รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* โดยการใช้สารยับยั้ง

Enhancement of H_2 Production Efficiency by Unicellular Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* Using Inhibitor

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์

b00273533

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๙

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* โดยการใช้สารยับยั้ง

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดินคณะวิทยาศาสตร์ประจำปี 2559
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2560

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุหน่วยงานต้นสังกัด
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงแล้วได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และยังสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยใช้น้ำและแสงอาทิตย์ซึ่งมีอยู่จำนวนมากเป็นแหล่งวัตถุดิบ ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มเซลล์เดียว *Aphanothece halophytica* เป็นไซยาโนแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน โดยสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ทั้งจากกระบวนการสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะที่มีแสง และจากการย่อยสลายไกลโคเจนที่เก็บอยู่ภายในเซลล์ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศในที่มืด ไฮโดรเจนจะถูกผลิตมาจากการทำงานของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนใน *A. halophytica* โดยใช้สารยับยั้งหลายชนิด ได้แก่ สารยับยั้งระบบแสงสอง สารยับยั้งกระบวนการหายใจ สารยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน สารยับยั้งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และสารยับยั้งวัฏจักรเครบส์ และศึกษาผลของสารยับยั้งต่อจำนวนเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณไฮโดรเจน และปริมาณออกซิเจนใน *A. halophytica* จากการทดลองพบว่า อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ที่บ่มภายใต้สภาวะมืดสูงกว่าที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีแสง *A. halophytica* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น เมื่อบ่มด้วยสารยับยั้งชนิดต่างๆ ทั้งในที่มืดและที่มีแสง สารยับยั้งซิมาซีนจัดเป็นสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนโดย *A. halophytica* เซลล์ที่บ่มในซิมาซีนความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 5.260 ± 0.064 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง นอกจากนี้ เมื่อบ่มเซลล์ในสารยับยั้ง ทำให้จำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง อัตราการผลิตออกซิเจนของเซลล์ที่บ่มในสารยับยั้งภายใต้สภาวะที่มีแสงสูงกว่าในที่มืด นอกจากซิมาซีนที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนแล้ว ยังสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสอีกด้วย

คำสำคัญ: การผลิตไฮโดรเจน, สารยับยั้ง, ไซยาโนแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Enhancement of H_2 Production Efficiency by Unicellular Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* Using Inhibitor

Researchers:

Asst.Prof.Dr.Saranya Phunpruch, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Prof.Dr.Aran Incharoensakdi, Faculty of Science, Chulalongkorn University

ABSTRACT

Cyanobacteria are capable of oxygenic photosynthesis and can produce H_2 via photosynthesis using unlimited raw materials; sunlight and water. The unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* is one of the high potential H_2 producers. *A. halophytica* can produce H_2 via photosynthesis in the light and via the catabolism of storage glycogen under dark anaerobic condition. H_2 is produced by the action of bidirectional hydrogenase activity. This work aimed to investigate the increasing efficiency of H_2 production by *A. halophytica* by using many kinds of inhibitors; photosystem II inhibitor, respiration inhibitor, uncoupling agent of oxidative phosphorylation, CO_2 fixation inhibitor and Krebs' cycle inhibitor. The effects of inhibitors on cell number, chlorophyll content, H_2 production and O_2 production of *A. halophytica* were investigated. The result showed that H_2 production rate of *A. halophytica* incubated under dark condition was higher than that under light condition. *A. halophytica* could enhance H_2 production rate when incubated in many kinds of inhibitors under both dark and light conditions. Simazine was the highest efficient inhibitor for enhancing H_2 production by *A. halophytica.* Cells incubated in 25 μM simazine gave the highest H_2 production rate with 5.260 $\pm$ 0.064 μmolH_2 mg chl^{-1} h^{-1} under dark condition. In addition, cell concentration and chlorophyll a content of *A. halophytica* were decreased when *A. halophytica* cells were treated with inhibitors. O_2 production rate of *A. halophytica* cells incubated in inhibitors under light condition was higher than that under darkness. Besides simazine with a concentration of 25 μM could increase H_2 production rate, it could also increase bidirectional hydrogenase activity.

Keywords: Hydrogen production, Inhibitor, Cyanobacteria

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* โดยการใช้สารยับยั้ง ดำเนินงานจนสามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๙ คณะผู้ร่วมวิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัยที่ได้ทุ่มเมกำลังกายและกำลังใจในการทำการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II
กิตติกรรมประกาศ III
สารบัญ IV
สารบัญตาราง VII
สารบัญรูป VIII
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 พลังงานไฮโดรเจน 4
2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน 6
2.3 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 12
2.4 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย 13
2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย 16
2.6 ไซยาโนแบคทีเรีย 19
2.7 ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* 22
2.8 สารยับยั้ง 22
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 34
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 36
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 36
3.2 สารเคมี 36
3.3 อุปกรณ์ 37
3.4 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.5 วิธีการหาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ..... 38
3.6 วิธีการนับจำนวณเซลล์..... 38
3.7 วิธีการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*.... 39
3.8 วิธีการคัดเลือกชนิดของสารยับยั้งเพื่อใช้ในการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*..... 39
3.9 วิธีการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งต่อจำนวนเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณไฮโดรเจน และปริมาณออกซิเจน..... 40
3.10 วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส..... 40
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 41
4.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*..... 41
4.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*..... 50
4.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งต่อการปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*..... 58
4.4 ผลของสารยับยั้งซิมาซีนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* 68
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... 68
บรรณานุกรม 70
ภาคผนวก..... 74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ [Gas Chromatograph–Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)]..... 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ค่าพลังงานความร้อนของก๊าซไฮโดรเจนและแหล่งพลังงานอื่นๆ	5
2.2 ไอโซโทปของไฮโดรเจน	5
2.3 กระบวนการอิเล็กโตรไลซิสของน้ำ	8
2.4 กระบวนการโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอล	9
2.5 กระบวนการไบโอโฟโตไลซิส	11
2.6 การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว	13
2.7 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย	15
2.8 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยของไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน	16
2.9 การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส	17
2.10 การผลิตไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสและการสลายไฮโดรเจนของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส	18
2.11 การทำงานของเอนไซม์ไบไดเรคชันนาลไฮโดรจีเนส	19
2.12 ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีที่ไม่เป็นเส้นสาย	20
2.13 ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์รูปร่างเป็นเส้นสาย	21
2.14 ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*	22
2.15 การขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย	23
2.16 โครงสร้างของ DCMU	24
2.17 การยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนของ DCMU จากระบบแสงสองสู่พลาสโตควิโนนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง	25
2.18 โครงสร้างของ CCCP	25
2.19 การขนส่งอิเล็กตรอนโดยการแตกตัวของน้ำ	26
2.20 โครงสร้างของ water splitting enzyme system Y เป็นโปรตีนเชิงซ้อนที่มีองค์ประกอบของแมงกานีส	26
2.21 โครงสร้างของอะทราซีน	26
2.22 ปฏิกิริยาระหว่างอะทราซีนและโปรตีน D1 ในระบบแสงสอง	27
2.23 โครงสร้างของซิมาซีน	27
2.24 องค์ประกอบของโปรตีน D1 และ D2 และบริเวณที่ซิมาซีนเข้ามาจับ	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

2.25 การยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของโพแทสเซียมไซยาไนด์ และโซเดียมเอไซด์ในกระบวนการในไซยาโนแบคทีเรีย 29

2.26 โครงสร้างและปฏิกิริยาของเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส 30

2.27 การทำงานของเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส 30

2.28 การขัดขวางการส่งอิเล็กตรอนของโรทีโนนจาก NAD(P)H สู่พลาสโตควิโนน 31

2.29 การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน 31

2.30 โครงสร้างของไดไนโตรฟีนอล 32

2.31 การนำโปรตอนผ่านเข้าออกเมมแบรนของไดไนโตรฟีนอล 32

2.32 กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ 33

2.33 การจับกันของสารประกอบอาร์ซีเนตกับเอนไซม์ไพรูเวทดีไฮโดรจิเนส 34

4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงสองที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง 43

4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารที่ยับยั้งกระบวนการหายใจที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง 46

4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชันไดไนโตรฟีนอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง 47

4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ดีแอลกลีเซอรอลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง 48

4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งวัฏจักรเครบส์โซเดียมอาร์ซิเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง 49

4.6 ผลของความเข้มข้นของ CCCP ต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ 50

4.7 ผลของความเข้มข้นของ DCMU ต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ 52

4.8 ผลของความเข้มข้นของอะทราซีนต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.9 ผลของความเข้มข้นของซิมาซีนต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ 55

4.10 ผลของความเข้มข้นของไกลโฟเสตต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ 56

4.11 ผลของความเข้มข้นของโรทีโนนต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ 57

4.12 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้ง CCCP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด 59

4.13 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้ง DCMU ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด 60

4.14 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งอะทราซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด 61

4.15 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งซิมาซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด 63

4.16 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งไกลโฟเสตที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด 64

4.17 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งโรทีโนนที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด 65

4.18 กิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งซิมาซีนที่มีความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

พลังงานมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อมนุษย์ทุกคนบนโลก พลังงานได้ถูกนำไปใช้ในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการใช้พลังงานในการดำรงชีวิตประจำวัน ในด้านอุตสาหกรรม และในด้านการคมนาคมขนส่ง เป็นต้น การเพิ่มขึ้นของประชากรบนโลก การขยายตัวของเมืองและเศรษฐกิจทำให้ความต้องการในการใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม แหล่งพลังงานที่มีอยู่บนโลกนี้มีปริมาณจำกัด และพลังงานส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในปัจจุบันเป็นพลังงานสิ้นเปลืองที่ใช้แล้วหมดไป อาทิเช่น น้ำมันปิโตรเลียม ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ หินน้ำมัน และทรายน้ำมัน ฯลฯ เมื่อนำแหล่งพลังงานเหล่านี้มาใช้จะก่อให้เกิดปัญหามลภาวะกับสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก เนื่องจากการเผาไหม้ของพลังงานเหล่านี้จะเกิดปลดปล่อยก๊าซที่เป็นมลพิษต่างๆ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ มีเทน และสารพิษอื่นๆ ทำให้เกิดปัญหาสภาวะโลกร้อนจากการเกิดภาวะเรือนกระจก การเกิดฝนกรด หรือปัญหาสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ทางออกในการแก้ไขปัญหาการใช้พลังงานเหล่านี้คือ การใช้พลังงานให้ลดน้อยลง หรือ การหาพลังงานทดแทนที่สามารถหมุนเวียนและนำกลับมาใช้ได้อีก หรือ การใช้พลังงานจากแหล่งทรัพยากรที่มีอยู่อย่างมากมายและไม่จำกัด เช่น แสงอาทิตย์ ลม ชีวมวล น้ำ และ ไฮโดรเจน เป็นต้น

พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากไฮโดรเจนให้ค่าพลังงานในการเผาไหม้สูง และได้ผลิตภัณฑ์จากการเผาไหม้เป็นน้ำและก๊าซออกซิเจน ซึ่งไม่ก่อให้เกิดมลพิษกับสิ่งแวดล้อม การผลิตไฮโดรเจนแบ่งออกได้เป็น 2 กระบวนการหลัก คือ (1) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางกายภาพ เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการใช้ความร้อนสูง การใช้สารเคมี หรือการใช้กระแสไฟฟ้า ซึ่งกระบวนการเหล่านี้มีข้อเสีย คือ เกิดก๊าซที่เป็นมลพิษ และต้องใช้พลังงานและความร้อนสูง (2) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียว และไซยาแบคทีเรีย เป็นต้น การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียเป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสง ในการผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการนี้มีวัตถุดิบที่สำคัญ คือ แสงและน้ำ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างมากมายในปริมาณที่ไม่จำกัด และผลิตภัณฑ์จากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนนี้ คือ ก๊าซออกซิเจน ซึ่งไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษกับสิ่งแวดล้อม

การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* เกิดจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase) โดยกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียนี้สามารถเกิดขึ้นได้จาก 2 กระบวนการ คือ (1) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้อิเล็กตรอนจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการสังเคราะห์แสง (2) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้อิเล็กตรอนจากกระบวนการย่อยสลายไกลโคเจนที่เก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะไร้อากาศและอยู่ในที่มืด ไกลโคเจนที่เก็บสะสมไว้ภายในเซลล์จะถูกย่อยสลายเป็นกลูโคส และกลูโคสจะถูกออกซิไดซ์ให้เป็นอิเล็กตรอนกับ $NADP^+$ สร้าง NADPH เพื่อใช้เป็นสับสเตรทให้กับเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจน การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ส่วนใหญ่จะเป็นการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการที่สอง ในการผลิตไฮโดรเจนแบบกระบวนการแรกนั้นอาจจะเกิดขึ้นได้ แต่ในปริมาณน้อย เนื่องจากออกซิเจนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำนั้นจะเข้าไปยับยั้งการทำงานเอนไซม์เอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส โดยปกติแล้ว NAD(P)H จะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ไกลโคไลซิส การผลิตน้ำผ่านไซโตโครมซีออกซิเดส (Cytochrome C oxidase) และในกระบวนการหายใจโดยผ่าน NADH ดีไฮโดรจีเนสคอมเพล็กซ์ 1 (NADH dehydrogenase; NDH-1) ซัคซิเนทดีไฮโดรจีเนส (Succinate dehydrogenase; SDH) และ คิวนอลออกซิเดส (Quinol oxidase)

งานวิจัยนี้มีความสนใจในการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica* โดยใช้สารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ 2 เพื่อยับยั้งการผลิตออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้ ยังศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากการใช้สารยับยั้งกระบวนการหายใจของปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และวัฏจักรเครบส์ โดยสารยับยั้งเหล่านี้จะเข้าไปขัดขวางกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังวิถีต่างๆ อิเล็กตรอนจึงเปลี่ยนทิศทางไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้เอนไซม์มีอิเล็กตรอนไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มมากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ

1. เพื่อคัดเลือกสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica*
2. เพื่อศึกษาผลของสารยับยั้งต่อการเจริญของเซลล์ การผลิตไฮโดรเจน การผลิตออกซิเจน และกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica*

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ขอบเขตของงานวิจัยนี้ คือ คัดเลือกสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica* สารยับยั้งที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ สารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ 2 สารยับยั้งกระบวนการหายใจ สารยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน สารยับยั้งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และสารยับยั้งวัฏจักรเครบส์ หลังจากนั้น นำสารยับยั้งที่คัดเลือกได้มาศึกษาผลของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งต่อจำนวนเซลล์ ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ การผลิตไฮโดรเจน การผลิตออกซิเจน และ กิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ คือ

1. สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica* เพื่อเป็นพลังงานทางเลือกที่จะมาแทนพลังงานฟอสซิลในอนาคต

2. สามารถใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างไม่จำกัด ได้แก่ น้ำ และ แสง เพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบและพลังงานให้กับไซยาโนแบคทีเรียเพื่อการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลังงานไฮโดรเจน

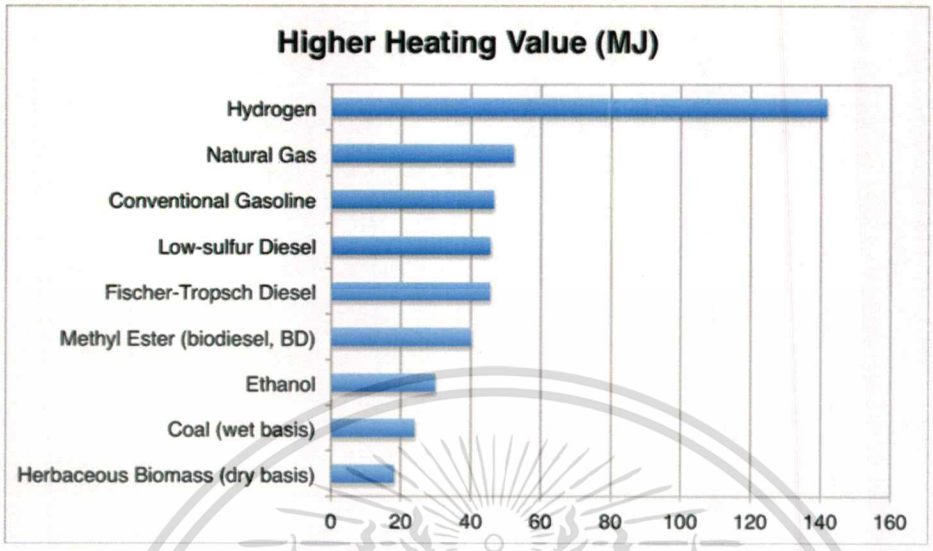
ในปัจจุบัน พลังงานเป็นสิ่งที่จำเป็นและเป็นที่ต้องการอย่างมากสำหรับมนุษย์ เนื่องจากโลกมีการขยายตัวทางเศรษฐกิจ และการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร พลังงานที่ใช้นั้นส่วนใหญ่ได้มาจากแหล่งน้ำมัน ก๊าซธรรมชาติ และ ถ่านหิน ฯลฯ ซึ่งมีอยู่ในปริมาณที่จำกัดและไม่เพียงพอต่อความต้องการในอนาคต ไฮโดรเจน (H_2) จัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาทดแทนพลังงานอื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และไม่ก่อให้เกิดผลกระทบกับสิ่งแวดล้อม ไฮโดรเจนเป็นธาตุลำดับที่ 1 มีสัญลักษณ์ คือ H โดยไฮโดรเจน (H) เป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นธาตุที่พบมากที่สุดในเอกภพ ซึ่งในบรรยากาศโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ส่วนในล้านส่วน มีมวลอะตอมเท่ากับ 1.00794 กรัมต่อโมล มีความหนาแน่น 0.08988 กรัมต่อลิตร คุณสมบัติทั่วไปของก๊าซไฮโดรเจน คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย ไม่มีเปลวไฟเวลาเผา การเผาไหม้สะอาด ไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม มีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลเท่ากับ 1.04 กิโลคาลอรีต่อโมล ดังนั้น เมื่อต้องการให้ไฮโดรเจนโมเลกุลทำปฏิกิริยา จึงต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลดังกล่าว เช่น เพิ่มอุณหภูมิหรือใช้สารเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น ไฮโดรเจนมีจุดเดือด -252.57 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลว -259.14 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ไฮโดรเจนมีอุณหภูมิการเผาไหม้สูงมากถึง 3,000 องศาเซลเซียส และให้พลังงานสูงถึง 127 กิโลจูลต่อกรัม ซึ่งให้พลังงานมากกว่าเชื้อเพลิงจากแหล่งไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ (รูปที่ 2.1)

อะตอมของไฮโดรเจนจะมีนิวเคลียสอยู่กลาง ภายในนิวเคลียสประกอบด้วยโปรตอนและนิวตรอน และมีอิเล็กตรอนวิ่งรอบนอกเหมือนธาตุอื่นๆ ไฮโดรเจนมี 3 ไอโซโทป (รูปที่ 2.2) ที่ขึ้นกับจำนวนโปรตอนและจำนวนนิวตรอนที่แตกต่างกัน ดังนี้

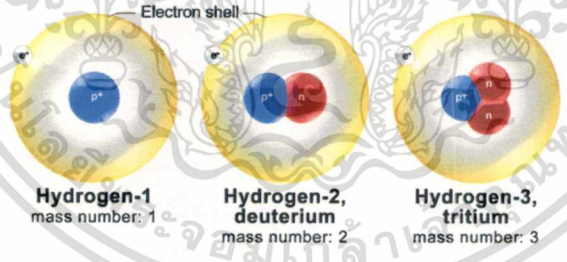
1. โปรเทียม (Protium) มีจำนวนโปรตอน 3 ตัว มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 1.0078
2. ดิวเทอเรียม (Deuterium) มีจำนวนโปรตอน 1 ตัว จำนวนนิวตรอน 1 ตัว มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 2.0141
3. ตริเทียม (Tritium) มีจำนวนโปรตอน 1 ตัว จำนวนนิวตรอน 2 ตัว มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ3.0161

ลักษณะทั่วไปของไฮโดรเจนทั้ง 3 สถานะ คือ ไฮโดรเจนที่เป็นของแข็งจะไม่มีสี มีโครงสร้างผลึก 6 เหลี่ยม ปริมาตรต่อโมล (Molar Volume) เท่ากับ 2.56 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อโมล ส่วนไฮโดรเจนที่เป็นของเหลวจะไม่มีสี มีค่าความหนืด (Viscosity) ต่ำ เคลื่อนที่ได้เร็ว ในขณะที่ไฮโดรเจนที่เป็นก๊าซจะไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นพิษ ก๊าซไฮโดรเจน 1 ลิตร มีมวล 0.0898 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ค่าพลังงานความร้อนของก๊าซไฮโดรเจนและแหล่งพลังงานอื่นๆ
(https://energyclub.stanford.edu/solar-fuels-as-versatile-energy-solutions/)



รูปที่ 2.2 ไอโซโทปของไฮโดรเจน
(https://simple.wikipedia.org/wiki/Isotope)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการแตกตัวของน้ำ คือ ไฮโดรเจนและออกซิเจน วิธีการที่สามารถทำให้น้ำแตกตัวได้ต้องใช้พลังงานหรืออาศัยสิ่งมีชีวิต โดยจะเกิดขึ้นได้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ในการแตกตัวของน้ำให้ได้ก๊าซไฮโดรเจน วัตถุดิบที่ผลิตไฮโดรเจนสามารถนำมาจากหลายแห่งด้วยกัน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน น้ำมันปิโตรเลียม ชีวมวล น้ำ หรือจากแหล่งพลังงานนิวเคลียร์ เป็นต้น การบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งออกเป็นได้หลายกระบวนการ ดังนี้

2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางกายภาพ

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางกายภาพ สามารถเป็นออกเป็นวิธีการต่างๆ ดังนี้

1) การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี (Thermochemical process)

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงเป็นการใช้ความร้อนในการเปลี่ยนมวลชีวภาพ ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน ให้กลายเป็นก๊าซผสม ได้แก่ ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ (H_2O) และมีเทน (CH_4) จากนั้น จึงทำการแยกไฮโดรเจนออกมาโดยใช้รูปแบบของการเผาไหม้ ซึ่งการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการความร้อนเคมี ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam reformation) กระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification) (ประพันธ์ 2551) ในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำจากก๊าซธรรมชาติ เป็นกระบวนการที่ใช้กันแพร่หลายในเชิงพาณิชย์ ซึ่งในประเทศไทยใช้กระบวนการนี้ในการผลิตไฮโดรเจน เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่างๆ แต่ข้อเสียของกระบวนการนี้คือ ก่อให้เกิดมลพิษ เนื่องจากมีสารพิษตกค้างจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เผาไหม้ คาร์บอนไดออกไซด์ และซัลเฟอร์ เป็นต้น การผลิตไฮโดรเจนสามารถผลิตจากสารตั้งต้นได้หลายชนิด เช่น การเปลี่ยนแปลงรูปของก๊าซธรรมชาติ โดยใช้ก๊าซธรรมชาติที่ได้จากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงรูปของไอมีเทน (Steam methane reforming) โดยใช้ไอน้ำภายใต้อุณหภูมิและแรงดันสูงเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 700-1,000 องศาเซลเซียส และทำปฏิกิริยากับไอน้ำที่อุณหภูมิสูงที่ความดัน 2-25 บาร์ โดยถ้ามีคาร์บอนมอนอกไซด์และคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณน้อยจะเป็นกระบวนการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปโดยใช้ไอน้ำจะเป็นปฏิกิริยาการดูดความร้อน ดังนั้น จึงต้องใช้ความร้อนในปฏิกิริยาของกระบวนการ และในขั้นตอนต่อมาเป็นปฏิกิริยาการเคลื่อนที่ของไอน้ำ (Water gas shift reaction) โดยคาร์บอนมอนอกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไอน้ำซึ่งจะเกิดการเร่งปฏิกิริยาสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนออกมา ต่อมา จึงเป็นกระบวนการดูดซับภายใต้ความดัน (Pressure swing adsorption) โดยคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซอื่นๆ จะเกิดการเคลื่อนที่ไปเป็นไอก๊าซและมีการปลดปล่อยก๊าซไฮโดรเจนบริสุทธิ์ออกมา (ชัยวัฒน์ 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากชีวมวล สารชีวมวลเป็นวัตถุอินทรีย์ที่สามารถนำกลับมาใช้ ซึ่งอาจได้จากเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าวสาลี วัสดุเศษเหลือจากโรงเลื่อยในอุตสาหกรรมป่าไม้ โดยเฉพาะพืชจำพวกหญ้าซึ่งจัดเป็นพวกวัชพืชทางการเกษตร โดยพืชเหล่านี้จะใช้พลังงานจากเศษสิ่งปฏิกูลที่ทิ้งจากชุมชนและสิ่งปฏิกูลจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เพื่อให้พืชจำพวกนี้เจริญเติบโตเพิ่มจำนวน ดังนั้น พืชจำพวกนี้ถือว่าเป็นแหล่งสารชีวมวลที่สำคัญ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลนั้นอาศัย 2 กระบวนการ คือ กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลโดยการใช้ความร้อนในรูปของไอน้ำภายใต้สภาวะที่มีความดัน ซึ่งสารชีวมวลจะถูกแยกออกเป็นก๊าซไฮโดรเจน และกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสารชีวมวลด้วยวิธีไพโรไลซิสเป็นวิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน

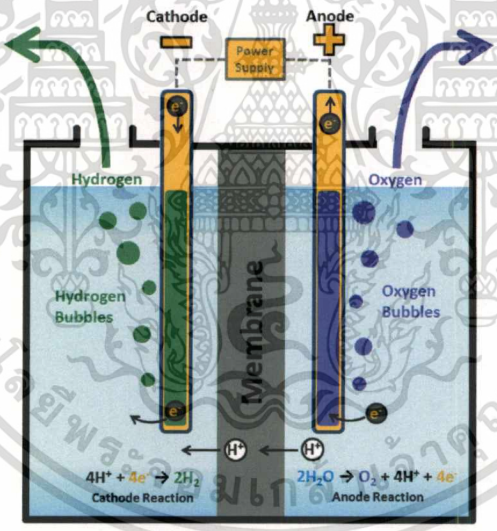
กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากถ่านหินเป็นกระบวนการทางเคมี สามารถผลิตได้ทั้งพลังงาน น้ำมันเชื้อเพลิง สารเคมี และไฮโดรเจน โดยไฮโดรเจนจะถูกสร้างขึ้นก่อนจากการทำปฏิกิริยาระหว่างถ่านหินกับออกซิเจนและไอน้ำภายใต้สภาวะที่มีความดันและอุณหภูมิสูง ซึ่งก๊าซที่สังเคราะห์ขึ้นจะเป็นก๊าซผสมของไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ หลังจากเกิดปฏิกิริยาแล้ว ก๊าซมลทินจะถูกกำจัดออกไป ส่วนคาร์บอนมอนอกไซด์จะเกิดการทำปฏิกิริยากับไอน้ำแล้วได้เป็นก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยก๊าซไฮโดรเจนจะถูกแยกออกจากระบบ ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกยึดจับและกำจัดออกไป การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชื้อเพลิงที่อยู่ในรูปของเหลว เป็นสภาวะที่มีความเหมาะสมในการแยกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเชื้อเพลิงชีวมวลที่อยู่ในรูปของเหลว ซึ่งได้แก่ เอทานอล น้ำมันที่ได้จากกระบวนการหมักโดยจะเกิดขึ้นติดต่อกันอย่างต่อเนื่อง ซึ่งในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงก็จะมีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น โดยขั้นตอนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้จะคล้ายกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติซึ่งได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการแยกโมเลกุลของน้ำ เป็นวิธีการที่ใช้กันมาเป็นเวลานาน ซึ่งเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีกระบวนการพัฒนาให้ดีขึ้น โดยการใช้ความร้อนอุณหภูมิสูง 500-2,000 องศาเซลเซียส ในการที่จะกระตุ้นปฏิกิริยาเคมีในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เมื่อไม่นานมานี้ นักวิจัยทั่วโลกได้ทำการพัฒนาวิธีการต่างๆ ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยการแยกโมเลกุลของน้ำที่อุณหภูมิสูง ได้แก่ กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแตกโมเลกุลของน้ำที่อุณหภูมิสูงโดยใช้พลังงานความเข้มข้นของแสง โดยใช้เลนส์กระจกในการจับแสงให้เกิดความเข้มข้นสูงๆ เพื่อกระตุ้นให้เกิดอุณหภูมิที่สูงขึ้น และกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการแตกโมเลกุลของน้ำที่อุณหภูมิสูงโดยใช้พลังงานนิวเคลียร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า (Electro-chemical process)

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า เป็นการแยกโมเลกุลของน้ำได้เป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในส่วนที่เรียกว่า อิเล็กโทรไลเซอร์ ซึ่งจะถูกประยุกต์ให้มีขนาดที่เล็กและมีหน้าที่ในการเกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรไลซิส ซึ่งจะมีขั้วบวกและขั้วลบของไฟฟ้าแยกออกจากกัน โดยไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่ขั้วลบและออกซิเจนจะไปเกาะที่ขั้วบวก วิธีการนี้ใช้กระแสไฟฟ้ามากถึง 90 กิโลวัตต์ และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต โดยก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งกระบวนการทำงานจะมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดอิเล็กโทรไลเซอร์ เช่น พอลิเมอร์อิเล็กโทรไลต์เมมเบรน (PEM electrolyzer) แอลคาไลน์อิเล็กโทรไลเซอร์ (Alkaline electrolyzer) และโลหะออกไซด์อิเล็กโทรไลเซอร์ (Solid oxide electrolyzer) ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ไม่ก่อให้เกิดสภาวะก๊าซเรือนกระจกในระหว่างกระบวนการผลิต ส่วนข้อเสียของวิธีการนี้ คือ ต้องการกระแสไฟฟ้าจำนวนมากและสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำ กระบวนการนี้ต้องใช้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียส เพื่อแยกโมเลกุลของน้ำให้เป็นออกซิเจนอะตอมและไฮโดรเจนอะตอม (รูปที่ 2.3)

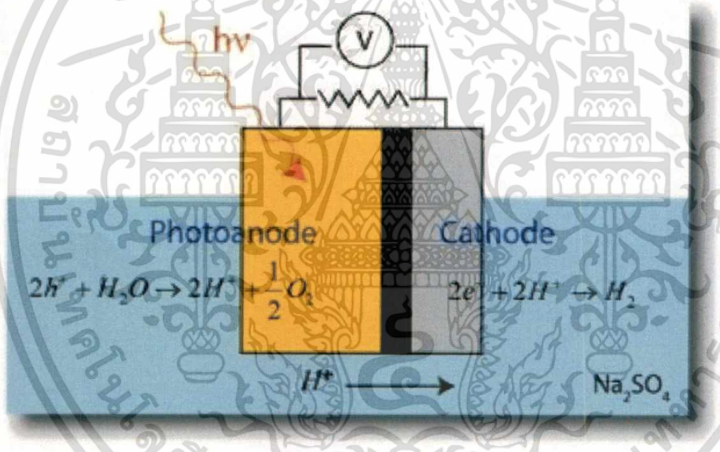


รูปที่ 2.3 กระบวนการอิเล็กโตรไลซิสของน้ำ
(https://energy.gov/eere/fuelcells/hydrogen-production-electrolysis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอล (Photoelectrochemical process)

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอล เป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแตกโมเลกุลของน้ำโดยอาศัยพลังงานแสง ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเร็วมาก และสามารถที่จะนำมาใช้ทำการผลิตในระยะยาวได้ นอกจากนี้ กระบวนการผลิตยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีการโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอล เกิดจากการแยกโมเลกุลของน้ำเพื่อให้ได้ก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอล ซึ่งจะใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน แสงจะเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการแยกโมเลกุลของน้ำผ่านเซมิคอนดักเตอร์อิเล็กโทรด โดยที่แผ่นของคอนดักเตอร์จะเคลือบด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนที่บริเวณพื้นผิวของคอนดักเตอร์ กลไลการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 กระบวนการโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอล
(http://emat-solar.lbl.gov/research/application-photo-electrochemical-cell-pec)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพ

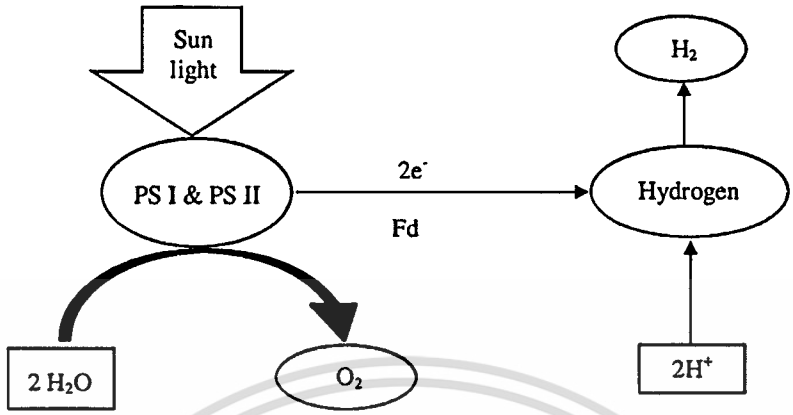
การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพ สามารถเป็นออกเป็นวิธีการต่างๆ ดังนี้

1) การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการชีวภาพแบบใช้แสง (Photobiological hydrogen production)

จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงมีหลายกลุ่มที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียว และไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงจะอาศัยรงควัตถุชนิดต่างๆ ในการดูดซับพลังงานแสง เช่น คลอโรฟิลล์ เอ และ คลอโรฟิลล์ บี กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงจะมีระบบแสงทั้งหมด 2 ระบบ คือ ระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I; PS I) และระบบแสงสอง (Photosystem II; PS II) ซึ่งระบบแสงทั้งสองจะทำหน้าที่ร่วมกันเพื่อให้สามารถถ่ายทอดพลังงานแสงไปใช้ในการสร้าง ATP และ NADPH ซึ่งจุลินทรีย์จะนำสารทั้งสองนี้ไปถ่ายทอดพลังงาน เพื่อช่วยตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในปฏิกิริยาที่ไม่ต้องใช้แสง เกิดเป็นคาร์โบไฮเดรต ($C_m(H_2O)_n$)

ปฏิกิริยาแรกในกระบวนการที่ต้องใช้แสง คือ ระบบแสงสองดูดซับพลังงานแสงที่ 680 นาโนเมตร โดยพลังงานจะถูกถ่ายทอดมาจากคลอโรฟิลล์ เอ ทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ โดยอิเล็กตรอนนี้จะเคลื่อนที่ไปตามระบบการขนส่งอิเล็กตรอน การที่อิเล็กตรอนของระบบแสงสองหลุดออกไป ทำให้เกิดการออกซิไดซ์น้ำได้เป็นออกซิเจน ไฮโดรเจน และอิเล็กตรอน ซึ่งออกซิเจนอะตอมจะรวมตัวกันเกิดเป็นโมเลกุลของออกซิเจน ส่วนอิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำจะเคลื่อนไปทดแทนอิเล็กตรอนที่หลุดออกไปจากคลอโรฟิลล์ และจะเคลื่อนที่ไปยังระบบแสงหนึ่งผ่านลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนที่มีระบบตัวนำอิเล็กตรอนชื่อ พลาสโตควิโนน (Plastoquinone; PQ) ซึ่งทำหน้าที่เป็นกระสวยรับโปรตอน และอาศัยการสูบโปรตอนโดยระบบไซโตโครม (Cytochrome; Cyt) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin; PC) โดยการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนจากระบบแสงสองไปตามระบบการขนส่งอิเล็กตรอน และทำให้เกิดพลังงานอิสระสำหรับนำไปใช้ในการสร้าง ATP เมื่อระบบแสงหนึ่งได้รับพลังงานจากแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกและส่งผ่านไปยังตัวรับอิเล็กตรอน จนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย คือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin; Fd) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ จากนั้น เอนไซม์ $NADP^+$ reductase (FNR) ส่งอิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินไปให้ $NADP^+$ ร่วมกับ $2H^+$ กลายเป็น NADPH และได้ก๊าซไฮโดรเจนโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเฟอร์รีดอกซินจะมีความเกี่ยวข้องโดยตรงต่อกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน (รูปที่ 2.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 กระบวนการไบโอโฟโตไลซิส
(Shaishav และคณะ 2013)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ได้แก่

ก. แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (Photosynthetic bacteria)

แบคทีเรียพวกนี้จัดเป็น Anoxygenic phototrophic bacteria ประกอบด้วย 3 กลุ่ม คือ

- แบคทีเรียสีม่วงไม่สะสมซัลเฟอร์ (Non-sulfur purple bacteria)
- แบคทีเรียสีม่วงสะสมซัลเฟอร์ (Purple sulfur bacteria)
- แบคทีเรียสีเขียวสะสมซัลเฟอร์ (Green sulfur bacteria)

การสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีสารสีเป็นชนิดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (Bacterio chlorophyll) ที่อยู่ในถุงแต่ไม่ใช่คลอโรพลาสต์ และไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ แต่สามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์ ไธโอซัลเฟตได้ และมีสารประกอบอินทรีย์เป็นสารให้อิเล็กตรอน

ข. สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการปรับตัวที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยสาหร่ายสีเขียวจึงจัดเป็น Photohydrogen production สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Clamydomonas* sp. และ *Scenedesmus* sp. เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค. ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตที่สังเคราะห์แสงแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซไฮโดรเจนและออกซิเจน (Oxygenic phototrophic prokaryote) โดยเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและชนิดของคลอโรฟิลล์ โดยจะประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบเหมือนสาหร่าย ปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสงจะทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำได้เป็นออกซิเจน โปรตอน และ อิเล็กตรอน อิเล็กตรอนจะถูกขนส่งไปยังลูกโซ่การขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อนำไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจน ข้อดีการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีนี้คือ ใช้น้ำกับแสงซึ่งมีอยู่มากมายในธรรมชาติเป็นแหล่งวัตถุดิบ และผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่ก่อให้เกิดมลพิษกับสิ่งแวดล้อม

2) การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ (Fermentative hydrogen production)

แบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ในวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซิอี (Enterobacteriaceae family) แบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก ซึ่งจะย่อยสารอินทรีย์ในสภาวะที่ไม่มีอากาศได้อิเล็กตรอนเพื่อผลิตไฮโดรเจนโดยใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส ข้อเสียของกระบวนการนี้คือ จะมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้น และปฏิกิริยาต้องควบคุมในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

2.3 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

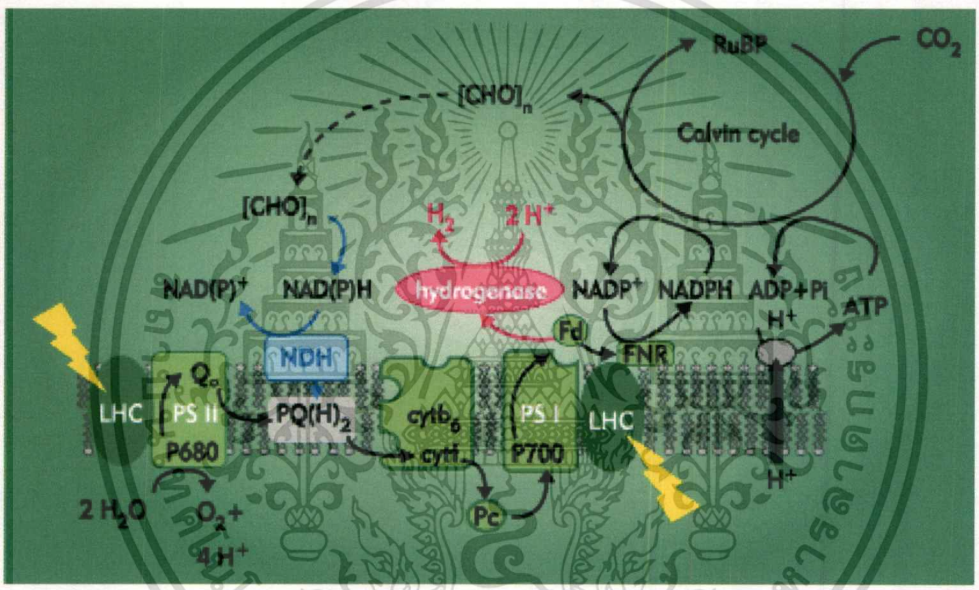
สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัย 2 กระบวนการหลัก คือ การผลิตไฮโดรเจนที่ขึ้นกับแสง (Light-dependent pathway) และการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่ขึ้นกับแสง (Light-independent pathway) การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวสามารถเร่งปฏิกิริยาได้จากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งจะมีไอออนของเหล็กอยู่ที่บริเวณเร่ง จึงเรียกเอนไซม์นี้ว่า Fe หรือ FeFe-hydrogenase เอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจน โดยมีเฟอร์รีดอกซินเป็นกุญเจสำคัญในการส่งอิเล็กตรอนไปสู่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับไม่ได้

$$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$$

ในการผลิตไฮโดรเจนในปฏิกิริยาที่ใช้แสงนั้น หน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ในระบบสังเคราะห์แสงสองจะรับพลังงานแสง จากนั้น ศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดการกระตุ้น และจะเกิดการปลดปล่อยอิเล็กตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การขนส่งอิเล็กตรอน (Electron transport chain) จนในที่สุด อิเล็กตรอนจะถูกส่งไปใช้ในปฏิกิริยารีดักชันของเฟอร์รีดอกซิน (รูปที่ 2.6) เมื่อศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาเกิดการกระตุ้นและปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกไป ทำให้เกิดความไม่เสถียร ดังนั้น จึงรับอิเล็กตรอนจากการแตกตัวของน้ำเข้ามาทดแทน ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่ใช้แสง อิเล็กตรอนที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนจะได้มาจากการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สลายคาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ (Endogenous carbohydrate) ที่ได้มาจากวิถีไกลโคไลซิส และวัฏจักรกรดซิตริกหรือได้มาจากการสลายโมเลกุลของสารอินทรีย์อื่นๆ เช่น ลิพิด ฯลฯ การย่อยสลายองค์ประกอบต่างๆ จะได้โมเลกุลของ NAD(P)H ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ได้เป็นอิเล็กตรอนออกมา หลังจากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งเข้าไปยังลูกโซ่อิเล็กตรอนผ่านพลาสโตควิโนน การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่มืดและไม่มีอากาศ (Dark anoxic condition) ซึ่งภายใต้สภาวะนี้ เมแทบอลิซึมของสาหร่ายโดยทั่วไปจะเกิดการหมักได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น ฟอร์เมต อะซิติก เอทานอล และไฮโดรเจน เมื่อลูกโซ่การขนส่งอิเล็กตรอนไม่ทำงานและอยู่ในสภาวะมืด ไพรูเวท (Pyruvate) จะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนเพื่อไปรีดิวซ์เฟอร์รีดอกซิน (Seibert และคณะ 2008)



รูปที่ 2.6 การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว
(Vilchez และคณะ 2001)

2.4 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้แล้วได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ โดยประกอบด้วยระบบแสงหนึ่งและระบบแสงสอง ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง การหมักในที่มืด นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายบางชนิดที่มีเฮเทอโรซิสต์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

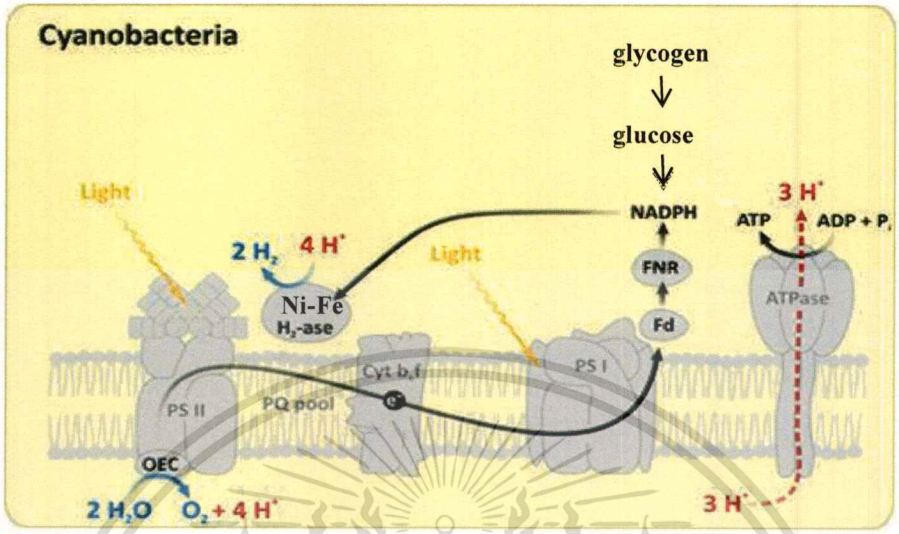
2.4.1 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง

ไซยาโนแบคทีเรียมีองค์ประกอบต่างๆ ที่สำคัญสำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงอยู่บนเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ (Thylakoid membrane) การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงเกิดขึ้นเมื่อหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ในระบบแสงที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิด ทั้งแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) และ คลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll A) ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง แล้วส่งพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยาแสง (Light reaction center) ที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ศูนย์กลางปฏิกิริยาแสงจะอยู่ในสภาวะกระตุ้น จึงมีต้องปลดปล่อยอิเล็กตรอนเพื่อให้กลับสู่สภาวะเดิม โดยจะส่งต่ออิเล็กตรอนเข้าสู่ลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน เมื่อระบบแสงสองสูญเสียอิเล็กตรอนไป จะมีการรับอิเล็กตรอนที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำเข้ามาทดแทน ในกระบวนการแตกตัวของน้ำนั้น จะได้อิเล็กตรอน โปรตอน และออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ ในลูกโซ่การขนส่งอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนจะถูกส่งจากระบบแสงสองผ่านพลาสโตควิโนน (Plastoquinone; PQ) ไซโตโครม บี ซิก เอฟ (Cytochrome b_6f; $Cytb_6f$) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin; PC) ระบบแสงหนึ่ง และไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin; Fd) (รูปที่ 2.7) จากนั้น เฟอร์รีดอกซินจะรีดิวซ์ NAD(P) ให้เป็น NAD(P)H ซึ่ง NAD(P)H จะให้อิเล็กตรอนแก่โปรตอนผ่านเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase) เพื่อผลิตไฮโดรเจน ดังสมการ

$$2H^+ + 2e^- \longleftrightarrow H_2$$

ปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนของไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ ซึ่งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง เรียกว่า Direct photolysis นอกจากนี้ พลังงานและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์แสง คือ ATP และ NAD(P)H จะสามารถนำไปใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 fixation) เพื่อสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตเก็บสะสมภายในเซลล์ ในไซยาโนแบคทีเรีย เซลล์จะเก็บสะสมคาร์บไฮเดรตในรูปของไกลโคเจน เมื่อไซยาโนแบคทีเรียอยู่ในสภาวะมืดและปราศจากอากาศ จะเกิดการย่อยสลายไกลโคเจนที่เก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ อิเล็กตรอนที่ได้จากการย่อยสลายไกลโคเจนจะถูกส่งไปรีดิวซ์ NAD(P) ให้เป็น NAD(P)H (รูปที่ 2.7) หลังจากนั้น จะถูกออกซิไดซ์ได้อิเล็กตรอนที่ใช้ผลิตไฮโดรเจนโดยผ่านการทำงานของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส เรียกกระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบไม่ใช้แสงนี้ว่า Indirect photolysis (Appel และ Schulz 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย
(ดัดแปลงจาก Shevela และ Messinger 2011)

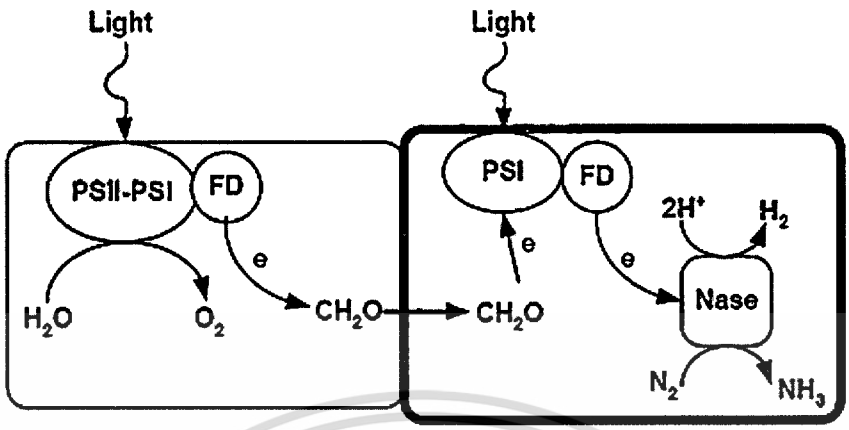
2.4.2 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน

การผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ จะเกิดขึ้นในเซลล์พิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst) กระบวนการตรึงไนโตรเจนจากอากาศจะได้แอมโมเนียและไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ โดยผ่านการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังสมการ

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$

กระบวนการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียจะใช้พลังงาน ATP 2 โมเลกุลขึ้นไป สำหรับเริ่มการขนส่งอิเล็กตรอน จากนั้น อิเล็กตรอน และ ATP จะถูกส่งไปยังเอนไซม์ไนโตรจีเนสเพื่อใช้ในการผลิตแอมโมเนียและไฮโดรเจน ซึ่งอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านระบบแสงหนึ่ง จนไปถึงเฟอร์รีดอกซินซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ส่งไปยังเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ ซึ่งมีเพียงระบบแสงหนึ่งเท่านั้น ดังนั้น ระบบแสงหนึ่งในเฮเทอโรซิสต์จะได้รับอิเล็กตรอนมาจากการย่อนสลายคาร์โบไฮเดรตจากเซลล์ปกติ (Vegetative cell) (รูปที่ 2.8) นอกจากนี้ ไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยกระบวนการตรึงไนโตรเจน สามารถถูกสลายไปได้ด้วยเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenase) อิเล็กตรอนที่ได้จากการใช้ไฮโดรเจนจะกลับเข้าสู่ลูกโซ่การขนส่งอิเล็กตรอนผ่านทางพลาสโตควิโนนพูล (Plastoquinone pool) (Appel และ Schulz 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน (Yu และ Takahashi 2007)

2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

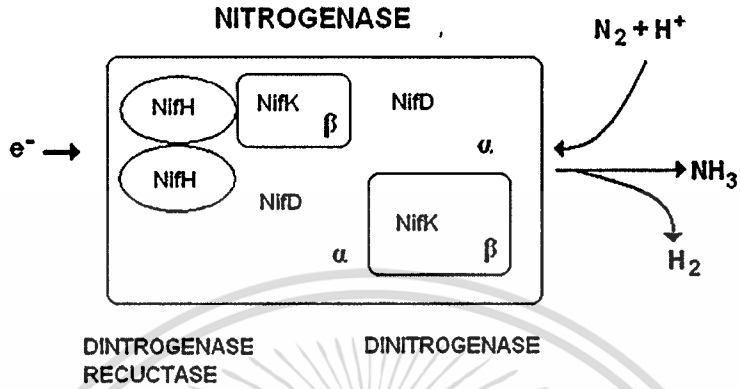
ไซยาโนแบคทีเรียมีเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดนั้นจะมีกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียมีทั้งหมด 3 ชนิด ดังนี้

2.5.1 เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase)

เอนไซม์ไนโตรจีเนสมีหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ โดยการเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียและได้ผลิตผลพลอยได้ออกมาเป็นก๊าซไฮโดรเจน เอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบด้วยโปรตีน 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นเอนไซม์ไดไนโตรจีเนส (Dinitrogenese) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ (Fe-protein) เอนไซม์นี้มีมวลโมเลกุล 60-70 กิโลดาลตัน มี 2 หน่วยย่อย คือ α และ β ที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifD* และ *nifK* ตามลำดับ ซึ่งทำหน้าที่แตกตัวโมเลกุลของไฮโดรเจน ส่วนที่สองเป็นเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทส (Dinitrogenase reductase) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีทั้งธาตุเหล็กและโมลิบดินัมเป็นองค์ประกอบ (MoFe-protein) เอนไซม์ส่วนนี้มีมวลโมเลกุลประมาณ 220-240 กิโลดาลตัน ที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifH* เอนไซม์นี้จะมีหน่วยย่อยทั้งหมด 4 หน่วยย่อย ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนและสลาย ATP เพื่อผลักดันอิเล็กตรอนให้แก่ส่วนที่ 2 โดยที่อิเล็กตรอน 2 ตัว จะสามารถรีดิวซ์ให้ได้ไฮโดรเจนไอออน 2 ตัว เช่นกัน ซึ่งเป็นตัวที่ทำหน้าที่ในการรีดิวซ์ไนโตรเจนให้เป็นไดเอมีน HN=NH จากนั้น ก็จะเกิดกลไกซ้ำกับขั้นตอนแรก โดยรับอิเล็กตรอนมาจากเฟอร์รีดอกซิน จนกระทั่ง เกิดการรีดิวซ์ไดเอมีน HN=NH ไปเป็นไฮดราซีน $H_2N\text{-}NH_2$ กระบวนการก็จะเกิดวนซ้ำ จนกระทั่ง รีดิวซ์ $2HN\text{-}NH_2$ ไปเป็นแอมโมเนีย 2 โมเลกุล รวมแล้ว กระบวนการตรึงไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียใช้อิเล็กตรอนทั้งหมด 8 ตัว โดยใช้อิเล็กตรอน 6 ตัว ในกระบวนการรีดักชันจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย และใช้อิเล็กตรอนอีก 2 ตัว ในการรีดิวซ์ไฮโดรเจน แอมโมเนียที่สังเคราะห์ได้จะเข้าสู่เมตาบอลิซึมของกรดนิวคลีอิกเป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.9 การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส
(Tiwari และ Pandey 2012)

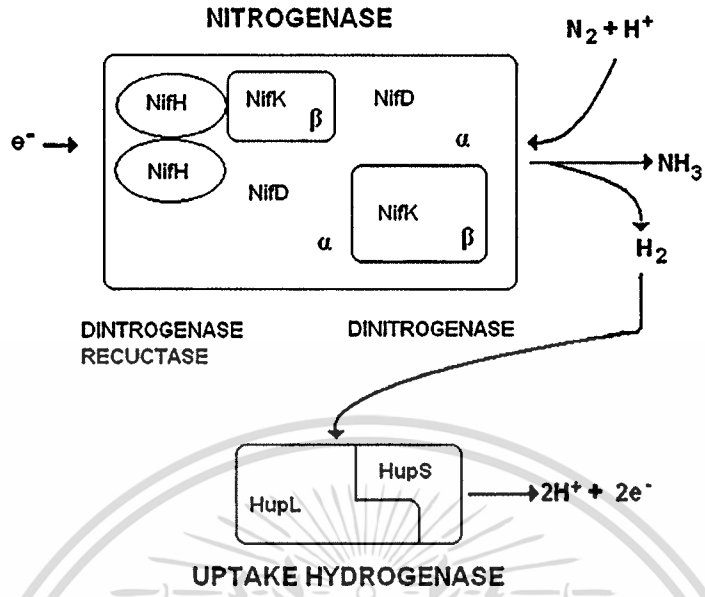
เอนไซม์ชนิดนี้สามารถที่จะพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายหรือในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด ซึ่งในกระบวนการตรึงไนโตรเจนนั้น มีการใช้พลังงาน ATP ในการเร่งปฏิกิริยาอย่างน้อย 16 โมเลกุล เพื่อทำการรีดิวซ์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย และได้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลผลิต (Rao และ Hall 1996) ดังสมการต่อไปนี้

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$
$$8H^+ + 8e^- + 16ATP \longrightarrow 4H_2 + 16ADP + 16Pi$$
$$16ATP + 16H_2O + N_2 + 10H^+ + 8e^- \longrightarrow 16ADP + 16Pi + 2NH_4^+ + H_2$$

2.5.2 เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenese)

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสทำหน้าที่ในการสลายไฮโดรเจนที่ได้จากการตรึงไนโตรเจน สามารถพบได้ในเฉพาะเซลล์เฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรีย เอนไซม์นี้ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ โปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ (HupL) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการสลายโมเลกุลของไฮโดรเจนที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจน ให้กลายเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน และโปรตีนหน่วยย่อยเล็ก (HupS) ซึ่งทำหน้าที่ในการส่งเสริมการทำงานของโปรตีน HupL (รูปที่ 2.10) โดยโมเลกุลของไฮโดรเจนที่ถูกผลิตขึ้นจะถูกออกซิไดซ์ทันทีด้วยเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส ซึ่งเรียกปฏิกิริยานี้ว่า Knallgas reaction ดังนั้น จึงไม่มีการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการทำงานของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสได้สมบูรณ์ (Tamagnini และคณะ 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

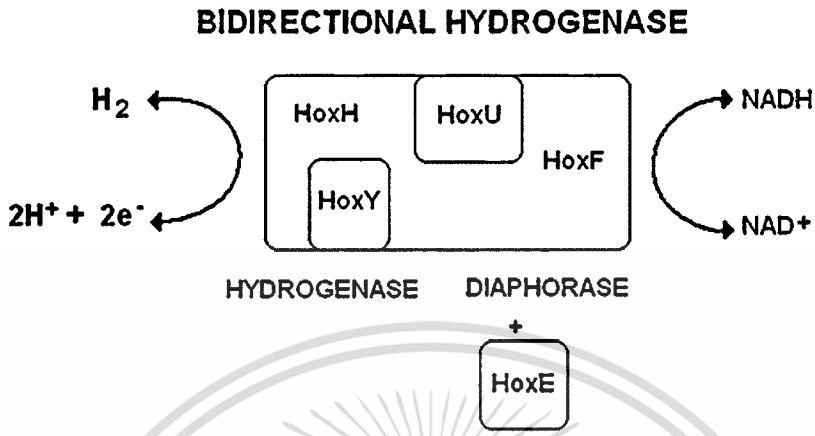


รูปที่ 2.10 การผลิตไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสและการสลายไฮโดรเจนของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (Tiwari **และ** Pandey 2012)

2.5.3 เอนไซม์ไบไดเรคชันนาลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase)

เอนไซม์ไบไดเรคชันนาลไฮโดรจีเนส หรืออาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (Reversible hydrogenase) **เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ทั่วไป สามารถพบในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว เช่น** *Synechocystis* sp. **และ** *Synechococcus* sp. **และในพวกไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย เช่น** *Spirulina maxima* **รวมไปถึงไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ด้วย เอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ในการสร้างและสลายไฮโดรเจน โดยเอนไซม์นี้จะประกอบไปด้วยโปรตีน 4 หน่วยย่อยที่แตกต่างกัน** (Heterotetra meric enzyme) **โดย 2 หน่วยย่อยแรกรวมกันเป็นไฮโดรจีเนส โดยหน่วยย่อยซิกมาและเบต้าถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน** *hoxY* **และ** *hoxH* **ตามลำดับ ส่วนโปรตีน 2 หน่วยย่อยที่เหลือเรียกว่า ไดอะฟอเรส** (Diaphorase) **โดยหน่วยย่อยไดอะฟอเรสแอลฟาและแกมมาถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน** *hoxF* **และ** *hoxU* **ตามลำดับ โปรตีนทั้งสองส่วนนี้จะทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนไปยัง** NAD^+ **หรือ** NADH **(รูปที่** 2.11**) โดยก่อนหน้านี้ ได้มีการรายงานการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสว่ามีความไวต่อออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่า แต่สามารถทนความร้อนได้น้อยกว่าเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 การทำงานของเอนไซม์ไบไดเรคชันนาลไฮโดรจีเนส
(Tiwari และ Pandey 2012)

2.6 ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดแรกที่ถือกำเนิดขึ้นบนโลกใบนี้ มีหลักฐานการค้นพบซากโบราณ (Fossil) ของแบคทีเรียในหินที่ตกตะกอนที่อยู่ในทะเล นักธรณีวิทยาคาดว่าไซยาโนแบคทีเรียมีอายุประมาณ 3,500 ล้านปีและยังคงมีชีวิตยาวนานมาจนถึงทุกวันนี้ ไซยาโนแบคทีเรียจัดอยู่ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว จัดอยู่ในดิวิชัน Cyanochloronta ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอต ซึ่งจัดอยู่รวมกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างออกไป คือ ไซยาโนแบคทีเรียมีคลอโรฟิลล์ เอ จึงสามารถสังเคราะห์แสงได้ มีโครงสร้างเซลล์แบบเรียบง่าย ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (โปรคาริโอต) ทำให้สารพันธุกรรมกระจายอยู่ในเซลล์ มีการเจริญแบบแบ่งตัว ซึ่งโลกสมัยแรกมีอุณหภูมิร้อนจัด ไม่มีออกซิเจน มีแต่คาร์บอนไดออกไซด์ และสารหรือธาตุที่เกิดจากการระเบิดของภูเขาไฟ เช่น ไนโตรเจน มีเทน แอมโมเนีย เป็นต้น แต่ด้วยไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการปรับตัวได้สูงมาก เช่น สร้างเมือกห่อหุ้มเซลล์ และในเซลล์จะมีถุงลมเพื่อช่วยการลอยตัวหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แสง มีเม็ดสีช่วยในการต่อต้านแสงอัลตราไวโอเลตจากดวงอาทิตย์ เป็นต้น จึงทำให้สามารถมีชีวิตในสภาพแวดล้อมในโลกเมื่อ 3.5 พันล้านปีได้ อีกทั้งด้วยภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียมีสารคลอโรฟิลล์เป็นองค์ประกอบ จึงสังเคราะห์แสงผลิตออกซิเจนออกมายังพื้นโลก จึงสันนิษฐานได้ว่า เป็นจุดเริ่มต้นกระบวนการที่สร้างสภาพแวดล้อมให้เอื้อต่อการเกิดสิ่งมีชีวิตอื่นตามมา โดยวิวัฒนาการจะเป็นไปอย่างช้าๆ กล่าวคือ เมื่อ 2,000 ล้านปี จึงเริ่มมีการพบหลักฐานการเกิดสิ่งมีชีวิตที่พัฒนาขึ้นจากยุคแรกๆ คือมีทั้งเซลล์เดียวและหลายเซลล์ ภายในเซลล์จะมีความซับซ้อนมากขึ้น แต่ละเซลล์มีผนังหุ้ม นอกจากนี้ ยังมีผนัง

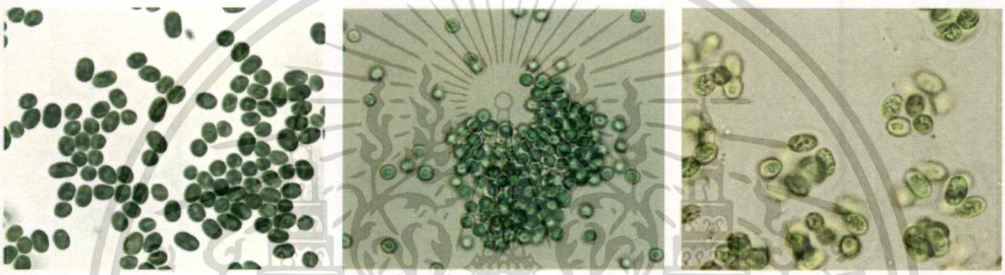
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หุ้มนิวเคลียส (ยูคาริโอต) ซึ่งเป็นที่รวมของสารพันธุกรรม มีการขยายพันธุ์ด้วยตัวเอง (แบ่งตัว/แตกหน่อ) และแบบผสมกับเซลล์อื่น สิ่งมีชีวิตที่พัฒนาขึ้นมาในยุคนี้ ได้แก่ รา (รวมยีสต์) และสาหร่ายชั้นสูง

2.6.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถแบ่งไซยาโนแบคทีเรียได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1) กลุ่มที่ไม่เป็นเส้นสายหรือเซลล์เดี่ยว (Non-filamentous form หรือ Unicellular cyanobacteria) ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นทรงกลม (Coccoid form) พบทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและอยู่กันเป็นกลุ่มแบบ Palmelloid colony ที่มีเมือกหุ้มอยู่ (Firm mucilaginous envelop) เช่น *Microcystis* sp. เป็นต้น (รูปที่ 2.12)

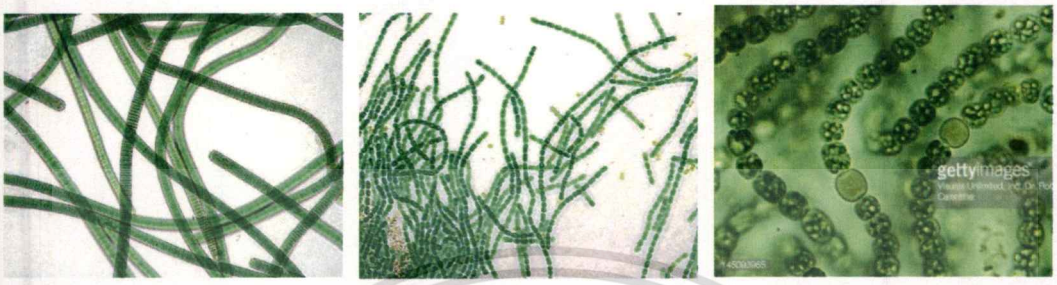


รูปที่ 2.12 ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีที่ไม่เป็นเส้นสาย
(http://irrigation.rid.go.th/rid14/water/library/shelf/data/page/science/science_6.html)

2) กลุ่มที่เป็นเส้นสาย (Filamentous form) เซลล์จะเรียงต่อกันเป็นเส้นสายเรียกว่า ตรัยโคม (Trichome) เส้นสายนี้อาจจะตรงและเรียบ ไม่มีการแตกแขนง มีเซลล์ชนิดเดียวกันมาเรียงต่อกันที่เรียกว่า Homocystous form เช่น *Oscillatoria* sp. และ *Lyngbya* sp. เป็นต้น และอีกกลุ่มเส้นสายที่มีเซลล์ปกติและมีเฮเทอโรซิสต์มาเรียงสลับหรืออยู่ที่ปลายสุดของตรัยโคมที่เรียกว่า Heterocystous form เช่น *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. เป็นต้น (รูปที่ 2.13) เฮเทอโรซิสต์เป็นเซลล์ที่มีผนังหนา ภายในเซลล์ใส เป็นสีเหลืองจางๆ เกิดอยู่ระหว่างเซลล์ปกติในเส้นสาย ซึ่งเรียกเฮเทอโรซิสต์ที่อยู่ในตำแหน่งแบบนี้ว่า อินเตอร์คาลารีเฮเทอโรซิสต์ (Intercalary heterocyst) และแบบที่สอง เป็นเฮเทอโรซิสต์ที่เกิดตรงปลายข้างใดข้างหนึ่งของเส้นสายหรือทั้งสองข้าง เรียกเฮเทอโรซิสต์ที่อยู่ในตำแหน่งแบบนี้ว่า เทอร์มินัลเฮเทอโรซิสต์ (Terminal heterocyst) ซึ่งยังสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ชนิดแรก เบซัลเฮเทอโรซิสต์ (Basal heterocyst) พบในเส้นสายของเซลล์ที่มีขนาดไม่เท่ากันตลอดทั้งสาย ส่วนมากมักเกิดติดกับเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด พบในไซยาโนแบคทีเรีย *Calothrix* sp. ชนิดที่สอง เพดิเซลเลทเฮแทอโรซิสต์ (Pedicellate heterocyst) เกิดที่ปลายของแขนงสั้นๆ ซึ่งมีจำนวนเซลล์เพียง 1-3 เซลล์ และชนิดที่สาม แลทเทอรัลเฮแทอโรซิสต์ (Lateral heterocyst) เกิดข้างๆ เส้นสาย โดยแนบติดกับเซลล์ในเส้นสายนั้นๆ สามารถพบเพดิเซลเลทเฮแทอโรซิสต์และแลทเทอรัลเฮแทอโร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิสต์ได้ในไซยาโนแบคทีเรีย *Nostochopsis* sp. และบางชนิดเส้นสายนั้นอาจจะมีปลายโค้งงอหรือบิดเป็นเกลียว เช่น *Arthrospira* sp. และ *Spirulina* sp. (ยุวดี 2546)



รูปที่ 2.13 ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์รูปร่างเป็นเส้นสาย
(http://irrigation.rid.go.th/rid14/water/library/shelf/data/page/science/science_6.html)

2.6.2 การสืบพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย

1) การแบ่งเซลล์

ไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มเซลล์เดี่ยวจะมีการแบ่งเซลล์ ทำให้เกิดกลุ่มเซลล์รวมตัวกันอยู่ในผนังเซลล์เดียวกัน จากนั้น เซลล์ที่ได้จากการแบ่งตัวจะหลุดออกจากผนังเซลล์เจริญเป็นเซลล์ใหม่ ส่วนกลุ่มที่อยู่รวมเป็นโคโลนีจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและหลุดออกไปเป็นกลุ่มย่อยๆ แล้วจึงเจริญออกไปเป็นเซลล์ใหม่ ในขณะที่พวกที่มีไตรโคมจะแยกไตรโคมเป็นท่อนสั้นๆ ประมาณ 2-3 เซลล์หรือมากกว่า เรียกว่า ฮอร์โมโกเนียม (hormogonium) และเจริญไปเป็นสายใหม่ต่อไป ฮอร์โมโกเนียมจะมีการเคลื่อนไหวมากกว่าไตรโคมเดิม บริเวณที่ขาดออกจากกันตรงบริเวณเซลล์ที่ตายเรียกว่า เซพาเรชันดิสก์ (Separation disk) หรือ เนครีเดีย (Necridia) ในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียเส้นสาย ยังมีการสร้างเฮเทโรซิสต์กับเซลล์ที่อยู่ติดกัน นอกจากนี้ ยังสร้างเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ผนังเซลล์หนาคล้ายกับสปอร์ที่เรียกว่า อะคินีต (Akinete) ซึ่งภายในมีเม็ดไซยาโนไฟซิน (Cyanophycin granule) โดยเซลล์จะเจริญเมื่อมีการสร้างอะคินีตเสร็จใหม่ๆ อะคินีตสามารถทนสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความแห้งแล้ง หรืออุณหภูมิสูงได้ระยะหนึ่ง เมื่อมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม อะคินีตจะเจริญเป็นสายใหม่ได้

2) การสร้างสปอร์

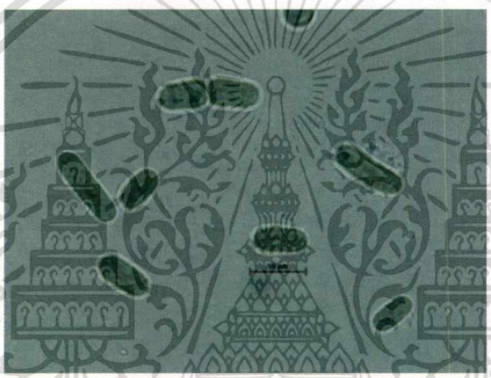
สปอร์ที่สร้างโดยไซยาโนแบคทีเรียมี 2 ชนิด คือ เอนโดสปอร์ (Endospore) และเอกโซสปอร์ (Exospore) ซึ่งไม่มีแฟลกเจลลัม (Flagellum) สำหรับใช้ในการเคลื่อนที่ เอนโดสปอร์เป็นสปอร์ที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายในเซลล์จากการแบ่งโปรโตพลาสต์ โดยแต่ละส่วนจะพัฒนาไปเป็นสปอร์เมื่อหลุดออกจากผนังเซลล์เดิม จะงอกเป็นทัลลัสใหม่ และเอกโซสปอร์เกิดจากการแบ่งของส่วนปลาย

2.7 ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica* สามารถพบได้ในสภาพแวดล้อมที่มีความข้มข้นเกลือสูงๆ เซลล์จะมีลักษณะกลมหรือทรงกระบอก และมีหลากหลายขนาดตั้งแต่ 2-10 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.14) การเพิ่มขนาดของเซลล์จะทำให้เพิ่มความสามารถในการทนเค็มได้เพิ่มมากขึ้น (Berland และคณะ 1989) *A. halophytica* สามารถเจริญเติบโตในความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 3 โมลาร์ และความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 0.5 ถึง 1.0 โมลาร์ (Takabe และคณะ 1988)

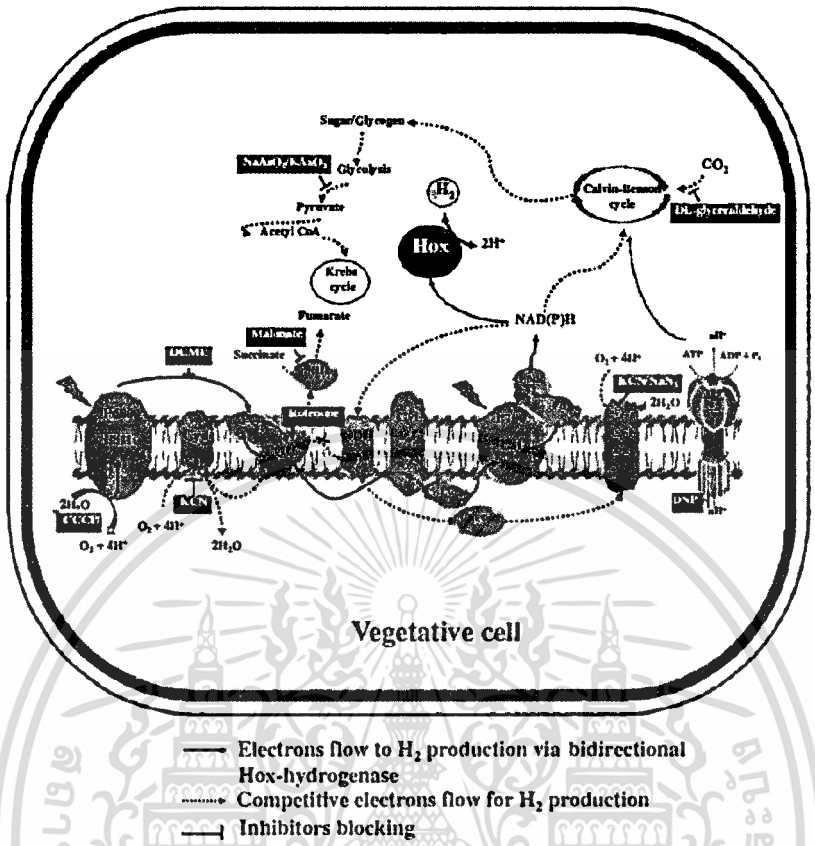


รูปที่ 2.14 ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

2.8 สารยับยั้ง

ได้มีการศึกษาสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การยับยั้งการทำงานของระบบแสงสอง ซึ่งส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถผลิตออกซิเจนที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำได้ ทำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน ซึ่งภายใต้สภาวะนี้ ทำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมากขึ้น และยังไม่มีออกซิเจนมายับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีกด้วย จึงทำให้เอนไซม์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มมากขึ้น และยังสามารถผลิตไฮโดรเจนในที่สว่างได้ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาการใช้สารยับยั้งในกระบวนการอื่นๆ เช่น สารยับยั้งกระบวนการหายใจ ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และวัฏจักรเครบส์ โดยสารยับยั้งจะเข้าไปขัดขวางกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังวิถีต่างๆ (รูปที่ 2.15) อิเล็กตรอนจึงเปลี่ยนทิศทางไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้เอนไซม์มีอิเล็กตรอนไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.15 การขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย (PQ/PQH2: Plastoquinone pool, Cyt b6f: Cytochrome b6f, PC: Plastocyanin, Cyt c553: Cytochrome c553, Cyd: Quinol oxidase, Fd: Ferridoxin, FNR: Ferridoxin–NADP reductase, SDH: Succinate dehydrogenase, NDH-I: NADPH dehydrogenase (complex I), Cyt ox: Cytochrome c oxidase) (Khetkorn และคณะ 2012)

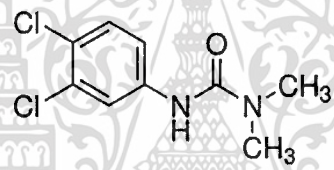
จากรูปที่ 2.15 แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหายใจของไซยาโนแบคทีเรียจะอยู่ร่วมกัน ลูกศรสีดำแสดงการขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อนำไปผลิตไฮโดรเจนโดยผ่านการทำงานของเอนไซม์ bidirectional hydrogenase ในขณะที่ลูกศรเส้นประแสดงการแข่งขันอิเล็กตรอนที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการต่างๆ และแสดงสารยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการต่างๆ เพื่อนำอิเล็กตรอนไปใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.1 สารยับยั้งระบบแสงสอง

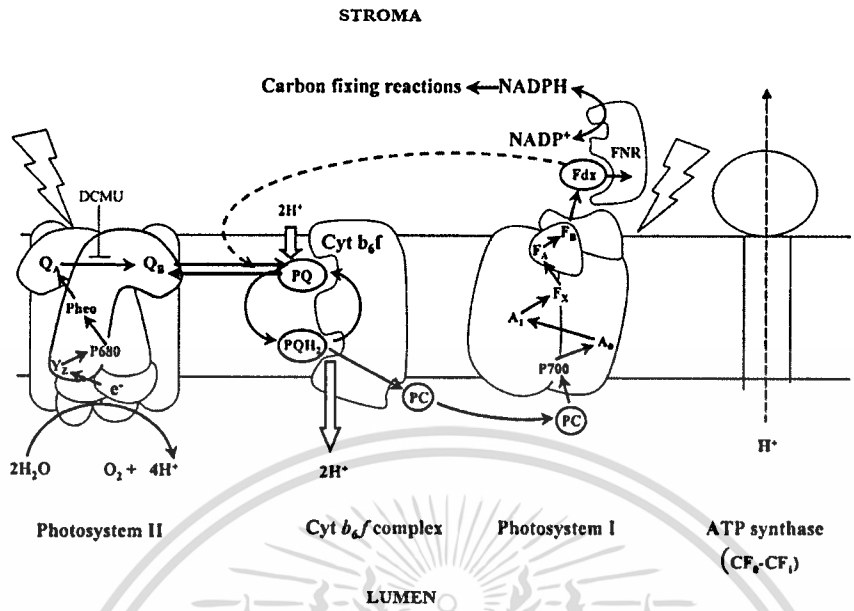
1. สารไดยูโรน หรือ ดีซีเอ็มยู (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea, DCMU)

เมื่อระบบแสงสองรับโฟตอน (P680) จะเกิดสภาวะกระตุ้น ทำให้โมเลกุลไม่เสถียร จึงต้องส่งอิเล็กตรอนไปยังโมเลกุลที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในลำดับถัดไปในระบบแสงสอง คือ ฟีโอไฟติน (Pheophytin) ควิโนน เอ (Q_A) ควิโนน บี (Q_B) แล้วจึงส่งอิเล็กกตรอนต่อไปยังพลาสโตควิโนน (Plastoquinone) หลังจากนั้นระบบแสงสองจะรับอิเล็กตรอนจากการแตกตัวของน้ำเข้ามาแทนที่ ซึ่งการแตกตัวของน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน และโปรตอน สารยับยั้งระบบแสงสองที่เป็นที่รู้จักกันดี คือ สาร (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea หรือ DCMU ซึ่งมีโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.16 เมื่อใส่สาร DCMU เข้าไปในระบบ DCMU จะเข้าไปแย่งอิเล็กตรอนจาก ควิโนน เอ ทำให้ ควิโนน เอ ไม่สามารถส่งอิเล็กตรอนต่อไปยัง ควิโนน บี และ พลาสโตควิโนน จึงทำให้กระบวนการแตกตัวของน้ำไม่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงไม่มีการผลิตออกซิเจน (รูปที่ 2.17)



รูปที่ 2.16 โครงสร้างของ DCMU

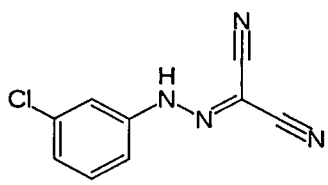
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.17 การยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนของ DCMU จากระบบแสงสองสู่พลาสโตควิโนน ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Dean 2014)

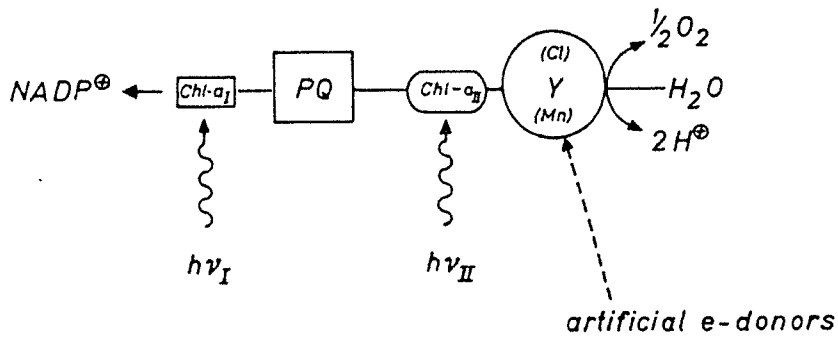
2. สารซีซีซีพี (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine, CCCP)

ในปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำ (Water splitting) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องจะเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์การแตกตัวของน้ำทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนที่ได้จะถูกส่งไปยังระบบแสงสอง โดยผ่านการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเป็นทอดๆ ตามลำดับ สาร Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine หรือ CCCP จัดเป็นเอดีอาร์วายเอเจนท์ (Agent accelerating the deactivation reactions of water splitting enzyme system Y, ADRY agent) มีโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.18 และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำ (รูปที่ 2.19) โดย CCCP จะเข้าไปจับกับบริเวนเร่ง (Active site) ตัวส่งอิเล็กตรอนตัวแรก (Primary electron D) ในโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้กลายเป็นบริเวณที่ไม่สามารถทำงานได้ (Inactive site) จึงทำให้ไม่มีการแตกตัวของน้ำเกิดขึ้น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องนี้จะประกอบไปด้วยโปรตีนเชิงซ้อนที่มีแมงกานีสเป็นองค์ประกอบ (รูปที่ 2.20)

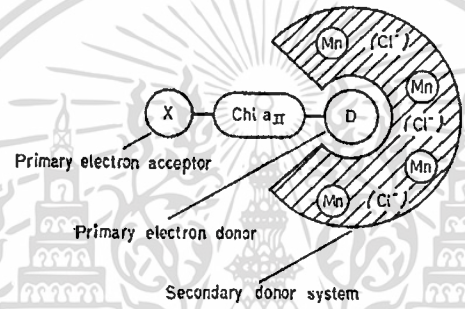


รูปที่ 2.18 โครงสร้างของ CCCP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



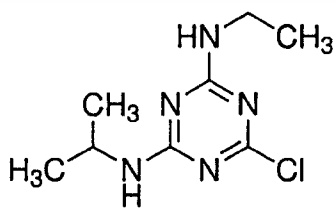
รูปที่ 2.19 การขนส่งอิเล็กตรอนโดยการแตกตัวของน้ำ (Renger 1970)



รูปที่ 2.20 โครงสร้างของ water splitting enzyme system Y เป็นโปรตีนเชิงซ้อนที่มีองค์ประกอบของแมงกานีส (Renger 1970)

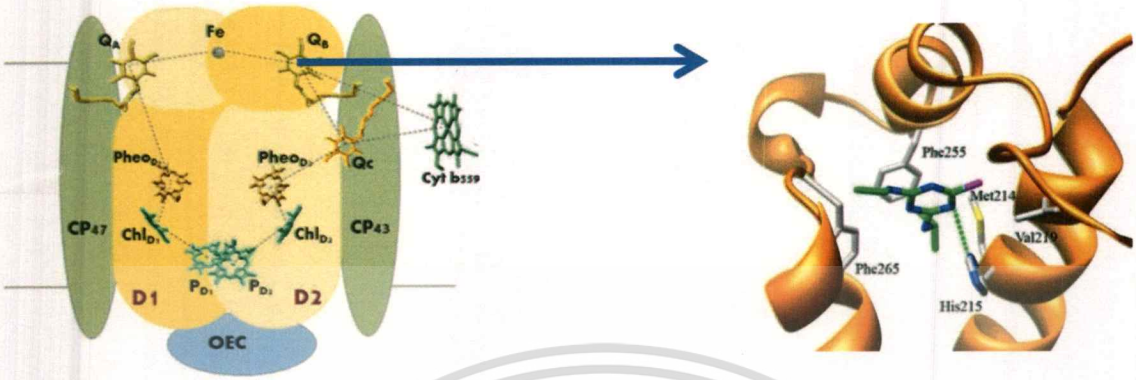
3. อะทราซีน (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine, Atrazine)

อะทราซีนมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.21 เป็นสารยับยั้งการสังเคราะห์แสง โดยไปขัดขวางการขนส่งอิเล็กตรอนในระบบแสงสอง (รูปที่ 2.22) โดยจะจับกับโปรตีนในพลาสโตควิโนน (Plastoquinone-binding protein) ซึ่งจะขัดขวางการส่งอิเล็กตรอนของไซโตโครมบี 6 เอฟคอมเพล็กซ์ (Cytochrome *b6f* complex) จึงทำให้ระบบแสงไม่ทำงาน (Bérard และ Pelte 1999) การแตกตัวของน้ำไม่เกิดขึ้น การตอบสนองของสาหร่ายต่ออะทราซีนจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ ระยะเวลา และสายพันธุ์ของสาหร่าย



รูปที่ 2.21 โครสร้างของอะทราซีน

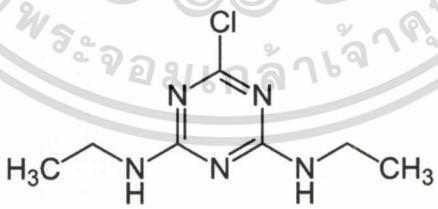
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.22 ปฏิกิริยาระหว่างอะทราซีนและโปรตีน D1 ในระบบแสงสอง

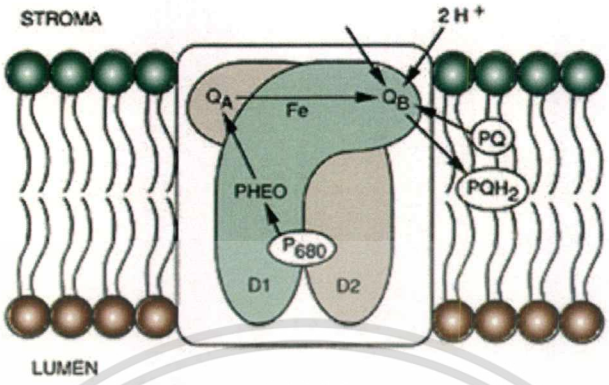
4. ซิมาซีน (6-Chloro-N,N'-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine, Simazine)

ซิมาซีน (Simazine) เป็นสารยับยั้งชนิดหนึ่งในระบบแสงสอง มีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.23 ในศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center) ของระบบแสงสองจะมีองค์ประกอบของโปรตีน D1 และ D2 ซึ่งมีตัวรับอิเล็กตรอนชนิดต่างๆ อยู่รวมกับโปรตีน ที่โปรตีน D1 จะมีองค์ประกอบของเหล็กและตัวรับอิเล็กตรอน คือ ฟีโอไฟทิน (PHEO) และ ควิโนน บี (Q_B) ส่วนโปรตีน D2 จะมี ควิโนน เอ (Q_A) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (รูปที่ 2.24) ในโปรตีน D1 ซิมาซีนจับกับบริเวณจับจำเพาะ (binding site) ของ ควิโนน บี (Q_B) ซึ่งจะทำให้อิเล็กตรอนถูกขัดขวางการส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน ระบบแสงสองจึงไม่สามารถทำงานได้ (O'neal และ Lembi 1983) มีรายงานการศึกษาพบว่าซิมาซีนมีการตอบสนองต่อไซยาโนแบคทีเรียมากที่สุด



รูปที่ 2.23 โครงสร้างของซิมาซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.24 องค์ประกอบของโปรตีน D1 และ D2 และบริเวณที่ซิมาซีนเข้าจับ (https://www.btny.purdue.edu/WeedScience/MOA/Photosynthetic_Inhibitors/text.html)

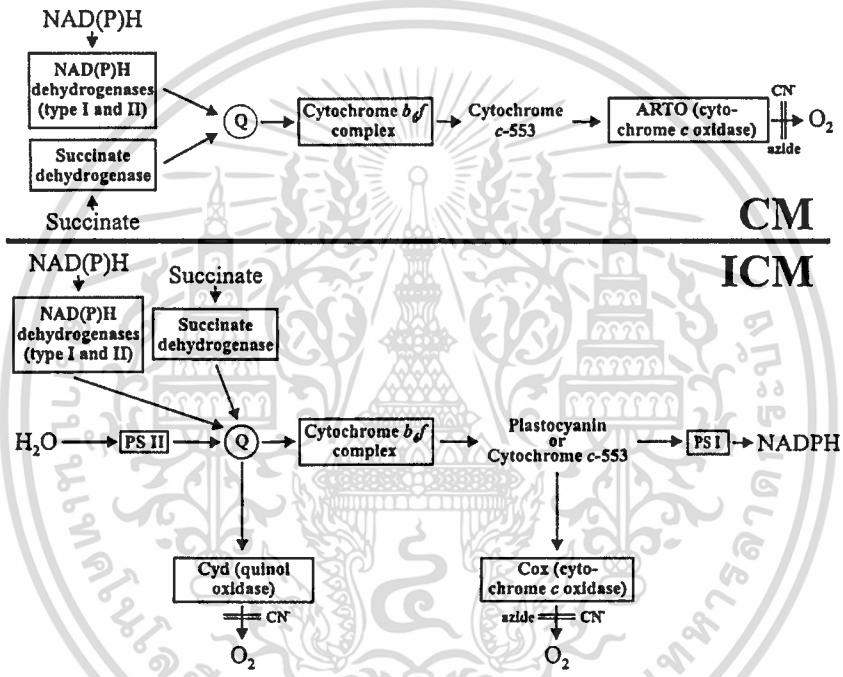
2.8.2 สารยับยั้งกระบวนการหายใจ

1. โพแทสเซียมไซยาไนด์ (Potassium cyanide, KCN) และโซเดียมเอไซด์ (Sodium azide, NaN_3)

โพแทสเซียมไซยาไนด์สามารถยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของกระบวนการหายใจ โดยยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของควินอลออกซิเดส (Quinol oxidase) และไซโตโครม ซี ออกซิเดส (Cytochrome c oxidase) ให้กับออกซิเจน ส่วนโซเดียมเอไซด์จะยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากไซโตโครม ซี ออกซิเดส ให้กับน้ำ ในไซยาโนแบคทีเรีย องค์ประกอบต่างๆ ของกระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการหายใจจะอยู่บริเวณใกล้เคียงกันบนเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ (Thylakoid หรือ Intracytoplasmic membrane, ICM) ส่วนในไซโตพลาสมิคเมมเบรน (Cytoplasmic membrane, CM) จะเพียงมีองค์ประกอบของกระบวนการหายใจ ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไซโตพลาสมิคเมมเบรน NAH(P)H จะถ่ายทอดอิเล็คตรอนให้กับ NAD(P)H dehydrogenase ส่วนซักซิเนต (Succinate) จะถ่ายทอดอิเล็ตรอนให้กับซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส (Succinate dedydrogenase) จากนั้น อิเล็กตรอนจากทั้ง 2 คอมเพล็กซ์จะถูกส่งไปยังพลาสโตควิโนน และจะส่งอิเล็กตรอนให้กับออกซิเจนซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย โดยจะส่งผ่านไซโตโครม บี6เอฟ คอมเพล็กซ์ (Cytrochrome *b6f* complex) และ ไซโตรโครม ซี ออกซิเดส (Cytrochrome c oxidase) โพแทสเซียมไซยาไนด์และโซเดียมเอไซด์สามารถยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากไซโตรโครมซีออกซิเดสสู่ออกซิเจนได้ (รูปที่ 2.25)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนเยื่อไทลาคอยด์ พลาสโตควิโนนจะรับอิเล็กตรอนที่ถ่ายทอดมาจาก NAD(P)H ดีไฮโดรจีเนส ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส และระบบแสงสอง จากนั้น จะส่งอิเล็กตรอนให้กับออกซิเจนโดยผ่านควินอลออกซิเดส นอกจากนั้น อิเล็กตรอนยังสามารถถูกส่งไปยังออกซิเจนโดยผ่านไซโตโครม บี6เอฟ คอมเพล็กซ์ พลาสโตไซยานิน ไซโตโครม ซี-553 (Cytochrome c-553) และ ไซโตโครม ซี ออกซิเดส และยังถูกนำไปสร้าง NADPH โดยผ่านระบบแสงหนึ่งอีกด้วย โพแทสเซียมไซยาไนด์สามารถยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากควินอลออกซิเดส และไซโตรโครม ซี ออกซิเดสสู่ออกซิเจนได้ ส่วนโซเดียมเอไซด์ ยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากไซโตโครม ซี ออกซิเดสสู่ออกซิเจนเท่านั้น (รูปที่ 2.25)

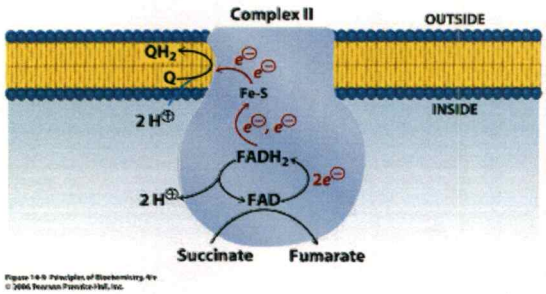


รูปที่ 2.25 การยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของโพแทสเซียมไซยาไนด์ และโซเดียมเอไซด์ในกระบวนการหายใจในไซยาโนแบคทีเรีย (Pils และ Schmetterer 2001)

2. มาโลเนต (Malonate)

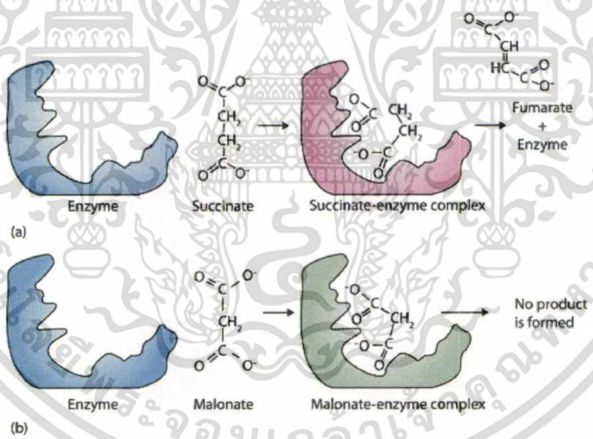
มาโลเนตเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibitor) ของเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส (Succinate dehydrogenase) ในกระบวนการหายใจจะมีเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส หรือ complex II อยู่บนเมมเบรน โดยเอนไซม์จะทำปฏิกิริยาเปลี่ยนซักซิเนต (Succinate) ไปเป็นฟูมาเรต (Fumarate) และมีการรีดิวซ์ FAD ให้เป็น $FADH_2$ (รูปที่ 2.26) (Peschek และคณะ 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.26 โครงสร้างและปฏิกิริยาของเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส
(http://www.studydroid.com/index.php?page=viewPack&packId=128877)

มาโลเนตเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันที่แรง (Strong competitive inhibitor) ของเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส โดยมาโลเนตจะสามารถเข้าแย่งจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส แทนซักซิเนตได้ เมื่อเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนสจับกับมาโลเนต จะกลายเป็นมาโลเนตเอนไซม์คอมเพล็กซ์ ดังนั้นเอนไซม์จึงไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนซักซิเนตไปเป็นฟูมาเรตได้ (รูปที่ 2.27)



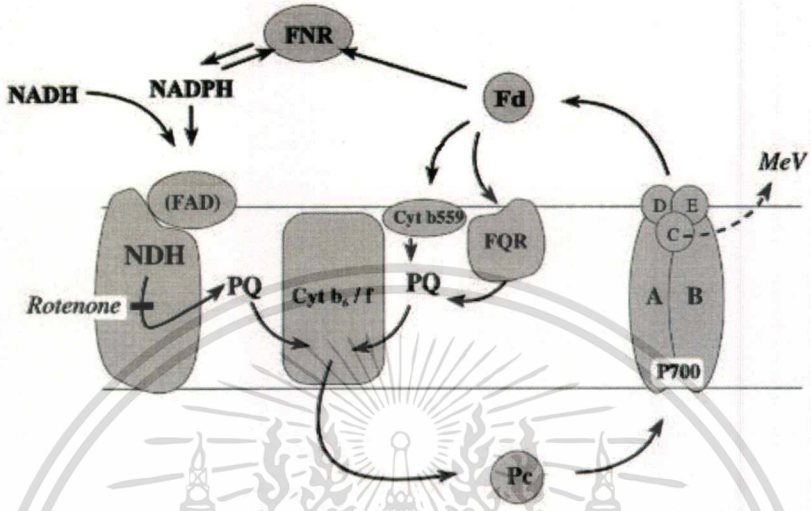
รูปที่ 2.27 การทำงานของเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส เมื่อเอนไซม์จับกับซักซิเนตจะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นฟูมาเรต (a) แต่เมื่อเอนไซม์จับกับมาโลเนตซึ่งเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันจะไม่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น (b)
(http://2012books.lardbucket.org/books/introduction-to-chemistry-general-organic-and-biological/s21-08-enzyme-inhibition.html)

3. โรทีโนน (Rotenone)

โรทีโนนจะขัดขวางการส่งอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ดีไฮโดรจีเนส สู่พลาสโตควิโนนในกระบวนการหายใจ NAD(P)H จะถ่ายทอดอิเล็ตรอนให้กับ NAD(P)H ดีไฮโดรจีเนส และจะส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน พลาส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โตไซยานิน และ ระบบแสงหนึ่ง โรทีโนนจะขัดขวางการส่งอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ดีไฮโดรจีเนส เข้าสู่พลาสโตควิโนน (รูปที่ 2.28)

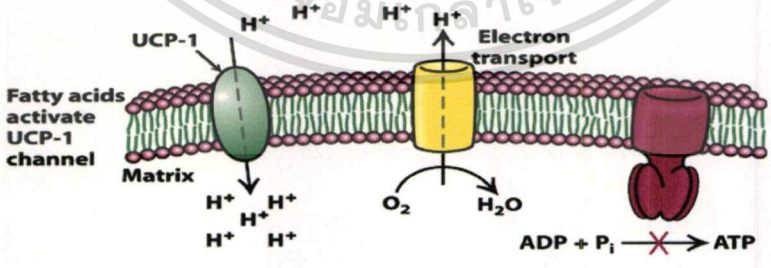


รูปที่ 2.28 การขัดขวางการส่งอิเล็กตรอนของโรทีโนนจาก NAD(P)H สู่พลาสโตควิโนน (Teicher และ Scheller, 1998)

2.8.3 สารยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน (Uncoupling oxidative phosphorylation)

1. สารซีซีซีพี (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine, CCCP)

นอกจากสาร CCCP จะเป็นสารยับยั้งในระบบแสงสองแล้ว ยังเป็นสารยับยั้งในปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน (Oxidative phosphorylation) อีกด้วย CCCP สามารถทำลายโปรตอนโมทีฟโดยการจับกับโปรตอน และสามารถผ่านเข้าออกชั้นของเยื่อหุ้มเมมเบรนได้โดยไม่ต้องผ่านเอนไซม์ ATP synthase จึงส่งผลให้ยั้บยั้งการสร้าง ATP (รูปที่ 2.29) (Hopfer และคณะ 1968)

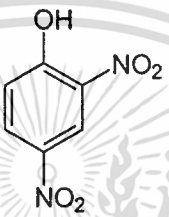


รูปที่ 2.29 การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน (http://www.namrata.co/inhibition-of-oxidative-phosphorylation/)

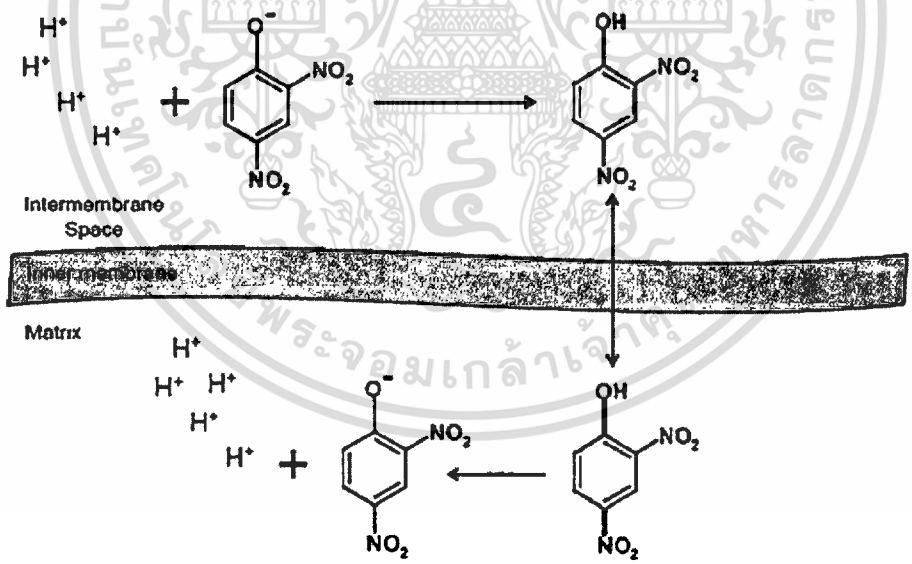
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารไดไนโตรฟีนอล (2,4-dinitrophenol, DNP)

ไดไนโตรฟีนอลมีโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.30 สามารถยับยั้งการสร้าง ATP จากการปั๊มโปรตอนผ่าน ATP synthase ในกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหายใจจะมีการนำโปรตอนผ่านเข้าออกเมมเบรนทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของโปรตอน (Proton gradient) ในฝั่งของเมทริกซ์และอินเตอร์เมมเบรนสเปซ (intermembrane space) โดยฝั่งที่มีความเข้มข้นของโปรตอนมากกว่าโปรตอนจะถูกปั๊มผ่านเมมเบรนโดยผ่าน ATP synthase พร้อมกับสร้าง ATP แต่สารไดไนโตรฟีนอลมีความสามารถเป็นตัวมารับโปรตอน และสามารถผ่านเข้าออกเมมเบรนได้โดยไม่ต้องผ่านเอนไซม์ ATP synthase ดังนั้น จึงไม่ทำให้เกิดการปั๊มโปรตอนผ่าน ATP synthase ส่งผลให้ไม่เกิดการสร้าง ATP (รูปที่ 2.31) (Heytler, 1979)



รูปที่ 2.30 โครงสร้างของไดไนโตรฟีนอล



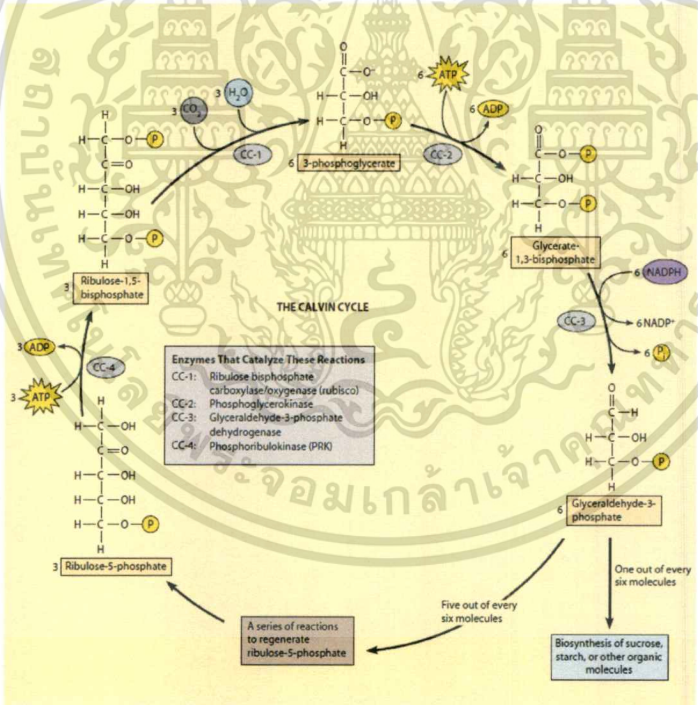
รูปที่ 2.31 การนำโปรตอนผ่านเข้าออกเมมเบรนของสารไดไนโตรฟีนอล
(https://quizlet.com/2934325/etc-flash-cards/)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.4 สารยับยั้งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

1. ดีแอล-กลีเซอราลดีไฮด์ (DL-glyceraldehyde)

กลีเซอราลดีไฮด์สามารถขัดขวางอิเล็กตรอนที่จะนำเข้ามาสู่กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์แสดงดังรูปที่ 2.32 โดยกลีเซอรอลดีไฮด์เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันของเอนไซม์ฟอสโฟไรบูโลไคเนส (Phosphoribulokinase) ซึ่งจะทำให้ไรบูโบส-5-ฟอสเฟต (Ribulose-5-phosphate) ไม่สามารถถูกเปลี่ยนเป็นไรบูโบส-1,5-ฟอสเฟต (Ribulose-1,5-phosphate) ได้ ในกระบวนการตรึงคารบอนไดออกไซด์นั้น ไรบูโบส-1,5-ฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารคาร์บอน 5 อะตอมจะถูกทำปฏิกิริยาควบแน่นกับคาร์บอนไดออกไซด์ ได้เป็นสารที่มีคาร์บอน 6 อะตอมซึ่งเป็นสารที่ไม่เสถียร หลังจากนั้น จะแตกตัวเป็น 3-ฟอสโฟกลีเซอเรต (3-Phosphoglycerate) ด้วยเอนไซม์รูบิสโก้ (RuBisco) ซึ่งเป็นสารที่มีคาร์บอน 3 อะตอม และจะเข้าทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปของกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อไรโบส-5-ฟอสเฟต ไม่สามารถถูกเปลี่ยนเป็นไรบูโบส-1,5-ฟอสเฟต ได้กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จึงไม่เกิดขึ้น (Stokes และ Walker 1972)

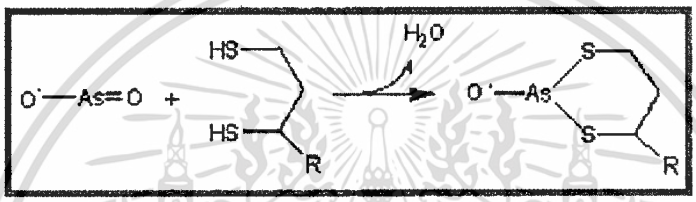


รูปที่ 2.32 กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์
(http://reasonandscience.heavenforum.org/t2164-the-calvin-benson-cycle)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.5 สารยับยั้งวัฏจักรเครบส์ โซเดียมอาร์ซีเนต (Sodium arsenate, $NaAsO_2$) และโพแทสเซียมอาร์ซีเนต (Potassium arsenate, $KAsO_2$)

โซเดียมอาร์ซีเนตและโพแทสเซียมอาร์ซีเนตเป็นสารพิษประเภทสารหนู สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวทดีไฮโดรจีเนส (Pyruvate dehydrogenase) (Tretter และ Vizi 2000) สารประกอบประเภทอาร์ซีเนตสามารถจับกับสามารถจับกับหมู่ซัลไฟล์ดิล (-SH group) ของเอนไซม์ไพรูเวทดีไฮโดรจีเนส (รูปที่ 2.33) ทำให้เอนไซม์ไพรูเวทดีไฮโดรจีเนสไม่สามารถเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นอะซีติล โคเอ (Acetyl-CoA) อะซีติล โคเอ จึงไม่สามารถทำปฏิกิริยาควบแน่นกับออกซาโลอะซีเตท (Oxaloacetate) ในวัฏจักรเครปส์ได้



รูปที่ 2.33 การจับกันของสารประกอบอาร์ซีเนตกับเอนไซม์ไพรูเวทดีไฮโดรจีเนส (https://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/krebs.htm)

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Spiller และคณะ 1978 ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพและความเสถียรของการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc muscorum* โดยใช้สารยับยั้งระบบแสงสอง พบว่า เซลล์ที่บ่มด้วยสารยับยั้ง DCMU และอะทราซีน สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้บ่มด้วยสารยับยั้ง

Guan และคณะ 2004 ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนโดยสารยับยั้งในสาหร่ายสีเขียว *Platymonas subcordiformis* พบว่า เซลล์ที่บ่มใน CCCP สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาวะที่มีแสง โดยเซลล์ที่บ่มใน CCCP ที่มีความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นถึง 240 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้บ่มใน CCCP

Ran และคณะ 2006 ศึกษาบทบาทของ CCCP ต่อการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนในที่มีแสงของสาหร่ายสีเขียว *Platymonas subcordiformis* โดยการเติม CCCP ลงไปหลังจากบ่มเซลล์ในที่มืด เป็นเวลา 32 ชั่วโมง พบว่า CCCP ส่งผลให้เซลล์สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากเกิดการยับยั้งถึง 3 กลไก คือ การยับยั้งการแตกตัวของน้ำ การยับยั้งการหายใจในไมโตคอนเดรีย และการปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน

Guo และคณะ 2008 ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Platymonas subcordiformis* ที่บ่มใน CCCP และในสภาวะที่พ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในถังหมัก พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ที่บ่มด้วย CCCP ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน และเพิ่มการสะสมแป้งภายในเซลล์ และเซลล์ยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 5 รอบการผลิต

Burrows และคณะ 2011 ศึกษาผลของสารยับยั้งต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 พบว่า โพแทสเซียมไซยาไนด์ที่ความเข้มข้น 9.4 มิลลิโมลาร์ และมาโลเนตที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ทำให้เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 30 เท่า ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร EHB-1 ที่ปรับสูตรไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และคาร์บอน ที่ได้ศึกษาก่อนหน้านี้

Zhang และคณะ 2012 ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Platymonas helgolandica* var. tsingtaoensis ที่บ่มใน CCCP พบว่า การเติม CCCP ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นถึง 260 เท่า ระบบแสงสองของสาหร่ายถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อบ่มด้วย CCCP การผลิตไฮโดรเจนอิเล็กตรอนจะถูกส่งให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส โดยแหล่งอิเล็กตรอนได้จากการย่อยสลายสับสเตรทภายในเซลล์สาหร่ายที่บ่มด้วย CCCP

Khetkon และคณะ 2012 ศึกษากระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ไนโตรจีเนส และเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 พบว่า เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหาร $BG11_0$ ที่เสริมด้วย โพแทสเซียมไซยาไนด์ โรทีโนน DCMU และ กลีเซอราลดีไฮด์ ภายใต้สภาวะที่มีแสงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียสามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้ โดยโพแทสเซียมไซยาไนด์ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ในอาหาร $BG11_0$ สามารถทำให้เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้น 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม โดยที่การบ่มด้วยสารยับยั้งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและการแสดงออกของยีน *nifD* เพิ่มขึ้น

Chen และคณะ 2013 ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* โดยบ่มด้วย DCMU พบว่า การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 3.6 เท่า เมื่อทำการบ่มเซลล์ใน DCMU ที่มีความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ในก๊าซอาร์กอน

Yang และคณะ 2014 ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ที่บ่มด้วย CCCP พบว่า การเติม CCCP ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์สาหร่ายเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 13 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์สาหร่ายที่ไม่ได้บ่มด้วย CCCP โดย CCCP สามารถยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองภายใต้สภาวะที่มีแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 เสริมด้วย Turk Island salt solution (ภาคผนวก ก)

3.2.1.1 กรดบอริก (H_3BO_3) (Merck, Germany)

3.2.1.2 กรดซิตริก (Citric Acid) (Anlar, England)

3.2.1.3 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) (Carlo Erba, Italy)

3.2.1.4 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) (Carlo Erba, Italy)

3.2.1.5 โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2.6H_2O$) (Ajex, Australia)

3.2.1.6 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) (Fluka, Switzerland)

3.2.1.7 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Carlo Erba, Italy)

3.2.1.8 โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) (Carlo Erba, Italy)

3.2.1.9 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4.2H_2O$) (British Drug Houses, England)

3.2.1.10 ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA) (Promega, USA)

3.2.1.11 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) (Merck, Germany)

3.2.1.12 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Carlo Erba, Italy)

3.2.1.13 เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4$ citrate) (British Drug Houses, England)

3.2.1.14 แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2.6H_2O$) (Carlo Erba, Italy)

3.2.1.15 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) (Carlo Erba, Italy)

3.2.1.16 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) (Ajex, Australia)

3.2.2 สารยับยั้ง

3.2.2.1 ไดยูโรน หรือ ดีซีเอ็มยู (DCMU) ($C_9H_{10}Cl_2N_2O$) (Sigma, Israel)

3.2.2.2 คาร์บอนิลไซยาไนด์คลอโรฟีนิลไฮดราโซน หรือ ซีซีซีพี (CCCP) ($C_9H_5ClN_4$) (Sigma, USA)

3.2.2.3 ซิมาซีน ($C_7H_{12}ClN_5$) (Sigma, Germany)

3.2.2.4 อะทราซีน ($C_8H_4ClN_5$) (Sigma, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.5 โรทีโนน ($C_{23}H_{22}O_6$) (Sigma, China)

3.2.2.6 ไดไนโตรฟีนอล ($C_6H_4N_2O_3$) (Sigma, Spain)

3.2.2.7 มาโลนิกแอซิด ($C_3H_4O_4$) (Sigma, China)

3.2.2.8 โซเดียมอาร์ซิเนตไดเบสิกเฮปตะไฮเดรต ($HAsNa_2O_4.7H_2O$) (Sigma India)

3.2.2.9 โซเดียมเอไซด์ (N_3Na) (Sigma, Germany)

3.2.2.10 เอ็นฟอสโฟโนเมทิลไกลซีน ($C_3H_8NO_5P$) (Sigma, USA)

3.2.2.11 ดีแอล-กลีเซอราลดีไฮด์ ($C_3H_4O_4$) (Sigma, Switzerland)

3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

3.2.3.1 เมทานอล (CH_3OH) (Analytical grade, Univar, Australia)

3.2.4 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

3.2.4.1 ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอน (Thailand Industrial Gas Co. Ltd., Thailand)

3.2.4.2 ก๊าซอาร์กอน (ความบริสุทธิ์ 99.999%) (Thailand Industrial Gas Co. Ltd., Thailand)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)

3.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Scientific Promotion, Binder, Thailand)

3.3.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)

3.3.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)

3.3.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)

3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortech Z38K, Germany)

3.3.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)

3.3.8 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)

3.3.9 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)

3.3.10 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)

3.3.11 ไมโครปิเปต (Micropipette)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.12 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)

3.3.13 กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)

3.3.14 ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด (National Scientific, USA)

3.3.15 เข็มฉีดก๊าซ (Scientific Glass Engineering, Australia)

3.4 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution พีเอช 7.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วรูปชมพู่หรือฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 จากการวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำฟลาสก์ไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์

3.5 วิธีการหาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ

นำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก เติมเมทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร นำผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ จากสูตร

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ} = 12.7 \times A_{665} \times 10$$

3.6 วิธีการนับจำนวนเซลล์

นำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาใส่ลงในฮีมาไซโตมิเตอร์ และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และนำไปนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.7 วิธีการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ทำการล้างเซลล์และกระจายเซลล์ด้วยอาหาร $BG11_0$ ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ซึ่งเป็นอาหารที่ขาดไนโตรเจน จากนั้น นำเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด แล้วพ่นก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อครบเวลา ดูดก๊าซด้านบน (Head space) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ปริมาณก๊าซด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนและออกซิเจนแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-เทอร์มอลคอนดักติวิตี ดีเทคเตอร์ [Gas Chromatograph–Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)]

Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Column	Packed SS Column 2m x 4mm OD x 3mm ID p/w Molecular sieve 5 ^{0}A 60/80 mesh
Temperature Program	Injector temperature : 100 ^{o}C Column temperature: 50 ^{o}C Detector temperature: 100 ^{o}C
Argon Carrier gas	Flow rate 20 ml/min (99.999% purity)

3.8 วิธีการคัดเลือกชนิดของสารยับยั้งเพื่อใช้ในการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์และกระจายเซลล์ด้วยอาหาร $BG11_0$ ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ซึ่งเป็นอาหารที่ขาดไนโตรเจน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำฟลาสก์ไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์และกระจายเซลล์ด้วยอาหาร $BG11_0$ ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution จากนั้น นำเซลล์ 5 มิลลิลิตร ไปใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร และเติมสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ สารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงสอง ได้แก่ DCMU ความเข้มข้น 0, 0.05, 5, 50, 125 และ 250 ไมโครโมลาร์ CCCP ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1 และ 5 ไมโครโมลาร์ ซิมาซีน ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.5 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ อะทราซีน ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.5, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ และไกลโฟเสต ความเข้มข้น 0, 0.03, 0.3, 3, 30, 150 และ 300 ไมโครโมลาร์ สารที่ยับยั้งกระบวนการหายใจ ได้แก่ โรทีโนน ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ มาโลนิกแอซิด ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ และโซเดียมเอไซด์ ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 1, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ สารยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน ได้แก่ ไดไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ สารยับยั้งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ได้แก่ ดีแอล-กลีเซอราลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 5, 10, 50 และ 250 ไมโครโมลาร์ และสารยับยั้งวัฏจักรเครบส์ ได้แก่ โซเดียมอาร์ซิเนต ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ปิดฝา นำไปบ่มในที่มืดหรือที่สว่าง โดยให้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้น พ่นด้วยก๊าซอาร์กอนและบ่มอีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในที่มืดหรือที่สว่าง เมื่อครบเวลา ดูดก๊าซด้านบน (Head space) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.9 วิธีการศึกษาความเข้มข้นของสารยับยั้งต่อจำนวนเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณไฮโดรเจน และปริมาณออกซิเจน

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* และเตรียมสารละลายเซลล์ตามวิธีการในหัวข้อที่ 3.9 จากนั้น นำเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร และเติมสารยับยั้งที่คัดเลือกที่ความเข้มข้นต่างๆ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่สว่างภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการเก็บกี่ยวเซลล์ที่ 2, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดจำนวนเซลล์ ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ เอ ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซออกซิเจน

3.10 วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส

เพาะเลี้ยงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์และกระจายเซลล์ด้วยอาหาร $BG11_0$ ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้น นำฟลาสก์ไปเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มีแสง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างเซลล์และกระจายเซลล์ด้วยอาหาร $BG11_0$ ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution นำเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร และเติมสารยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทั้งในที่สว่างและในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น พ่นด้วยก๊าซอาร์กอนและบ่มต่ออีก เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืดและที่สว่าง เมื่อบ่มครบเวลา นำเซลล์มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส โดยนำเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ลงในขวดแก้วที่พ่นด้วยก๊าซอาร์กอนที่มีบัฟเฟอร์ที่มีสารละลายเมทิลไวโอโลเจน ความเข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครโมลาร์ และ โซเดียมไดไทโอไนต์ ความเข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครโมลาร์ บ่มเป็นเวลา 15 นาที และนำไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

4.1.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งระบบแสงสองต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ระบบแสงสอง ได้แก่ DCMU, CCCP, ซิมาซีน, อะทราซีน และไกลโฟเสต ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* โดยทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยง ทำการล้างเซลล์ และกระจายเซลล์ด้วยอาหาร $BG11_0$ ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่า และบ่มในที่มีแสง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยง และกระจายเซลล์ในอาหาร $BG11_0$ ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution นำสารละลายเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร และเติมสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในขวด หลังจากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และพ่นด้วยก๊าซอาร์กอน และบ่มต่อไปอีก เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในที่มืดและที่สว่าง เมื่อครบกำหนด นำก๊าซมาวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากการทดลองพบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่บ่มภายใต้สภาวะมืดสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าเซลล์ที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีแสง ทั้งในสภาวะที่เติมและไม่มีการเติมสารยับยั้ง (รูปที่ 4.1) นอกจากนี้ ยังพบว่า เซลล์ *A. halophytica* ผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณน้อยมาก หรือแทบจะไม่ผลิตไฮโดรเจนเลย ภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากการเติมสารยับยั้ง (รูปที่ 4.1) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ออกซิเจนที่ได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะที่มีแสงสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณลดลง ในขณะที่การเติมสารยับยั้งของระบบแสงสองทุกชนิด จะทำให้เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะที่มีแสง (รูปที่ 4.1) ทั้งนี้เนื่องมาจาก สารยับยั้งต่างๆ จะไปขัดขวางกระบวนการแตกตัวของน้ำในระบบการสังเคราะห์แสง ทำให้ไม่เกิดการผลิตออกซิเจน ซึ่งเป็นตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้น

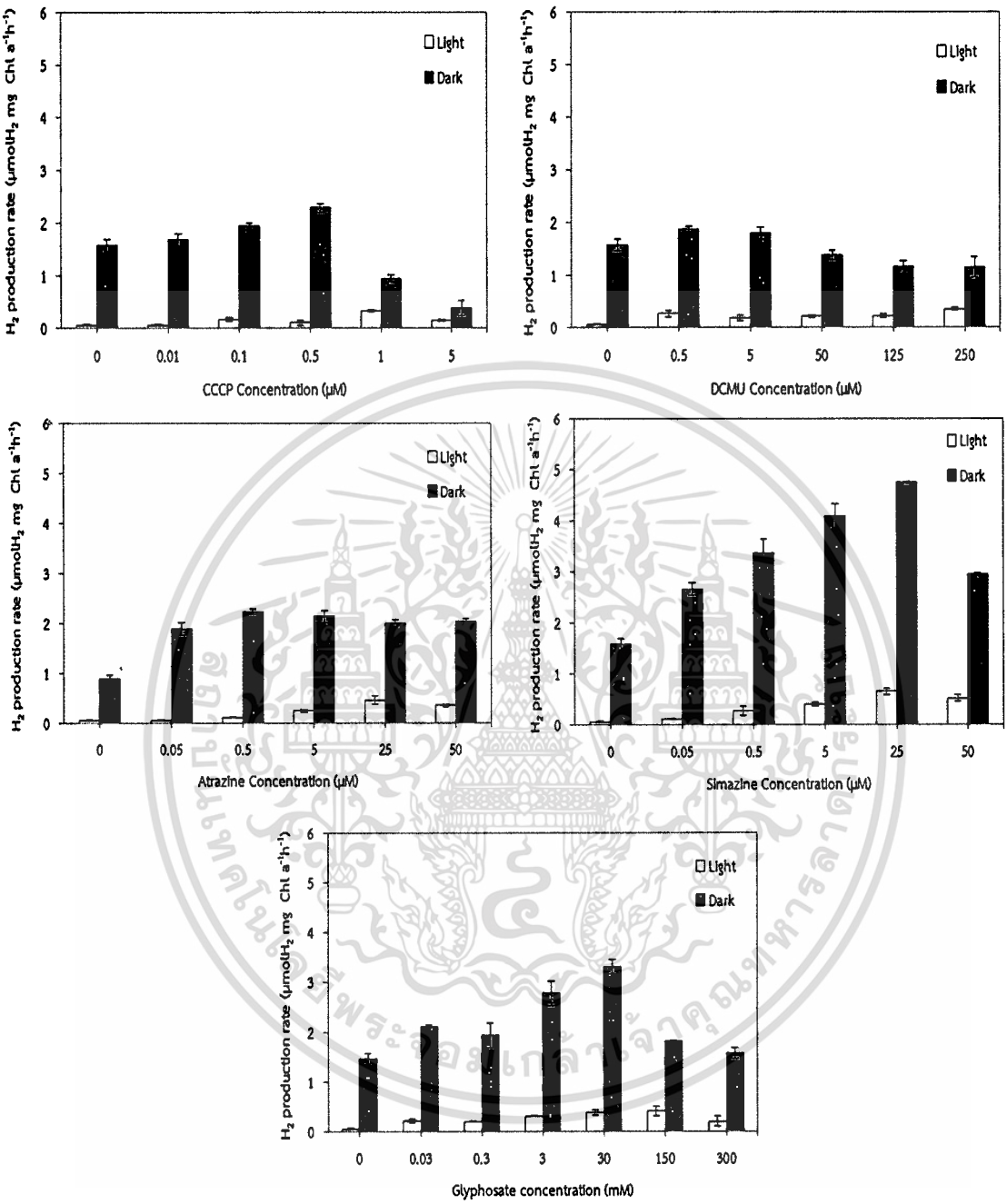
จากการเปรียบเทียบปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อมีการเติมสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่ปราศจากแสง พบว่า *A. halophytica* สามารถผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนได้สูงที่สุด ในเซลล์ที่เติมสารยับยั้งซิมาซีนที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 4.747 ± 0.019 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และสารยับยั้งที่ทำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงรองลงมา คือ ไกลโฟเสต โดยเซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 3.700 ± 0.085 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเติมไกลโฟเสตความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ ตามมาด้วยสารยับยั้ง CCCP เมื่อเติมสาร CCCP ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 2.285 ± 0.081 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามมาด้วยสารยับยั้งอะทราซีน เมื่อเติมสารอะทราซีนความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 2.232 ± 0.056 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และสุดท้ายคือ DCMU เมื่อเติมสาร DCMU ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 1.866 ± 0.116 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และที่ความเข้มข้นสูงกว่า 5 ไมโครโมลาร์ เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้ต่ำกว่าเซลล์ที่ไม่ได้บ่มด้วยสารยับยั้ง (รูปที่ 4.1)

จากการเปรียบเทียบปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อมีการเติมสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีแสง พบว่า *A. halophytica* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด ในเซลล์ที่มีการเติมสารยับยั้งซิมาซีนความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ โดยเซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.650 ± 0.062 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และสารยับยั้งที่ทำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้รองลงมาคือ อะทราซีน โดยเมื่อเติมอะทราซีนความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ เซลล์เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.461 ± 0.078 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามมาด้วย สารยับยั้งไกลโฟเสต โดยเมื่อเติมไกลโฟเสตความเข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ เซลล์เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.413 ± 0.104 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามมาด้วย สารยับยั้ง DCMU เมื่อเติม DCMU ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ เซลล์เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.352 ± 0.067 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และสุดท้าย เมื่อเติม CCCP ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เซลล์เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.247 ± 0.01 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงสอง ได้แก่ CCCP, DCMU, อะทราซีน, ซิมาซีน และไกลโฟเสต ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองทั้ง 5 ชนิด สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ได้ เนื่องมาจากสารเหล่านี้จะเข้าไปยับยั้งการทำงานของระบบแสงสอง เมื่อระบบแสงสอง ทำงานลดลง การผลิตออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำก็จะลดน้อยลงไปด้วย ซึ่งออกซิเจนจะไม่สามารถไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส ทำให้เอนไซม์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มมากขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Tetraselmis subcordiformis* โดยพบว่า เซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น เมื่อบ่มในสารยับยั้ง CCCP (Ji และคณะ 2011) และมีรายงานการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 12 ชั่วโมง เมื่อบ่มในสารยับยั้ง CCCP (Yang และคณะ 2014) นอกจากนี้ มีศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *Anadaena cylindrical* และพบว่า เซลล์สามารถเพิ่มการผลิตโฮโดรเจนได้ถึง 3.6 เท่า เมื่อบ่มด้วยสารยับยั้ง DCMU (Chen และคณะ 2013)

นอกจากนี้ ยังพบว่า เมื่อเติมสารยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองทั้ง 5 ชนิด ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สามารถผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงได้สูงกว่าภายใต้สภาวะที่มีแสง (รูปที่ 4.1) เนื่องมาจาก ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ส่วนใหญ่จะใช้อิเล็กตรอนที่ได้มาจากการย่อยสลายไกลโคเจนที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ และอิเล็กตรอนที่ได้นี้จะถูกนำไปส่งให้กับเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน ซึ่งอิเล็กตรอนที่ได้จากการสลายไกลโคเจนในสภาวะที่ไม่มีแสงจะมากกว่าอิเล็กตรอนที่ได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะที่มีแสง จึงส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงหรือที่มืดสูงกว่าภายใต้สภาวะที่มีแสง มีรายงานการศึกษาที่พบว่านอกจากสารยับยั้งเหล่านี้จะมีผลต่อระบบแสงสองแล้ว สารเหล่านี้ยังมีผลต่อกระบวนการอื่นๆ ในเซลล์อีกด้วย สารยับยั้ง CCCP สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน โดยยับยั้งการนำโปรตอนผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์ ผ่าน ATP synthase จึงทำให้ไม่เกิดการสร้าง ATP (Hopfer และคณะ 1968) นอกจากนี้ สารยับยั้งบางชนิดสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยจะไปทำลายกระบวนการแปลรหัสของโปรตีนอีกด้วย (Konstantinov และคณะ 1996) นอกจากสารยับยั้งซิมาซีนจะมีผลต่อระบบสังเคราะห์แสงโดยตรงแล้ว ยังมีผลต่อระบบการหายใจของเซลล์อีกด้วย (Metcalf และ Collin 1978) มีรายงานการศึกษาพบว่า อะทราซีนมีผลในการยับยั้งกระบวนการหายใจ การสังเคราะห์โปรตีน และการสังเคราะห์กรดไขมันในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella kessleri* (El-Sheekh และคณะ 1994) นอกจากนี้ ยังพบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria limnetica* ที่บ่มในไกลไฟเสต มีการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และสารฟลาโวนอยด์ลดลง (Salman และคณะ 2016) เมื่อกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ถูกยับยั้ง ส่งผลให้อิเล็กตรอนที่จะเข้าไปในกระบวนการ ถูกส่งไปสู่เอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส จึงทำให้การผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะมืดเพิ่มมากขึ้น

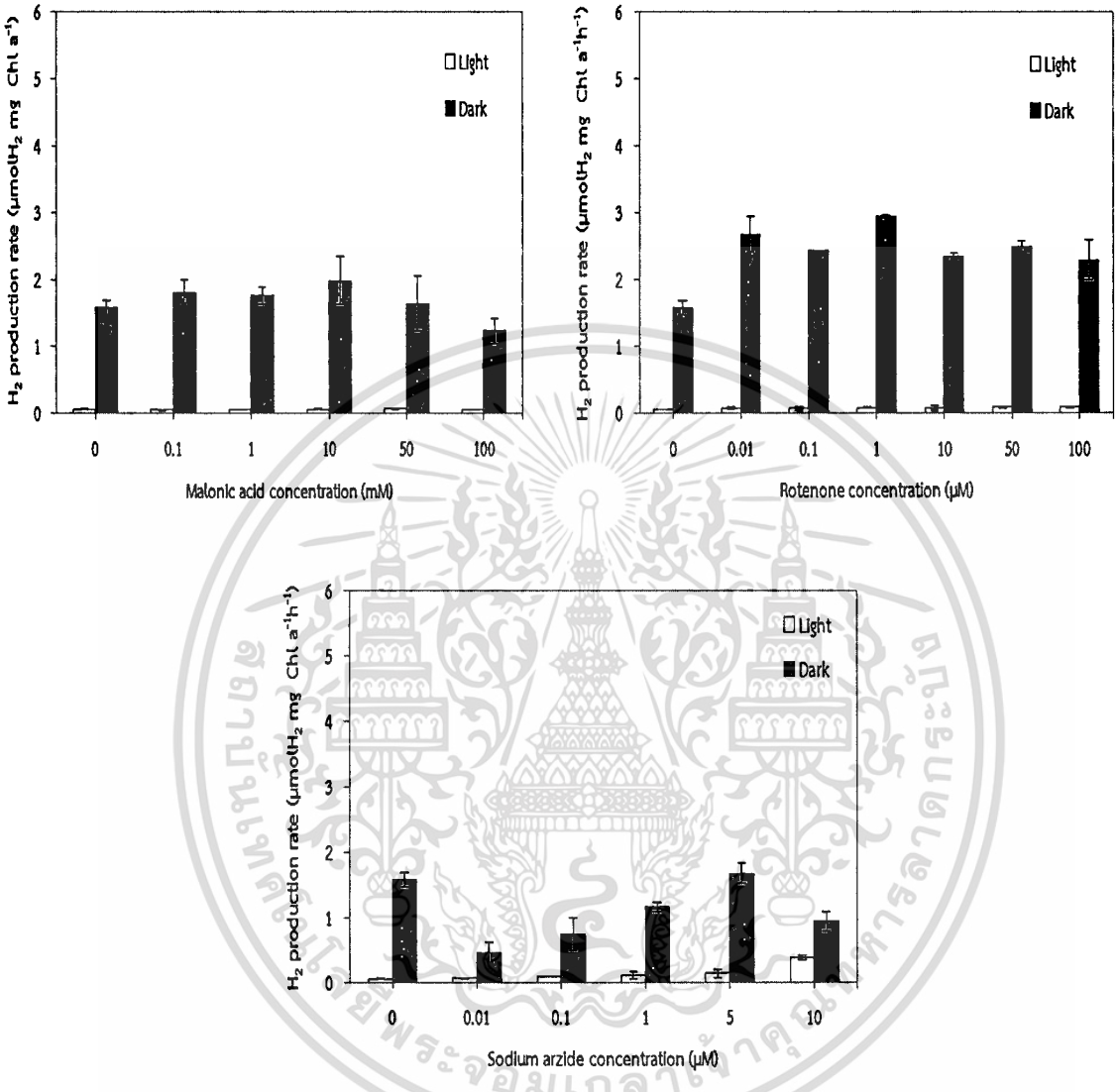
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งกระบวนการหายใจต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งกระบวนการหายใจทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ โรทีโนน มาโลนิกแอซิด และโซเดียมเอไซด์ ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* พบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด เมื่อบ่มเซลล์ในสารยับยั้งโรทีโนนที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ โดยเซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสงหรือในที่มืดเท่ากับ 2.949 ± 0.018 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.2) ในขณะที่เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจะไม่สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้ เมื่อบ่มในสารยับยั้งมาโลนิกแอซิดและโซเดียมเอไซด์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง ในขณะที่เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจะไม่สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้เช่นกัน เมื่อบ่มในสารยับยั้งโรทีโนนและมาโลนิกแอซิด ภายใต้สภาวะที่มีแสง (รูปที่ 4.2) ส่วนเซลล์ที่บ่มในโซเดียมเอไซด์ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีแสง จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้บ่มด้วยสารยับยั้ง (รูปที่ 4.2)

จากการทดลองพบว่า การใส่สารยับยั้งโรทีโนนทำให้การผลิตไฮโดรเจนในที่มืดสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากโรทีโนนจะขัดขวางการส่งอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ดีไฮโดรจีเนส เข้าสู่พลาสโตควิโนนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ (Teicher และ Scheller 1998) การยับยั้งการขนส่งอิเล็กรอนในกระบวนการการหายใจระดับเซลล์ด้วยสารยับยั้งนี้ทำให้ NAD(P)H ไม่สามารถถ่ายทอดอิเล็กตรอนเข้าสู่ลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนได้ NAD(P)H จึงเหลือมากพอที่จะนำไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนผ่านการทำงานของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 ที่พบว่า เซลล์สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้ เมื่อบ่มในสารยับยั้งโรทีโนน (Khetkorn และคณะ 2012) ส่วนสารยับยั้งมาโลนิกแอซิดและโซเดียมเอไซด์ไม่สามารถทำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด อาจจะเนื่องมาจากสารยับยั้งเหล่านี้มีผลต่อเซลล์มากจนเกินไป อาจทำให้เซลล์เกิดความเสียหายจนไม่สามารถนำไปผลิตไฮโดรเจนได้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ซึ่งพบว่า เซลล์สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 30 เท่า เมื่อบ่มในสารยับยั้งมาโลเนต (Burrows และคณะ 2011) นอกจากนี้ จากการทดลองยังพบว่า ภายใต้สภาวะที่มีแสง เซลล์ที่บ่มในสารยับยั้งไม่ผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นหรือหากเพิ่มขึ้น ก็เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.2) เนื่องจากเมื่อบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีแสง เซลล์จะมีการสังเคราะห์แสงและผลิตออกซิเจนเกิดขึ้น เมื่อกระบวนการหายใจถูกยับยั้ง จึงไม่มีการใช้ออกซิเจนในระบบ ส่งผลให้เซลล์มีปริมาณออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งออกซิเจนนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส จึงทำให้การผลิตไฮโดรเจนลงน้อยลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

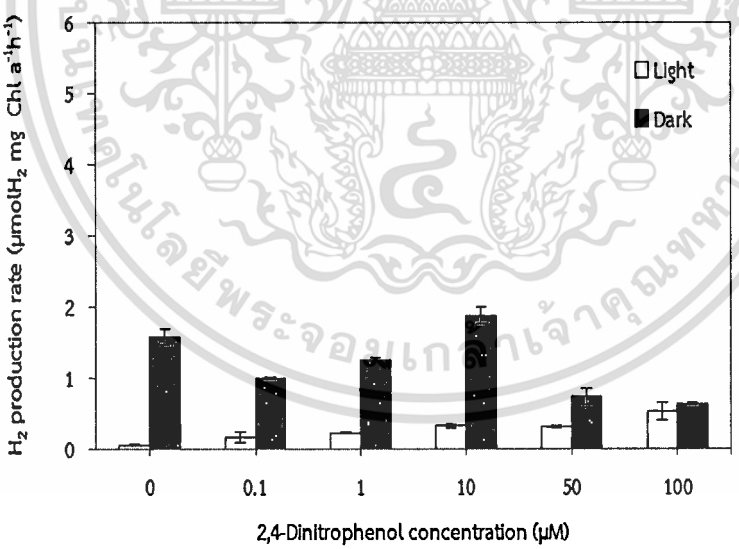


รูปที่ 4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งกระบวนการหายใจ ได้แก่ โรทีโนน มาโลนิกแอซิด และโซเดียมเอไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชันต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการศึกษาผลของสารยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน คือ 2,4-ไดไนโตรฟีนอล ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* พบว่า ภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสงหรือในที่มืด เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้บ่มในสารยับยั้งเล็กน้อย โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 1.881 ± 0.113 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเติมสารยับยั้งไดไนโตรฟีนอลความเข้มข้น 10 ไมโครไมลาร์ ส่วนภายใต้สภาวะที่มีแสง เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.527 ± 0.120 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเติมสารยับยั้งไดไนโตรฟีนอลความเข้มข้น 100 ไมโครไมลาร์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มในสารไดไนโตรฟีนอลความเข้มข้นอื่นๆ (รูปที่ 4.3) มีรายงานการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย เมื่อบ่มในไดไนโตรฟีนอล เนื่องมาจากไดไนโตรฟีนอลเข้าไปยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ ATP (Heytler, 1979) ดังนั้น กระบวนการต่างๆ ในเซลล์ จึงไม่มี ATP และ NAD(P)H เข้าไปใช้ในปฏิกิริยา NAD(P)H จึงเหลือมากพอที่จะนำไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสารยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน คือ ไดไนโตรฟีนอล ไม่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

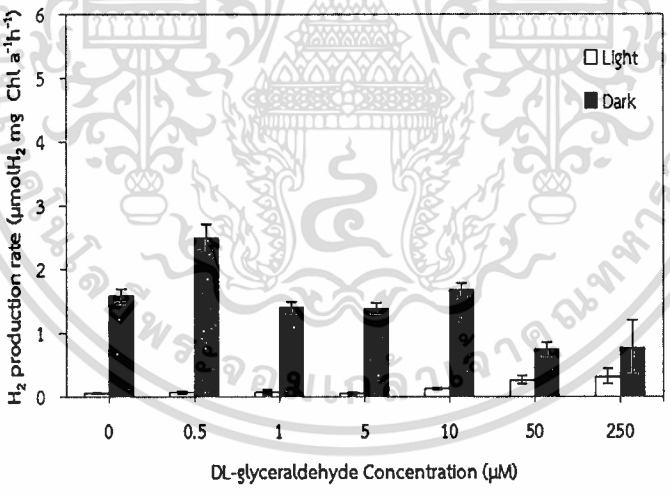


รูปที่ 4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชันไดไนโตรฟีนอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการศึกษาผลของสารยับยั้งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ดีแอล-กลีเซอราลดีไฮด์ ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* พบว่า ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 2.484 ± 0.216 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเติมสารยับยั้งดีแอล-กลีเซอราลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครไมลาร์ ส่วนภายใต้สภาวะที่มีแสง เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.429 ± 0.039 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเติมสารยับยั้งดีแอล-กลีเซอราลดีไฮด์ความเข้มข้น 250 ไมโครไมลาร์ (รูปที่ 4.4) การผลิตไฮโดรเจนของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อมีการบ่มเซลล์ในดีแอลกลีเซอราลดีไฮด์ อาจจะเนื่องมาจากกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ถูกยับยั้งโดยดีแอลกลีเซอราลดีไฮด์เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันของเอนไซม์ฟอสโฟไรบูโลไคเนส ซึ่งจะทำให้ไรบูโบส-5-ฟอสเฟต ไม่สามารถถูกเปลี่ยนเป็นไรบูโบส-1,5-ฟอสเฟตได้ (Stokes และ Walker 1972) อิเล็กตรอนที่ใช้ในกระบวนการจึงเปลี่ยนทิศทางมายังเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสเพื่อการผลิตไฮโดรเจน มีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* TISTR 8012 เมื่อบ่มในสารยับยั้งดีแอลกลีเซอราลดีไฮด์ พบว่าเซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้น (Khetkorn และคณะ 2012)

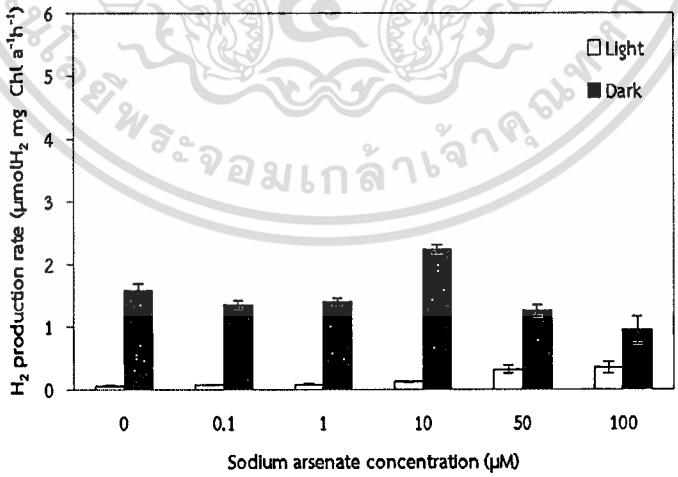


รูปที่ 4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ดีแอลกลีเซอราลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้งวัฏจักรเครบส์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการศึกษาผลของสารยับยั้งวัฏจักรเครบส์ คือ โซเดียมอาร์ซิเนต ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* พบว่า ภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง เซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด เมื่อบ่มในสารยับยั้งโซเดียมอาร์ซิเนตที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครไมลาร์ โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 2.243 ± 0.066 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ในขณะที่เมื่อบ่มเซลล์ในสารยับยั้งที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าหรือสูงกว่า 10 ไมโครไมลาร์ เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนไม่แตกต่างจากเซลล์ที่ไม่ได้บ่มในสารยับยั้ง และเมื่อบ่มในสารยับยั้งโซเดียมอาร์ซิเนตที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครไมลาร์ เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง (รูปที่ 4.5) ภายใต้สภาวะที่มีแสง ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้นเล็กน้อย เมื่อบ่มในโซเดียมอาร์ซิเนตที่มีความเข้มข้น 100 และ 50 ไมโครไมลาร์ โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.355 ± 0.090 และ 0.316 ± 0.066 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ การบ่มเซลล์ในโซเดียมอาร์ซิเนตสามารถทำให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น เนื่องมาจาก โซเดียมอาร์ซิเนตสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวทดีไฮโดรจีเนสได้ (Tretter และ Vizi 2000) โดยสารประกอบประเภทอาร์ซิเนตสามารถจับกับหมู่ซัลไฮดิลของเอนไซม์ไพรูเวทดีไฮโดรจีเนส อิเล็กตรอนที่ใช้ในกระบวนการจึงเปลี่ยนทิศทางมายังเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสเพื่อการผลิตไฮโดรเจน มีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* TISTR 8012 เมื่อบ่มในสารยับยั้งโซเดียมอาร์ซิเนต พบว่าเซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้น (Khetkorn และคณะ 2012)



รูปที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งวัฏจักรเครบส์โซเดียมอาร์ซิเนต ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

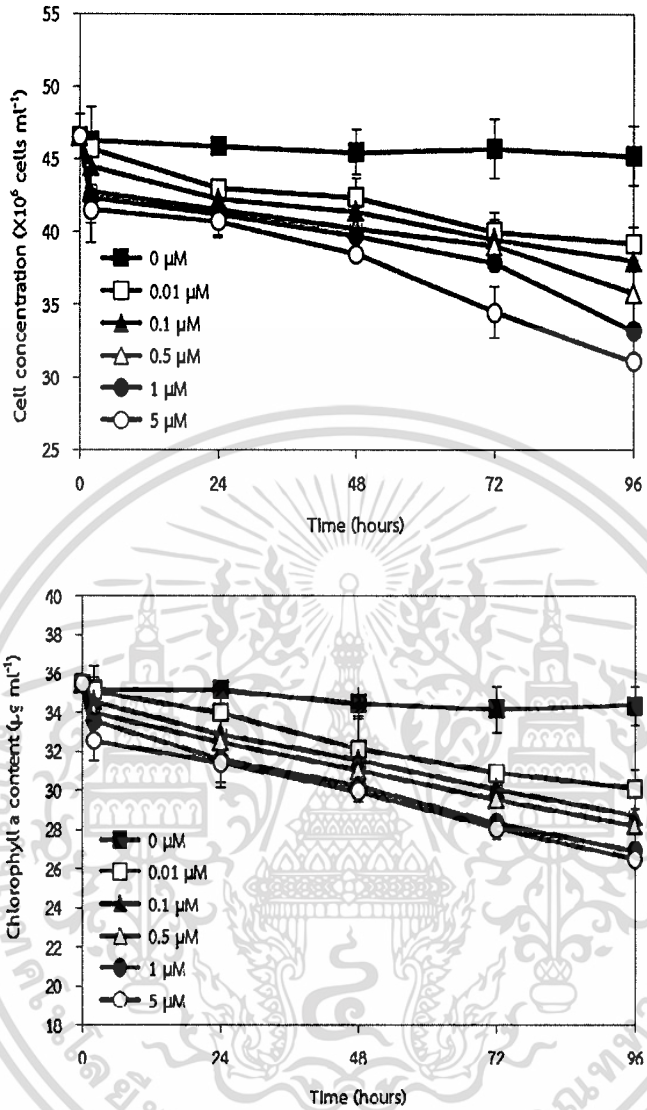
4.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากผลการทดลองที่ 4.1 ได้คัดเลือกสารยับยั้งจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ CCCP, DCMU, อะทราซีน, ซิมาซีน, ไกลโฟเสต และ โรทีโนน มาศึกษาผลของสารยับยั้งต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง ล้างและกระจายเซลล์ในอาหาร $BG11_0$ ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution จากนั้น นำสารละลายเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร และเติมสารยับยั้งที่คัดเลือกที่มีความเข้มข้นต่างๆ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มีแสงภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการเก็บกี่ยวเซลล์ที่เวลา 2, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มานับจำนวนเซลล์และความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์

4.2.1 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้ง CCCP ต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการทดลองบ่มเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในสารยับยั้ง CCCP ที่มีความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1 และ 5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า การเติม CCCP มีผลต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาในการบ่มของ CCCP จะส่งผลให้จำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ลดลงมากขึ้น โดยลดลงตั้งแต่ 2 ชั่วโมงแรก (รูปที่ 4.6) การที่ CCCP มีผลต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ เนื่องจาก CCCP ยับยั้งกระบวนการแตกตัวของน้ำ (Basset และ Bader 1998) และยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชันทำให้เกิดการยับยั้งการสร้าง ATP (Heytler 1979) เมื่อขาด ATP ที่นำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน การสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ และการแบ่งเซลล์ จึงทำให้จำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาในสาหร่าย *Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis* และ *C. reinhardtii* ที่พบว่าเซลล์มีปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง เมื่อบ่มในสารยับยั้ง CCCP (Yang และคณะ 2014; Zhang และคณะ 2012) นอกจากนี้ ความเข้มข้นของสารยับยั้ง CCCP ที่มากเกินไป ยังส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



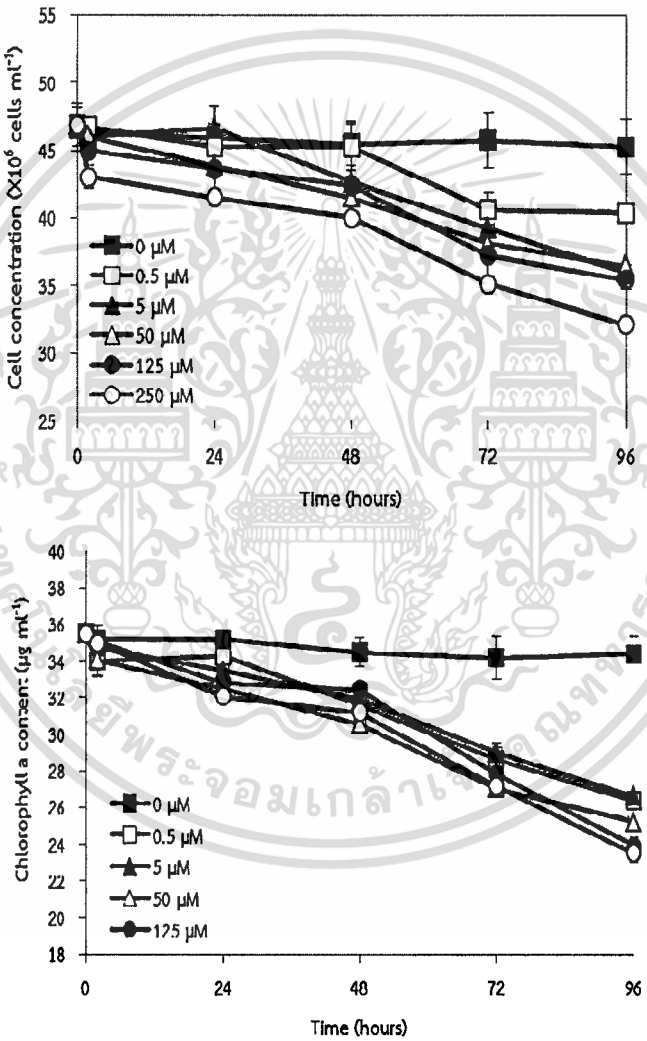
รูปที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นของ CCCP ต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ

4.2.2 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้ง DCMU ต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการทดลองบ่มเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในสารยับยั้ง DCMU ที่มีความเข้มข้น 0, 0.5, 5, 50, 125 และ 250 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า การเติม DCMU มีผลต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์เช่นเดียวกันกับการเติม CCCP โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการบ่มของ DCMU จะส่งผลให้จำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ลดลงมากขึ้น (รูปที่ 4.7) การที่ DCMU มีผลต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ เนื่องจาก DCMU เป็นสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ระบบแสงสอง โดยจะเข้าไปแย่งอิเล็กตรอนจากควิโนน เอ ทำให้ควิโนน เอ ไม่สามารถส่งต่ออิเล็กตรอนไปยังควิโนน บี และพลาสโตควิโนนได้ ส่งผลให้ไม่เกิดกระบวนการแตกตัวของน้ำ (Dean 2014) เมื่ออิเล็กตรอนเข้าไปในระบบการสังเคราะห์แสงลดลง จึงทำให้เซลล์มีการสังเคราะห์; ATP และ NAD(P)H ลดลง ส่งผลต่อการเจริญ การแบ่งตัวของเซลล์ และปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ นอกจากนี้ ความเข้มข้นของสารยับยั้ง DCMU ที่มากเกินไป ยังส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์อีกด้วย

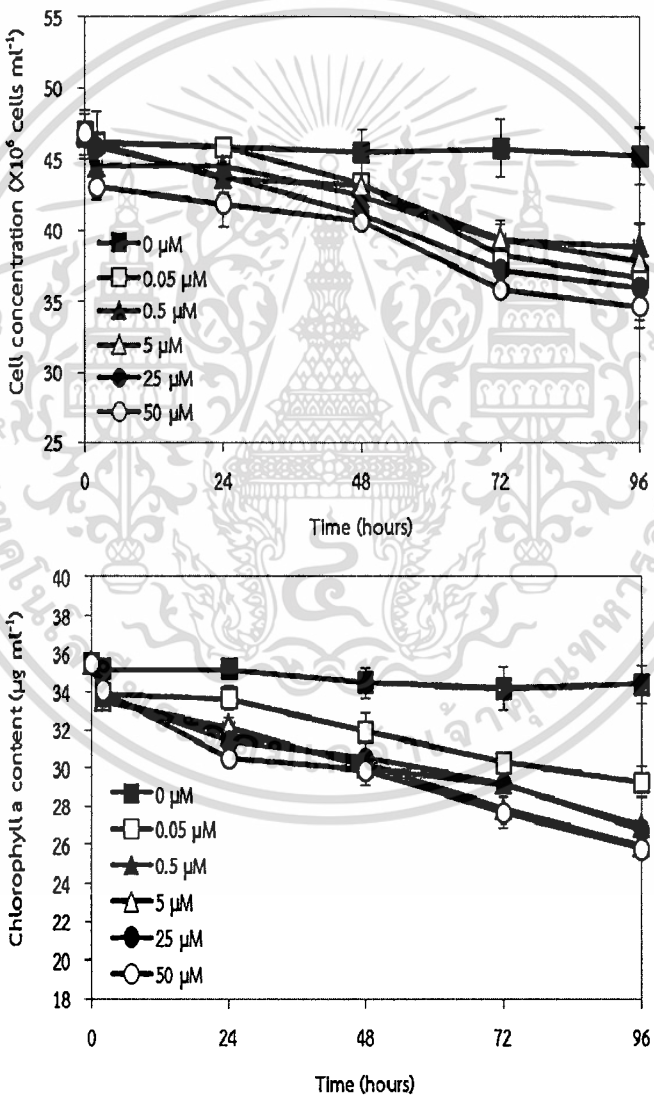


รูปที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นของ DCMU ต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้งอะทราซีนต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการทดลองบ่มเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในสารยับยั้งอะทราซีนที่มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.5, 5, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า การเติมอะทราซีนมีผลต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์เช่นเดียวกันกับการเติม CCCP และ DCMU โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาในการบ่มของอะทราซีน จะส่งผลให้จำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ลดลงมากขึ้น (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 ผลของความเข้มข้นของอะทราซีนต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การที่อะทราซีนมีผลต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ เนื่องจากสารยับยั้งอะทราซีนสามารถยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง จึงทำให้การเจริญของเซลล์ลดลง นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาพบว่าอะทราซีนมีผลในการยับยั้งกระบวนการหายใจ การสังเคราะห์โปรตีน และการสังเคราะห์กรดไขมันในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella kessleri* (El-Sheekh และคณะ 1994) อีกด้วย ดังนั้น การเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาในการบ่มของอะทราซีนจึงทำให้จำนวนเซลล์ และปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง

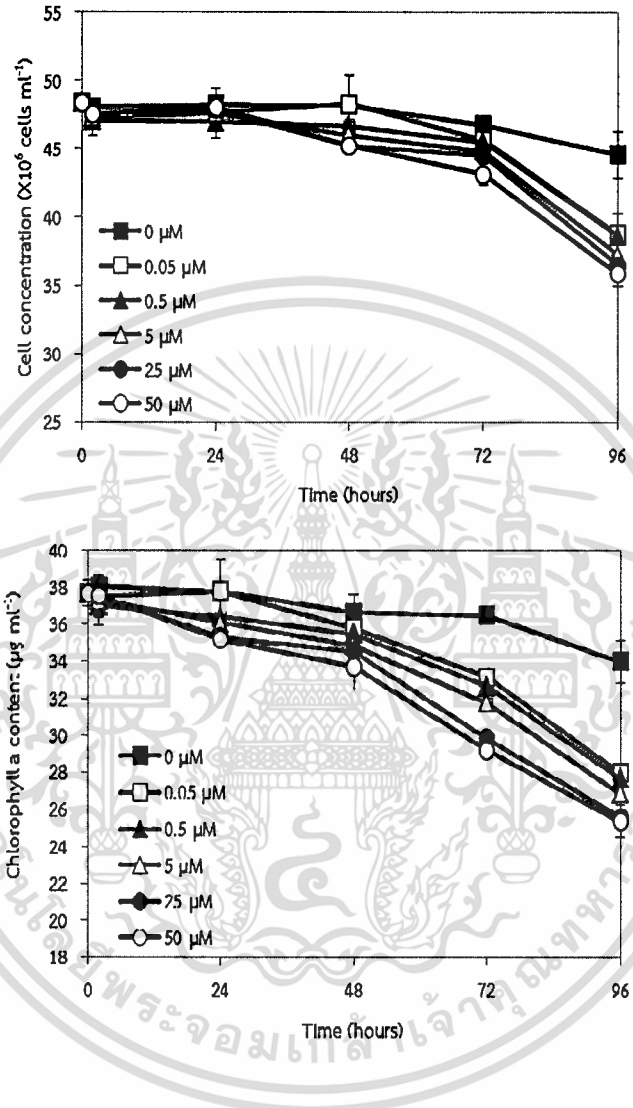
4.2.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งซิมาซีนต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการทดลองบ่มเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในสารยับยั้งซิมาซีนที่มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.5, 5, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า จำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อบ่มเซลล์กับซิมาซีนที่มีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รวมถึงเซลล์ที่ไม่มีการเติมซิมาซีน (รูปที่ 4.9) การเพิ่มความเข้มข้นของซิมาซีนและระยะเวลาในการบ่มส่งผลให้จำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียลดลงอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.9) การที่ซิมาซีนมีผลต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ อาจเนื่องมาจากซิมาซีนสามารถยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง จึงส่งผลต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์เช่นเดียวกับสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ มีรายงานการศึกษาพบว่า ซิมาซีนยังมีผลต่อการหายใจระดับเซลล์อีกด้วย (Metcalf และ Collin 1978)

4.2.5 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้งไกลโฟเสตต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

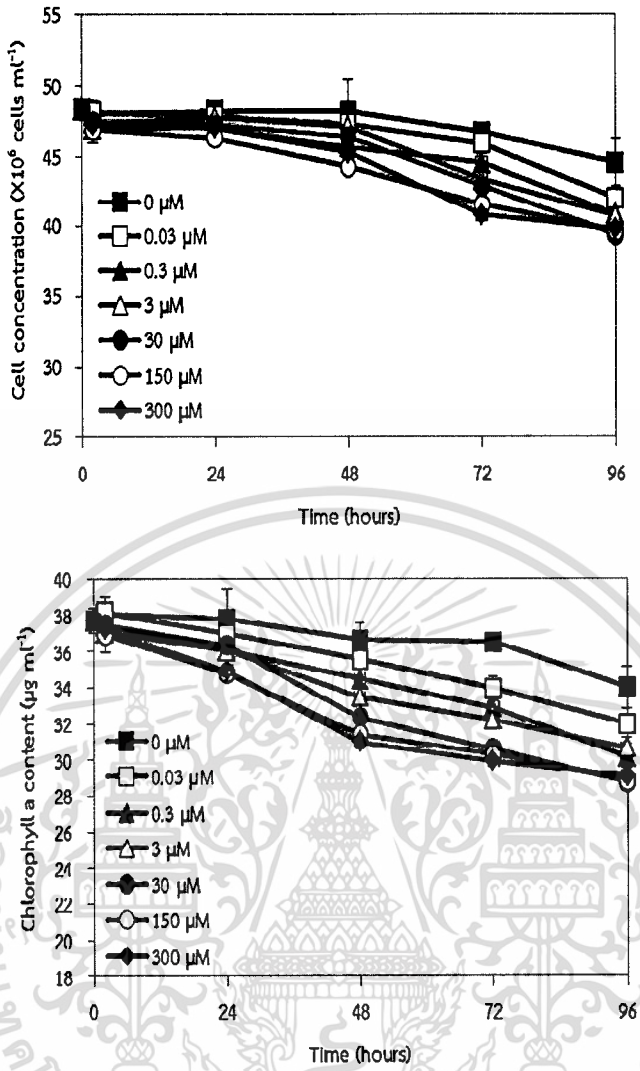
จากการทดลองบ่มเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในสารยับยั้งไกลโฟเสตที่มีความเข้มข้น 0, 0.03, 0.3, 3, 30, 150 และ 300 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า จำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อบ่มเซลล์กับไกลโฟเสตที่มีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รวมถึงเซลล์ที่ไม่มีการเติมไกลโฟเสต (รูปที่ 4.10) การเพิ่มความเข้มข้นของไกลโฟเสตและระยะเวลาในการบ่มส่งผลให้จำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียลดลงอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.10) การเพิ่มความเข้มข้นของไกลโฟเสตและระยะเวลาในการบ่มเซลล์ทำให้จำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง เนื่องมาจากไกลโฟเสตสามารถยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง จึงส่งผลต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์เช่นเดียวกับสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ มีรายงานการศึกษาพบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria limnetica* ที่บ่มในไกลไฟเสตมีการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และฟลาโวนอยด์ลดลง (Salman และคณะ 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ผลของความเข้มข้นของชิมาซีนต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



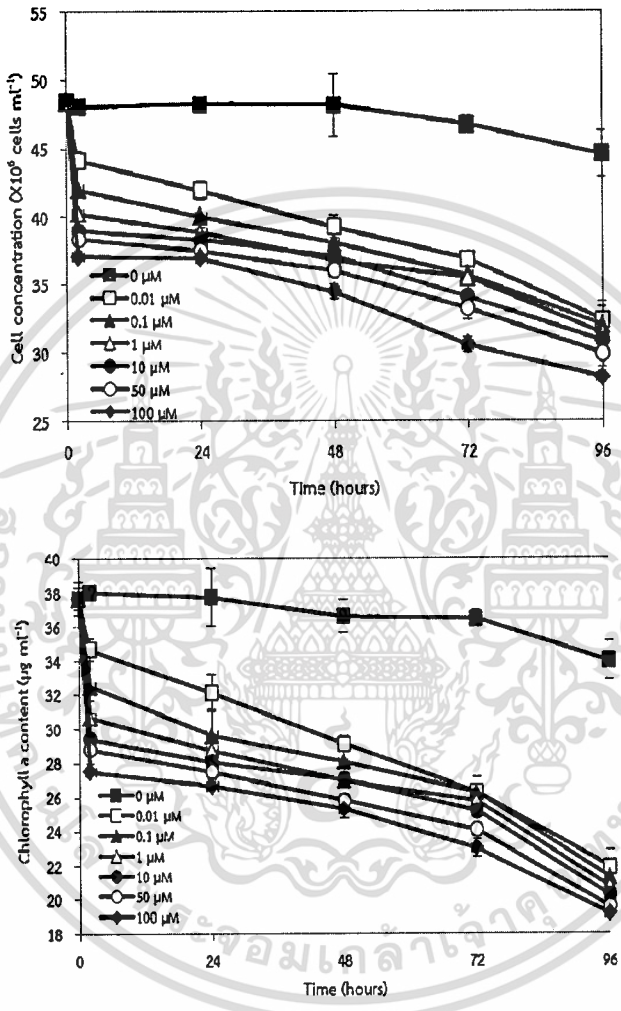
รูปที่ 4.10 ผลของความเข้มข้นของไกลโฟเสตต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ

4.2.6 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้งโรทีโนนต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการทดลองบ่มเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในสารยับยั้งโรทีโนนที่มีความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า การเติมโรทีโนนมีผลต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์อย่างเห็นได้ชัด โดยเมื่อเติมสารโรทีโนนตั้งแต่ 0.01 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้จำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ลดลงอย่างเห็นได้ชัดตั้งแต่ 2 ชั่วโมงแรกของการบ่ม และ จำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องจนครบระยะเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การบ่มที่ 96 ชั่วโมง (รูปที่ 4.11) ทั้งนี้เนื่องมาจากโรทีโนนเป็นสารยับยั้งที่รุนแรง สามารถยับยั้งกระบวนการหายใจ โดยขัดขวางการส่งอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ดีไฮโดรจีเนส ไปยังพลาสโตควิโนนในระบบลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการหายใจระดับเซลล์ (Teicher และ Scheller 1998) ซึ่งมีผลทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโต แบ่งเซลล์ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด



รูปที่ 4.11 ผลของความเข้มข้นของโรทีโนนต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ระยะเวลาในการบ่มต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

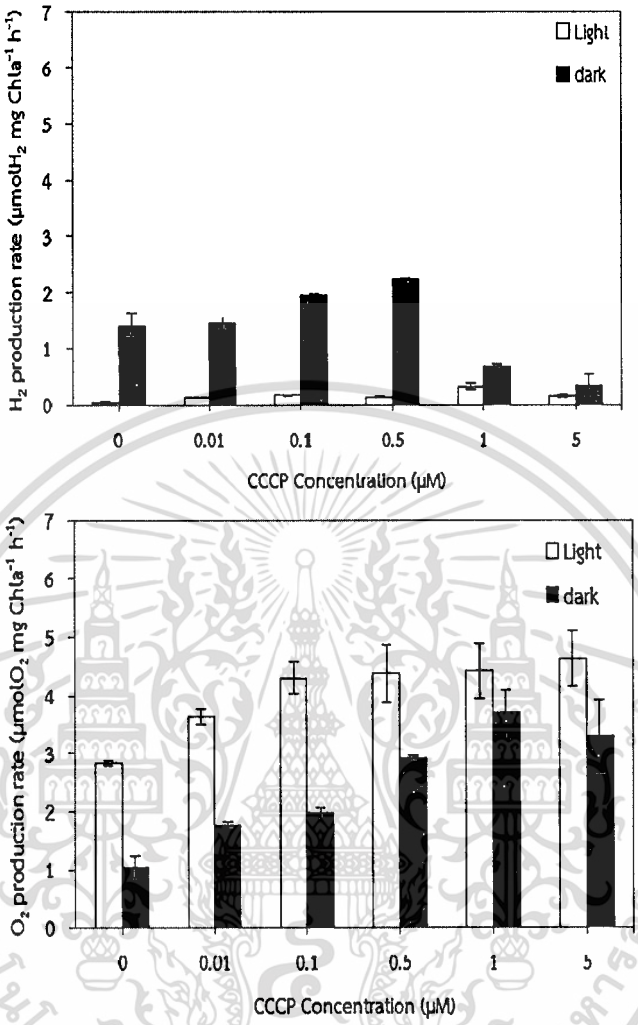
4.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากผลการทดลองที่ 4.1 ได้คัดเลือกสารยับยั้งจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ CCCP, DCMU, อะทราซีน, ซิมาซีน, ไกลโฟเสต และ โรทีโนน มาศึกษาผลของสารยับยั้งต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจน โดยทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง ล้างและกระจายเซลล์ในอาหาร $BG11_0$ ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution จากนั้น นำสารละลายเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร และเติมสารยับยั้งที่คัดเลือกที่มีความเข้มข้นต่างๆ หลังจากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนและออกซิเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

4.3.1 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้ง CCCP ต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการทดลองบ่มเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในสารยับยั้ง CCCP ที่มีความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1 และ 5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากแสงพบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อบ่มในสารยับยั้ง CCCP และเซลล์ที่บ่มภายใต้สภาวะมืดสามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีแสง โดยเซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.239 ± 0.026 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มในสารยับยั้ง CCCP ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และเมื่อบ่มในสารยับยั้ง CCCP ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 0.5 ไมโครโมลาร์ เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง (รูปที่ 4.12) จากการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ผลิตขึ้นพบว่าเซลล์ที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีแสงผลิตออกซิเจนได้สูงกว่าเซลล์ที่บ่มภายใต้สภาวะมืด (รูปที่ 4.12) ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่มาจากการแตกตัวของน้ำในกระบวนการสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะที่มีแสง เมื่อบ่มเซลล์ในสารยับยั้ง CCCP พบว่า ปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นและเซลล์ผลิตออกซิเจนสูงสุดที่ความเข้มข้นของ CCCP 0.5 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.12) โดยปกติ สาร CCCP เป็นสารยับยั้งที่สำคัญของกระบวนการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสอง 2 และยังเป็นสารยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชันของกระบวนการหายใจระดับเซลล์ จึงไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP เกิดขึ้น จากการทดลองพบว่า เมื่อบ่มไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ใน CCCP เซลล์ผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะมืดได้สูงกว่าสภาวะที่มีแสง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก CCCP มีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชันมากกว่าไปยับยั้งกระบวนการแตกตัวของน้ำ จึงทำให้เมื่อนำไปบ่มในที่มีแสง เซลล์ยังสามารถผลิตออกซิเจนได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้สามารถผลิตออกซิเจนได้มากกว่าในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



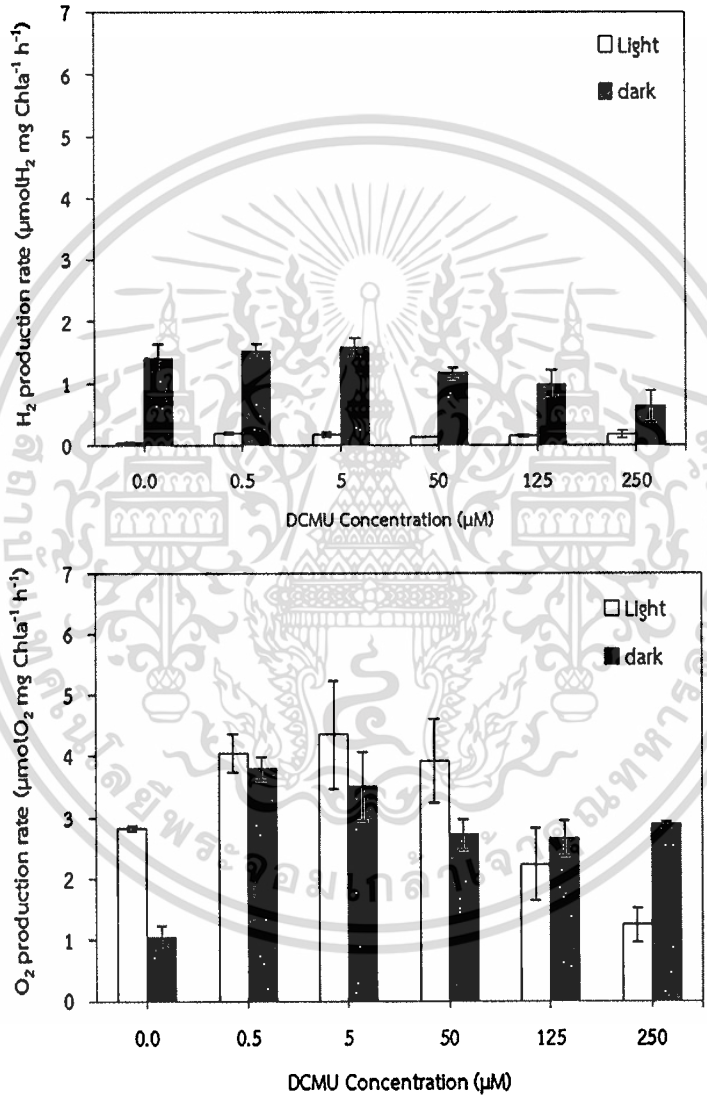
รูปที่ 4.12 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้ง CCCP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด

4.3.2 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้ง DCMU ต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการทดลองบ่มเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในสารยับยั้ง DCMU ที่มีความเข้มข้น 0, 0.5, 5, 50, 125 และ 250 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากแสงพบว่า เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียไม่สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อบ่มใน DCMU ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด โดยในที่มืด การผลิตไฮโดรเจนจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อบ่มใน DCMU ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 50 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.13) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณการผลิตออกซิเจนในเซลล์ที่บ่มใน DCMU พบว่า ภายใต้สภาวะที่มีแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ที่บ่มใน DCMU ความเข้มข้น 0.5, 5 และ 50 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการผลิตออกซิเจนเพิ่มขึ้น แต่ถ้าบ่มใน DCMU ที่มีความเข้มข้น 125 และ 250 ไมโครโมลาร์ เซลล์มีอัตราการผลิตออกซิเจนลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้บ่ม แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของ DCMU มีผลต่อการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงของระบบแสงสอง โดยความเข้มข้นของ DCMU 125 และ 250 ไมโครโมลาร์ ทำให้การผลิตออกจิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลงได้ แต่ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจน

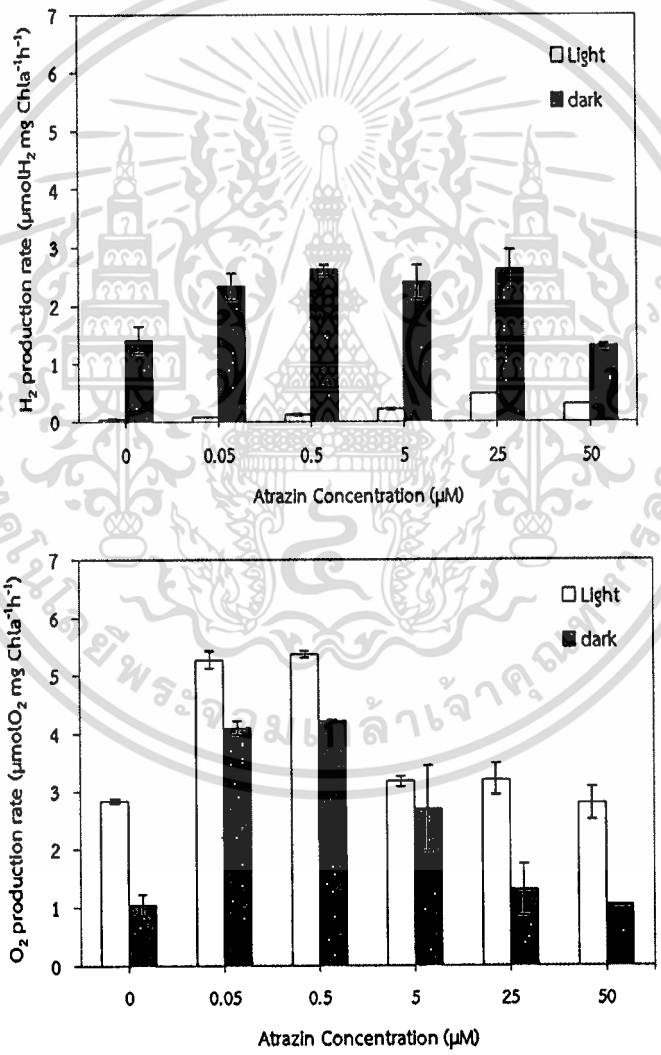


รูปที่ 4.13 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้ง DCMU ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้งอะทราซีนต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการทดลองบ่มเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในอะทราซีนที่มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.5, 5, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากแสงพบว่า ภายใต้สภาวะที่มืด เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น เมื่อบ่มในอะทราซีนความเข้มข้น 0.05-25 ไมโครโมลาร์ แต่เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง เมื่อบ่มในอะทราซีนความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.14) ส่วนภายใต้สภาวะที่มีแสงเซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น เมื่อบ่มในอะทราซีน และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เมื่อบ่มในอะทราซีนที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.14)



รูปที่ 4.14 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งอะทราซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด

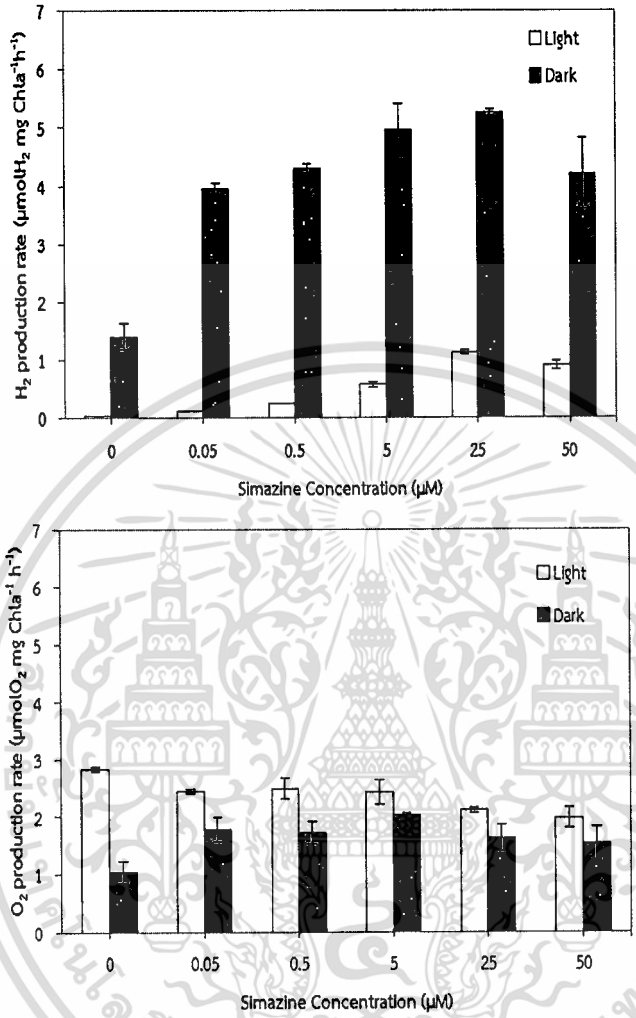
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณการผลิตออกซิเจนในเซลล์ที่บ่มในอะทราซีนความเข้มข้นต่างๆ พบว่า เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียมีอัตราการผลิตออกซิเจนภายใต้สภาวะที่มีแสงสูงกว่าเซลล์ที่บ่มในที่มืด โดยภายใต้สภาวะที่มีแสง เซลล์มีอัตราการผลิตออกซิเจนสูงขึ้น เมื่อบ่มในอะทราซีนที่มีความเข้มข้น 0.05 และ 0.5 ไมโครโมลาร์ และการผลิตออกซิเจนลดลงเมื่อบ่มในอะทราซีนที่มีความเข้มข้น 5-50 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.14) อะทราซีนมีผลต่อการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงสอง โดยความเข้มข้นของอะทราซีนตั้งแต่ 5 ไมโครโมลาร์ ขึ้นไป สามารถลดอัตราการผลิตออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ได้

4.3.4 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้งซิมาซีนต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการทดลองบ่มเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในซิมาซีนที่มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.5, 5, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากแสง พบว่าเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่บ่มในสารยับยั้งซิมาซีนมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่บ่มในสารยับยั้งชนิดอื่นๆ ทั้งภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากแสง โดยเซลล์ที่บ่มในที่มืดมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีแสง นอกจากนี้ เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 5.260 ± 0.064 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มในสารยับยั้งซิมาซีนที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มืด และเมื่อบ่มในสารยับยั้งซิมาซีนที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 25 ไมโครโมลาร์ เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง(รูปที่ 4.15) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณการผลิตออกซิเจนในเซลล์ที่บ่มในซิมาซีนความเข้มข้นต่างๆ พบว่าภายใต้สภาวะที่มีแสง เซลล์มีอัตราการผลิตออกซิเจนลดลง เมื่อบ่มในซิมาซีนที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น แสดงให้เห็นว่า ซิมาซีน เป็นสารยับยั้งที่สามารถลดอัตราการผลิตออกซิเจนได้ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ได้ดีที่สุด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซิมาซีนส่งผลให้ระบบแสงสองในกระบวนการสังเคราะห์แสงถูกยับยั้งมากขึ้น การผลิตออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจึงลดลง นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาพบว่าซิมาซีนมีผลต่อระบบการหายใจ (Metcalf และ Collin 1978) การสังเคราะห์โปรตีนและการสังเคราะห์กรดไขมันอีกด้วย (El-Sheekh และคณะ 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



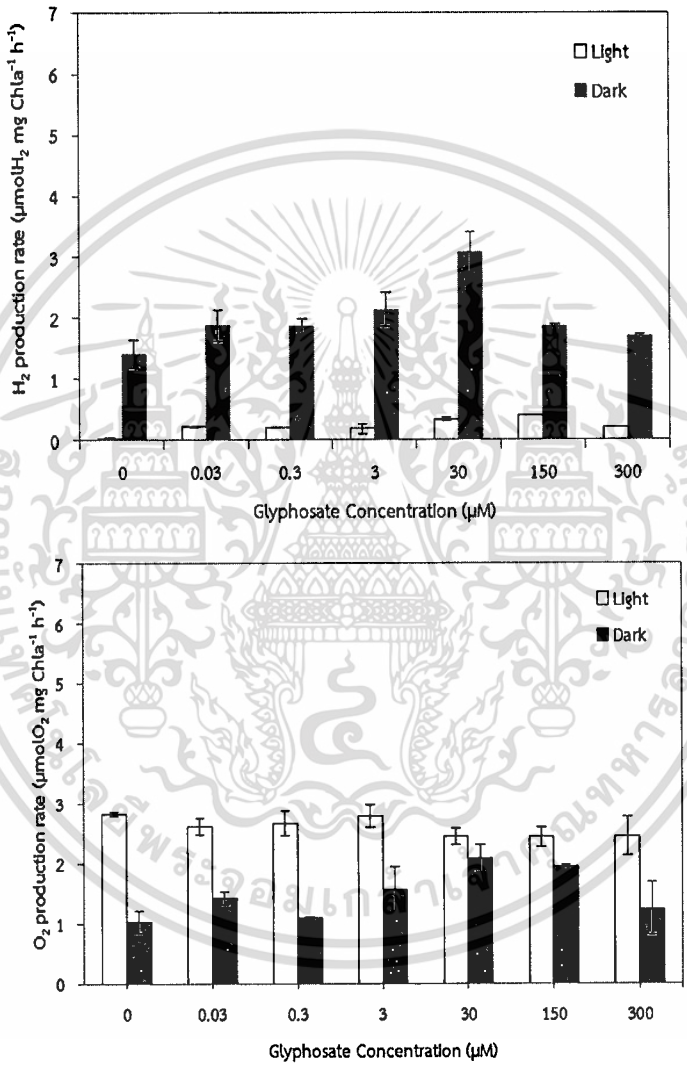
รูปที่ 4.15 **อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย** *A. halophytica* **เมื่อบ่มในสารยับยั้งซิมาซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด**

4.3.5 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้งไกลโฟเสตต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการทดลองบ่มเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในไกลโฟเสตที่มีความเข้มข้น 0, 0.03, 0.3, 3, 30, 150 และ 300 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากแสง พบว่าเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่บ่มในไกลโฟเสตมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น ทั้งภายใต้สภาวะในที่มืดและที่มีแสง เซลล์ที่บ่มในไกลโฟเสตภายใต้สภาวะมืดมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่บ่มในไกลโฟเสตภายใต้สภาวะที่มีแสง เซลล์ที่บ่มใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไกลโฟเสตที่มีความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะปราศจากแสง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดโดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 3.076 ± 0.325 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.16) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณการผลิตออกซิเจนในเซลล์ที่บ่มในไกลโฟเสตความเข้มข้นต่างๆ พบว่าภายใต้สภาวะที่มีแสง การผลิตออกซิเจนของเซลล์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ที่บ่มในไกลโฟเสตที่มีความเข้มข้นต่างๆ เซลล์มีอัตราการผลิตออกซิเจนภายใต้สภาวะที่มีแสงสูงกว่าในสภาวะมืด

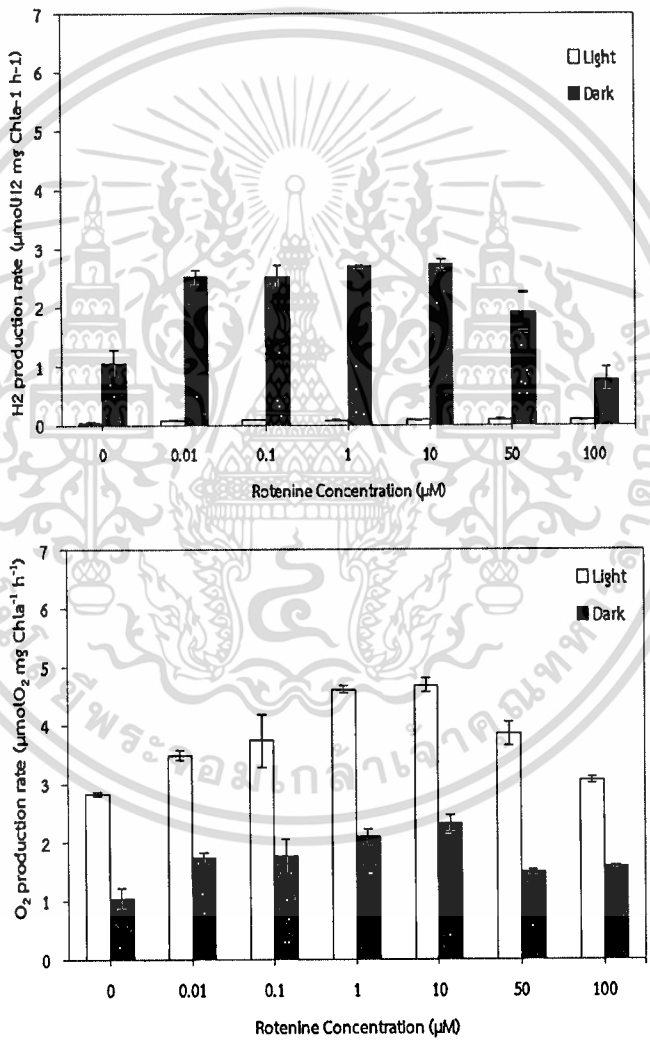


รูปที่ 4.16 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งไกลโฟเสตที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.6 ผลของความเข้มข้นของสารยับยั้งโรทีโนนต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการทดลองบ่มเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในโรทีโนนที่มีความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากแสง พบว่า เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น เมื่อบ่มในโรทีโนนที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 ถึง 50 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีแสง ในขณะที่ภายใต้สภาวะมืด เซลล์ไม่สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้ เมื่อบ่มในโรทีโนนที่มีความเข้มข้นต่างๆ (รูปที่ 4.17)



รูปที่ 4.17 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งโรทีโนนที่มีความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด

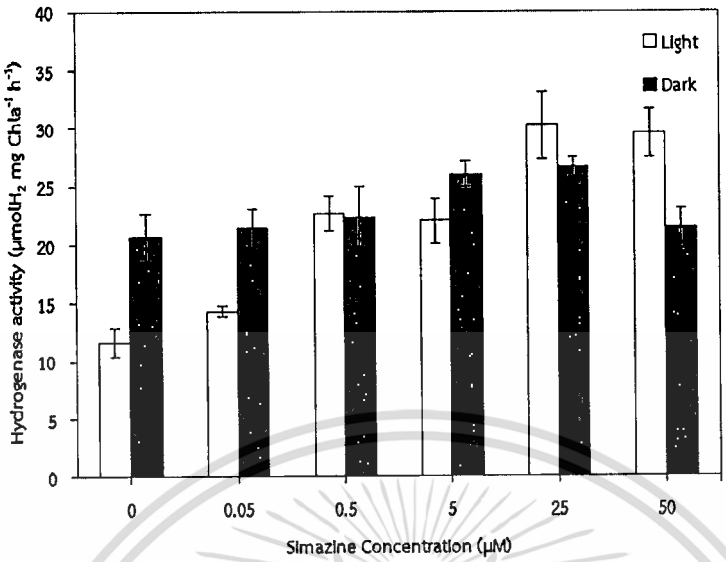
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณการผลิตออกซิเจนในเซลล์ที่บ่มในโรทีโนนความเข้มข้นต่างๆ พบว่า เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียมีอัตราการผลิตออกซิเจนภายใต้สภาวะที่มีแสงสูงกว่าเซลล์ที่บ่มในที่มืด โดยภายใต้สภาวะที่มีแสงเซลล์มีอัตราการผลิตออกซิเจนสูงขึ้น เมื่อบ่มในโรทีโนนที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 จนถึง 10 ไมโครโมลาร์ และการผลิตออกซิเจนลดลงเมื่อบ่มในโรทีโนนที่มีความเข้มข้น 50-100 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.17) โรทีโนนเป็นสารยับยั้งกระบวนการหายใจ ทำให้เซลล์ไม่ส่งต่ออิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ อิเล็กตรอนจึงถูกนำไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนแทน

4.4 ผลของสารยับยั้งซิมาซีนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการทดลองที่ 4.3.4 พบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่บ่มในสารยับยั้งซิมาซีนมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดภายใต้สภาวะทั้งที่มีแสงและไม่มีแสง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่บ่มในสารยับยั้งชนิดอื่นๆ จึงได้ทำการคัดเลือกสารยับยั้งซิมาซีนมาศึกษาผลของซิมาซีนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส โดยทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง ล้างเซลล์และกระจายเซลล์ด้วยอาหาร $BG11_0$ ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเซลล์โดยทำการปั่นเหวี่ยง การล้างเซลล์และกระจายเซลล์ด้วยอาหาร $BG11_0$ ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution นำสารละลายเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร และเติมสารยับยั้งซิมาซีนที่มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.5, 5, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มีแสงและในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น พ่นด้วยก๊าซอาร์กอนและบ่มอีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืดและที่สว่าง เมื่อบ่มครบเวลา นำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส โดยให้เซลล์ทำปฏิกิริยากับสารละลายเมทิลไวโอโลเจน และโซเดียไดไทโอไนต์ และวิเคราะห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ หลังจากบ่มเป็นเวลา 15 นาที พบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่บ่มในซิมาซีนที่มีความเข้มข้นต่างๆ ทั้งในสภาวะมืดและสว่างมีกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้บ่มในซิมาซีน โดยเซลล์มีกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสสูงที่สุดเท่ากับ 30.174 ± 2.854 และ 26.661 ± 0.871 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มในซิมาซีนที่มีความเข้มข้นที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด ตามลำดับ (รูปที่ 4.18) แสดงให้เห็นว่า ซิมาซีนมีผลไปยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนของระบบแสงสอง (O'neal และ Lembi 1983) และสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ได้ อย่างไรก็ตาม ภายใต้สภาวะที่มีแสง ออกซิเจนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำจะยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะมืดสูงกว่าภายใต้สภาวะที่มีแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 กิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เมื่อบ่มในสารยับยั้งซิมาซีนที่มีความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

สรุปผลการทดลอง

5.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งต่างๆ เช่น สารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง สารยับยั้งกระบวนการหายใจ สารยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน สารยับยั้งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และสารยับยั้งวัฏจักรเครบส์ ต่อการผลิตไฮโดรเจน สรุปได้ว่า

1. สารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงของระบบแสงสอง คือ DCMU, CCCP, ซิมาซีน, อะทราซีน และไกลโฟเสต ทำให้ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น ทั้งภายใต้สภาวะมืดและสภาวะที่มีแสง โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะมืดสูงกว่าภายใต้สภาวะที่มีแสง ในสารยับยั้งทุกชนิด ซิมาซีนที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด

2. สารที่ยับยั้งกระบวนการหายใจโรทีโนนทำให้ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะมืดสูงกว่าภายใต้สภาวะที่มีแสง โรทีโนนที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด

3. สารยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน คือ สารไดไนโตรฟีนอล สารยับยั้งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ คือ สารดีแอล-กลีเซอราลดีไฮด์ และ สารยับยั้งวัฏจักรเครบส์ คือ โซเดียมอาร์ซิเนต มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เพียงเล็กน้อย

5.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการศึกษาผลของสารยับยั้งชนิดต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ สรุปได้ว่า สารยับยั้งทั้ง 6 ชนิด คือ DCMU, CCCP, ซิมาซีน, อะทราซีน, ไกลโฟเสต และ โรทีโนน มีผลต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาในการบ่ม เซลล์มีจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง โดยโรทีโนนมีผลต่อจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งชนิดต่างๆ ต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากการศึกษาผลของสารยับยั้งชนิดต่างๆ ต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจน สรุปได้ว่า สารยับยั้งทั้ง 6 ชนิด คือ DCMU, CCCP, ซิมาซีน, อะทราซีน, ไกลโฟเสต และ โรทีโนน มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* แตกต่างกัน การผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสงสูงกว่าเซลล์ที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีแสง แต่การผลิตออกซิเจนของเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีแสงสูงกว่าภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง เซลล์ที่บ่มในสารยับยั้งซิมาซีนที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด

5.4 ผลของสารยับยั้งซิมาซีนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

สารยับยั้งซิมาซีนสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* โดยเซลล์ที่บ่มในซิมาซีนที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์มีกิจกรรมของเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ประพันธ์ คูชลธารา. 2551. การลดปริมาณทาร์ในกระบวนการแกสซิฟิเคชันของชีวมวลโดยตัวเร่งปฏิกิริยา $K_2CO_3/NiO/Al_2O_3$ ภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชัยวัฒน์ ธานีรัตน์. 2536. จลนพลสาสตร์ของการรีฟอร์ม มีเทน ไอน้ำ คาร์บอนไดออกไซด์บนตัวเร่งปฏิกิริยานิกเกิล/อลูมินา. โครงงานพิเศษวิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. วิทยาศาสตร์ (เคมีเทคนิค) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546. สาหร่ายวิทยา (Phycology). พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Appel, J., Schulz, R. 1998. "Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis: hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poising." **J. Photochem Photobiol.** B47: 1-11.

Basset, R.A. and Bader, K.P. 1998. "Physiological analyses of the hydrogen gas exchange in cyanobacteria." **J. Photochem. Photobiol.** 43(2): 146-151.

Bérard, A. and Pelte, T. 1999. "The impact of photosystemII (PSII), inhibitors on algae communities and dynamics." **Rev.Sci.Eau.** 12: 333-361.

Berland, B., Le-Canpion, T. and Campos-Baeta-Neves M.H. 1989. "Interaction de la salinité et de la température sur la morphologie croissance et la compostion cellulaire d'nue cyanobacteria halotolérante (*Aphanothece* sp.)." **Bot. Mar.** 32: 317-332.

Burrows, E.H., Frank, Chaplen, W.R. and Ely R.L. 2011. "Effects of selected electron transport chain inhibitors on 24-h hydrogen production by *Synechocystis* sp. PCC6803." **Bioresour Technol.** 102: 3062-3070.

Chen, M., Zhang, Z., Wanga, C., Zhang, L. Li, J., Chang, S., Mao, Z. and Li, S. 2013. "Improving conversion efficiency of solar energy to electricity in cyanobacterial PEMFC by high levels of photo-H_2 production." **Int. J. Hydrog. Energy.** 38: 13556-13563.

Dean, R.L. 2014. "Measuring light-dependent proton translocation in isolated thylakoids." **J Lab Chem Educ.** 2(3): 33-43.

El-Sheekh M.M., Kotkat, H.M. and Hammouda, OH. 1994. "Effect of atrazine herbicide on growth, photosynthesis, protein synthesis, and fatty acid composition in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*." **Ecotoxicol Environ Saf.** 29(3): 349-358.

Guan. Y.F., Zhang, W., Deng, M.C., Jin, M.F. and Yu, XJ. 2004. "Significant enhancement of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

photobiological H_2 evolution by carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone in the marine green alga *Platymonas subcordiformis*." **Biotechnol Lett.** 26: 1031–1035.

Guo, Z., Chen, Z., Zhang, W., Yu, X. and Jin, M. 2008. "Improved hydrogen photoproduction regulated by carbonylcyanide m-chlorophenylhrazone from marine green alga *Platymonas subcordiformis* grown in CO_2-supplemented air bubble column bioreactor." **Biotechnol Lett.** 30: 877–883.

Heytler, P.G. 1979. "Uncouplers of oxidative phosphorylation." **Method Enzymol.** 55: 442–462.

Hopfer, U., Lehninger, A.L. and Thompson, T.E. 1968. "Protonic conductance across phospholipid bilayer membranes induced by uncoupling agent for oxidative phosphorylation." **Proceeding of the National Academy of Sciences** 59: 484-490.

Ji, C.F., Yu, X.J. Chen, Z.A. Xue, Legrand, S. J. and Zhang, W. 2011. "Effects of nutrient deprivation on biochemical compositions and photo-hydrogen production of *Tetraselmis subcordiformis*." **Int J Hydrog Energy.** 36: 5817-5821.

Khetkorn W. Baebprasert W., Lindblad P. and Incharoensakdi A. 2012. "Redirecting the electron flow towards the nitrogenase and bidirectional Hox-hydrogenase by using specific inhibitors results in enhanced H_2 production in the cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012." **Bioresour Technol.** 8: 265-271.

Konstantinov, Y.M., Subota I.V. and Arziev, A.S. 1996. "Protein synthesis in mitochondria under different redox conditions." **Maize Genet. Coop.** 70: 29-30.

Metcalf, E.C. and Collin, H.A. 1978. "The effect of simazine on the growth and respiration of a cell suspension culture of celery." **New Phytol.** 81: 243-248.

O'Neal, S.W. and Lembi, C.A. 1983. "Effect of simazine on photosynthesis and growth of filamentous algae." **Weed Sci.** 31: 899-903.

Peschek , G.A., Obinger, C. and Paumann, M., 2004. "The respiratory chain of blue–green algae." **Physiol. Plantarum.** 120(3): 358–369.

Pils, D. and Schmetterer, G. 2001. "Characterization of three bioenergetically active respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6803." **FEMS Microbiol. Lett.** 203(2): 217–222.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ran, C.Q., Yu, X.J., Jin, M.F. and Zhang, W. 2006. "Role of carbonyl cyanide m-chloropheny hydrazone in enhancing photobiological hydrogen production by marine green alga *Platymonas subcordiformis*." **Biotechnol Prog.** 22: 438–443.

Rao, K.K and Hall, D.O. 1996. "Hydrogenproduction by cyanobacteria: potential, problems and prospects." **J Mar Biotechnol.** 4: 10-15.

Renger G. 1970. "The water splitting system of photosynthesis I a postulated model." **Z. Naturforsch.** 25b: 966-971.

Salman J.M., Abdul-Adel, E. and AlKaim, A.F. 2016. "Effect of pesticide glyphosate on some biochemical features in cyanophyta algae *Oscillatoria limnetica*." **Int J PharmTech Res.** 9(8): 355-365.

Seibert, M., King, P.W., Posewitz, M., Melis, A. and Ghirardi, M. 2008. "Photosynthetic water-splitting for hydrogen production." **ASM Press Washington.** 273-291.

Shaishav, S., Singh, R.N. and Satyendra, T. 2013. "Biohydrogen from algae: Fuel of the future."**Int Res J Environ. Sci.** 2(4): 44-47.

Shestakov, S. and Mikheeva, L., 2006. "Genetic control of hydrogen metabolism in cyanobacteria." **Russ. J. Genet.** 42: 1272–1284.

Shevela, D., and Messinger, J. 2011. "Principles of photosynthesis: fundamentals of materials for energy and environmental sustainability" **Cambridge University Press.** p. 302.

Spiller, H., Ernst, A., Kerfin, W. and Böger, P. 1978. "Increase and stabilization of photoproduction of hydrogen in *Nostoc muscorum* by photosynthetic electron transport inhibitors." **Z. Naturforsch.** 33c: 541-547.

Stokes D.M. and Walker D.A. 1972. "Photosynthesis by isolated chloroplasts inhibition by DL-glyceraldehyde of carbon dioxide assimilation." **Biochem. J.** 128(5): 1147–1157.

Takabe, T., Incharoensakdi, A., Arakawa, K. and Yokota, S. 1988. "CO_2 fixation rate and RuBisCO content increase in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* grown in hight salinities." **Plant Physiol.** 88: 1120-1124.

Tamagnini, P. 2002. "Hydrogen and fuel cells: hydrogen and fuel fells." **Emerging Technologies and Applications.** p. 33.

Tretter, L. and Vizi, V.A. 2000. "Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress." **J. Neurosci.** 20(24): 8972–8979.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Teicher, H.B. and Scheller, H.V. 1998. "The NAD(P)H dehydrogenase in barley thylakoids is photoactivatable and uses NADPH as well as NADH." **Plant Physiol.** 117(2): 525–532.

Tiwari, A. and Pandey, A. 2012. "Cyanobacterial hydrogen production a step towards clean environment" **Int. J. Hydrog. Energy.** 37 : 139-150.

Vilchez, C., Garbayo, I., Markvicheva, E., Galvan, F. and Leon, R. 2001. "Studies on the suitability of alginate-entrapped *Chlamydomonas reinhardtii* cells for sustaining nitrate consumption processes." **Bioresource Technol.** 78: 55-61.

Yang, D., Y. Zhang, D.K. Barupal, X. Fan, R. Gustafson, R. Guo and O. Fiehn. 2014. Metabolomics of photobiological hydrogen production induced by CCCP in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Int. J. Hydrog. Energy.** 39: 150-158.

Yu, J. and Takahashi, P. 2007. "Biophotolysis-based hydrogen production by cyanobacteria and green microalgae." 79-89. in Mendez-Vilas, A. **Communicating Current Research and Education Topics and Trends in Applied Microbiology.** Spain: Formatex.

Zhang, Y., X. Fan, Z. Yang, H. Wang, D. Yang and R. Guo. 2012. "Characterization of H_2 photoproduction by a new marine green alga, *Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis*." **Appl Energy.** 92: 38-43.

https://simple.wikipedia.org/wiki/Isotope

https://energyclub.stanford.edu/solar-fuels-as-versatile-energy-solutions/

https://energy.gov/eere/fuelcells/hydrogen-production-electrolysis

http://emat-solar.lbl.gov/research/application-photo-electrochemical-cell-pec

http://irrigation.rid.go.th/rid14/water/library/shelf/data/page/science/science_6.html

https://www.btny.purdue.edu/WeedScience/MOA/Photosynthetic_Inhibitors/text.html

http://www.studydroid.com/index.php?page=viewPack&packId=128877

http://2012books.lardbucket.org/books/introduction-to-chemistry-general-organic-and-biological/s21-08-enzyme-inhibition.html

https://quizlet.com/2934325/etc-flash-cards/)

http://www.namrata.co/inhibition-of-oxidative-phosphorylation/

http://reasonandscience.heavenforum.org/t2164-the-calvin-benson-cycle

https://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/krebs.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (Blue-green medium)

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	มิลลิโมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.77	มิลลิโมลาร์
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4.2H_2O$)	1.61	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2.6H_2O$)	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	1.76	โมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric Acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)	279	มิลลิโมลาร์
Trace metal mix 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น	1000	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบอาหาร BG11

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
Na_2CO_3 (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
K_2HPO_4 (3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
$FeNH_4$.Citrate (0.60 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Sail Solution

ส่วนประกอบอาหาร BG11ที่เสริมด้วย Turk Island Sail Solution

อาหาร BG11 100 เท่า (ภาคผนวก ก)	10	มิลลิลิตร
*Stock A solution	100	มิลลิลิตร
*Stock B solution	100	มิลลิลิตร
Na_2CO_3 (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
K_2HPO_4 (3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
$FeNH_4$.Citrate (0.60 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	28.16	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร และปรับพีเอชของอาหารเป็น 7.6 โดยการเติม 2 N NaOH

*Stock A solution

ส่วนประกอบต่อลิตร

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	6.6	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2.6H_2O$)	55	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	14.66	กรัม

*Stock A solution

ส่วนประกอบต่อลิตร

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	74.48	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

1. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์ เอ ต่อมิลลิลิตร) เท่ากับ $12.7 \times A_{665} \times 10$

หมายเหตุ A_{665} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์ เอ ที่สกัดได้โดยเมทานอล ที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร

2. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างที่วัดได้จากเครื่อง GC × เปอร์เซนต์ของก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐานพื้นที่ใต้กราฟมาตรฐานที่ได้จากเครื่อง GC = A mL

$$\frac{\text{Headspace} \times \text{A mL}}{100\ \text{mL}} = B$$

22.4 mL = 1 mmol

$$\text{B mL} = \frac{\text{B} \times 1\ \text{mmol}}{22.4\ \text{mL}} = \text{C mmol}$$

C × 1000 = D µmol

ดังนั้น [H_2] = D/ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ/µmol H_2/mgch a/h

*** 100 mL คือ เลี้ยงในอาหารปริมาตร 100 mL

22.4 mL คือ มวลโมเลกุลของ H_2 1 mmol

1000 คือ การเปลี่ยนหน่วยจาก mmol เป็น µmol

2 คือ ระยะเวลาในการบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้