 requires various factors enhancing H₂ production. *Arthrospira* cells adapted to dark-anaerobic conditions produced hydrogen consistent with increased hydrogenase activity when supplemented with iron. H₂ production could be stimulated by addition of reductants, either dithiothreitol or β-mercaptoethanol with higher production observed with the latter. Additionally, β-Mercaptoethanol and iron added to nitrogen- and sulphur-deprived cells significantly stimulated H₂ production with maximal value of $5.91 \pm 0.14 \mu\text{mol mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Glucose and a small increase of osmolality obtained with different NaCl and sorbitol concentrations enhanced H₂ production. H₂ production increased with increasing external pH from 6.0 to 11.0, whereas a sharp drop in the production occurred at pH 5.0. The steady state transcriptional levels of genes, namely *hoxE*, *hoxF* and *hoxH*, were examined under dark-anaerobic conditions in response to external factors. The steady-state amounts of the *hoxE*, *hoxF* and *hoxH* transcripts of adapted cells were up-regulated under nitrogen- and sulphur deprivation in the presence of iron, NaCl, glucose or reductants.

Keywords : *Arthrospira* sp. PCC8005, Hydrogen production, Hydrogenase, *hox* gene, cyanobacteria

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5380025

ชื่อโครงการ : โครงการศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพโดยไซยาโนแบคทีเรีย

Spirulina platensis

ชื่อนักวิจัย : อ.ดร. วุฒินันท์ รักษาจิตร คณะเทคนิคการสัตวแพทยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail Address: cvtwnr@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

ไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ต้องการปัจจัยภายนอกในการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ พบว่า *Arthrospira* sp. PCC8005 ที่ปรับตัวในอาหารเลี้ยง Zarrouk ซึ่งขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจน (ZN_0) เลี้ยงภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจนและไม่มีแสง สามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้มากกว่าในอาหารเลี้ยง Zarrouk โดยอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพมีความสัมพันธ์กับอัตราการเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เมื่อมีเติมธาตุเหล็กลงในอาหาร ZN_0 พบว่าการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพเพิ่มขึ้น การเติมตัวรีดิวซ์ β -Mercaptoethanol เพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ดีกว่าการเติมตัวรีดิวซ์ Dithiothreitol นอกจากนี้พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง ZN_0 ที่แร่ธาตุซัลเฟอร์และมีการเติมธาตุเหล็ก 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 1.5 มิลลิโมลาร์ของ β -Mercaptoethanol สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้สูงที่สุดเท่ากับ 5.91 ± 0.14 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง การเติมน้ำตาล กลูโคสและภาวะออสโมลาริตีจากเกลือ NaCl หรือน้ำตาล Sorbitol เพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพเช่นกัน ช่วงพีเอช 6.0 ถึงพีเอช 11.0 เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพเพิ่มขึ้นและแต่ อัตราการผลิตลดลงที่พีเอช 5.0 ผลของปัจจัยภายนอกต่อการแสดงออกของยีน *hoxH*, *hoxE*, และ *hoxY* พบว่าภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจนและไม่มีแสง เซลล์ที่ปรับตัวในอาหารเลี้ยง ZN_0 จากปัจจัยภายนอกเช่นการขาดแหล่งธาตุอาหารซัลเฟอร์ การเพิ่มธาตุเหล็ก เกลือ NaCl น้ำตาล กลูโคสและตัวรีดิวซ์ มีการแสดงออกของยีน *hoxH*, *hoxE*, และ *hoxY* เพิ่มขึ้น

คำสำคัญ : *Arthrospira* sp. PCC8005, การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ, ไฮโดรจีเนส, ยีน *hox*, ไซยาโนแบคทีเรีย

Executive Summary

พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่สะอาด เป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อถูกเผาไหม้ด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน ไม่มีก๊าซเรือนกระจกเกิดขึ้น ไสยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถใช้แสงอาทิตย์และคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศมาเปลี่ยนเป็นพลังงานในรูปกลูโคสผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและสามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ผ่านการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ไสยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 หรือที่รู้จักกันดีทางการค้าว่า *Spirulina* มีโครงสร้างแบบเกลียว เจริญเติบโตได้ง่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ Zarrouk ที่มีค่าพีเอชเป็นด่าง สามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ งานวิจัยนี้ต้องการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพให้ได้ปริมาณสูงที่สุด พบว่าปริมาณธาตุเหล็กที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยง Zarrouk มีผลต่ออัตราการเจริญของ *Arthrospira* sp. PCC 8005 ในสภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีแสง *Arthrospira* sp. PCC 8005 ที่ปรับตัวในอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (ZN_0) สามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ พบว่าการเพิ่มธาตุเหล็กในอาหารเลี้ยง ZN_0 เพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็กในอาหารเลี้ยง ZN_0 พบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพและแอกติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสลดลง เมื่อมีปริมาณธาตุเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ ZN_0 เท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 4.37 ± 0.15 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมงและพบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงสุดเท่ากับ 0.47 ± 0.02 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง การเพิ่มธาตุเหล็กที่ได้จากสารประกอบ FeSO_4 และ FeCl_2 ลงไปในอาหาร ZN_0 ให้ผลไม่แตกต่างกัน *Arthrospira* sp. PCC8005 สามารถเจริญได้ปกติในสภาวะที่ไม่มีแสงและสามารถใช้กลูโคสหรือฟรุคโตสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนแทนไบคาร์บอเนต (ZN_0C_0) แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ เซลล์จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแต่ก็ยังเจริญ เซลล์ผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ปริมาณสูงในอาหารเลี้ยง ZN_0C_0 ที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสที่ 0.1% เท่ากับ 3.61 ± 0.17 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสสูงกว่า 0.2% ทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพลดลง การเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงมีผลต่อการเจริญและอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของ *Arthrospira* sp. PCC8005 พบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพลดลงในอาหารเลี้ยงที่มีความเป็นกรดที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 และอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพเพิ่มขึ้นในช่วงพีเอช 6.0 ถึง พีเอช 9.0 โดยที่เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอช 9.0 เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 2.99 ± 0.18 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามการเพิ่มพีเอชสูงกว่า 10.0 อัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพลดลง การเปลี่ยนแปลงพีเอชภายนอกด้วยการควบคุมด้วยบัฟเฟอร์มีผลต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ พบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพเพิ่มขึ้นตั้งแต่พีเอชภายนอกเป็น 5.0 ถึงพีเอช 11.0 โดยเมื่อพีเอชภายนอกเท่ากับ 11.0 เซลล์มีอัตราการผลิต

ไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงสุดเท่ากับ 3.10 ± 0.25 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ในอาหารเลี้ยง ZN_0 ที่มีการเติมตัวรีดิวซ์ β -Mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ 1.5 เท่าโดยมีปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงสุดเท่ากับ 3.90 ± 0.15 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ขณะที่การเติมตัวรีดิวซ์ Dithiothreitol ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ ในอาหารเลี้ยง ZN_0 ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ (ZN_0 -S-deprived) เซลล์เพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงกว่าปกติถึง 1.4 เท่า เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง (ZN_0 -S-deprived) ซึ่งมีการเติมธาตุเหล็ก 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและตัวรีดิวซ์ β -Mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้สูงที่สุดเท่ากับ 5.91 ± 0.14 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง การเติมเกลือ NaCl หรือน้ำตาล sorbitol ที่ระดับออสโมลาริตีประมาณ 5 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัม กระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงขึ้นประมาณ 35% อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มระดับออสโมลาริตีสูงกว่า 5 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัม การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ลดลงอย่างรวดเร็ว การแสดงออกของยีน *hox* เมื่อเปรียบเทียบกับยีน 23S rRNA (internal control) ของเซลล์ที่ปรับตัวในอาหารเลี้ยง ZN_0 ภายใต้อาการเครียดจากปัจจัยภายนอกเช่นการเพิ่มธาตุเหล็ก 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือการเติมตัวรีดิวซ์ β -Mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์หรือการเติมน้ำตาลกลูโคสที่ 0.1% ลงในอาหาร ZN_0C_0 หรือการเติมเกลือ NaCl 2 มิลลิโมลาร์ลงในอาหาร ZN_0 รวมทั้งการขาดแหล่งธาตุอาหารซัลเฟอร์ กระตุ้นการแสดงออกของยีน *hoxH*, *hoxE*, และ *hoxY* เพิ่มขึ้น พบว่าภาวะที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง (ZN_0 -S-deprived) และมีการเพิ่มธาตุเหล็ก 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและตัวรีดิวซ์ β -Mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ *hoxH*, *hoxE*, และ *hoxY* มีการแสดงออกสูงที่สุด

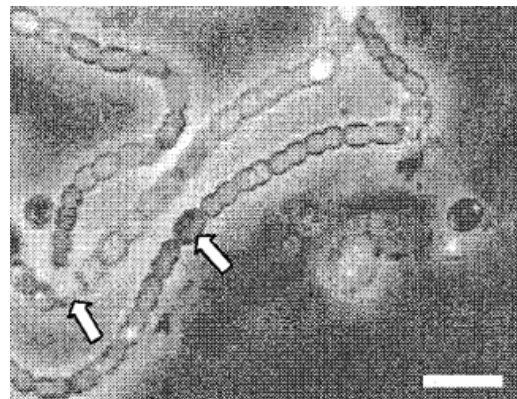
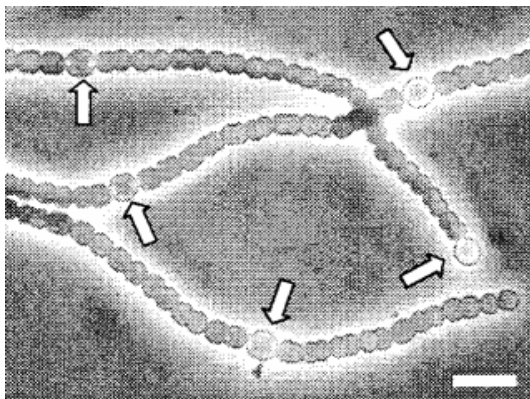
บทนำ

วิกฤตการณ์ด้านพลังงานและปัญหาสิ่งแวดล้อมเริ่มส่งผลกระทบโดยตรงต่อวิถีการดำรงชีวิตของมนุษย์ในปัจจุบัน เช่นปัญหาวิกฤตน้ำมัน ราคาน้ำมันที่มีความผันผวนและพุ่งสูงขึ้นในช่วงเวลาที่ผ่านมาและคาดว่าจะมีราคาสูงขึ้นอีกในอนาคตอันใกล้ ซึ่งเกิดจากความต้องการใช้พลังงานที่มากเกินไป จากข้อมูลของกระทรวงพลังงาน รายงานว่าพลังงานหลักของประเทศได้มาจากแหล่งพลังงานฟอสซิลและน้ำมันดิบ ซึ่งแหล่งพลังงานดังกล่าวถูกนำมาใช้ในด้านต่างๆ ทั้งภาคการขนส่ง และภาคการเกษตรกรรม ส่งผลให้ในปัจจุบันเกิดความขาดแคลนพลังงานฟอสซิลจนอยู่ในขั้นวิกฤต นอกจากนี้พบว่าพลังงานที่เกิดจากการสันดาป (Combustion) เชื้อเพลิงฟอสซิลหรือน้ำมันดิบไม่ว่าในด้านใดก็ตาม จะมีการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก (Greenhouse gas) อันได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ มีเทน และไดไนโตรเจนออกไซด์ ออกมาด้วยทุกครั้งไป ก๊าซดังกล่าวส่งผลต่อการเกิดภาวะโลกร้อน (Global warming) โดยตรงตามมา ซึ่งผลกระทบนี้ไม่อาจแก้ไขได้เพียงชั่วข้ามคืน ต้องค่อยเป็นค่อยไป ด้วยการลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจกและปรับเปลี่ยนพฤติกรรม การดำเนินชีวิต ดังนั้น ในปัจจุบันการศึกษาค้นคว้าวิจัยเพื่อเสาะหาแหล่งพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ เข้ามาใช้ เพื่อลดอัตราการนำเข้าพลังงานเชื้อเพลิงและลดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานทดแทนอีกแนวทางหนึ่งที่มีการนำมาใช้ ด้วยเหตุผลเชิงบวกหลายอย่าง เช่น พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่มีศักยภาพสูงที่ให้ค่าความร้อนสูงถึง 141.65 MJ/kg ก๊าซไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด (clean fuel) เป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อถูกเผาไหม้ด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน ไม่มีก๊าซเรือนกระจกเกิดขึ้น ปัจจุบันมีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงในหลายด้าน แต่ต้นทุนการผลิตยังคงสูงอยู่ นักวิจัยและนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจึงหันมาสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่า ไฮโดรเจนชีวภาพ (biohydrogen) เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่ากระบวนการทางเคมี สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ ไชยาโนแบคทีเรีย และแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสง เป็นต้น ไชยาโนแบคทีเรียสามารถนำเอาพลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดและคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศมาใช้เป็นแหล่งพลังงานในรูปกลูโคสผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง อีกทั้งสามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ผ่านการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) และเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาหลักการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพจากไชยาโนแบคทีเรียเพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนในอนาคต

ไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงานยั่งยืน (Sustainable energy) อีกแหล่งหนึ่งที่มีศักยภาพสูง เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและปราศจากมลพิษ ก๊าซไฮโดรเจนถูกผลิตขึ้นได้จากกระบวนการทางเคมีและชีวภาพ สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ ไชยาโนแบคทีเรีย (Tamagnini et al., 2002, Lopes Pinto et al., 2002) และแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสง เป็นต้น ไชยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยมีเอนไซม์ 2 ชนิดเกี่ยวข้องได้แก่

เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ซึ่งพบใน heterocyst (รูปที่ 1) ของไซยาโนแบคทีเรียแบบเส้นสาย (filamentous cyanobacteria) (Masepohl et al., 1997, Moezalaar et al., 1996, Orme-Johnson, 1992) โดยที่โมเลกุลไนโตรเจนจะถูกตรึงไปเป็นแอมโมเนียโดยใช้พลังงาน ATP (รูปที่ 2) เอนไซม์ไนโตรจีเนส ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ไดไนโตรจีเนส (dinitrogenase; ถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *nifD* และ *nifK*) และไดไนโตรจีเนส รีดักเทส (dinitrogenase reductase; ถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *nifH*) (รูปที่ 3)

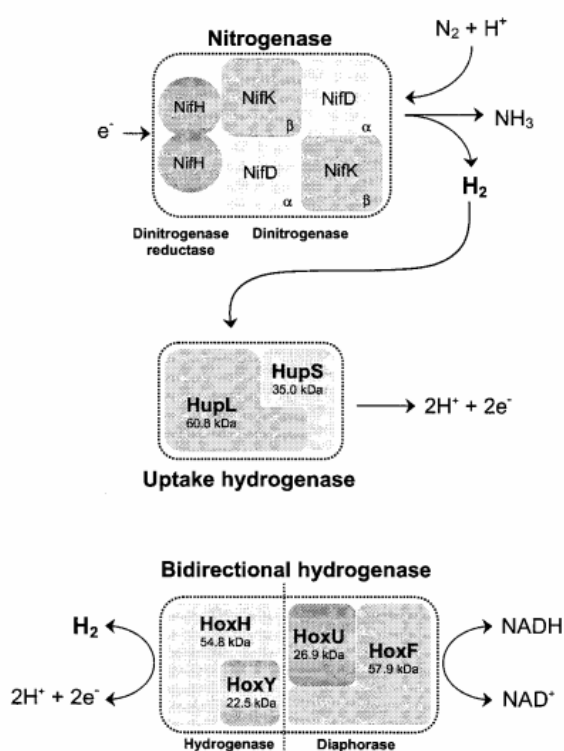
เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ซึ่งพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์รวมทั้ง *Spirulina* sp. เอนไซม์ไฮโดรจีเนส แบ่งออกได้ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์อัพเทค ดีไฮโดรจีเนส (uptake dehydrogenase; ถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *hupSL*) ซึ่งพบได้ที่เยื่อไทลาคอยด์ของ heterocyst ของไซยาโนแบคทีเรียแบบเส้นสาย (Tamagnini et al., 2002) มีหน้าที่ในการออกซิไดซ์ไฮโดรเจน (รูปที่ 2 และ รูปที่ 3) และเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิล ไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase; ถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *hoxFUEYH*) หรือมีชื่อเรียกอีกว่า เอนไซม์ไบไดเรกชันนัล ไฮโดรจีเนส (bidirectional hydrogenase) ซึ่งพบได้ที่เยื่อไซโตพลาสซึมของเซลล์กลไกการทำงานที่แท้จริงของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิล ไฮโดรจีเนส ยังไม่ทราบมากนัก สันนิษฐานว่ามีบทบาทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ H_2 (Boison et al., 1999) (รูปที่ 3)



รูปที่ 1 การปรากฏของ heterocysts (หัวลูกศร) ในไซยาโนแบคทีเรียชนิดตรึงไนโตรเจน *Anabaena* strain PCC7120 (ซ้าย) และ *Nostoc* strain PCC73102 (ขวา), — 10 μm (Tamagnini et al., 2002)

Nitrogenase $16\text{ATP} + 16\text{H}_2\text{O} + \text{N}_2 + 10\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow 16\text{ADP} + 16\text{PPi} + 2\text{NH}_4^+ + \text{H}_2$
Hydrogenase $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$

รูปที่ 2 สมการเคมีแสดงปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและไนโตรจีเนส (Tamagnini et al., 2002)



รูปที่ 3 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับไฮโดรเจนเมตาบอลิซึม

3.1 เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 3 ส่วนคือ โปรตีน NifD, NifK และ NifH

3.2 เอนไซม์อัพเทค ดีไฮโดรจีเนส (uptake dehydrogenase) ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 2 ส่วนคือ โปรตีน HupS และ HupL

3.3 เอนไซม์ไบไดเรกชันนัล ดีไฮโดรจีเนส (bidirectional dehydrogenase) ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 4 ส่วนคือ โปรตีน HoxH, HoxY, HoxU และ HoxF

หน่วยย่อยของแต่ละเอนไซม์อ้างอิงจากลำดับกรดอะมิโนของ *Anabaena* strain PCC7120, *Nostoc* strain PCC 73102, *A. variabilis* ATCC 29413, และ *A. variabilis* ATCC 29413. (Datta et al., 2005)

เอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำงานได้ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน เนื่องด้วยออกซิเจนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดี นอกจากนี้ปัจจัยภายนอกอื่นยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และส่งผลกระทบต่อศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน อาทิ ความเข้มข้น อุณหภูมิ แสง ความเค็ม สารอาหารและแร่ธาตุ เช่น โคบอลต์ (Co) คอปเปอร์ (Cu) โมลิบดีนัม (Mo) นิกเกิล (Ni) เหล็ก (Fe) สังกะสี (Zn) แหล่งอาหารคาร์บอน แหล่งอาหารไนโตรเจน เป็นต้น มีรายงานวิจัยในปัจจุบันศึกษาผลกระทบของปัจจัยภายนอกต่อศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย อาทิเช่น *Synechococcus* PCC7942 ผลิตไฮโดรเจนได้ดีในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนและที่ไม่มีแสง (Asada and Miyake, 1999) ขณะที่ *Nostoc muscorum* ผลิตได้ดีในที่มีแสงมากกว่าที่ไม่มีแสง (Shah et al., 2003) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่ธาตุ Co, Cu, Mn, Zn, Ni, Fe

ความเข้มข้นน้อยกว่า 10 มิลลิโมลาร์ *Anabaena variabilis* ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ (Serebryakova et al., 2000) *Anabaena variabilis* SPU003 ผลิตไฮโดรเจนได้ภายใต้อุณหภูมิเลี้ยง 30 องศาเซลเซียส (Moezelaar and Stal, 1994, Flores and Herrero, 1994) ขณะที่ *Nostoc muscorum* SPU004 สามารถผลิตได้ภายใต้อุณหภูมิเลี้ยง 40 องศาเซลเซียส (Datta et al., 2000) *Gloeocapsa alpicola* และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Antal et al., 2005) ผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH 5.0-5.5 *Gloeocapsa alpicola* (Antal et al., 2005) *Anabaena cylindrica* (Jeffries et al., 1978) ผลิตไฮโดรเจนได้ดีในสภาวะความเข้มแสงแสงน้อยหรือขาดแหล่งอาหารไนโตรเจน ขณะที่ *Nostoc punctiforme* NHM5 (Lindberg et al., 2004) ที่ขาดเอนไซม์ hydrogenase เพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนได้ในที่มีแสงมาก

ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 หรือที่รู้จักกันดีทางการค้าว่า *Spirulina* มีโครมรูปแบบเกลียว จัดอยู่ในดิวิชัน Cyanophyta, คลาส Cyanophyceae, ออร์เดอร์ Oscillatoriales, แฟมิลี Oscillatoriaceae เจริญเติบโตได้ง่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ Zarrouk ที่มีค่า pH เป็นด่าง *Arthrospira* sp. สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาวะปราศจากออกซิเจนทั้งที่มีแสงและไม่มีแสง (Aoyama et al., 1997, Behera et al., 2007) อย่างไรก็ตาม รายงานเกี่ยวกับการศึกษาระดับโมเลกุลของยีนที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพจาก *Arthrospira* sp. ยังมีไม่มากนัก ดังนั้น ในโครงการวิจัยนี้ ศึกษาศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของ *Arthrospira* sp. PCC8005 และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนในระดับแอกติวิตีและชีววิทยาโมเลกุล

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005
2. ศึกษาการแสดงออกของยีนไฮโดรจีเนสจากไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005

วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005

เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Zarrouk ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งมีความเข้มแสง 40 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ณ อุณหภูมิภายนอกคงที่ 32°C และมีการเขย่าตลอดเวลา วัดการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร สำหรับสภาวะเครียด (stress conditions) เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Zarrouk (Z) ที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะได้แก่ พีเอชของอาหารเลี้ยง พีเอชของสภาวะการทดลอง ความเพียงพอของแร่ธาตุหรือสารอาหาร อาทิการเปลี่ยนแหล่งธาตุอาหารคาร์บอนโดยการใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตสและซูโครสแทนสารประกอบไบคาร์บอเนต ภาวะขาดไนเตรต (ZN_0) ภาวะขาดธาตุซัลเฟอร์ ($\text{ZN}_0\text{-S-deprived}$) ภาวะปราศจากก๊าซออกซิเจน ภาวะออสโมติกจากการเติมเกลือ NaCl หรือน้ำตาล sorbitol การเติมสาร Reductants หรือตัวรีดิวซ์ เช่น dithiothreitol or β -mercaptoethanol ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Kirsi Lehto, Laboratory of Plant Physiology and Molecular Biology, Department of Biochemistry and Food Chemistry, University of Turku, Finland

2. การสกัดอาร์เอ็นเอจากไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005

ปั่นเก็บเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ในระยะ logarithmic phase นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000×g 15 นาที นำเซลล์แช่ในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นจึงนำเซลล์ดังกล่าวมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Hot phenol (Jantaro et al. 2006) นำเซลล์ที่แข็งตัวมาหลอมละลาย จากนั้นย้ายของเหลวใส่หลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 1 ml เติม Resuspension buffer (10 mM sodium acetate buffer pH 4.5, 0.3 M sucrose) ปริมาตร 250 μl และเติม 250 mM EDTA buffer pH 8.0 ปริมาตร 75 μl จากนั้นปั่นไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม Lysis buffer (2% SDS, 10 mM sodium acetate buffer pH 4.5) ปริมาตร 375 μl และปั่นต่อที่ 65°C เป็นเวลา 3 นาที หลังจากปั่น เติม phenol (pH 6.5, 65°C) ปริมาตร 700 μl และปั่นต่ออีก 3 นาที จากนั้นทำให้เซลล์เย็นลงทันทีด้วย Freeze aluminium block เป็นเวลา 10 วินาที ปั่นเก็บสารละลายใสส่วนบนด้วยเครื่องเซนตริฟิวซ์ที่ความเร็ว 12,000×rpm 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสใส่หลอดเซนตริฟิวซ์หลอดใหม่ จากนั้นเติม Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1) ที่ปริมาตร 1 เท่า ลงไป ผสมเบาๆแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000×rpm 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสใส่หลอดเซนตริฟิวซ์หลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเติม 0.1 เท่าของปริมาตรสุดท้ายของของเหลวผสมด้วย 3 M sodium acetate buffer, pH 6.0 และ 2.5 เท่าของ

ปริมาตรสุดท้ายของของเหลวด้วย cold ethanol บ่มที่ -20°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากบ่มนำมาปั่นเหวี่ยงที่ $12,000\times\text{rpm}$ 20 นาที (4°C) เทส่วนใสทิ้ง เก็บ pellet แล้วล้างอีกครั้งด้วย 70% ethanol บั่นเหวี่ยงที่ $12,000\times\text{rpm}$ 2 นาที เก็บ pellet แล้วทำให้แห้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย Storage buffer (20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5) ปริมาตร 50 μl วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

3. การเตรียมอาร์เอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำ 50 μg ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ข้างต้นมาเติม 10xBuffer ปริมาตร 5 μl , RQ RNase-Free DNase ปริมาตร 5 μl และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 μl บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพื่อกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ จากนั้นนำของเหลวผสมดังกล่าวมาเติม 40 mM Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 200 μl ตามด้วย Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 250 μl บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $12,000\times\text{rpm}$ 5 นาที เก็บสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 0.1 เท่าของปริมาตรสุดท้ายของของเหลวผสมด้วย 3 M sodium acetate buffer, pH 5.2 และเติม 0.6 เท่าของปริมาตรสุดท้ายของของเหลวด้วย Isopropanol บ่มที่ -20°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากบ่มนำมาปั่นเหวี่ยงที่ $12,000\times\text{rpm}$ 20 นาที (4°C) เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเออีกครั้งด้วย 70% ethanol บั่นเหวี่ยงที่ $12,000\times\text{rpm}$ 2 นาที เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอแล้วทำให้แห้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย Storage buffer (20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5) 50 μl วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

4. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reactions (RT-PCR)

นำ 5 ไมโครกรัมของอาร์เอ็นเอมาละลายด้วยน้ำ Milli-Q ปริมาตร 23 μl บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาทีแล้ววางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายอาร์เอ็นเอมาเติม 50 pmol ของไพรเมอร์ที่จำเพาะทั้งสองตัว (forward และ reverse ไพรเมอร์) แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 33 μl นำสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads Kit (Amersham Biosciences) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นเขย่าเบาๆแล้วบ่มต่อที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำสารละลาย (cDNA) ดังกล่าวไปเป็นแม่แบบเพื่อทำ Polymerase chain reaction (PCR) ต่อไป (pre-denaturation ที่ 95°C , 2 นาที, 34 รอบ ตามด้วย denaturation ที่ 95°C , 1 นาที, annealing ที่ 55°C , 1 นาที, extension ที่ 72°C , 1.30 นาที, รอบสุดท้าย extension at 72°C , 2 นาที) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

ไพรเมอร์สำหรับยีนไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 จากฐานข้อมูล NCBI โดยเปรียบเทียบกับลำดับจีโนมของ *Arthrospira platensis* NIES-39 และ *Synechocystis* sp. PCC6803 ดังนี้

No.	Name	Sequence (5'-3')	Length
1	3'-HoxE	GTCAGGATGCCCTAATCGAA	20
2	5'-HoxE	CCACTTTTGCAGTCGTGCTA	20
3	3'-HoxF	TAGGTAGCCGCATCTTTGGT	20
4	5'-HoxF	TTCCAAATCAGCAGGGGTAG	20
5	3'-HoxH	TTGTCGCTGATGGTTTGAGT	20
6	5'-HoxH	CTTCGGGGATTTCATTACCA	20
7	3'-HoxU	TTTTAGAAGCCGCCAAAGAG	20
8	5'-HoxU	TCAACACATTTACCGCAGGA	20
9	3'-HoxY	CTGGATGAATGGCTGATTGA	20
10	5'-HoxY	CATTTTCCCTTCCACCAAAG	20

5. การตรวจวัดแอกติวิตีของรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส

วัดแอกติวิตีของรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสด้วยโครมาโทกราฟีแบบก๊าซ ส่วนผสมใน 1 ปฏิกริยา ประกอบด้วย 10 mM methyl viologen, 100 mM sodium dithionite, 50 mM phosphate buffer pH 7.5 เขย่าที่ 32 องศาเซลเซียสและทำการทดลองภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน แอกติวิตีของ เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสคำนวณจาก 1 ไมโครโมลของไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นต่อมิลลิกรัมของ คลอโรฟิลล์ต่อหนึ่งหน่วยเวลา (Tamagnini et al. 1997)

6. การตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจน

ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 4000×g 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วใส่ใน ขวด vial ขนาด 20 ml บ่มเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิภายนอก 32 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งมีความเข้มแสง 40 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ สร้างสภาวะไร้ออกซิเจนโดยพ่นก๊าซอาร์กอนเข้าไป ใน vial เพื่อแทนที่ก๊าซออกซิเจน วัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยโครมาโทกราฟีแบบก๊าซ คำนวณ เทียบกับกราฟไฮโดรเจนมาตรฐานต่อมิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์ต่อหนึ่งหน่วยเวลา (Allahverdiyeva et al. 2010)

7. วิธีหาปริมาณคลอโรฟิลล์

สกัดคลอโรฟิลล์ด้วย 90% methanol (Meeks et al., 1971) และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยสเปกโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร

8. การวิเคราะห์ผล

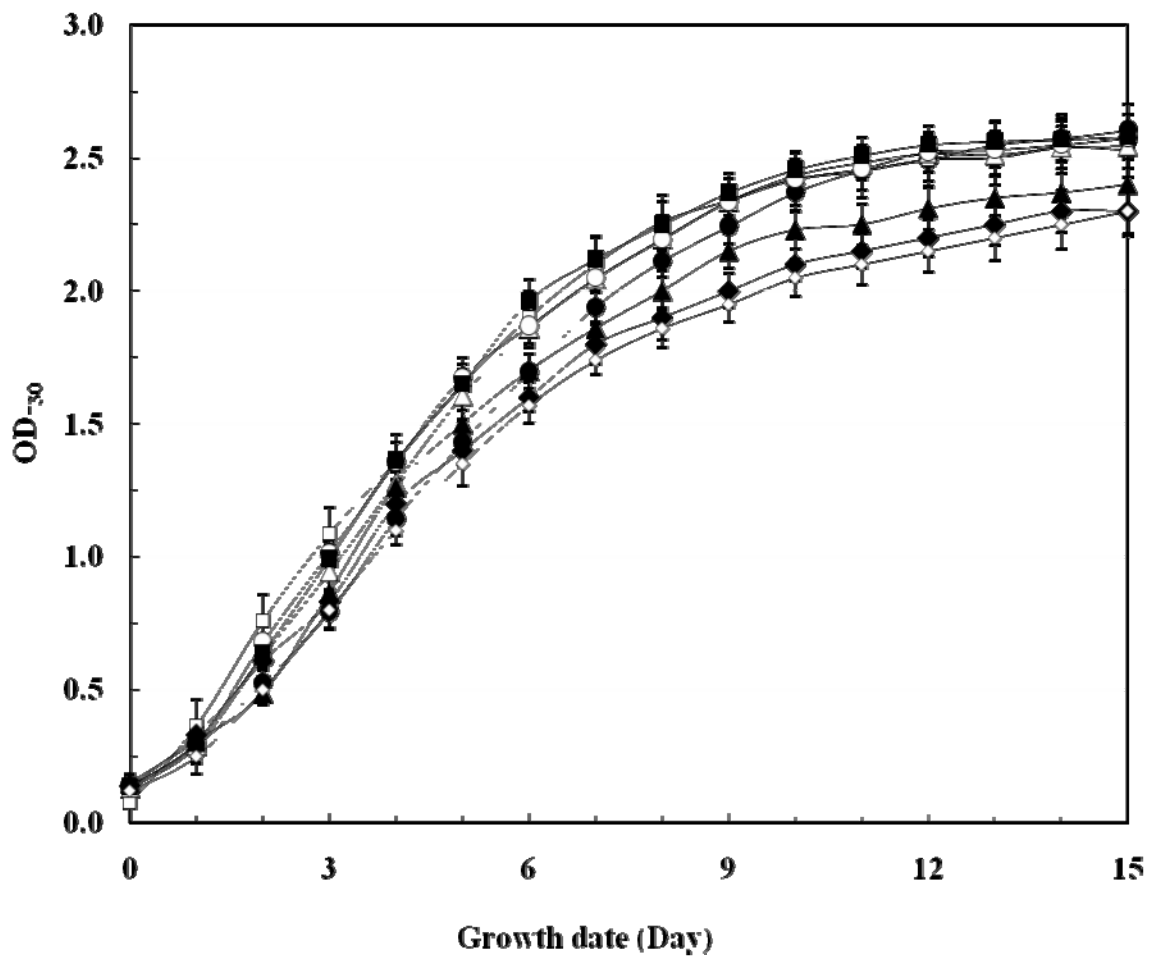
การวัดปริมาณการแสดงออกของยีน *hox* โดยเปรียบเทียบกับยีน 23s rRNA (internal control) หาความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วย AISTM program และคำนวณเป็น relative expression วัดค่าสถิติ Student's *t*-test จากตัวอย่าง 3 ตัวอย่างจากการทดลองที่แยกกันโดยอิสระ (independent biological replications) แต่ละตัวอย่างถูกวัดค่าการสะสมอย่างน้อย 3 ครั้ง (independent technical replications) คำนวณหาค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. ซึ่งมีค่านัยสำคัญทางสถิติที่ยอมรับได้เมื่อ $P < 0.05$

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

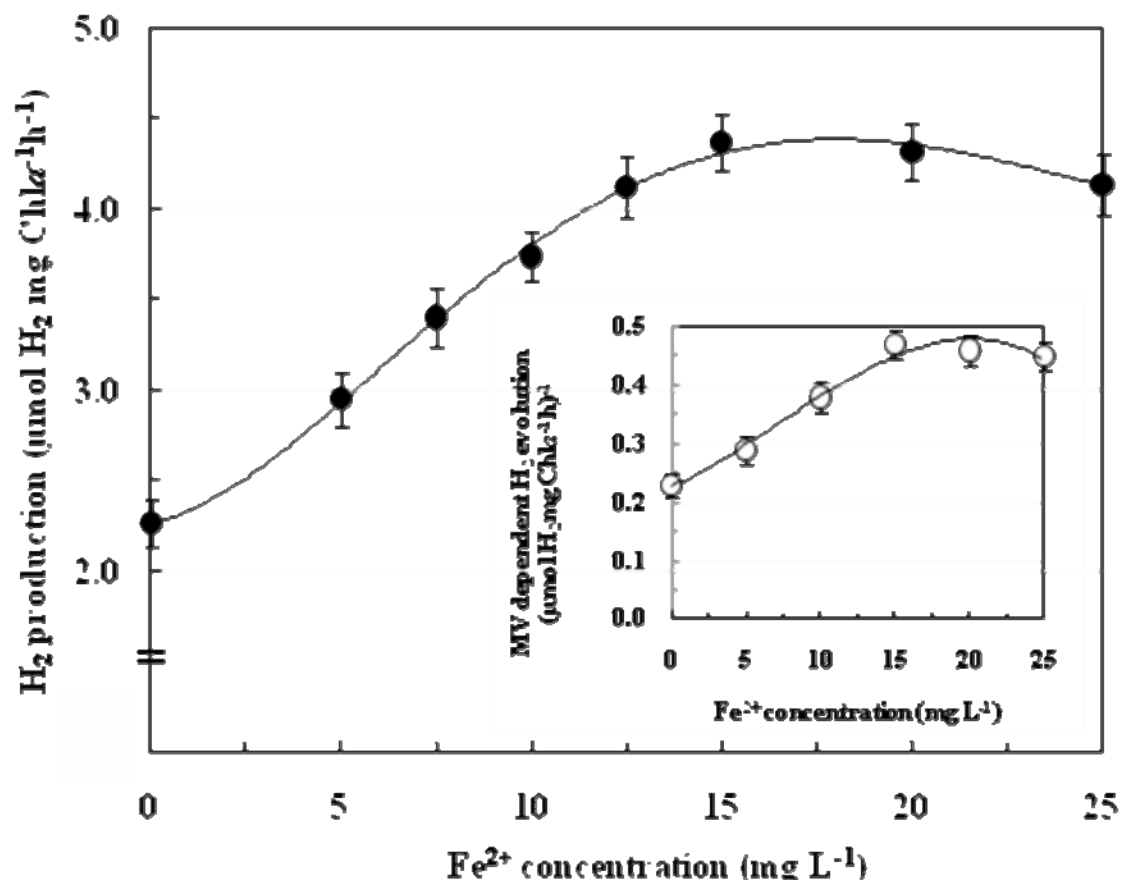
1. การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพภายใต้สภาวะที่มีการเติมเหล็กลงไปในการเลี้ยง

การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ในอาหารเลี้ยง Zarrouk และอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่มีการเติมธาตุเหล็กที่มีความเข้มข้นต่างกันแสดงดังรูปที่ 4 พบว่าปริมาณธาตุเหล็กที่เติมลงไปในการเลี้ยง Zarrouk มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย *Arthrospira* sp. PCC 8005 เมื่อความเข้มข้นของธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0 จนถึง 15 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการเจริญเพิ่มขึ้นตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของธาตุเหล็กสูงกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการเจริญลดลงหลังจากวันที่ 6 ของการเลี้ยง แสดงว่าปริมาณของธาตุเหล็กในอาหารเลี้ยงมีอิทธิพลต่อการเจริญของเซลล์ ซึ่งปริมาณธาตุเหล็กที่เพิ่มสูงขึ้นอาจไปมีผลโดยตรงต่อเอนไซม์ในระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงของเซลล์ทำให้มีผลต่อการเจริญของเซลล์ ดังเช่นที่รายงานไว้ในเซลล์ของ *Anabaena* PCC 7120 (Saxena, 2006) และ *Synechocystis* sp. E35 (Demirel et al., 2009) เป็นต้น

ไซยาโนแบคทีเรีย *Arthrospira* sp. PCC 8005 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ขาดธาตุอาหารไนโตรเจน (Zn_0) สามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ในสภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีแสง โดยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส โดยพบว่าปริมาณธาตุเหล็กในอาหารเลี้ยงมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพพบว่าในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็กในอาหารเลี้ยง Zn_0 แม้ว่าเซลล์สามารถเจริญได้เป็นปกติแต่พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ (รูปที่ 5) อัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพจะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณธาตุเหล็กลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Zn_0 ตั้งแต่ 0 จนถึง 15 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าปริมาณธาตุเหล็ก 15 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เติมลงไปทำให้เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 4.37 ± 0.15 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมงและพบแอกติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงสุดเท่ากับ 0.47 ± 0.02 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณธาตุเหล็กที่เหมาะสมมีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย แอกติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ รายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina maxima* สามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้สูงถึงร้อยละ 120 (Janssen et al., 2010) ในภาวะที่มีการเติมธาตุเหล็กลงไปในการเลี้ยง อย่างไรก็ตามในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* PCC 7120 พบว่าการเติมธาตุเหล็กลงไปในการเลี้ยงมีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเมตาบอลิซึมการสังเคราะห์ด้วยแสงและการพัฒนาของเฮเทอโรซิส (Saxena, 2006)



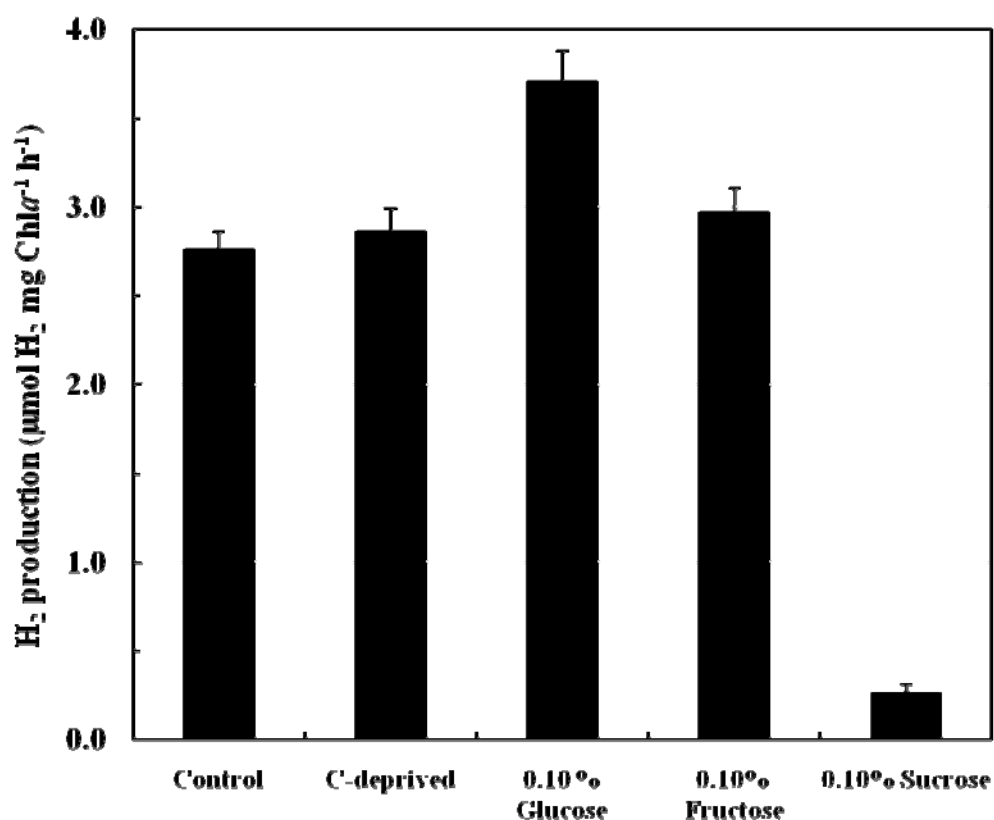
รูปที่ 4 ผลของธาตุเหล็กต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ในอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่มีการเติมธาตุเหล็กที่ความเข้มข้นดังนี้ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร, (◇), 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (●, control), 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (□), 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (△), 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (○), 15 มิลลิกรัมต่อลิตร (■), 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (▲), 25 มิลลิกรัมต่อลิตร (◆). (Means $\pm$ S.D. $n=3$).



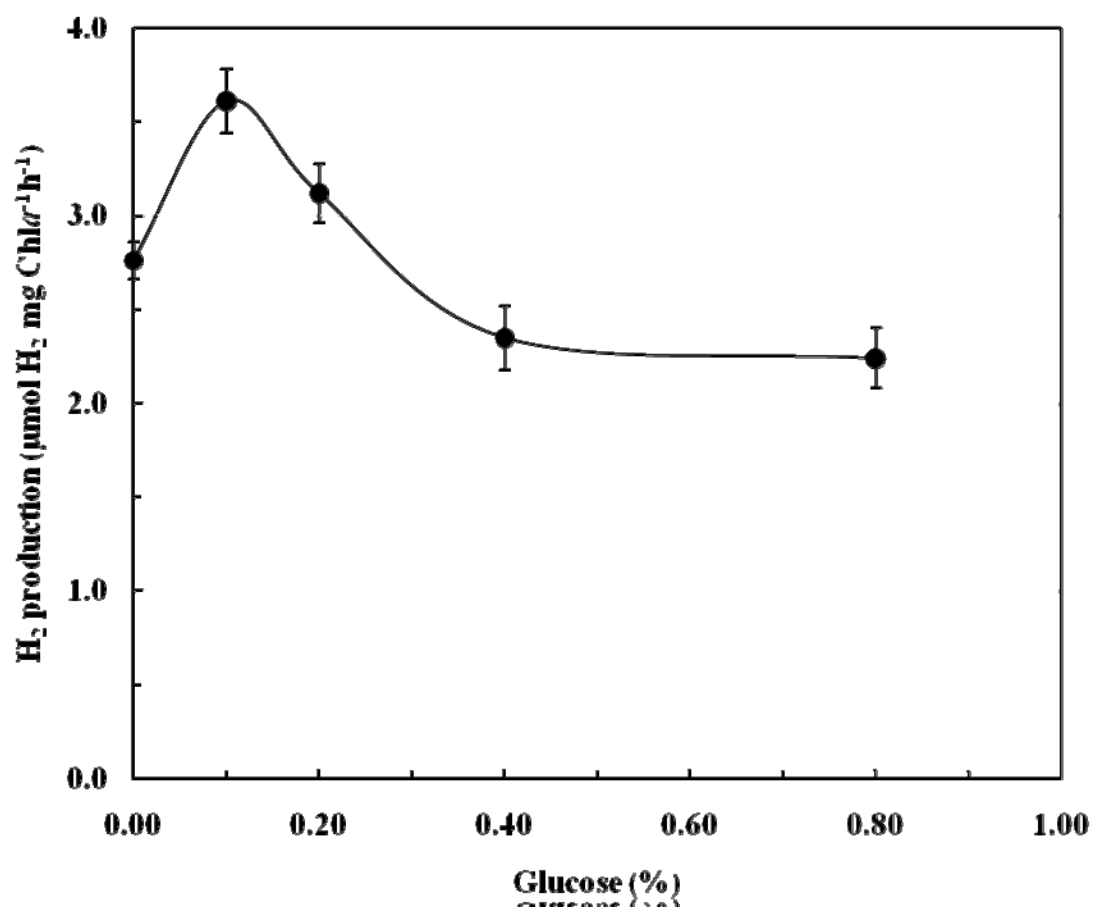
รูปที่ 5 ผลของธาตุเหล็กต่อการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เซลล์ถูกบ่มในอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ไม่มีแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจน (ZNO) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน ไม่มีแสงและมีการเติมธาตุเหล็กที่ความเข้มข้นดังนี้ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร, 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, 15 มิลลิกรัมต่อลิตร, 20 มิลลิกรัมต่อลิตร, 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะใช้สาร Methyl viologen (MV) เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Means $\pm$ S.D. $n=3$).

2. ผลของแหล่งอาหารคาร์บอนและปริมาณกลูโคสต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

โดยปกติเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์หรือใช้ไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) ในอาหารเลี้ยงเพื่อการเจริญได้ นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดยังสามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโมเลกุลคู่ อาทิ กลูโคส ฟรุคโตส กาแลคโตส และแลคโตสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนได้และพบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพเพิ่มขึ้นจากภาวะปกติ (Baebprasert et al., 2010, Khetkorn et al., 2010) ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 สามารถเจริญได้ปกติในสภาวะที่ไม่มีแสงและสามารถใช้กลูโคสหรือฟรุคโตสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนแทนไบคาร์บอเนต อย่างไรก็ตาม *Arthrospira* ไม่สามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่เช่นซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ เซลล์จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เจริญได้ช้าลงและตายในที่สุด (Mühling et al., 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่มีการเติมกลูโคสหรือฟรุคโตสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน (ZnO_2) สามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ และการเติมน้ำตาลกลูโคสเซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพสูงกว่าการเติมน้ำตาลฟรุคโตส แสดงให้เห็นว่า *Arthrospira* ใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในการผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่าน้ำตาลฟรุคโตส (รูปที่ 6) ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 0.1% ที่เติมลงในอาหาร ZnO_2 กระตุ้นให้เซลล์เพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้สูงสุดเท่ากับ 3.61 ± 0.17 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาในไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* sp. strain Cc (Baebprasert et al., 2010) และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Tredici et al., 1990) ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์เพิ่มผลิตผลไฮโดรเจนชีวภาพได้ดีในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนเช่นกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสสูงกว่า 0.2% พบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพลดลง (รูปที่ 7) อาจเป็นผลมาจากเซลล์ปรับเปลี่ยนวิถีเมตาบอลิซึมเพื่อรักษาลำงานระดับเซลล์ไว้เพื่อนำกลูโคสที่มีการสะสมภายในเซลล์ออกนอกเซลล์เพื่อรักษาสสมดุลออสโมติก



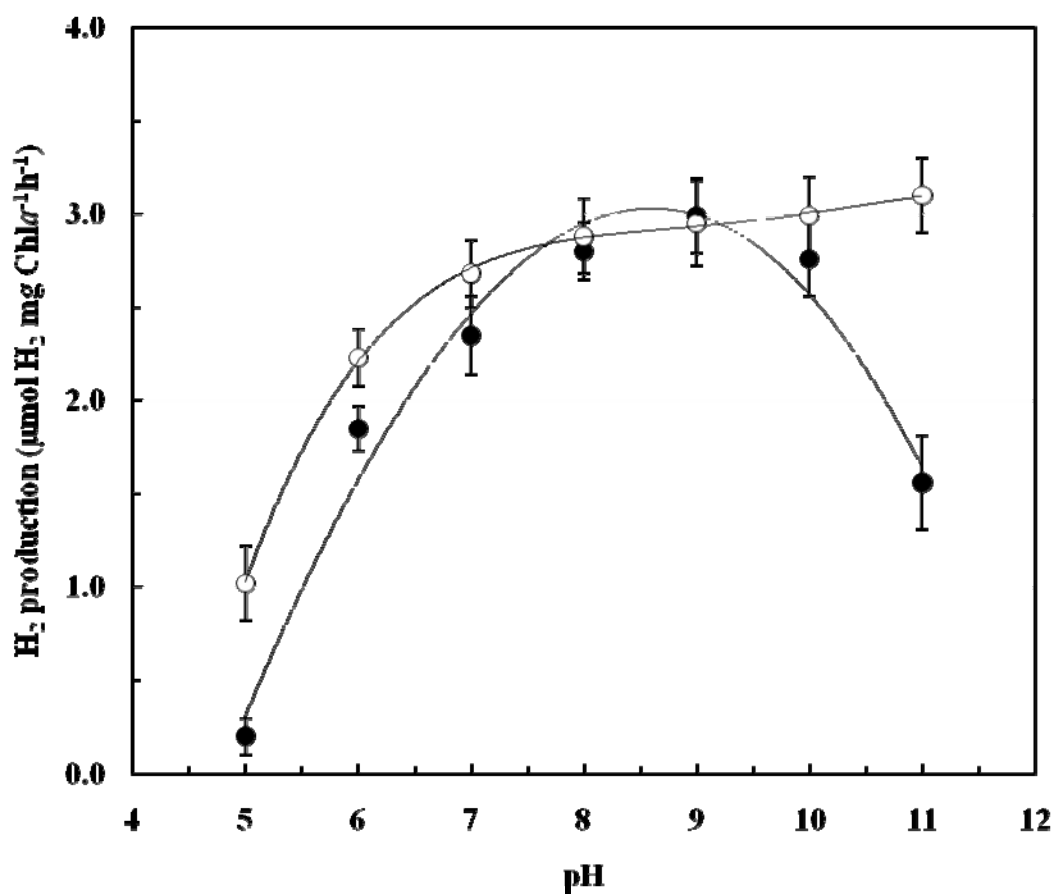
รูปที่ 6 ผลของแหล่งธาตุอาหารคาร์บอน: น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตสและน้ำตาลซูโครส ต่อ อัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน ไม่มีแสง กำหนดให้ อาหารเลี้ยง Zarrouk แทนด้วย control อาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ไม่มีแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนแทนด้วย ZN₀ และอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ไม่มีแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนและคาร์บอนแทนด้วย ZN₀C₀ หรือ C-deprived (Means ± S.D. n =3)



รูปที่ 7 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (%) ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน ไม่มีแสง (Means $\pm$ S.D. $n=3$)

3. ผลของพีเอชเริ่มต้นและพีเอชภายนอกต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

การเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงมีผลต่อการเจริญและอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ *Arthrospira* sp. PCC8005 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงตั้งแต่พีเอช 5.0 ถึงพีเอช 11.0 มีผลต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ พบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพลดลงในอาหารเลี้ยงที่เป็นกรดซึ่งมีพีเอชต่ำกว่า 5.0 และอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพเพิ่มขึ้นในช่วงพีเอช 6.0 ถึงพีเอช 9.0 โดยอาหารเลี้ยงที่มีพีเอช 9.0 เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 2.99 ± 0.18 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 8) อย่างไรก็ตามการเพิ่มพีเอชในอาหารเลี้ยงสูงกว่า 10.0 อัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพลดลง รายงานวิจัยอื่นๆพบว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้เช่น *Clostridium* sp., *Klebsiella* sp. และ *Streptococcus* sp. ผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้สูงในสภาวะที่อาหารเลี้ยงมีพีเอชเป็นกรด นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังศึกษาการเปลี่ยนแปลงพีเอชภายนอกด้วยการควบคุมด้วยบัฟเฟอร์ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ พบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพเพิ่มขึ้นตั้งแต่พีเอชภายนอกเป็น 5.0 ถึงพีเอช 11.0 โดยที่พีเอชเป็น 11.0 เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 3.10 ± 0.25 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 8) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงว่า *Arthrospira* สามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ที่พีเอชต่างกัน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่ศึกษาในเซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 (Maneeruttanarungroj et al., 2010)

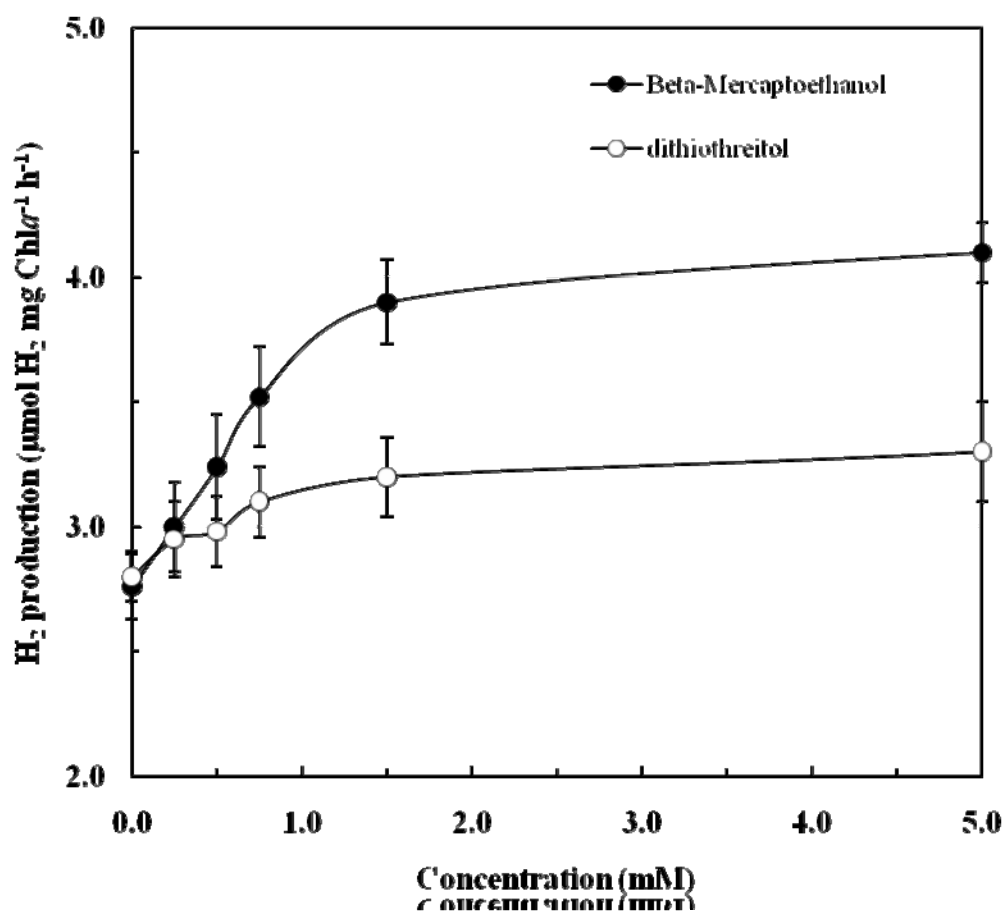


รูปที่ 8 ผลของพีเอชต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน ไม่มีแสง สำหรับผลของพีเอชเริ่มต้นเซลล์ถูกบ่มในอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ไม่มีแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจน (ZNo) และปรับให้มีพีเอชต่าง ๆ กันตั้งแต่ pH 5.0 -11.0 (●) สำหรับผลของพีเอชภายนอกต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ เซลล์ถูกบ่มภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน ไม่มีแสงในสารละลายบัฟเฟอร์ดังนี้ pH 5.0 และ pH 6.0 ใช้ 50 mM acetate buffer pH 7.0, 8.0 และ pH 9.0 ใช้ 50 mM Tris buffer, pH 10.0 และ pH 11.0 ใช้ 50 mM phosphate buffer (○) (Means $\pm$ S.D. $n=3$)

4. ผลของตัวรีดิวซ์และสภาวะการขาดแร่ธาตุซัลเฟอร์ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

งานวิจัยก่อนหน้านี้หลายงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าการไหลเวียนของอิเล็กตรอนจากระบวนการให้และรับอิเล็กตรอนของเซลล์ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ อิเล็กตรอนที่อยู่ในรูปตัวรีดิวซ์จะถูกสร้างขึ้นจากเมตาบอลิซึมการสังเคราะห์ของเซลล์ เมื่อระดับของตัวรีดิวซ์ภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นเซลล์จะปรับตัวโดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับโปรตอนหรือไฮโดรเจนอ็อกไซด์ในเซลล์เพื่อผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนขึ้นมา ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกตัวรีดิวซ์สองชนิดคือ β -Mercaptoethanol และ Dithiothreitol มาทดสอบเพื่อดูผลของตัวรีดิวซ์ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ผลการทดลองพบว่า ในอาหารเลี้ยง Zn_0 ที่มีการเติมตัวรีดิวซ์ β -Mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้สูงถึง 1.5 เท่าโดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 3.90 ± 0.15 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ขณะที่การเติมตัวรีดิวซ์ Dithiothreitol ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพมากนัก (รูปที่ 9) และพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของตัวรีดิวซ์ β -Mercaptoethanol และตัวรีดิวซ์ Dithiothreitol ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1.5 มิลลิโมลาร์จนถึง 5 มิลลิโมลาร์ ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่ศึกษาในเซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 (Maneeruttanarungroj et al., 2010) แสดงว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวรีดิวซ์มีผลต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

ในอาหารเลี้ยงที่ขาดแหล่งแร่ธาตุซัลเฟอร์และไนโตรเจน (Zn_0 -S-deprived) เซลล์มีอัตราผลิตไฮโดรเจนชีวภาพมากขึ้น โดยพบว่าการขาดแหล่งแร่ธาตุซัลเฟอร์และไนโตรเจนจะทำให้เกิดการผลิตอิเล็กตรอนมากขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานมากขึ้นในการส่งอิเล็กตรอนให้กับโปรตอนหรือไฮโดรเจนอ็อกไซด์เพื่อสร้างโมเลกุลไฮโดรเจน ซึ่งมีผลกระทบต่อระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรีย ผลงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการไหลเวียนของอิเล็กตรอนในระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรีย *Gloeocapsa alpicola*, *Synechocystis* sp. PCC6803 (Antal and Lindblad, 2005) และ *Anabaena siamensis* TISTR8012 (Khetkorn et al., 2010) เพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ ตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าในอาหารเลี้ยง Zn_0 -S-deprived เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพสูงถึง 1.4 เท่า พบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง Zn_0 ที่มีการเพิ่มธาตุเหล็กที่ได้จากสารประกอบ FeSO_4 และ FeCl_2 ให้ผลไม่แตกต่างกัน เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง Zn_0 -S-deprived ซึ่งมีการเติมธาตุเหล็ก 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและตัวรีดิวซ์ β -Mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้สูงที่สุดเท่ากับ 5.91 ± 0.14 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพนี้สูงกว่าไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่มีเฮเทอโรซิส *Nodularia* sp. SR5a และ *Calothrix* sp. XPORK1A (Allahverdiyeva et al., 2010) และไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว *Synechocystis* sp. PCC6803 (Baebprasert et al., 2010)



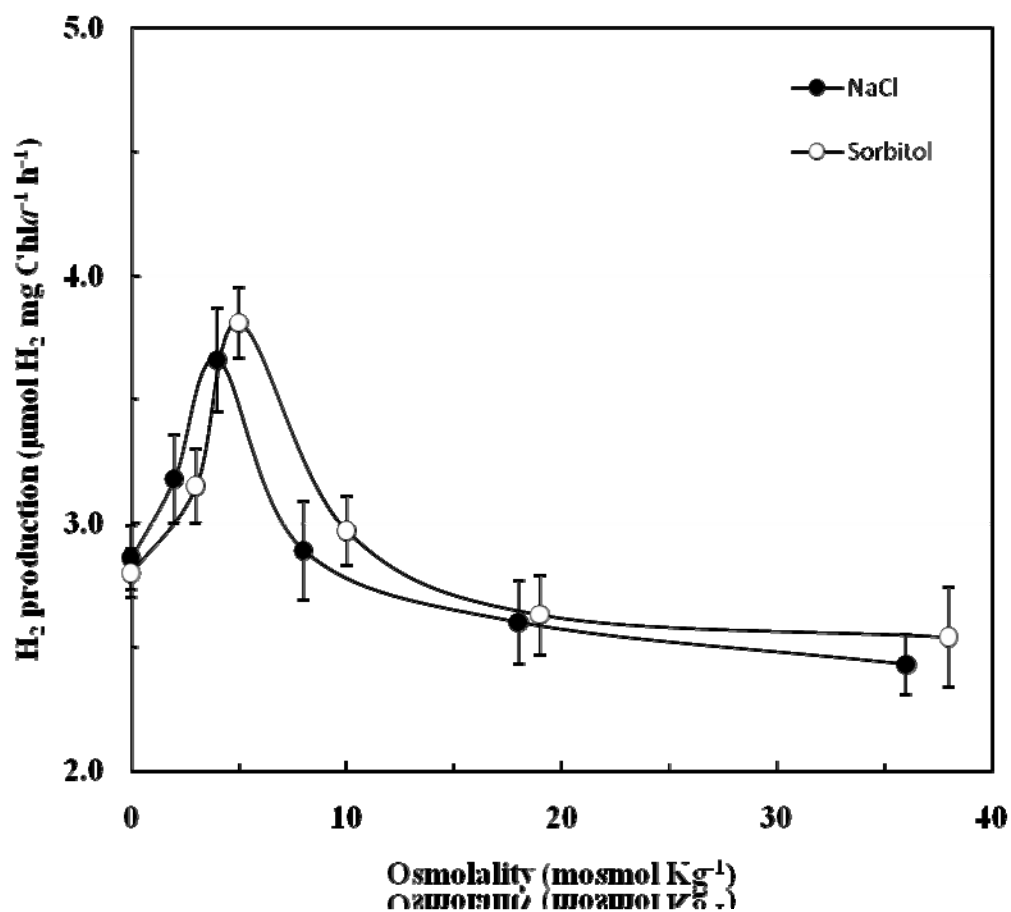
รูปที่ 9 ผลของตัวรีดิวซ์ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน ไม่มีแสง เซลล์ถูกบ่มในอาหารเลี้ยง Zarrowk ที่ไม่มีแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจน (ZNo) และมีการเติมตัวรีดิวซ์ดังนี้ β-mercaptoethanol (●) or dithiothreitol (○) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันดังนี้ 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, และ 5.0 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Means ± S.D. n =3).

ตารางที่ 1 ผลของธาตุเหล็ก ธาตุซัลเฟอร์และตัวรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจน
ชีวภาพของ *Arthrospira* sp. PCC8005

Conditions	Hydrogen production ($\mu\text{mol mgCha}^{-1}\text{h}^{-1}$)
ZN ₀	2.76 $\pm$ 0.16
ZN ₀ + 15 mg L ⁻¹ Fe ²⁺ (FeSO ₄)	4.37 $\pm$ 0.15
ZN ₀ + 15 mg L ⁻¹ Fe ²⁺ (FeCl ₂)	4.31 $\pm$ 0.16
ZN ₀ - S-deprived	3.93 $\pm$ 0.15
ZN ₀ - S-deprived + 15 mg L ⁻¹ Fe ²⁺ (FeSO ₄)	4.53 $\pm$ 0.16
ZN ₀ + 1.5 mM β -mercaptoethanol	3.91 $\pm$ 0.15
ZN ₀ - S-deprived + 15 mg L ⁻¹ Fe ²⁺ (FeSO ₄) + 1.5 mM β -mercaptoethanol	5.91 $\pm$ 0.14
ZN ₀ + 1.5 mM dithiothreitol	3.20 $\pm$ 0.17
ZN ₀ - S-deprived + 15 mg L ⁻¹ Fe ²⁺ (FeSO ₄) + 1.5 mM dithiothreitol	4.22 $\pm$ 0.17

5. ผลของออสโมลาริตีต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

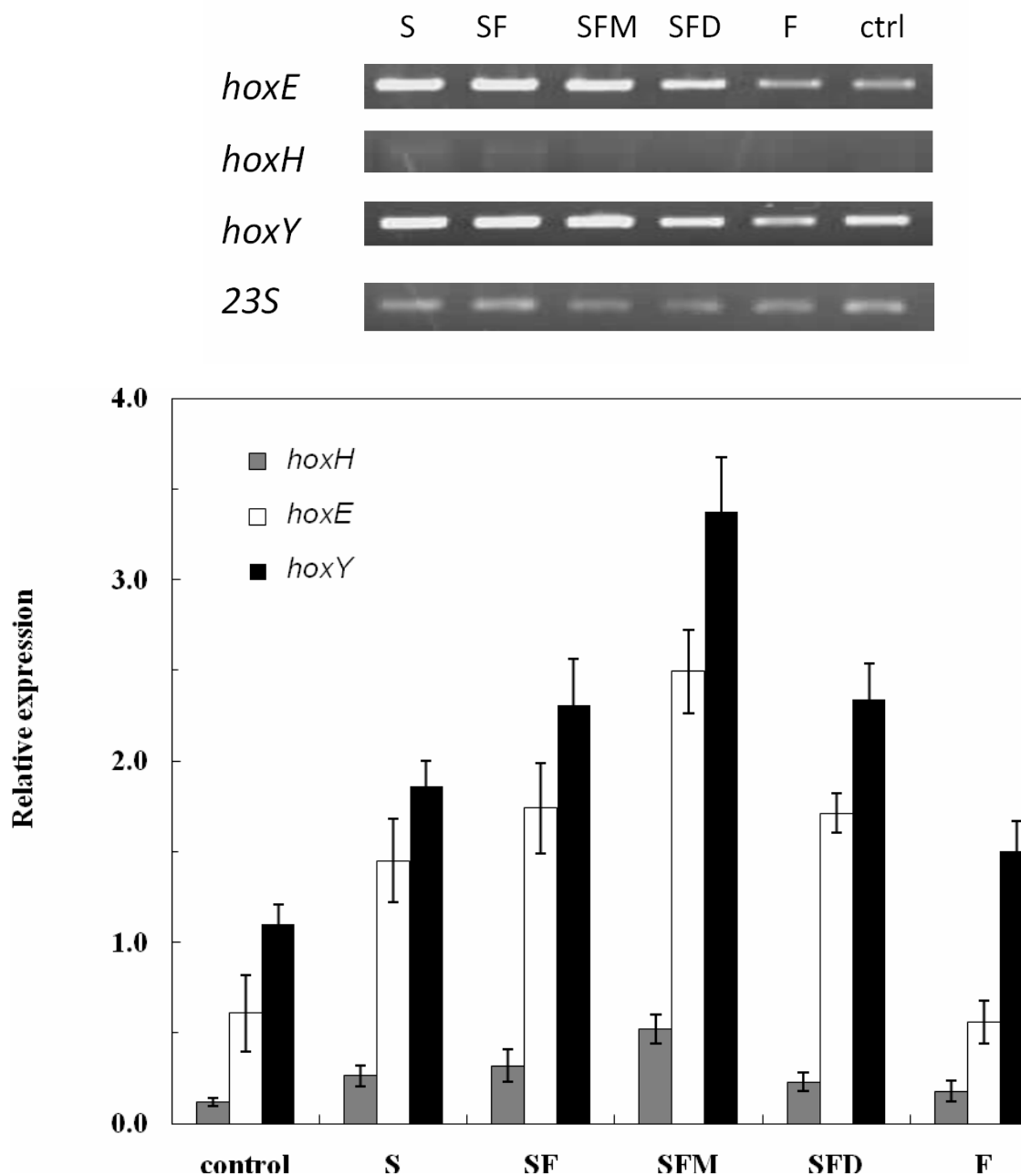
ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยง ZnO ที่มีการเติมเกลือ NaCl หรือน้ำตาล sorbitol เพื่อสร้างสภาวะออสโมติกให้กับเซลล์ พบว่าระดับออสโมลาริตีประมาณ 5 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัม กระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพสูงขึ้นประมาณ 35% จากสภาวะปกติ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นออสโมลาริตีสูงกว่า 5 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัม การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 10) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่ศึกษาใน *Synechocystis* sp. PCC6803 (Baebprasert et al., 2010) โดยปกติแล้วความเครียดจากระดับออสโมลาริตีที่เกิดจากเกลือหรือแรงดันออสโมติกจะส่งผลกระทบต่อระบบสรีรวิทยาและชีวเคมีของเซลล์ ไซยาโนแบคทีเรียสามารถปรับตัวได้โดยการสร้างสารสำคัญขึ้นภายในเซลล์หรือขนส่งสารจากภายนอกเข้าไปเพื่อสร้างสมดุลออสโมติกระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ ผลงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า *Arthrospira maxima* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง 0.25-1.0 โมลาร์ มีการสะสมน้ำตาลมากขึ้นถึง 4 เท่าภายในเซลล์และปรับเปลี่ยนเมตาบอลิซึมภายในเซลล์โดยลดการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ (Ananyev et al., 2008)



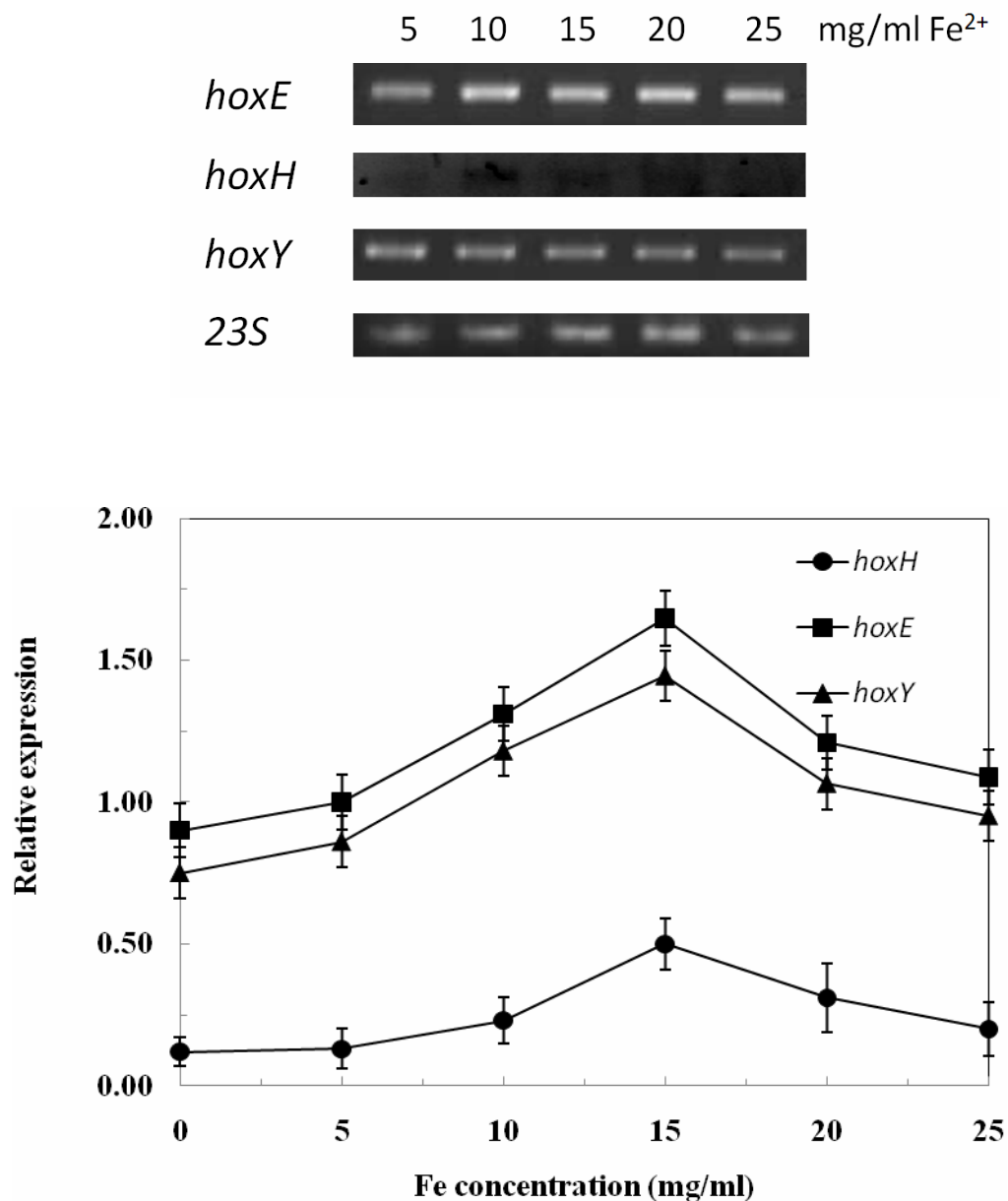
รูปที่ 10 ผลของออสโมลาริตีต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน ไม่มีแสง เซลล์ถูกบ่มในอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ไม่มีแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจน (ZNo) และมีการเติมเกลือ NaCl หรือน้ำตาล Sorbitol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันดังนี้ NaCl (●) 0, 2, 4, 8, 18, and 36 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัม หรือ sorbitol (○) 0, 3, 5 10, 19, and 38 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Means $\pm$ S.D. $n=3$).

6. การแสดงออกของยีน *hox* ในการตอบสนองต่อสภาวะเครียด

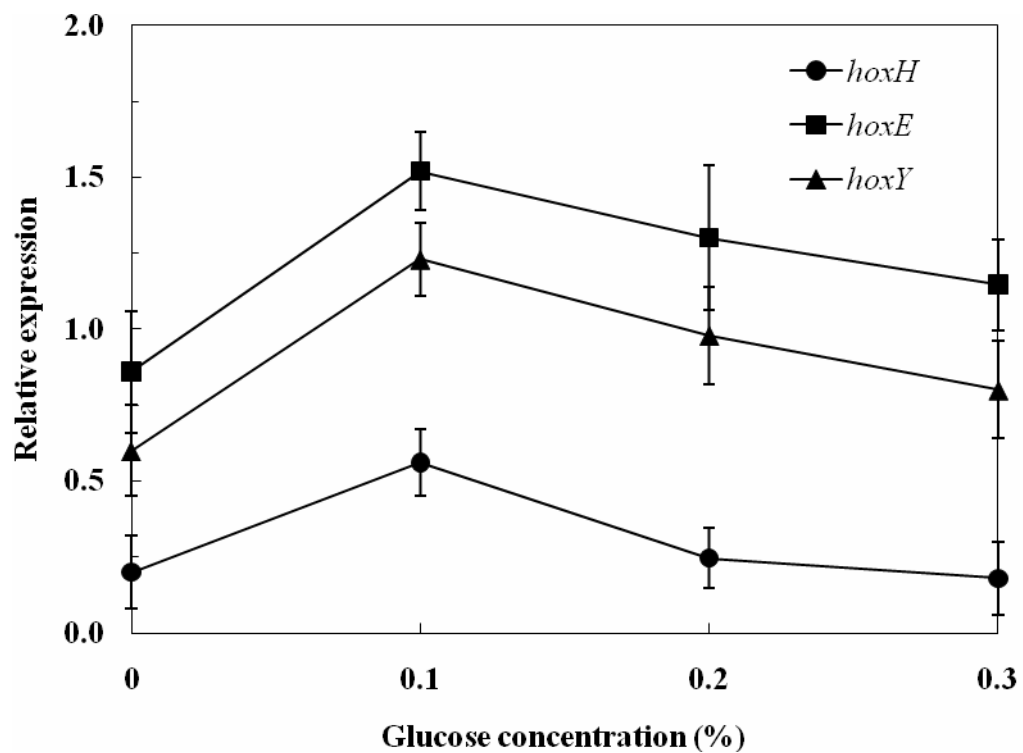
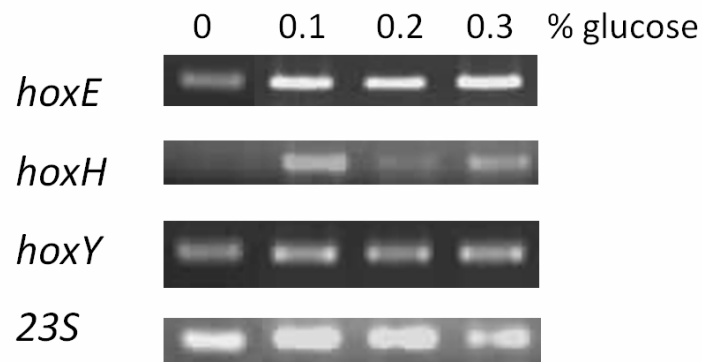
ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *hox* จะใช้ยีน 23S rRNA เป็นยีนเปรียบเทียบ (internal control) สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ที่เลี้ยงในอาหาร Zn_0 ภายใต้สภาวะปราศจากก๊าซออกซิเจน ไม่มีแสง มีการเพิ่มธาตุเหล็ก หรือตัวรีดิวซ์ รวมทั้งภาวะการขาดธาตุซัลเฟอร์ จากนั้นสร้างสาย cDNA ด้วย Reverse transcriptase และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย PCR เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *hox* กับยีน 23S rRNA และคำนวณเป็น relative expression ผลการทดลองพบว่า ยีน *hox* มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมธาตุเหล็ก หรือตัวรีดิวซ์ (dithiothreitol หรือ β -mercaptoethanol) รวมทั้งภาวะการขาดธาตุซัลเฟอร์ (รูปที่ 11) พบว่าเซลล์ *Arthrospira* sp. PCC8005 ที่เลี้ยงในอาหาร Zn_0 -S deprived ภายใต้ภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน ไม่มีแสง และมีการเพิ่มธาตุเหล็ก 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและเติมตัวรีดิวซ์ β -Mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ กระตุ้นให้การแสดงออกยีน *hoxH*, *hoxE*, และ *hoxY* มีเพิ่มขึ้นประมาณ 3.5 เท่าอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณธาตุเหล็กลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Zn_0 ตั้งแต่ 0 จนถึง 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *hoxH*, *hoxE*, และ *hoxY* โดยที่ความเข้มข้นธาตุเหล็ก 15 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นการแสดงออกของยีน *hoxH*, *hoxE*, และ *hoxY* สูงที่สุด (รูปที่ 12) เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Zn_0C_0 ตั้งแต่ 0 จนถึง 0.3% ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *hoxH*, *hoxE*, และ *hoxY* โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 0.1% ที่เติมลงในอาหาร Zn_0C_0 กระตุ้นการแสดงออกของยีน *hoxH*, *hoxE*, *hoxY* สูงที่สุด (รูปที่ 13) เมื่อเพิ่มปริมาณเกลือ NaCl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Zn_0 ตั้งแต่ 0 จนถึง 3 มิลลิโมลาร์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *hoxH*, *hoxE*, และ *hoxY* โดยที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl 2 มิลลิโมลาร์ที่เติมลงในอาหาร Zn_0 กระตุ้นการแสดงออกของยีน *hoxH*, *hoxE*, *hoxY* สูงที่สุด (รูปที่ 14) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปัจจัยภายนอกได้แก่ ธาตุเหล็ก น้ำตาลกลูโคสและเกลือ NaCl มีผลต่อการแสดงออกของยีน *hox* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่ศึกษาใน *Anabaena siamensis* TISTR 8012 (Khetkorn et al., 2012)



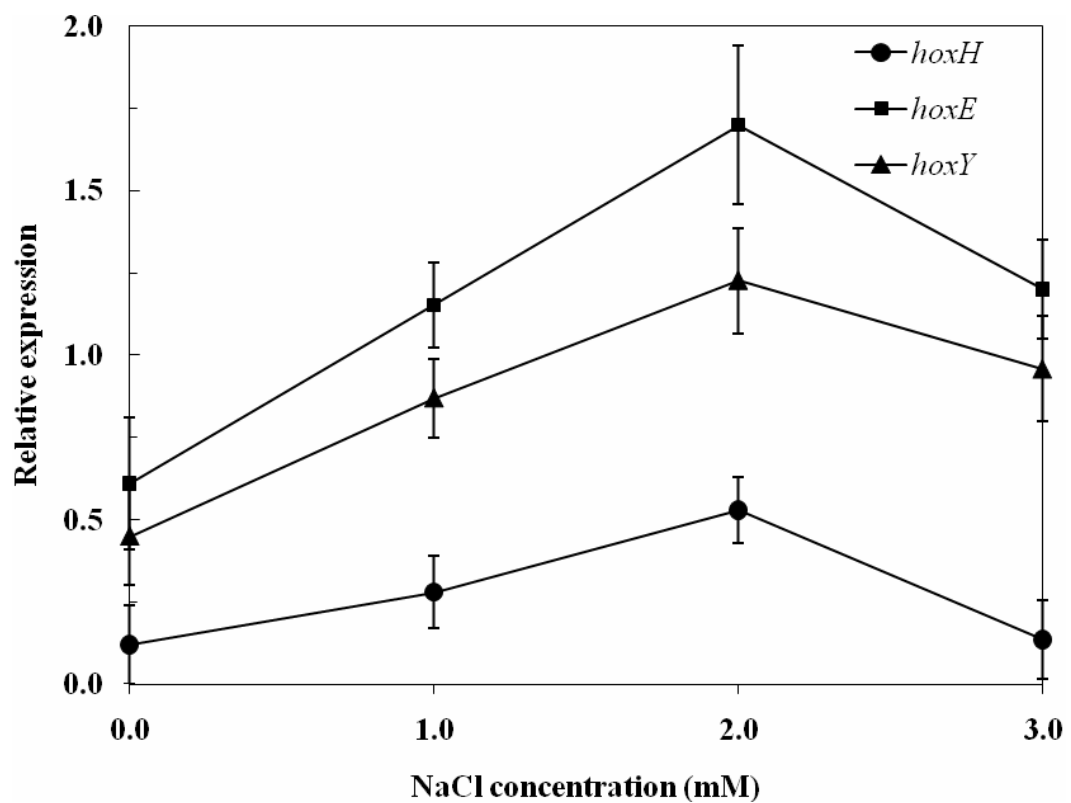
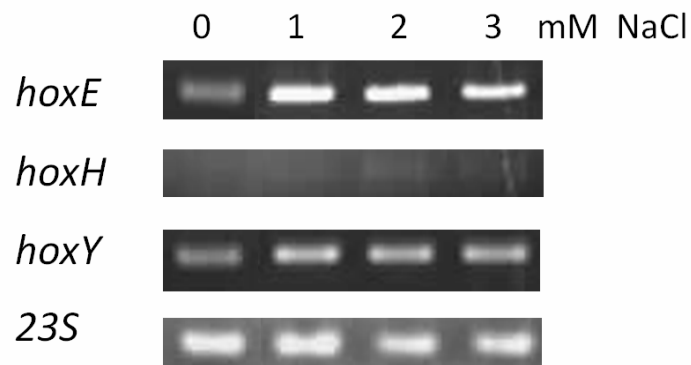
รูปที่ 11 ระดับการแสดงออกของยีน *hox* ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน ไม่มีแสง ขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจน (control) ขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนและธาตุซัลเฟอร์ (S) ขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนและธาตุซัลเฟอร์มีการเพิ่มธาตุเหล็ก 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (SF) ขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนและธาตุซัลเฟอร์มีการเพิ่มธาตุเหล็ก 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและตัวรีดิวซ์ 1.5 มิลลิโมลาร์ของ β -Mercaptoethanol (SFM) หรือ 1.5 มิลลิโมลาร์ของ dithiothreitol (SFD) และขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนและมีการเพิ่มธาตุเหล็ก 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตรทั้งนี้ใช้ 23S rRNA เป็นยีนมาตรฐานเปรียบเทียบ (Means $\pm$ S.D. $n = 3$).



รูปที่ 12 ระดับการแสดงออกของยีน *hox* ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน ไม่มีแสง ขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนและมีการเพิ่มธาตุเหล็กตั้งแต่ 0 ถึง 25.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ใช้ 23S rRNA เป็นยีนมาตรฐานเปรียบเทียบ (Means $\pm$ S.D. $n = 3$).



รูปที่ 13 ระดับการแสดงออกของยีน *hox* ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน ไม่มีแสง ขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนและมีการเพิ่มน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ 0% ถึง 0.3% ทั้งนี้ใช้ 23S rRNA เป็นยีนมาตรฐานเปรียบเทียบ (Means $\pm$ S.D. $n = 3$).



รูปที่ 14 ระดับการแสดงออกของยีน *hox* ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน ไม่มีแสง ขาดแหล่งธาตุอาหาร ไนโตรเจนและมีการเพิ่มเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0 ถึง 3.0 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้ใช้ 23S rRNA เป็นยีนมาตรฐานเปรียบเทียบ (Means $\pm$ S.D. $n=3$).

สรุปผลการทดลอง

ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิส *Arthrospira* sp. PCC8005 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนและซัลเฟอร์ (Zn₀-S deprived) และมีการเติมธาตุเหล็ก 15 มิลลิกรัมต่อลิตรและตัวรีดิวซ์ β -Mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงภายใต้สภาวะปราศจากก๊าซ ออกซิเจน ไม่มีแสง สามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ปริมาณสูงสุดด้วยอัตราการผลิตเท่ากับ 5.91 ± 0.14 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมงและมีแอกติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงที่สุด อัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพนี้เป็นอัตราการผลิตที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับไซยาโนแบคทีเรียชนิดเซลล์เดี่ยว *Synechocystis* sp. PCC6803 และไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่มีเฮเทอโรซิส *Nodularia* sp. SR5a และ *Calothrix* sp. XPORK1A แม้ว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพยังไม่สูงเท่ากับการผลิตของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่มีเฮเทอโรซิส *Anabaena siamensis* TISTR นอกจากนี้ยังพบว่าในสภาวะดังกล่าวนอกจากเซลล์ *Arthrospira* sp. PCC8005 จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพสูงที่สุด ยังพบการแสดงออกยีน *hoxH*, *hoxE*, และ *hoxY* เพิ่มขึ้นประมาณ 3.5 เท่าอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจนและการแสดงออกระดับยีนของยีน *hox* ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

ดังนั้นงานวิจัยในอนาคตควรมีการนำเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาปรับปรุงยีนเพื่อเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพให้สูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Allahverdiyeva, Y., Leino, Hannu, Saari, L., Fewer, D.P., Shunmugam, S., Sivonen, K., Aro, E.M. Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes. *Int. J. Hydrogen Energy* 2010; **35**: 1117-1127.
- Ananyev, G., Carrieri, D., Dismukes, G.C. Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the cyanobacterium "*Arthrospira (Spirulina) maxima*". *Appl Environ Microbiol* 2008; **74**:6102-13.
- Antal T.K., Lindblad, P. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *J. Appl. Microbiol.* 2005; **98**: 14-120.
- Antal, T.K., Lindblad, P. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *J. Appl. Microbiol.* 2005; **98**:114-120.
- Aoyama K., Uemura I., Miyake J., Asada Y. Fermentative Metabolism to Produce Hydrogen Gas and Organic Compounds in a Cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *J. Ferment. Bioeng.* 1997; **83**:17-20.
- Asada, Y., Miyake, J. Photobiological hydrogen production. *J. Biosci. Bioeng.* 1999; **88**: 1-6.
- Baebprasert, W., Jantaro, S., Khetkorn, W., Lindblad, P., Incharoensakdi A. Increased H₂ production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by redirecting the electron supply via genetic engineering of the nitrate assimilation pathway. *Metab. Eng.* 2011;**13**: 610-6.
- Baebprasert, W., Lindblad, P., Incharoensakdi, A. Response of H₂ production and Hox-hydrogenase activity to external factors in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Int. J. Hydrogen Energy* 2010; **35**:6611-16.
- Behera B.K., Balasundaram, R., Gadgil, K, Sharma, D.K. Photobiological production of hydrogen from *Spirulina* for fueling fuel cells. *Energy sources.* 2007; **29**: 761-767
- Boison, G., Bothe, H., Hansel, A., Lindblad, P. Evidence against a common use of the diaphorase subunits by the bidirectional hydrogenase and by the respiratory complex I in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; **174**: 159-165.
- Datta, M., Nikki, G., Shah, V. Cyanobacterial hydrogen production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2000; **16**: 8-9.

- Demirel, S., Ustun, B., Aslim, B., Suludere, Z.. Toxicity and uptake of iron ions by *Synechocystis* sp. E35 isolated from Kucukcekmece Lagoon, Istanbul. *J. Harzard Mater.* 2009;**171**:710-16.
- Dutta, D., De, D., Chaudhuri, S. and Bhattacharya, SK. Hydrogen production by cyanobacteria. *Microb. Cell. Fact.* 2005; **4**: 36-47.
- Flores, E., Herrero, A. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. In *The molecular biology of cyanobacteria* Edited by: Bryant, D.A. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1994; 487-517.
- Janssen, P.J., Morin, N., Mergeay, M., Leroy, B., Wattiez, R., Vallaey, T, et al. Genome sequence of the edible cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005. *J. Bacteriol.* 2010;**192**:2465-66.
- Jantaro, S., Kidron, H., Chesnel, D., Incharoensakdi, A., Mulo, P., Salminen, T., Maenpaa, P. Structural modeling and environmental regulation of arginine decarboxylase in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* 2006; **184**:397–406
- Jeffries, T.W., Timourien, H., Ward, R.L. Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: effect of varying ammonium and ferric ions, pH and light. *Appl. Environ. Microbiol.* 1978; **35**: 704-710.
- Khetkorn, W., Baebprasert, W., Lindblad, P., Incharoensakdi, A. Redirecting the electron flow towards the nitrogenase and bidirectional Hox-hydrogenase by using specific inhibitors results in enhanced H₂ production in the cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012. *Bioresource Technol* doi:10.1016/j.biortech.2012.05.052.
- Khetkorn, W., Lindblad, P., Incharoensakdi, A. Enhanced biohydrogen production by the N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* strain TISTR 8012. *Int. J. Hydrogen Energy* 2010; **35**:12767- 76.
- Lindberg P, Lindblad P, Cournac L. Gas exchange in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC29133 and its hydrogenase-deficient mutant strain NHM5. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; **70**: 2137-2145.
- Lopes Pinto, F.A., Troshina, O., Lindblad, P. A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution. *Int. J. Hydrog. Energy.* 2002; **27**: 1209-1215.
- Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P., Incharoensakdi, A. A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 2010; **35**:13193-99.

- Masepohl, B., Schoelisch, K., Goerlitz, K., Kutzki, C., Bhme, H. The heterocyst-specific *fdxH* gene product of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is important but not essential for nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 1997; **253**: 770-776.
- Meeks, J.C., Castenholz, R.W. Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). *Arch. Microbiol.* 1971; **78**:25–41.
- Moezelaar, R., Bijvank, S.M., Stal, L.J. Fermentation and sulfur reduction in the mat-building cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; **62**: 1752-1758.
- Moezelaar, R., Stal, L.J. Fermentation in the unicellular cyanobacterium *Microcystis* PCC7806. *Arch. Microbiol.* 1994; **162**: 63-69.
- Mühling, M., Belay, A., Whitton, B.A. Screening *Arthrospira* (Spirulina) strains for heterotrophy. *J. Appl. Phycol.* 2005; **17**:129-35.
- Orme-Johnson, W.H. Nitrogenase structure: where to now? *Science.* 1992; **257**: 1639-1640.
- Saxena, R.K. Iron induced metabolic changes in the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Indian J. Exp. Biol.* 2006; **44**:849-51.
- Serebryakova, L.T., Sheremetieva, M.E., Lindblad, P. H₂-uptake and evolution in the unicellular cyanobacterium *Chroococcidiopsis thermalis* CALU 758. *Plant Physiol. Biochem.* 2000; **38**: 525-530.
- Shah, V., Garg, N., Madamwar, D. Ultrastructure of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* and exploitation of the culture for hydrogen production. *Folia. Microbiol.* 2003; **48**: 65-70.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wunchiers, R., Lindblad, P. Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002; **66**: 1-20.
- Tredici, M.R., Margheri, M.C., Philippis, R.D., Materassi, R. The role of hydrogen metabolism in photoheterotrophic cultures of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain Cc isolated from *Cycas circinalis* L. *J. Gen. Microbiol.* 1990; **136**:1009-15.

ภาคผนวก

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุน

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 1 ฉบับ

Wuttinun Raksajit, Khomson Satchasataporn, Kirsi Lehto, Pirkko Maenpaa, Aran Incharoensakdi (2012) Enhancement of hydrogen production by the filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005 *International Journal of Hydrogen Energy* 37: 18791-18797

2. บทความเชิงวิชาการในวารสารระดับชาติ จำนวน 1 ฉบับ

Wuttinun Raksajit, Khomson Satchasataporn (2011) Factors Influencing Hydrogenase and Nitrogenase Activity in Cyanobacterial Biohydrogen Production. *KKU Science Journal* (Reviewed in Thai) 39:1-13

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและไนโตรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรีย วารสารวิทยาศาสตร์ มข. (KKU Sci. J.) 2554, 39:1-13

3. ฝึกอบรมและวิจัยด้าน Biochemistry and Food Chemistry in Cyanobacteria contributing Biohydrogen Production ณ Department of Biochemistry and Food Chemistry, University of Turku, Turku, Finland ด้วยทุนจาก ERASMUS MUNDUS ภายใต้โปรแกรม Exchange by Promoting Quality Education, Research and Training in South and South-East Asia (EXPERTS) การแลกเปลี่ยนครั้งนี้ทำให้มีโอกาสดำเนินการความร่วมมือทางงานวิจัยเพิ่มขึ้นที่ Department of Biochemistry and Pharmacy, Åbo Akademi University, Finland

4. การเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ที่งานประชุมวิชาการ

Wuttinun Raksajit, Khomson Satchasataporn, Kirsi Lehto, Pirkko Maenpaa, Aran Incharoensakdi (2012) Enhancement of hydrogen production by the filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005

การประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 12 ณ โรงแรมฮอติเต็ลอินน์ รีสอร์ทที่รีเจนท์ บีช ชะอำ จ.เพชรบุรี ในวันที่ 10-12 ตุลาคม 2555

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/he

Enhancement of hydrogen production by the filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005

Wuttinun Raksajit^a, Khomson Satchasataporn^a, Kirsi Lehto^b, Pirkko Mäenpää^b, Aran Incharoensakdi^{c,*}

^a Center of Integrated Bioscience for Animal Health and Alternative Energy, Department of Veterinary Technology, Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

^b Department of Biochemistry and Food Chemistry, Laboratory of Molecular Plant Biology, FI20014 Turku, Finland

^c Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2012

Received in revised form

27 September 2012

Accepted 3 October 2012

Available online 27 October 2012

Keywords:

Arthrospira sp. PCC 8005

Hydrogen production

Hydrogenase

Iron supplementation

Reductant

Nitrogen and sulphur deprivation

ABSTRACT

The efficiency of hydrogen production by different cyanobacterial species depends on several external factors. We report here the factors enhancing hydrogen production by filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005. Cells adapted to dark-anaerobic conditions produced hydrogen consistent with increased hydrogenase activity when supplemented with Fe²⁺. Stimulation of hydrogen production could be achieved by addition of reductants, either dithiothreitol or β-mercaptoethanol with higher production observed with the latter. Additionally, Fe²⁺ and β-mercaptoethanol added to nitrogen- and sulphur-deprived cells significantly stimulated H₂ production with maximal value of $5.91 \pm 0.14 \mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chl a}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Glucose and a small increase of osmolality imposed by either NaCl or sorbitol enhanced hydrogen production. High rates of hydrogen production were obtained in cells adapted in nitrogen-deprived medium with neutral and alkaline external pH, significant decrease of hydrogen production occurred under acidic external pH.

Copyright © 2012, Hydrogen Energy Publications, LLC. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Photobiological hydrogen production is one of the attractive renewable energy sources being considered nowadays as an alternative source to the limited fossil fuels. Hydrogen seems to be an ideal fuel since it is environmentally friendly and clean-burning. Cyanobacteria are among the most ancient oxygenic phototrophic organism on Earth, that can produce molecular hydrogen from water by using energy from sunlight. Most cyanobacteria are able to produce biohydrogen mediated by several enzymes [1–3]. Nitrogenase, generating

hydrogen as a by-product of fixing molecular nitrogen gas, is localized in heterocysts of filamentous cyanobacteria as well as in unicellular cyanobacteria [4]. Other enzymes involved are the uptake hydrogenase which catalyses the hydrogen consumption, and a bidirectional hydrogenase which catalyses both consumption and production of hydrogen [3,5].

Arthrospira is an individual genus consisting of various different species including *A. maxima* and *A. platensis* [6]. These filamentous *Arthrospira* species are representatives of the non-heterocystous cyanobacteria, that lack any heterocysts (specialized thick-walled cells) or akinete differentiations

* Corresponding author. Tel.: +66 2218 5424; fax: +66 2218 5418.

E-mail addresses: cvtwnr@ku.ac.th (W. Raksajit), cvtkss@ku.ac.th (K. Satchasataporn), klehto@utu.fi (K. Lehto), pirmae@utu.fi (P. Mäenpää), aran.i@chula.ac.th (A. Incharoensakdi).

0360-3199/\$ – see front matter Copyright © 2012, Hydrogen Energy Publications, LLC. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.10.011>

which occur in some filamentous N_2 -fixing cyanobacteria [4]. These organisms show a vital gliding motility of filamentous segment (trichomes) [7]. The genome sequence of cyanobacterium *Arthrospira platensis* NIES-39 and *Arthrospira* sp. PCC 8005 have been recently reported [8,9]. The *Arthrospira* is an attractive candidate for a cell factory for (edible) biomass production. In addition, due to its ability to produce hydrogen, it may be also usable for clean biohydrogen energy production [10–12].

The efficiency of hydrogen production by different cyanobacterial strains depends on several external factors. Many nitrogen-fixing cyanobacteria can produce hydrogen under an anaerobic atmosphere, and do very well under anaerobic conditions. Some cyanobacteria have the enzymes for nitrogen fixation and hydrogen production within heterocysts to avoid inactivation of the enzymes by molecular oxygen [13]. For filamentous cyanobacteria lacking heterocysts, some have developed behaviour of compartmentalizing nitrogen fixation within indispensable regions of trichomes, while others activate its nitrogenase at night [14].

Previous studies have demonstrated that different growth media, pH, and nutrient availability are key factors for a successful hydrogen production by different cyanobacteria [15]. Adequate metal concentration in the growth medium is also needed for hydrogen production by filamentous *Spirulina maxima* [9]. The N_2 -fixing cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Anabaena* CH3 are able to use organic carbon substrates for hydrogen production [16,17]. Nitrogen deprivation enhanced the production of hydrogen in a unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [18] and in a filamentous cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012 [19]. As environmental factors may often result in growth limitation and consequent inhibition of hydrogen production, it is important to find proper conditions to increase biohydrogen production. In this study we have examined external factors such as nitrate deprivation, sulphur deprivation, addition of iron, organic carbon sources, pH variation, reductants and external osmolality, affecting hydrogen production in the filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005.

2. Materials and methods

2.1. Strain and cultivation

Arthrospira sp. PCC 8005 (hereafter called *Arthrospira*) was photoautotrophically cultivated in 50 ml of Zarrouk medium [20] under continuous cool white fluorescent lamps ($40 \mu\text{molE m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on a rotatory shaker at 120 rpm at 30°C . Cell growth was monitored by measuring the optical density at 730 nm (OD_{730}). Other growth media used were ZN_0 (Zarrouk medium without nitrate), ZN_0C_0 (ZN_0 medium without Na_2CO_3), ZN_0C_0 supplemented with different sugars (sucrose, fructose or glucose), ZN_0 supplemented with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl or sorbitol, β -mercaptoethanol or dithiothreitol, at indicated concentrations. ZN_0 -S-deprived (ZN_0 medium with the following modifications: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ replaced with $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ replaced with $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ replaced with CuCl_2 and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ replaced with $\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, all in equal molarity). The pH of culture medium was adjusted to 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 using

25%(v/v) HCl and 5 N NaOH to determine the influence of initial cultivation pH. The effect of external pH was investigated using cells grown in ZN_0 medium containing a pH controlled buffer for 24 h (final concentration of the buffer was 50 mM, acetate buffer for pH 5.0 and 6.0; Tris buffer for pH 7.0, 8.0 and 9.0; sodium phosphate buffer for pH 10.0 and 11.0) before measuring the H_2 production.

2.2. Chlorophyll a determination

The content of chlorophyll a (Chla) was determined using 90% (v/v) methanol extracts [21].

2.3. Cell preparation

Arthrospira cells were harvested at mid-logarithmic growth phase (6 days) by centrifugation at room temperature. After twice washing with ZN_0 medium, the pellet was resuspended in ZN_0 medium followed by 24 h cultivation. The pellets were harvested and resuspended in 5 ml of ZN_0 medium. The vials containing suspension were bubbled with argon for 5 min. The vials were sealed with a rubber septum and an aluminium lid before placing upside down in darkness under anaerobic condition for 24 h prior to measurement of H_2 production.

2.4. Measurement of H_2 production

Gas samples (500 μl) from the head space of the vial were withdrawn with a syringe. The samples were analysed by a gas chromatography (Shimadzu, Kyoto, Japan, a Molecular Sieve 5 Å, 60/80 Mesh column) according to Baebprasert et al. [18]. Conditions were as follows: carrier gas-argon, flow rate of 30 ml min^{-1} , column oven at 50°C and a thermal conductivity detector at 100°C . The hydrogen production rate is expressed as μmol of H_2 evolved per mg of Chla per hour.

2.5. Hydrogenase activity determination

The hydrogenase activity was determined according to Baebprasert et al. [18]. Briefly, the *Arthrospira* reaction mixture (2 ml) contained 1 ml of cell suspensions in 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 5 mM methyl viologen, and 20 mM sodium dithionite in a 10 ml glass vial under an argon atmosphere, sealed with a rubber septum and an aluminium lid. The vials were placed at room temperature for 10 min. The hydrogenase activity is expressed as μmol of H_2 evolved per mg of Chla per hour.

3. Results and discussion

3.1. Growth and hydrogen production under iron supplementation

Growth of *Arthrospira* was examined in Zarrouk medium in the presence of different concentrations of iron (Fe^{2+}) as shown in Fig. 1A. Supplementation of iron with increasing concentration only slightly stimulated the growth of *Arthrospira*, except for those at very high concentration (20 and 25 mg L^{-1}) which slightly reduced the growth rate.

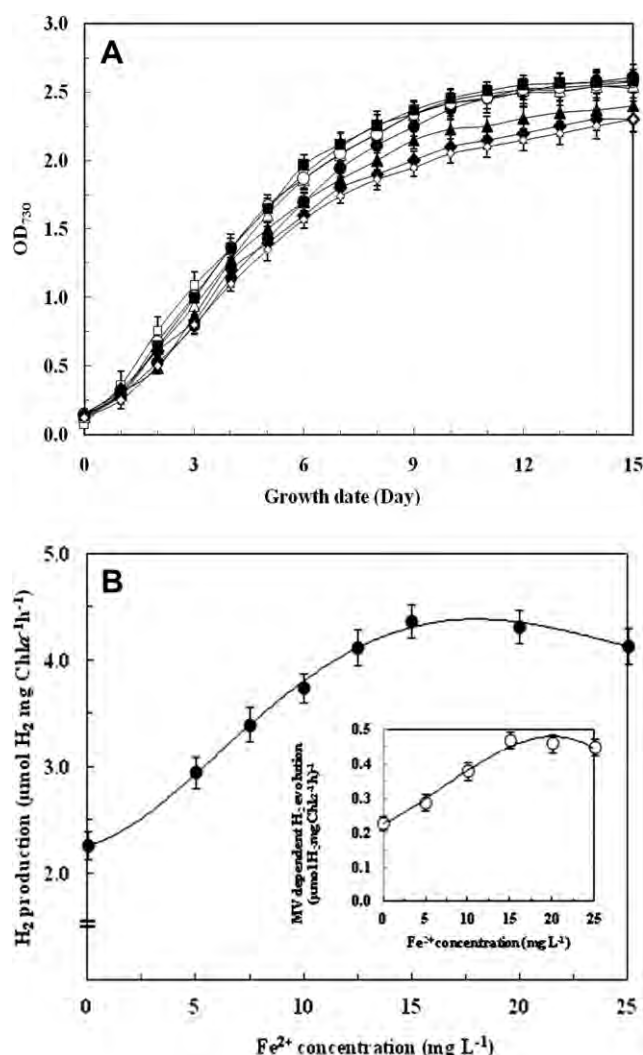


Fig. 1 – Influence of iron on *Arthrospira* sp. PCC 8005 growth and its H₂ production. (A) Growth of *Arthrospira* sp. PCC 8005 in Zarrouk medium supplemented with various concentrations of Fe²⁺: 0 mg L⁻¹ (◇), 5 mg L⁻¹ (●, control), 7.5 mg L⁻¹ (□), 10 mg L⁻¹ (△), 12.5 mg L⁻¹ (○), 15 mg L⁻¹ (■), 20 mg L⁻¹ (▲), 25 mg L⁻¹ (◆). (B) H₂ production and hydrogenase activity were determined after incubation under darkness and anaerobic conditions for 24 h using cells adapted in ZN₀ medium, supplemented with various concentrations of Fe²⁺ as indicated. Inset: Bidirectional hydrogenase activity measured as H₂ production using methyl viologen (MV) as electron donor. Means ± S.D. (n = 3).

Undoubtedly, availability of appropriate amount of iron is beneficial for the growth of *Arthrospira*. However, excess of iron may be harmful to the cell growth and photosynthetic activity, as has been reported for *Anabaena* PCC 7120 [22] and *Synechocystis* sp. E35 [23].

Arthrospira adapted under nitrate-deprivation condition produced hydrogen consistent with hydrogenase activity in the argon atmosphere under anaerobic-dark condition. No H₂ production was observed in the presence of nitrate in Zarrouk medium (data not shown). In the absence of iron, a small

amount of hydrogen was produced consistent with a low hydrogenase activity (Fig. 1B). Hydrogen production by *Arthrospira* increased with increasing amount of Fe²⁺ in the experimental range of the Fe²⁺ supplementation up to 15.0 mg L⁻¹. Under these conditions, the hydrogen yield reached the maximum of $4.37 \pm 0.15 \mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ with a maximum value of hydrogenase activity at $0.47 \pm 0.02 \mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 1B, inset). Results indicated that the activity of hydrogen production of *Arthrospira* could be improved by supplementation to the growth medium with proper Fe²⁺ concentration. This may be related to the requirement of iron for the hydrogenase activity, as it has been previously demonstrated that iron activates hydrogenase isolated from *Spirulina maxima*, by over 120% [9]. Therefore it is likely that iron plays an important role for H₂ evolution in *Arthrospira*. On the other hand, a further increase in iron concentration resulted in inhibition not only in metabolic enzyme activity but also the heterocyst differentiation in *Anabaena* PCC 7120 [22].

3.2. Effect of different carbon sources and glucose concentration on H₂ production

Cyanobacteria are capable of metabolizing both CO₂ and bicarbonate ions (HCO₃⁻) as inorganic carbon sources to support their growth. They are also able to use various organic carbon sources such as glucose, fructose, galactose and lactose for hydrogen production [18,19]. *Arthrospira* strains have ability to grow in the dark heterotrophically on glucose and fructose as carbon sources, but not on any of the disaccharides. Cells of *Arthrospira* failed to grow with sucrose, although they remained yellow-green for a long period [24]. In the present study, *Arthrospira* was able to produce hydrogen when grown in ZN₀C₀ (C-deprived) medium, indicating that it can use CO₂ as efficiently as the bicarbonate ions. Interestingly, hydrogen production was significantly increased by addition of glucose, while fructose hardly stimulated the production, and sucrose suppressed it significantly (Fig. 2A). It was found that glucose at 0.1% (w/v) yielded the highest H₂ production at $3.61 \pm 0.17 \mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 2B). This observation is in agreement with previous results using either the N₂-fixing cyanobacterium *Nostoc* sp. strain Cc or non-N₂-fixing cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, both of which were able to utilize glucose for hydrogen production [18,25]. Hydrogen production decreased with glucose concentrations higher than 0.2% (Fig. 2B). At very high concentration of glucose, cells might be forced to expend needed energy to excrete sugar out of the cells and thereby lower their capacity for H₂ production.

3.3. Effect of initial and external pH on H₂ production

It is important to adjust the pH value of the *Arthrospira* in an optimal range to maintain hydrogen production. The changes of initial cultivation pH between 5.0 and 11.0 affected the hydrogen production by *Arthrospira* (Fig. 3). Hydrogen production was drastically lowered at acidic initial pH 5.0. The hydrogen yield increased as the initial pH increased from 6.0 to 9.0 and reached a maximum of $2.99 \pm 0.18 \mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at initial pH 9.0. Besides, an initial pH higher

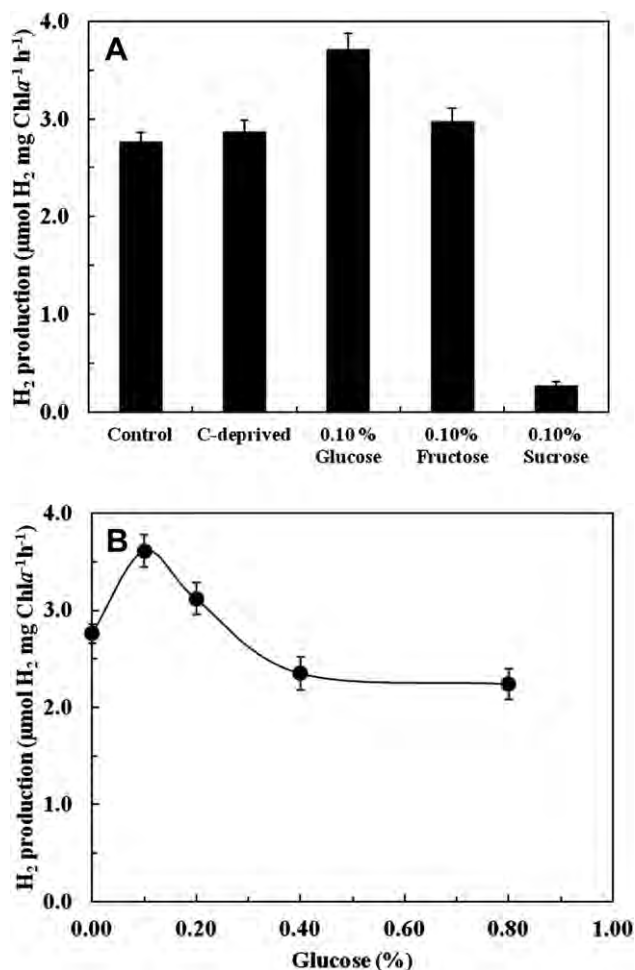


Fig. 2 – Effect of organic carbon source and glucose concentrations on H₂ production by *Arthrospira* sp. PCC 8005. (A) H₂ production was determined after incubation under darkness and anaerobic conditions for 24 h using cells adapted in ZN₀ (control), ZN₀ medium lacking Na₂CO₃ (ZN₀C₀) (C-deprived) and ZN₀C₀ medium supplemented with either 0.1% glucose, fructose or sucrose. (B) Effect of glucose concentration on H₂ production. Means ± S.D. (n = 3).

than 10.0 resulted in a sharp decrease in hydrogen production rate. Different responses to changes in initial cultivation pH were reported for hydrogen-producing bacteria. For instance, the favourable effect of a low initial cultivation pH on the hydrogen yield was shown in mixed culture of *Clostridium* sp., *Klebsiella* sp. and *Streptococcus* sp. [26], and axenic culture of *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 [27]. Additionally, the changes of external pH also affected the hydrogen production by *Arthrospira*. The hydrogen yield increased as the external pH increased from 5.0 to 11.0. The highest yield was $3.10 \pm 0.25 \mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at external pH 11.0. A similar hydrogen yield between initial pH and external pH was observed at pH 7.0 to 10.0. These results are most likely due to the favourable adaptation of *Arthrospira* to alkaline growth conditions. These results are in line with the previous study demonstrating that hydrogen production of *Tetraspora* sp. CU2551 increased with increasing external pH from 5.75 to

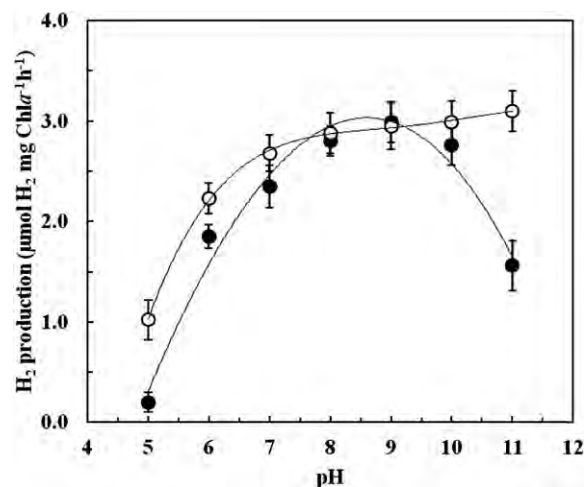


Fig. 3 – Effect of initial and external pH on H₂ production by *Arthrospira* sp. PCC 8005. For initial pH, H₂ production was measured from cells adapted in ZN₀ medium with initial cultivation pH varying from 7.0 to 11.0 after 24 h incubation under darkness and anaerobic conditions (●). For external pH, the cultures were buffered with controlled buffer (final concentration 50 mM, pH 5.0 and 6.0, acetate buffer; pH 7.0, 8.0 and 9.0, Tris buffer; pH 10.0 and 11.0, sodium phosphate buffer) incubated under darkness and anaerobic conditions before measuring the H₂ production (○). Means ± S.D. (n = 3).

9.30 [28]. Similar relationships between the effects of the initial and external pH on hydrogen production have been reported by Wu and Lin [29].

3.4. Effect of reductants and sulphur deprivation on H₂ production

Several studies have shown that the electron sink generated by reduction/oxidation status controls hydrogenases [30]. The hydrogenase produces hydrogen from excess reductant which is made available through the anaerobic fermentative breakdown of stored organic carbon. When excess reductant is available, the cells may be able to effectively avoid excess energy through the production of molecular hydrogen [31]. Fig. 4A shows that *Arthrospira* adapted in ZN₀ medium supplemented with 1.5 mM β-mercaptoethanol had an increased hydrogen production, 1.5-fold of that without supplementation, with a maximal value of $3.90 \pm 0.15 \mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Cells adapted in ZN₀ medium supplemented with 1.5 mM dithiothreitol also showed slight stimulation of hydrogen production. No further increase of hydrogen production was observed when the concentrations of these two reductants were raised to 5 mM. These results are in agreement with a previous study using *Tetraspora* sp. CU2551 [28].

Limited concentrations of macronutrients (nitrogen or sulphur) induce a set of general responses in cyanobacteria that could lead to elevated H₂ evolution. Nitrogen deprivation triggers cells to generate electron sink providing excess electron for hydrogenase [30]. Sulphur is mainly required as a nutrient for cell metabolism and was used as a tool in

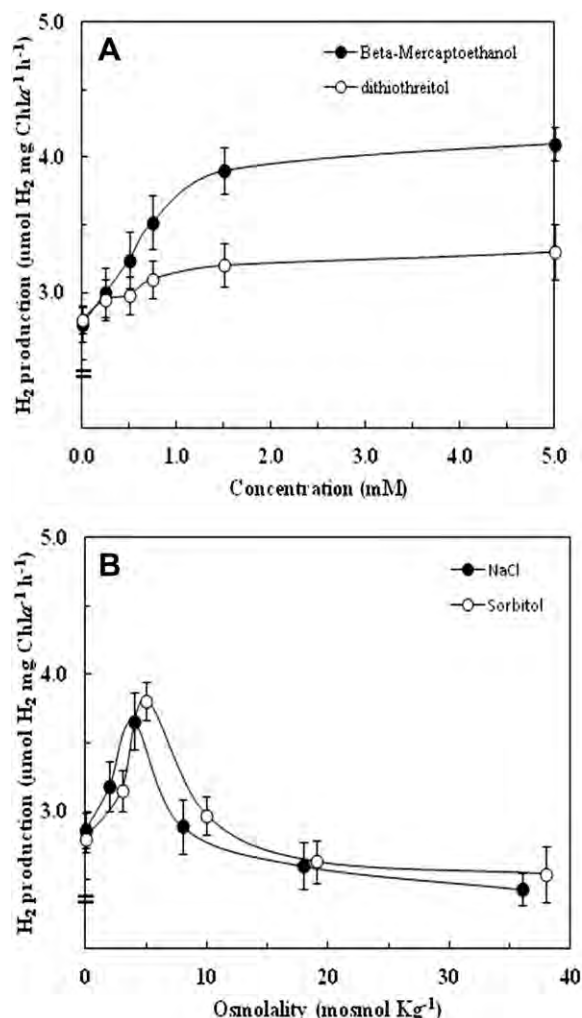


Fig. 4 – Effect of reducing agents and osmolality on H₂ production. (A) Effect of reducing agents on H₂ production by *Arthrospira* sp. PCC 8005. Cells were adapted in ZN₀ medium supplemented with β-mercaptoethanol (●) or dithiothreitol (○) with various concentrations (0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, and 5 mM) for 24 h under darkness and anaerobic conditions before being analysed for H₂ production. Means ± S.D. (n = 3). (B) Effect of osmolality on H₂ production by *Arthrospira* sp. PCC 8005. Cells adapted in ZN₀ medium supplemented with NaCl (●) (0, 2, 4, 8, 18, and 36 mOsmol kg⁻¹) or sorbitol (○) (0, 3, 5, 10, 19, and 38 mOsmol kg⁻¹) for 24 h under darkness and anaerobic conditions to generate indicated osmolality followed by the analysis of H₂ production. Means ± S.D. (n = 3).

altering cellular metabolism, thus redirecting photosynthetic electron transport towards hydrogen production in *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 [32]. Recently the redirecting of electron flow towards hydrogenase and/or nitrogenase has been reported to increase hydrogen production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Anabaena siamensis* TISTR 8012 [33,34]. The results in Table 1 revealed that cells adapted under ZN₀-S-deprived medium resulted in significantly enhanced hydrogen production, approximately 1.4-fold

Table 1 – Hydrogen production of *Arthrospira* sp. PCC 8005 under applied conditions.

Conditions	Hydrogen production ^a (μmol H ₂ mg Chl a ⁻¹ h ⁻¹)
ZN ₀	2.76 ± 0.16
ZN ₀ + 15 mg L ⁻¹ Fe ²⁺ (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	4.37 ± 0.15
ZN ₀ + 15 mg L ⁻¹ Fe ²⁺ (FeCl ₂ ·2H ₂ O)	4.31 ± 0.16
ZN ₀ -S-deprived	3.93 ± 0.15
ZN ₀ -S-deprived + 15 mg L ⁻¹ Fe ²⁺ (FeCl ₂ ·2H ₂ O)	4.53 ± 0.16
ZN ₀ -S-deprived + 15 mg L ⁻¹ Fe ²⁺ (FeCl ₂ ·2H ₂ O) + 1.5 mM β-mercaptoethanol	5.91 ± 0.14
ZN ₀ -S-deprived + 15 mg L ⁻¹ Fe ²⁺ (FeCl ₂ ·2H ₂ O) + 1.5 mM dithiothreitol	4.22 ± 0.17

^a Means ± S.D. (n = 3).

increase compared with ZN₀-adapted cells. Supplementation of iron generated from FeSO₄ or FeCl₂ into ZN₀-adapted cells enhanced regularly hydrogen production. Additionally, a combination of ZN₀-S-deprived cells, Fe²⁺ (15.0 mg L⁻¹) and 1.5 mM β-mercaptoethanol gave the highest H₂ production with the value of 5.91 ± 0.14 μmol H₂ mg Chl a⁻¹ h⁻¹ in the present study.

3.5. Effect of osmolality on H₂ production

Arthrospira cells were adapted for 24 h in ZN₀ medium supplemented with NaCl or sorbitol to generate different osmolalities. An increase of about 35% of hydrogen production was observed by the low osmolalities at about 5 mOsmol kg⁻¹ (Fig. 4B). A sharp decrease in hydrogen production was observed by increasing the osmolalities. These observations are in agreement with previous results using unicellular non-N₂-fixing cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [18]. It is known that various stresses change the physiological and biochemical responses and affect adversely growth and photosynthesis of *Spirulina platensis* [35]. Cyanobacteria are able to synthesize and take up a variety of proteins and organic compatible solutes to balance the osmotic potential, and to prevent influx of sodium ion under salt-stress conditions or to protect membranes and proteins [36]. Elevated salt concentration (0.25–1.0 M NaCl) in *Arthrospira maxima* growth medium resulted in increased accumulation of sugars (osmolytes) up to 4-fold with the consequent reduction of hydrogen production [37].

3.6. Comparison of H₂ production between *Arthrospira* sp. PCC 8005 and other cyanobacterial strains under optimal conditions

Our results show that the non-N₂-fixing filamentous cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005 can evolve significant amount of hydrogen, comparable to other *Arthrospira* species; *Arthrospira platensis* NIES-46 and *Arthrospira maxima* CS-328 (Table 2). *Arthrospira* sp. PCC 8005 has the capacity to produce 20-times and 8-times as much hydrogen as the N₂-

Table 2 – Comparison of H₂ production between *Arthrospira* sp. PCC 8005 and other cyanobacterial strains.

Organism	Morphology	Maximum H ₂ production	Growth condition	H ₂ production condition
<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 (This study)	Non-N ₂ -fixing filamentous with no heterocysts	2.76 $\mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 5.91 $\mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Air, Zarrouk medium, 30 °C, 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Air, Zarrouk medium, 30 °C, 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Ar, ZN ₀ , 30 °C, Darkness Ar, ZN ₀ -S-deprived, 15 $\text{mg L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$, 1.5 mM β -mercaptoethanol 30 °C, Darkness
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-46 [ref. [11]]	Non-N ₂ -fixing filamentous with no heterocysts	0.10 $\mu\text{mol H}_2 \text{ mg dry-wt}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Air, SOT medium, 30 °C, 5 klx	N ₂ , SOT medium, 30 °C, Darkness
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328 [ref. [37]]	Non-N ₂ -fixing filamentous with no heterocysts	0.19 $\text{ml H}_2 \text{ g dry-wt}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Air, Zarrouk medium, 1 $\mu\text{M Ni}^{+}$, 30 °C, 12 h light/dark cycles	Ar, Zarrouk medium, 1 $\mu\text{M Ni}^{+}$, Darkness
<i>Anabaena siamensis</i> TISTR 8012 [ref. [19]]	N ₂ -fixing filamentous with heterocysts	8.68 $\mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Air, BG11 ₀ , 30 °C, 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Ar, BG11 ₀ , 30 °C, 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
<i>Calothrix</i> sp. XPORK1A [ref. [38]]	N ₂ -fixing filamentous with heterocysts	0.34 $\mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Air, Z8x, 22 °C, 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Ar, Z8x, 23 °C, 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
<i>Nodularia</i> sp. SR5a [ref. [38]]	N ₂ -fixing filamentous with heterocysts	0.14 $\mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Air, Z8xs, 22 °C, 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Ar, Z8, 23 °C, Darkness
<i>Microcystis</i> Syke 967/5 [ref. [38]]	Non-N ₂ -fixing unicellular	0.04 $\mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Air, Z8, 22 °C, 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Ar, Z8, 23 °C, Darkness
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 [ref. [18]]	Non-N ₂ -fixing unicellular	0.02 $\mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Air, BG11, 30 °C, 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Ar, BG11 ₀ , 30 °C, 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

fixing filamentous cyanobacterium *Nodularia* sp. SR5a [38] and *Calothrix* sp. XPORK1A [38], but its production was about one-third of that in the N₂-fixing filamentous cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012 under nitrogen deprived conditions. However, the maximum H₂ production rates in *Arthrospira* sp. PCC 8005 was $5.91 \pm 0.14 \mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ under ZN₀-S-deprived condition combined with 15 mg L^{-1} iron supplementation and 1.5 mM β -mercaptoethanol. In addition, *Arthrospira* sp. PCC 8005 produces higher amount of H₂ than the unicellular cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 [18] and *Microcystis* Syke 967/5 [38].

Changes in the composition of the growth medium and/or the medium during hydrogen production affected the hydrogen production rate depending on the strains. For example, the hydrogen production rates were different among the *Arthrospira* strains. Addition of either Ni²⁺ to the growth medium of *Arthrospira maxima* CS-328 [37], or Fe²⁺ to the growth medium of *Arthrospira* sp. PCC 6803 (in this study), led to an increase in H₂ production rate, by enhancing the hydrogenase activity. These results demonstrate that optimizing the external factors for improved hydrogen production requires individual approaches for each promising hydrogen-producing strain. *Arthrospira* sp. PCC 8005 is therefore an attractive model strain suitable for further improvement of photobiological hydrogen production employing metabolic engineering approach as recently reported in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Anabaena siamensis* TISTR 8012 [33,34].

4. Conclusions

Arthrospira sp. PCC 8005 evolved H₂ continuously in nitrogen-deprived Zarrouk medium under dark anaerobic conditions. High rates of hydrogen production were obtained in cells adapted in nitrogen- and sulphur-deprived medium

supplemented with iron and β -mercaptoethanol. The rates of hydrogen production by *Arthrospira* sp. PCC 8005 are not as high as that by the heterocystous *Anabaena siamensis* TISTR 8012. Nevertheless, it is likely that a further increase in hydrogen production rate could be achieved by means of redirecting the electron supply towards the hydrogenase either by genetic engineering or using metabolic inhibitors of certain electron-competing pathways.

Acknowledgements

We thank Dr. Natalie Leys (Unit of Microbiology, Institute for Environment, Health and Safety-Belgian Nuclear Research Centre SCKCEN, Boeretang200, Belgium) for *Arthrospira* sp. PCC 8005. This work was supported by Research Grant for New Scholar (MRG5300825) co-funded by Thailand Research Fund (TRF) and Commission on Higher Education (CHE) and Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI) (M-W9.53) to W. Raksajit. The EXPERTS Fellowship for academic staff exchange of W. Raksajit is also acknowledged. A. Incharoensakdi thanks CHE (the university staff development consortium), the Thai Government SP2 (TKK 2555), and the National Research University Project (FW0659A) for the grants.

REFERENCES

- [1] Antal TK, Oliveira P, Lindblad P. The bidirectional hydrogenase in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Int J Hydrogen Energy* 2006;31:1439–44.
- [2] Quintana N, Van der Kooy F, Van de Rhee MD, Voshol GP, Verpoorte R. Renewable energy from cyanobacteria: energy

- production optimization by metabolic pathway engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;91:471–90.
- [3] Tamagnini P, Leitao E, Oliveira P, Ferreira D, Pinto F, Harris DJ, et al. Cyanobacterial hydrogenase: diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiol Rev* 2007;31:692–720.
 - [4] Tsygankov A. Nitrogen-fixing cyanobacteria: a review. *Appl Biochem* 2007;43:250–9.
 - [5] Carrieri D, Wawrousek K, Eckert C, Yu J, Maness PC. The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria. *Bioresour Technol* 2011;102:8368–77.
 - [6] Castenholz RW, Rippka R, Herdman M, Wilmotte A. Subsection III. (formerly oscillatorioides Elenkin 1934). In: Boone DR, Castenholz RW, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer; 2001. p. 539–62.
 - [7] Hoiczky E. Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations. *Arch Microbiol* 2000;174:11–7.
 - [8] Fujisawa T, Narikawa R, Okamoto S, Ehira S, Yoshimura H, Suzuki I, et al. Genomic structure of an economically important cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. *DNA Res* 2010;17:85–103.
 - [9] Janssen PJ, Morin N, Mergeay M, Leroy B, Wattiez R, Vallaes T, et al. Genome sequence of the edible cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005. *J Bacteriol* 2010;192:2465–6.
 - [10] Aoyama K, Uemura I, Miyake J, Asada Y. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *J Ferment Bioeng* 1997;83:17–20.
 - [11] Dismukes GC, Carrieri D, Bennette N, Ananyev GM, Posewitz MC. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19:235–40.
 - [12] Llama MJ, Serra JL, Rao KK, Hall DO. Isolation and characterization of the hydrogenase activity from the non-heterocystous cyanobacterium *Spirulina maxima*. *FEBS Lett* 1979;98:342–6.
 - [13] Peterson RB, Wolk CP. Localization of an uptake hydrogenase in *Anabaena*. *Plant Physiol* 1978;61:688–91.
 - [14] Janson S, Carpenter EJ, Bergman B. Compartmentalisation of nitrogenase in a non-heterocystous cyanobacterium: *Trichodesmium contortum*. *FEMS Microbiol Lett* 1994;118:9–14.
 - [15] Dutta D, De D, Chaudhuri S, Bhattacharya SK. Hydrogen production by cyanobacteria. *Microb Cell Fact* 2005;4:36.
 - [16] Chen PC, Fan SH, Chiang CL, Lee CM. Effect of growth conditions on the hydrogen production with cyanobacterium *Anabaena* sp. strain CH3. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:1460–4.
 - [17] Reddy PM, Spiller H, Albrecht SL, Shanmugam KT. Photodissimilation of fructose to H₂ and CO₂ by a dinitrogen fixing cyanobacterium, *Anabaena variabilis*. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:1220–6.
 - [18] Baebprasert W, Lindblad P, Incharoensakdi A. Response of H₂ production and Hox-hydrogenase activity to external factors in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:6611–6.
 - [19] Khetkorn W, Lindblad P, Incharoensakdi A. Enhanced biohydrogen production by the N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* strain TISTR 8012. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:12767–76.
 - [20] Zarrouk C. Contribution a l'étude du cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitl. PhD thesis: University of Paris. France: 1966.
 - [21] MacKinney G. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J Biol Chem* 1941;140:315–22.
 - [22] Saxena RK. Iron induced metabolic changes in the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Indian J Exp Biol* 2006;44:849–51.
 - [23] Demirel S, Ustun B, Aslim B, Suludere Z. Toxicity and uptake of iron ions by *Synechocystis* sp. E35 isolated from Kucukcekmece Lagoon, Istanbul. *J Harzard Mater* 2009;171:710–6.
 - [24] Mühling M, Belay A, Whitton BA. Screening *Arthrospira (Spirulina)* strains for heterotrophy. *J Appl Phycol* 2005;17:129–35.
 - [25] Tredici MR, Margheri MC, Philippis RD, Materassi R. The role of hydrogen metabolism in photoheterotrophic cultures of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain Cc isolated from *Cycas circinalis* L. *J Gen Microbiol* 1990;136:1009–15.
 - [26] Lin CH, Hung CH, Chen CH, Chung WT, Cheng LH. Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. *Process Biochem* 2006;41:1383–90.
 - [27] Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochem* 2000;35:589–93.
 - [28] Maneeruttanarungroj C, Lindblad P, Incharoensakdi A. A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:13193–9.
 - [29] Wu JH, Lin CY. Biohydrogen production by mesophilic fermentation of food wastewater. *Water Sci Technol* 2004;49:223–8.
 - [30] Kruse O, Hankamer B. Microalgal hydrogen production. *Curr Opin Biotechnol* 2010;21:238–43.
 - [31] Ihara M, Nakamoto H, Kamachi T, Okura I, Maedal M. Photoinduced hydrogen production by direct electron transfer from photosystem I cross-linked with cytochrome c3 to (NiFe)-hydrogenase. *Photochem Photobiol* 2006;82:167–85.
 - [32] Antal TK, Lindblad P. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *J Appl Microbiol* 2005;98:114–20.
 - [33] Baebprasert W, Jantaro S, Khetkorn W, Lindblad P, Incharoensakdi A. Increased H₂ production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by redirecting the electron supply via genetic engineering of the nitrate assimilation pathway. *Metab Eng* 2011;13:610–6.
 - [34] Khetkorn W, Baebprasert W, Lindblad P, Incharoensakdi A. Redirecting the electron flow towards the nitrogenase and bidirectional Hox-hydrogenase by using specific inhibitors results in enhanced H₂ production in the cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012. *Bioresour Technol*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.052>.
 - [35] Gong H, Tang Y, Wang J, Wen X, Zhang L, Lu C. Characterization of photosystem II in salt-stressed cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Biochim Biophys Acta* 2008;1777:488–95.
 - [36] Incharoensakdi A, Waditee-Sirisattha R. Regulatory mechanisms of cyanobacteria in response to osmotic stress. In: Srivastava AK, Rai AN, Neilan B, editors. *Stress biology of cyanobacteria: molecular mechanisms to cellular responses*. Taylor & Francis by CRC Press; 2013. p. 203–30.
 - [37] Ananyev G, Carrieri D, Dismukes GC. Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the cyanobacterium "*Arthrospira (Spirulina) maxima*". *Appl Environ Microbiol* 2008;74:6102–13.
 - [38] Allahverdiyeva Y, Leino H, Saari L, Fewer DP, Shunmugam S, Sivonen K, et al. Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:1117–27.



ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และไนโตรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

ของไซยาโนแบคทีเรีย

Factors Influencing Hydrogenase and Nitrogenase Activity in Cyanobacterial Biohydrogen Production

วุฒินันท์ รักษาจิตร^{1*} คมสัน สัจจะสถาพร¹

บทนำ

วิกฤตการณ์ด้านพลังงานและปัญหาสิ่งแวดล้อมเริ่มส่งผลกระทบโดยตรงต่อวิถีการดำรงชีวิตของมนุษย์ในปัจจุบัน เช่น ปัญหาวิกฤตน้ำมัน ราคา น้ำมันที่มีความผันผวนและพุ่งสูงขึ้นในช่วงเวลาที่ผ่านมา และคาดว่าจะมีราคาสูงขึ้นอีกในอนาคตอันใกล้ ซึ่งเกิดจากความต้องการใช้พลังงานที่มากเกินไป แหล่งพลังงานหลักของประเทศได้จากการสันดาป (combustion) เชื้อเพลิงฟอสซิลหรือน้ำมันดิบ ส่งผลให้ในปัจจุบันเกิดความขาดแคลนพลังงานฟอสซิลอยู่ในขั้นวิกฤต อีกทั้งการสันดาปเชื้อเพลิงฟอสซิลทำให้เกิดก๊าซเรือนกระจก (greenhouse gas) อันได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) มีเทน (CH_4) และ ไดไนโตรเจนมอนอกไซด์ (N_2O) เป็นต้น ก๊าซดังกล่าวส่งผลต่อการเกิดภาวะโลกร้อน (global warming) โดยตรงตามมา ในปัจจุบันการศึกษาค้นคว้าวิจัยเพื่อเสาะหาแหล่งพลังงานทดแทนในรูปแบบอื่นเข้ามาใช้เพื่อลดการใช้พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลและช่วยลด

มลพิษต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานไฮโดรเจน (hydrogen energy) เป็นแหล่งพลังงานทางเลือกอีกรูปแบบหนึ่งที่สามารถนำมาทดแทนได้ ด้วยเหตุผลเชิงบวกหลายอย่าง เช่น ในด้านสิ่งแวดล้อม พลังงานไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด (clean fuel) เป็นก๊าซที่ไม่มีสีและไม่มีการปนเปื้อน เมื่อถูกเผาไหม้ด้วยออกซิเจนให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อนซึ่งไม่มีก๊าซเรือนกระจกเกิดขึ้นจึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Lindblad, 1999) ปัจจุบันมีการใช้พลังงานไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นจากกระบวนการทางเคมีเป็นเชื้อเพลิงในหลายด้าน แต่ต้นทุนการผลิตยังคงสูงอยู่ นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจึงหันมาสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากแบคทีเรียหรือที่เรียกว่า ไฮโดรเจนชีวภาพ (biohydrogen) เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่ากระบวนการทางเคมี แบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพ ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรีย แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและแบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจน เป็นต้น

¹ ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

* Corresponding Author, E-mail: cvtwnr@ku.ac.th

ไซยาโนแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria หรือ blue-green algae หรือ cyanophytes) จัดอยู่ในอาณาจักรโปรคาริโอตา (kingdom of prokaryota) ติวชันไซยาโนไฟตา (division of cyanophyta) (Oren, 2004) การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรีย ในระดับของจีนัสและสปีชีส์จะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Rippka, 1988) โดยพิจารณาจากลักษณะการเจริญเติบโต เป็นเซลล์เดี่ยวรวมกันเป็นกลุ่ม หรือเรียงตัวกันอยู่เป็นเส้นสาย และลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็ง (solid agar) เป็นต้น ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่าง 2 แบบ คือ (1) เป็นโคโลนีหรือเซลล์เดี่ยวที่ไม่เป็นเส้นสาย (single cell, unicellular or non filamentous form) เช่น *Chroococcus* sp., *Eucapsis* sp., *Merismopedia* sp. และ *Anacystis* sp. เป็นต้น (2) มีรูปร่างเป็นเส้นสาย (filamentous form) เซลล์จะเรียงต่อกันเป็นเส้นสายตรงและเรียบไม่มีการแตกแขนง เช่น *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp., *Nostoc* sp. และ *Oscillatoria* sp. เป็นต้น หรือเซลล์บิดเป็นเกลียว เช่น *Spirulina* sp. เป็นต้น โครงสร้างเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย ประกอบด้วยผนังเซลล์ (cell wall) ภายในเซลล์มีไรโบโซม (ribosome) ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีไทลาคอยด์ (thylakoid) และมีคลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll a) ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้ยังมีเม็ดสีพวกแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ไฟโคบิลิน (phycobilin) ซึ่งประกอบด้วย ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) และไฟโคอีริทริน (phycoerythrin) (Oren, 2004)

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่อาศัยได้ดี และที่สำคัญไซยาโนแบคทีเรียสามารถนำพลังงานแสงอาทิตย์และคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้เป็นแหล่งพลังงานได้โดยตรงในรูปของน้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงซึ่งเป็นการช่วยลดปริมาณก๊าซเรือนกระจกและเพิ่มปริมาณออกซิเจนได้ ไซยาโนแบคทีเรียนับเป็นผู้ผลิตเบื้องต้น (primary producer) และเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีคุณค่า

เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง (oxygenic photosynthesis plant) ด้วยคุณสมบัติเชิงบวกหลายด้านของไซยาโนแบคทีเรีย นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจึงนิยมใช้ไซยาโนแบคทีเรียเป็นต้นแบบในงานวิจัยทางชีวเคมี พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพ บทความนี้กล่าวถึงลักษณะสมบัติของเอนไซม์ 2 กลุ่ม ได้แก่ ไนโตรจีเนส (nitrogenase) และไฮโดรจีเนส (hydrogenase) (Das and Veziroglu, 2001; Tamagnini et al., 2007) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรีย รวมทั้งกล่าวถึงปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกที่มีอิทธิพลโดยตรงต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพด้วย

ไนโตรจีเนส (nitrogenase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในโครงสร้างเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ของไซยาโนแบคทีเรียแบบเส้นสาย (filamentous cyanobacteria) ที่เจริญเติบโตในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน (nitrogen deficiency) ภายในเฮเทอโรซิสต์ ไซยาโนแบคทีเรียจะตรึงไนโตรเจนในอากาศแล้วเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียกับไฮโดรเจนโดยใช้พลังงาน ATP (รูปที่ 1) ไนโตรจีเนส ที่พบในไซยาโนแบคทีเรียมีรูปแบบที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ ซึ่งแบ่งตามชนิดของโลหะที่เป็นองค์ประกอบร่วมในโครงสร้าง ได้แก่ โมลิบดีนัมไนโตรจีเนส (Mo-containing nitrogenase) (Thiel, 1993) วาเนเดียมไนโตรจีเนส (V-containing nitrogenase) (Kentemich et al., 1991) และไอออนไนโตรจีเนส (Fe-containing nitrogenase) (Bishop and Premakumar, 1992) โครงสร้างประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วย คือ ไดไนโตรจีเนสและไดไนโตรจีเนสรีดักเทส (Flores and Herrero, 1994; Orme-Johnson, 1992)

1. ไดไนโตรจีเนส (dinitrogenase) เป็นเอนไซม์ซึ่งถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *nifD* และ *nifK* ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อย คือ โปรตีน NifD และโปรตีน NifK ตามลำดับ โครงสร้างของไดไนโตรจีเนสเป็น heterotetramer (NifD- α 2 หน่วย และ NifK- β 2 หน่วย) มีขนาดโมเลกุลประมาณ 220

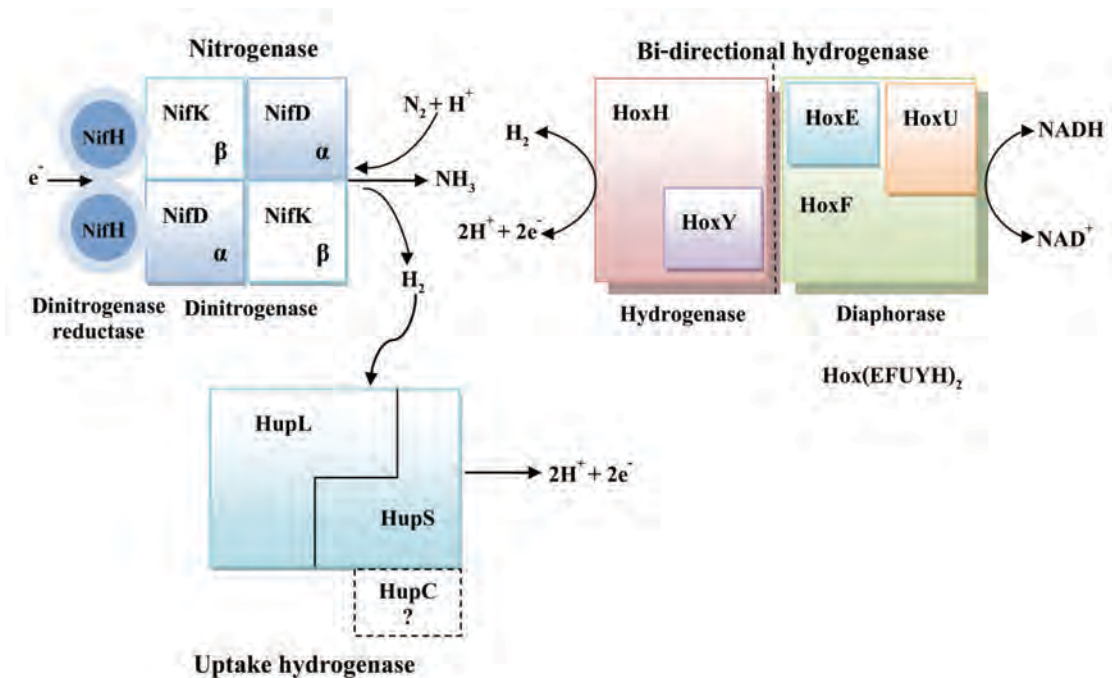
ถึง 240 กิโลดาลตัน (Tamagnini et al., 2007)

2. ไดไนโตรจีเนส รีดักเทส (dinitrogenase reductase) เป็นเอนไซม์ซึ่งถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *nifH* ประกอบด้วยโปรตีน NifH 2 หน่วย โครงสร้างของไดไนโตรจีเนส รีดักเทสเป็น homodimer มีขนาดโมเลกุลประมาณ 60 ถึง 70 กิโลดาลตัน ไดไนโตรจีเนส รีดักเทส มีหน้าที่เป็นตัวกลางขนส่งอิเล็กตรอนจาก ferredoxin หรือ flavodoxin ไปให้กับ ไดไนโตรจีเนส (Masepohl et al., 1997)

ไฮโดรจีเนส (hydrogenase)

1. อัฟเทค ไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase) เป็นเอนไซม์ซึ่งถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *hupSL(C)* ประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อย คือ โปรตีน HupL ขนาดโมเลกุลประมาณ 60 กิโลดาลตัน โปรตีน HupS ขนาดโมเลกุลประมาณ 35 กิโลดาลตัน และโปรตีน HupC ซึ่งยังไม่ได้รับการยืนยันคุณสมบัติ และหน้าที่ (รูปที่ 1) เอนไซม์อัฟเทค ไฮโดรจีเนส สามารถพบได้ที่เยื่อไทลาคอยด์ของเฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรียแบบเส้นสาย ได้แก่ *Anabaena* strain PCC 7120, *Nostoc* strain PCC 73102, *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4 (Happe et al., 2000; Linberg et al., 2000; Leitão et al., 2005) และ *Gloeotheca* sp. ATCC 27152 (Oliveira et al., 2004) เป็นต้น เอนไซม์อัฟเทค ไฮโดรจีเนส มีหน้าที่รับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลไฮโดรเจนไปส่งให้กับโมเลกุลออกซิเจนของกระบวนการหายใจระดับเซลล์

2. ไบไดเรกชันนัล ไฮโดรจีเนส (bidirectional hydrogenase) หรือเรียกอีกชื่อว่า รีเวอร์สซิเบิล ไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณเยื่อไซโตพลาสซึมของเซลล์แตก่งการทำงานที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด สันนิษฐานว่ามีบทบาทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ H_2 (Boison et al., 1999) (รูปที่ 1) เอนไซม์ไบไดเรกชันนัล ไฮโดรจีเนส ซึ่งถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *hoxEFUYH* ประกอบด้วยโปรตีนหลัก 2 ส่วนทำงานร่วมกัน (dimeric protein association) (Schmitz et al., 1995; 2002) คือ (1) ส่วนของไฮโดรจีเนส (hydrogenase subunit) ซึ่งถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *hoxYH* ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อย คือ โปรตีน HoxH และโปรตีน HoxY ขนาดโมเลกุลประมาณ 49 และ 24 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (2) ส่วนของไดอะโฟเรส (diaphorase subunit) ซึ่งถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *hoxEFU* ประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อย คือ โปรตีน HoxE, โปรตีน HoxU และโปรตีน HoxF ขนาดโมเลกุลประมาณ 20, 28 และ 61 กิโลดาลตัน ตามลำดับ พบเอนไซม์ไบไดเรกชันนัล ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Synechocystis* strain PCC 6803, *Synechococcus* strain 6301, *Anabaena* strain PCC 7120, *Anabaena variabilis* strain ATCC 29413, *Anabaena variabilis* strain IAM M58 (Schmitz et al., 1995; 2002), *Microcystis aeruginosa* (Asada et al., 1987) และ *Spirulina maxima* (Llama et al., 1979) เป็นต้น



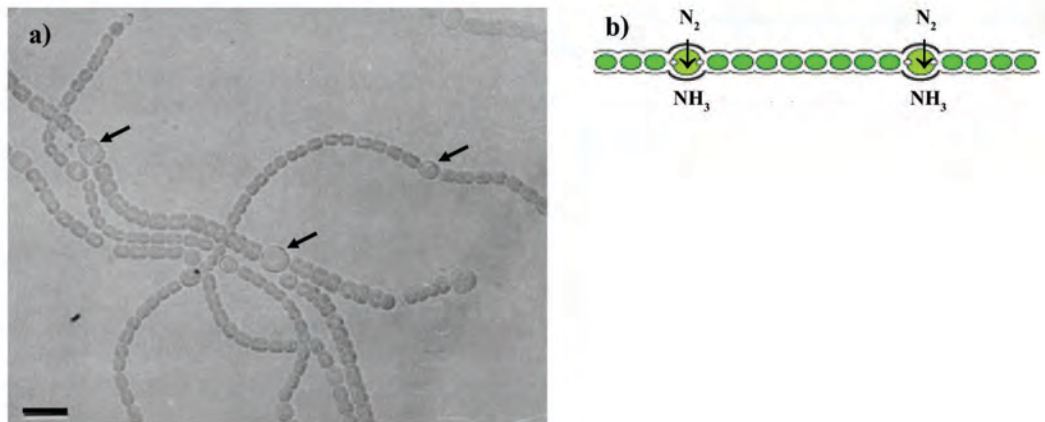
รูปที่ 1 กลไกการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับไฮโดรเจนเมตาบอลิซึมในไซยาโนแบคทีเรีย ประกอบด้วย (1) เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ซึ่งพบได้ในโครงสร้างเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ทำหน้าที่ตรึงโมเลกุลไนโตรเจนและเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียและโมเลกุลไฮโดรเจนกลไกการทำงานเริ่มจากหน่วยย่อยไดไนโตรจีเนส รีดักเทส (NifH) รับอิเล็กตรอนภายนอกจากตัวให้อิเล็กตรอน ferredoxin หรือ flavodoxin แล้วส่งอิเล็กตรอนให้หน่วยย่อยไดไนโตรจีเนส (NifDK) จากนั้นไดไนโตรจีเนสจะรีดิวซ์โมเลกุลไนโตรเจนเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนีย และโมเลกุลไฮโดรเจนซึ่งในกระบวนการต้องใช้พลังงาน ATP (2) เอนไซม์อัพเทค ไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase, HupSL(C)) ซึ่งพบได้ที่เยื่อไทลาคอยด์ของเฮเทอโรซิสต์ ทำหน้าที่ออกซิไดซ์โมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นไฮโดรเจนไอออน (H^+) และอิเล็กตรอน (3) เอนไซม์ไบไดเรกชันนัล ไฮโดรจีเนส (bidirectional hydrogenase) ซึ่งพบได้บริเวณเยื่อไซโตพลาสซึมของเซลล์ ทำหน้าที่รีดิวซ์ไฮโดรเจนไอออนกลับไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน กลไกการทำงานยังไม่ทราบแน่ชัด สันนิษฐานว่าเป็นการทำงานควบคู่กันของหน่วยย่อยไฮโดรจีเนส (HoxHY) และไดอะไฟเรส (HoxEFU) ในการรับอิเล็กตรอนจาก NADH แล้วส่งอิเล็กตรอนให้กับไฮโดรเจนไอออนเกิดผลิตภัณฑ์เป็นโมเลกุลไฮโดรเจนและ NAD^+ (Tamagnini et al., 2007)

ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่มีโลหะ นิกเกิล (Ni) เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างเช่นเดียวกับ เอนไซม์ยูรีเอส (urease) และคาร์บอน มอนอกไซด์ ดีไฮโดรจีเนส (carbon monoxide dehydrogenase) (Casalot and Rousset, 2001) กลุ่มเอนไซม์เหล่านี้ ต้องการโปรตีนตัวช่วย (auxiliary protein หรือ accessory protein) ในการทำงาน จากการศึกษา คุณสมบัติของโปรตีนตัวช่วย พบว่า ลำดับ นิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์มีความ คล้ายกันและอนุรักษ์ (homology and conservation) ในกลุ่มแบคทีเรีย (Lutz et al., 1991) เอนไซม์ไฮโดร จีเนสของไซยาโนแบคทีเรียมีโปรตีนตัวช่วยร่วมทำงาน เช่นกัน คือ กลุ่มโปรตีน Hyp (HypB, HypA, HypE, HypD, HypC และ HypF) ซึ่งถูกถอดรหัสและแปล รหัสจากยีน *hypBAEDCF* (Wünschiers et al., 2003) กลุ่มโปรตีน Hyp พบในไซยาโนแบคทีเรียหลากหลาย สายพันธุ์ อาทิ *Trichodesmium erythraeum* IMS101, *Anabaena* strain PCC 7120 และ *Synechocystis* strain PCC 6803, *Synechococcus* strain 6301, *Nostoc* strain PCC 73102, *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, *Anabaena variabilis* ATCC 29413 และ *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4 (Happe et al., 2000; Linberg et al., 2000; Leitão et al., 2005; Tamagnini et al., 2007)

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ ในไซยาโนแบคทีเรีย

ปัจจัยภายใน (Intrinsic factors) อาทิเช่น การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ในเมตาบอลิซึม และการสังเคราะห์เซลล์พิเศษ เป็นต้น เซลล์มีกลไก ในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์อ็อปเทค

ไฮโดรโรจีเนสและเอนไซม์ไบโคเร็กซ์นัล ไฮโดรจีเนส เพื่อช่วยรักษาสสมดุลไฮโดรเจนภายในเซลล์ อาทิ การ ลดแอกติวิตีของเอนไซม์อ็อปเทค ไฮโดรจีเนส ควบคู่ กับการเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ไบโคเร็กซ์นัล ไฮโดรจีเนส (Tamagnini et al., 2002) การทำให้ยีนที่ สังเคราะห์เอนไซม์อ็อปเทค ไฮโดรจีเนสเสียหายที่ไป (*hup* gene knock-out) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ไฮโดรเจนชีวภาพ (Tamagnini et al., 2002) ไซยา โนแบคทีเรีย *Nostoc muscorum* ที่ไม่มียีน *hupL* นั้น ไม่สามารถออกซิไดซ์โมเลกุลไฮโดรเจนได้ (Axelsson et al., 1999) เมื่อระดับการแสดงออกของโปรตีน HupL ของ *Lyngbya majuscula* เพิ่มขึ้น พบว่า แอกติวิตี ของเอนไซม์อ็อปเทค ไฮโดรจีเนสเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน (Leitão et al., 2005) แอกติวิตีของเอนไซม์ในไฮโดรจีเนส และไฮโดรจีเนส ถูกยับยั้งด้วยโมเลกุลออกซิเจนที่เกิด ขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ไซยาโน แบคทีเรียจึงมีกลไกในการปกป้องไม่ให้เอนไซม์สัมผัส กับโมเลกุลออกซิเจนได้โดยตรง อาทิเช่น (1) การ สร้างเซลล์พิเศษขึ้นในไซยาโนแบคทีเรียชนิด ตรึงไนโตรเจน เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) (รูปที่ 2) ช่วยในการตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มี ออกซิเจน (aerobic condition) เฮเทอโรซิสต์ไม่เกี่ยวข้อง กับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ดังนั้น จึงไม่มี การปลดปล่อยออกซิเจน เอนไซม์ในไฮโดรจีเนสจึงทำงาน ได้ปกติ (Lang et al., 1987; Fay, 1992; Adams, 2000) (2) มีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในไฮโดรจีเนส และไฮโดรจีเนสในช่วงสภาวะที่ไม่มีแสง ความเข้ม แสงน้อยหรือที่มืด เพื่อลดโอกาสสัมผัสกับโมเลกุล ออกซิเจนที่ถูกผลิตขึ้นขณะสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่ง กระบวนการนี้จะพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ ที่ไม่สามารถสร้างเฮเทอโรซิสต์ (Bergman et al., 1997)



รูปที่ 2 การปรากฏของเฮเทอโรซิสต์ (heterocysts) a) ไชยาโนแบคทีเรียชนิดตรึงไนโตรเจน *Anabaena variabilis* (ตำแหน่งที่ถูกครีชีคือเฮเทอโรซิสต์) ภาพขยาย 300 เท่า (bar —; 20 ไมโครเมตร) (Lang et al., 1987) b) แสดงตำแหน่งของเฮเทอโรซิสต์ที่มีการตรึงไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนีย

ปัจจัยภายนอก (Extrinsic factors or environmental factors) ที่มีผลเชิงบวกและเชิงลบต่อการเพิ่มผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไชยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ แสง อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ความเพียงพอของสารอาหาร แร่ธาตุ และปัจจัยอื่นๆ (ตารางที่ 1)

1. แสง ไชยาโนแบคทีเรียใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานหลักของเซลล์และแสงเป็นตัวแปรสำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของยีนและโปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง พบว่า เมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้นเป็น 250-300 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ เซลล์ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เพิ่มการแสดงออกของยีน *psbA2*, *psbD2* และ *hypA* (slr1675) มากกว่าสภาวะปกติ (Hihara et al., 2001; Gill et al., 2002) เป็นต้น แม้ว่าไชยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์จะเจริญเติบโตได้ดีในช่วงแสงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร แต่ความต้องการแสงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพกลับแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ อาทิเช่น ไชยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis* (Aoyama et al., 1997) และ *Synechococcus* PCC 7942 (Asada and Miyake, 1999) ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในที่มีด อุณหภูมิประมาณ 32 องศาเซลเซียส และปราศจากออกซิเจน ไชยาโนแบคทีเรียชนิดตรึงไนโตรเจน *Oscillatoria* sp.,

Anabaena variabilis ATCC 29413 และ *Anabaena variabilis* PK84 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพได้ดีในที่มีแสงเพียงพอและมีคาร์บอนไดออกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (Stal and Krumbein, 1985; Tsygankov et al., 1999) ขณะที่เซลล์ *Anabaena cylindrica* ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพได้ในสภาวะที่มีความเข้มแสงน้อยและมีก๊าซอาร์กอนสมบูรณ์ (Jeffries et al., 1978) และเซลล์ *Nostoc muscorum* ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพได้ทั้งในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง แต่ปริมาณการผลิตในช่วงที่มีแสงมีมากกว่าในช่วงที่ไม่มีแสง (Shah et al., 2003)

2. อุณหภูมิ Dutta et al. (2005) ได้รายงาน ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพในไชยาโนแบคทีเรียอยู่ในช่วงกว้างระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส ไชยาโนแบคทีเรีย *Nostoc muscorum* ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Ernst et al., 1979) และมีปริมาณสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 2.5 เท่า (Shah et al., 2003) แอคติวิตีของเอนไซม์ไบไดเรกชันนัลไฮโดรจีเนส (bidirectional-hox-hydrogenase) ของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 องศาเซลเซียส ถึง 60 องศา

เซลเซียส และเอนไซม์มีแอกติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Baebprsert et al., 2010) ขณะที่ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena variabilis* SPU 003 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Datta et al., 2000) ไซยาโนแบคทีเรีย *Calothrix336/3* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพเพิ่มขึ้น 2 เท่า สูงกว่า *Calothrix336/3* ที่เลี้ยง ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Allahverdiyeva et al., 2010)

3. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* PCC 7120 ที่ pH 7.5 มากกว่าที่ pH 8.2 ขณะที่ไซยาโนแบคทีเรีย *Calothrix* XPORK5E ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพที่ pH 7.5 มากกว่าที่ pH 6.8 (Allahverdiyeva et al., 2010)

4. แหล่งอาหารคาร์บอน ไซยาโนแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพิ่มการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพ เช่น ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena variabilis* และ *Anabaena* CH3 (Reddy et al., 1996; Chen et al., 2008) สามารถใช้น้ำตาลฟรักโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน *Synechocystis* sp. PCC 6803 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโตสและน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพได้ ซึ่งกลูโคสให้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากที่สุด (Baebprsert et al., 2010)

5. แหล่งอาหารไนโตรเจน สารประกอบไนโตรเจนในรูปไนไตรต์ (NO_2^-), ไนเตรต (NO_3^-) และแอมโมเนีย (NH_3) มีผลกระทบต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนที่เติมเพิ่มลงไปในการเพาะเลี้ยงจะยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Rawson, 1985) สารประกอบไนไตรต์ ไนเตรต และแอมโมเนียยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* และ *Anabaena variabilis* SPU 003 ส่งผลให้ระดับการ

ผลิตไฮโดรเจนชีวภาพลดลง (Lambert et al., 1979; Datta et al., 2000) อย่างไรก็ตามเมื่อลดปริมาณแอมโมเนียในอาหารเลี้ยงเชื้อลงเป็น 0.10 มิลลิโมลาร์ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* กลับไม่ถูกยับยั้ง (Jeffries et al., 1978) ในสภาวะที่มีไนโตรเจนปริมาณจำกัด (nitrogen limitation) พบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Gloeocapsa alpicola* มีการเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ ไบโโครีคชันนัลไฮโดรจีเนส มากขึ้น (Sheremetieva et al., 2002) ในทำนองเดียวกัน พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *hox* และแอกติวิตีของเอนไซม์ ไบโโครีคชันนัลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 เพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกันในสภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด (Antal et al., 2006)

6. แหล่งแร่ธาตุ ธาตุบางชนิดในไซยาโนแบคทีเรียต้องการในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ เนื่องจากแร่ธาตุเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์และมีผลกระทบต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพ อาทิเช่น แร่ธาตุซัลเฟอร์ และเหล็ก (Fe) เป็นองค์ประกอบสำคัญบริเวณแอคทีฟ ไซต์ (active site) ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ขณะที่ แร่ธาตุนิกเกิล (Ni) และเหล็ก (Fe) เป็นองค์ประกอบสำคัญบริเวณแอคทีฟ ไซต์ (active site) ของเอนไซม์ไบโโครีคชันนัลไฮโดรจีเนส (Tamagnini et al., 2002) เป็นต้น ไซยาโนแบคทีเรีย *Arthrospira maxima* ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณแร่ธาตุนิกเกิลในอาหารเลี้ยง (Carrieri et al., 2008) ขณะที่ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงที่มี 5.0 มิลลิกรัมเหล็กต่อลิตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 2 เท่าของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงที่มี 0.5 มิลลิกรัมเหล็กต่อลิตร (Jeffries et al., 1978) ไซยาโนแบคทีเรีย *Gloeocapsa alpicola* และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เช่นกันในสภาวะที่ขาดแร่ธาตุซัลเฟอร์ (sulfur deficiency) ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซมีเทน (CH_4) (Antal and Linblad, 2005)

จะเห็นได้ว่า การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียนั้นต้องการปัจจัยที่เหมาะสมและเพียงพอต่อการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เพื่อให้ได้มาซึ่งผลผลิตที่เพิ่มขึ้นของไฮโดรเจนชีวภาพ การเลือกสภาวะที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ไม่เพียงแต่ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ ยังมีแบคทีเรียอีกหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ เช่นกัน อาทิเช่น แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodobacter sphaeroides* ผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้จากการย่อยสลายกรดอินทรีย์ (organic acids) เช่น กรดอะซิติก ภายใต้สภาวะไร้อากาศ และไม่มีแสง (Nath et al., 2005) แบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจน *Clostridium acetobutylicum* ผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ผ่านกระบวนการหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง โดยเชื้อแบคทีเรียจะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และโมเลกุลไฮโดรเจนชีวภาพ (Zhang et al., 2006) แบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนและเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ดีภายใต้กระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ pH เท่ากับ 6.0 (Niu et al., 2010) เป็นต้น กระบวนการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียและ

แบคทีเรียมีทั้งข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันไปตามเงื่อนไขและสภาพแวดล้อม เช่น สิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดต้องการปัจจัยภายนอก อาทิ แหล่งอาหาร ความเข้มแสง อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและไฮโดรจีเนสในการเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนชีวภาพเหมือนกัน สิ่งที่แตกต่างกัน คือ ไซยาโนแบคทีเรียสามารถนำคาร์บอนไดออกไซด์หรือก๊าซเรือนกระจกมาใช้เป็นแหล่งพลังงานและสามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ ขณะที่แบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจนผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้แต่กลับให้ผลผลิตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาด้วยซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณก๊าซเรือนกระจก แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสง สามารถใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนและเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ ซึ่งต่างจากไซยาโนแบคทีเรียเป็นต้น อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการหมักชีวภาพจะเป็นแนวทางที่น่าสนใจและมีประสิทธิภาพ แต่กระบวนการทางชีวภาพยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง คือ อัตราการผลิตไฮโดรเจนยังไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับกระบวนการทางเคมี ดังนั้น การนำเทคโนโลยีทางชีวเคมีและอนุชีวโมเลกุลเข้ามาใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรีย คงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

ตารางที่ 1 สภาวะที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรีย	คำบรรยายลักษณะ	ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้	สภาวะที่ใช้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจน
<i>Cyanothece</i> 7822	Heterocyst	0.92 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	N_2 with 5% CO_2
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	Heterocyst	2.60 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Air, 60 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Anabaena cylindrica</i> IAMM-1	Heterocyst	2.01 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Air, 60 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Anabaena variabilis</i> IAMM-58	Heterocyst	4.20 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Air, 60 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Anabaena cylindrica</i> UTEX B 629	Heterocyst	0.91 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Air, 60 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Anabaena flos-aquae</i> UTEX 1444	Heterocyst	1.70 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Air, 60 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Anabaena flos-aquae</i> UTEX LB 2558	Heterocyst	3.20 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Air, 60 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Anabaenopsis circularis</i> IAM M-13	Heterocyst	0.31 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Air, 60 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Nostoc muscorum</i> IAM M-14	Heterocyst	0.60 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Air, 60 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$

ตารางที่ 1 (ต่อ) สภาวะที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรีย	คำบรรยายลักษณะ	ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้	สภาวะที่ใช้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจน
<i>Nostoc linckia</i> IAM M-30	Heterocyst	0.17 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Air, 60 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Nostoc commune</i> IAM M-13	Heterocyst	0.25 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Air, 60 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Heterocyst	32.3 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Argon environment.
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Heterocyst	167.6 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	93%Ar, 5%N ₂ , 2% CO ₂ , 90 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Heterocyst	0.11 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Air, 2% CO ₂ , 400 W/m ²
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Heterocyst	45.16 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	93%Ar, 5%N ₂ , 2% CO ₂ , 90 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Heterocyst	0.05 $\mu\text{mol/mg dry wt/h}$	Ar, 5% CO ₂ , 5000 lx /Tween 85 (77 mM)
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Heterocyst	39.40 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Argon environment
<i>Anabaena variabilis</i> 1403/4B	Heterocyst	20.0 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	25 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ on top; 13 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ on bottom of bioreactor
<i>Anabaena azollae</i>	Heterocyst	38.50 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Argon environment.
<i>Anabaena variabilis</i> PK17R	Heterocyst	59.18 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	93%Ar, 5%N ₂ , 2% CO ₂ , 90 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Synechococcus</i> PCC 6830	Non-heterocyst	0.26 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Ar with CO (13.4 μmol), C ₂ H ₂ (1.34 μmol); darkness
<i>Synechococcus</i> PCC 602	Non-heterocyst	0.66 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Ar with CO (13.4 μmol); 20–30 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Synechococcus</i> PCC 6307	Non-heterocyst	0.02 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Ar (100%), 20–30 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Synechococcus</i> PCC 6301	Non-heterocyst	0.09 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Ar with C ₂ H ₂ (1.34 μmol), 20–30 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Microcystis</i> PCC 7820	Non-heterocyst	0.16 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Ar with CO (13.4 μmol), C ₂ H ₂ (1.34 μmol), 20–30 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Gloeobacter</i> PCC 7421	Non-heterocyst	1.38 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Ar with CO (13.4 μmol), C ₂ H ₂ (1.34 μmol), 20–30 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Synechocystis</i> PCC 6308	Non-heterocyst	0.13 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Ar with CO (13.4 μmol), C ₂ H ₂ (1.34 μmol), 20–30 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Synechocystis</i> PCC 6714	Non-heterocyst	0.07 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Ar with CO (13.4 μmol), 20–30 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Aphanocapsa montana</i>	Non-heterocyst	0.40 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Ar (100%), 20–30 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$
<i>Oscillatoria limosa</i>	Non-heterocyst	0.83 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Air, 16h light, 8h dark

ที่มา: Dutta et al., 2005

สรุป

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหามลพิษจากก๊าซเรือนกระจกและเป็นการทดแทนการใช้เชื้อเพลิงจากฟอสซิลในการผลิตพลังงานในอนาคต การศึกษาระบบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรียจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจและอาจจะเป็นกุญแจสำคัญในการแก้ไขและบรรเทาปัญหาทางด้านวิกฤติพลังงานและปัญหาสภาวะเรือนกระจกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Adams, D. G. (2000). Heterocyst formation in cyanobacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 618-624.
- Allahverdiyeva, Y., Leino, H., Saari, L., Fewer, D. P., Shunmugam, S., Sivonen, K. and Aro, E. M. (2010). Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes. *Int. J. Hydrogen Energy.* 35: 1117-1127.

- Antal, T. K. and Lindblad, P. (2005). Production of H_2 by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *J. Appl. Microbiol.* 98: 14-120.
- Antal, T. K., Oliveira, P. and Lindblad, P. (2006). The bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Int. J. Hydrogen Energ.* 31: 1439-1444.
- Aoyama, K., Uemura, I., Miyake, J. and Asada, Y. (1997). Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *J. Ferment. Bioeng.* 83: 17-20.
- Asada, Y., Kawamura, S. and Ho, K. K. (1987). Hydrogenase from the unicellular cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Phytochem.* 26: 637-640.
- Asada, Y. and Miyake, J. (1999). Photobiological hydrogen production. *J. Biosci. Bioeng.* 88: 1-6.
- Axelsson, R., Oxelfelt, F. and Lindblad, P. (1999). Transcriptional regulation of *Nostoc* uptake hydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 77-81.
- Baebprasert, W., Lindblad, P. and Incharoensakdi, I. (2010). Response of H_2 production and Hox-hydrogenase activity to external factors in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Int. J. Hydrogen Energ.* 35: 6611-6616.
- Bergman, B., Gallon, J. R., Rai, A. N. and Stal, L. J. (1997). N_2 fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 139-185.
- Bishop, P. E. and Premakumar, R. (1992). Alternative nitrogen fixation systems. In *Biological nitrogen fixation*. Edited by: Stacey G, Burris RH, Evans HJ. New York: Chapman & Hall. 736-762.
- Boison, G., Bothe, H., Hansel, A., and Lindblad, P. (1999). Evidence against a common use of the diaphorase subunits by the bidirectional hydrogenase and by the respiratory complex I in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 159-165.
- Carrieri, D., Ananyev, G., Costas, A. M. G., Bryant, D. A. and Dismukes G. C. (2008). Renewable hydrogen production by cyanobacteria: Nickel requirements for optimal hydrogenase activity. *Int. J. Hydrogen Energ.* 33: 2014-2022.
- Casalot, L. and Rousset, M. (2001). Muturation of the [NiFe] hydrogenase. *Trends Microbiol.* 9: 228-237.
- Chen, P. C., Fan, S. H., Chiang, C. L. and Lee, C. M. (2008). Effect of growth conditions on the hydrogen production with cyanobacterium *Anabaena* sp. strain CH3. *Int. J. Hydrogen Energ.* 33: 1460-1464.
- Das, D. and Veziroglu, T. N. (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energ.* 26:13-28.
- Datta, M., Nikki, G. and Shah, V. (2000). Cyanobacterial hydrogen production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 8-9.
- Dutta, D., De, D., Chaudhuri, S. and Bhattacharya, S. K. (2005). Hydrogen production by

- cyanobacteria. *Microb. Cell. Fact.* 4: 36-47.
- Ernst, A., Kerfin, W., Spiller, H. and Boger, P. (1979). External factors influencing light-induced H_2 evolution by the blue-green algae, *Nostoc muscorum*. *Z. Naturforsch.* 34: 820-825.
- Fay, P. (1992). Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* 56: 340-373.
- Flores, E. and Herrero, A. (1994). Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. In *The molecular biology of cyanobacteria* Edited by: Bryant, D. A. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 487-517.
- Gill, R. T., E. Katsoulakis, W. Schmitt, G. Taroncher-Oldenburg, J. Misra, and G. Stephanopoulos. (2002). Genome-wide dynamic transcriptional profiling of the light-to-dark transition in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 184: 3671-3681.
- Happe, T., Schütz, K. and Böhme, H. (2000). Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *J. Bacteriol.* 182: 1624-1631.
- Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A., and Ikeuchi, M. (2001). DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell.* 13: 793-806.
- Jeffries, T. W., Timourien, H. and Ward, R. L. (1978). Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: effect of varying ammonium and ferric ions, pH and light. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 704-710.
- Kentemich, T., Haverkamp, G. and Bothe, H. (1991). The expression of a third nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Z. Naturforsch.* 46: 217-222.
- Lambert, G. R., Daday, A. and Smith, G. D. (1979). Hydrogen evolution from immobilized cultures of cyanobacterium *Anabena cylindrica*. *FEBS Lett.* 101: 125-128.
- Lang, N. J., Krupp, J. M. and Koller, A. L. (1987). Morphological and ultrastructural changes in vegetative cells and heterocysts of *Anabaena variabilis* grown with fructose. *J. Bacteriol.* 169: 920-923.
- Leitão, E., Oxelfelt, F., Oliveira, P., Moradas-Ferreira, P. and Tamagnini, P. (2005). Analysis of the *hupSL* operon of the nonheterocystous cyanobacterium *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4: regulation of transcription and expression under a light-dark regime. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4567-4576.
- Lindberg, P., Hansel, A. and Lindblad, P. (2000). *hupS* and *hupL* constitute a transcription unit in the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 73102. *Arch. Microbiol.* 174: 129-133.
- Lindblad, P. (1999). Cyanobacterial H_2 metabolism: knowledge and potential/strategies for a photobiotechnological production of H_2 . *Biotechnol. Appl.* 16: 141-144.
- Llama, M. J., Serra, J. L., Rao, K. K. and Hall, D. O. (1979). Isolation and characterization of the hydrogenase activity from the non-heterocystous cyanobacterium *Spirulina maxima*. *FEBS Lett.* 98: 342-346.
- Lutz, S., Jacobi, A., Schlensog, V., Böhm, R., Sawers, G. and Böck, A. (1991). Molecular characterization of an operon (*hyp*)

- necessary for the activity of the three hydrogenases isoenzymes in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 5: 123-135.
- Masepohl, B., Schoelisch, K., Goerlitz, K., Kutzki, C. and Bhme, H. (1997). The heterocyst-specific *fdxH* gene product of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is important but not essential for nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet. 253: 770-776.
- Nath, K., Kumar, A. and Das, D. (2005). Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U.001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68: 533-541.
- Niu, K., Zhang, X., Tan, W. S. and Zhu, M. L. (2010). Characteristics of fermentative hydrogen production with *Klebsiella pneumoniae* ECU-15 isolated from anaerobic sewage sludge. Int. J. Hydrogen Energ. 35: 71-80.
- Oliveira, P., Leitão, E., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P. and Oxelfelt, F. (2004). Characterization and transcriptional analysis of *hupSLW* in *Gloeotheca* sp. ATCC 27152: an uptake hydrogenase from a unicellular cyanobacterium. Microbiol. 150: 3647-3655.
- Oren, A. (2004). A proposal for further integration of the cyanobacteria under the bacteriological code. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1895-1902.
- Orme-Johnson, W. H. (1992). Nitrogenase structure: where to now? Science. 257: 1639-1640.
- Rawson, D. M. (1985). The effects of exogenous aminoacids on growth and nitrogenase activity in the cyanobacterium *Anabena cylindrica* PCC 7122. J. Gen. Microbiol. 134: 2549-2544.
- Reddy, P.M., Spiller, H., Albrecht, S.L. and Shanmugam, K.T. (1996). Photodissimilation of fructose to H₂ and CO₂ by a dinitrogen-fixing cyanobacterium, *Anabaena variabilis*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1220-1226.
- Rippka, R. (1988). Recognition and identification of cyanobacteria. Meth. Enzymol. 167: 28-67.
- Schmitz, O., Boison, G., Hilscher, R., Hundeshagen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F. and Bothe, H. (1995). Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. Eur. J. Biochem. 233: 266-276.
- Schmitz, O., Boison, G., Salzmann, H., Bothe, H., Schütz, K., Wang, S. and Happe, T. (2002). HoxE-a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. Biochim. Biophys. Acta. 1554: 66-74.
- Shah, V., Garg, N. and Madamwar, D. (2003). Ultrastructure of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* and exploitation of the culture for hydrogen production. Folia. Microbiol. 48: 65-70.
- Sheremetieva, M. E., Troshina, O. Y., Serebryakova, L. T., and Lindblad, P. (2002). Identification of *hox* genes and analysis of their transcription in the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 growing under nitrate-limiting conditions. FEMS. Microbiol. Lett. 214: 229-233.
- Stal, L. J., Krumbein, W. E. (1985). Oxygen protection of nitrogenase the aerobically nitrogen fixing, non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Arch. Microbiol. 143: 72-76.

- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wüschiers, R. and Lindblad, P. (2002). Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 1-20.
- Tamagnini, P., Leitao, E. Oliveira, P., Ferreira, D., Pinto, F., Harris D. J., Heidon, T. and Linblad, P. (2007). Cyanobacterial hydrogenase: diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 692-720.
- Thiel, T. (1993). Characterization of genes for an alternative nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* 175: 6276-6286.
- Tsygankov, A. A., Borodin, V. B., Rao, K. K. and Hall, D. O. (1999). H₂ photoproduction by batch culture of *Anabaena variabilis* ATCC 29413 and its mutant PK84 in a photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 64: 709-715.
- Wüschiers, R., Batur, M. and Lindblad, P. (2003). Presence and expression of hydrogenase specific C-terminal endopeptidases in cyanobacteria. *BMC Microbiol.* 3: 8-20.
- Zhanga, H., Brunsb, M. A., Logana, B. E. (2006). Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Res.* 40: 728-734.

