

การคัดเลือกสายสีเขียวเซลล์เดียวที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง
ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

SCREENING OF HIGH HYDROGEN-PRODUCING UNICELLULAR
GREEN ALGAE UNDER AEROBIC CONDITION



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2564

KMITL-2021-SC-M-020-033

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SCREENING OF HIGH HYDROGEN-PRODUCING UNICELLULAR
GREEN ALGAE UNDER AEROBIC CONDITION



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2021

KMITL-2021-SC-M-020-033

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2021

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่ผลิตไฮโดรเจน ในปริมาณสูงภายใต้สภาวะที่มีอากาศ
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกชพร เสรีตระกูล
รหัสประจำตัว	59605050
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2564
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา พันธุ์พุกฤษ์

บทคัดย่อ

ในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายกำลังเป็นที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการดูดซับพลังงานแสงซึ่งมีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสง การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวอาศัยการเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสชนิดที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ อิเล็กตรอนซึ่งเป็นซับสเตรตชนิดหนึ่งสำหรับการผลิตไฮโดรเจนสามารถผลิตมาจากปฏิกิริยาแสงของกระบวนการสังเคราะห์แสงหรือจากการสลายแป้ง อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายมีความไวต่อออกซิเจนที่เป็นผลิตภัณฑ์หลักของกระบวนการสังเคราะห์แสง ในงานวิจัยนี้ เริ่มต้นจากการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวเบื้องต้นจากจำนวน 24 สายพันธุ์ เพื่อหาสาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในระดับต่างๆ ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียว 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125, *Chlorella* sp. 2SinS4, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 และ *Tetraspora* sp. CU2551 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนสูง ในบรรดา 5 สายพันธุ์นี้ สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 และ *C. reinhardtii* CC-125 มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูง และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ทนต่อออกซิเจนสูง โดยมีค่า O_{2150} เท่ากับ 15.93 ± 0.24 และ 15.09 ± 0.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบว่า อายุเซลล์ ความหนาแน่นของเซลล์ และการขาดธาตุอาหารในอาหารเพาะเลี้ยง มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ภายใต้การบ่มเซลล์ในอากาศปกติ สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 และ *C. reinhardtii* CC-125 ที่อายุเซลล์ 36 ชั่วโมงและมีความหนาแน่นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.8 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด การขาดซัลเฟอร์ในอาหารจะส่งเสริมอัตราการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ส่วนการขาดโพแทสเซียมในอาหารจะส่งเสริมอัตราการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 การขาดโพแทสเซียมจะลดปริมาณของออกซิเจนในสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 โดยการลดอัตราการสังเคราะห์แสงและเพิ่มอัตราการหายใจในที่มีด นอกจากนี้ การขาดโพแทสเซียมยังเหนี่ยวนำให้สาหร่ายสลายแบ่งที่สะสมภายในเซลล์ ทำให้ได้รับปริมาณอิเล็กตรอนสูงสำหรับนำไปใช้ผลิตไฮโดรเจน ภายใต้สภาวะการบ่มเซลล์ในอากาศปกติ สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ให้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP (พีเอช 7.2) ที่ขาดโพแทสเซียมและมีกรดอะซิติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ ภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ การเติมสารให้อิเล็กตรอน ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก ซิสเทอีน โซเดียมไดไรโอไนต์ และกรดออกซาลิก สามารถกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 โดยพบว่าสาหร่ายมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ $1,153.783 \pm 52.651$ ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมที่เติมซิสเทอีนที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ภายใต้การบ่มแบบมีออกซิเจนในบรรยากาศในช่วงเวลาที่ 144

คำสำคัญ : การผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. สภาวะที่มีอากาศ

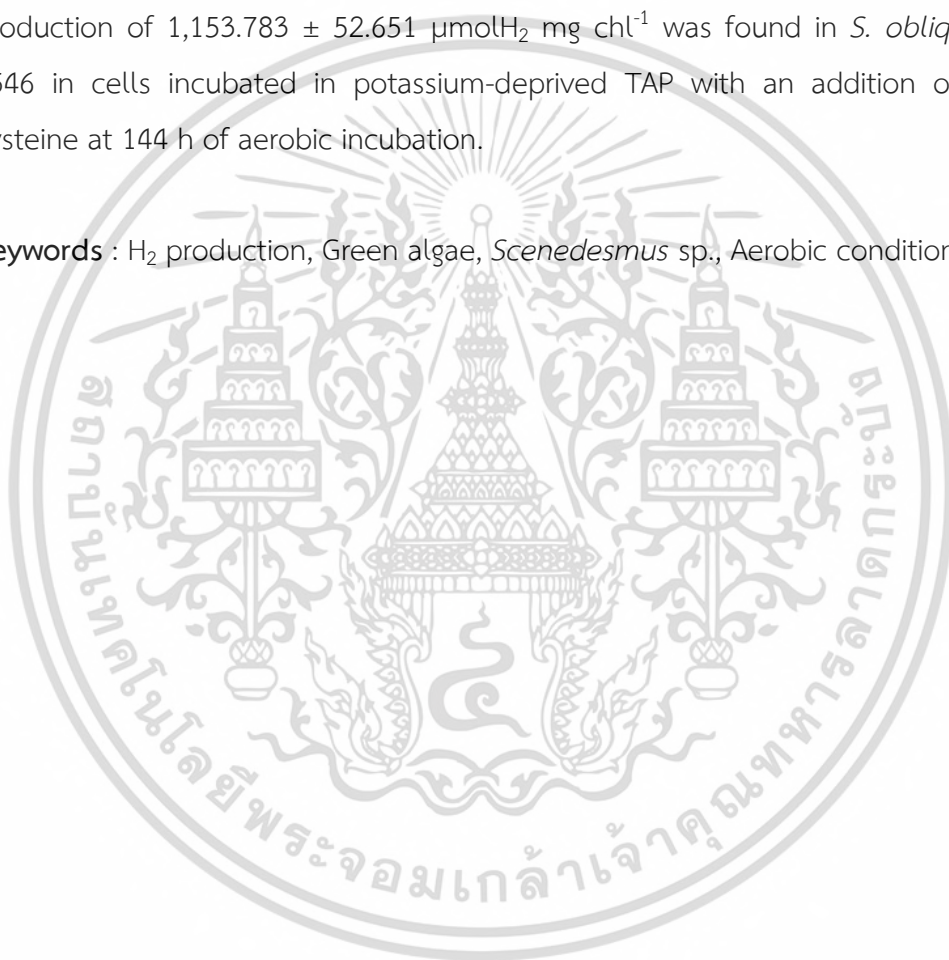
Thesis Title	Screening of high hydrogen-producing unicellular green algae under aerobic condition
Student Name	Kodchaporn Sereetrakul
Student ID	59605050
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2021
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Dr.Saranya Phunpruch

Abstract

Nowadays, much attention has been paid to investigate H₂ production by green algae due to the ability of absorbing the unlimited solar energy as an energy source for photosynthesis. H₂ production by green algae is catalyzed by an activity of iron hydrogenase. The electrons, one of substrate for H₂ production, can be obtained either from a light reaction of photosynthetic pathway or from a starch degradation. However, hydrogenase of green algae is sensitive to O₂ which is a main photosynthetic product. In this study, the primary screening of high H₂ producing green algae under various O₂ concentrations was investigated from twenty-four unicellular green algal strains. Five strains of green algae, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125, *Chlorella* sp. 2SinS4, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 and *Tetraspora* sp. CU2551 showed high potential for H₂ production under high O₂ concentrations. Among them, *S. obliquus* TISTR 8546 and *C. reinhardtii* CC-125 showed the high H₂ production and high O₂-tolerant hydrogenase activity with an O₂1₅₀ of 15.93 ± 0.24 % and 15.09 ± 0.33 %, respectively. It was found that the cell age, cell density and nutrient deprivation in media played important roles in H₂ production by both algal strains under atmospheric air condition. *S. obliquus* TISTR 8546 and *C. reinhardtii* CC-125 at a cell age of 36 h with an optical density at 750 nm of 0.8 showed the highest H₂ production rate. Sulfur deprivation increased H₂ production rate and hydrogenase activity in *C. reinhardtii* CC-125 whereas potassium deprivation increased H₂ production rate and hydrogenase activity in *S. obliquus* TISTR 8546. Potassium deprivation reduced O₂

concentrations in *S. obliquus* TISTR 8546 by decreasing a photosynthetic rate and increasing a dark respiration rate. Moreover, potassium deprivation could induce an intracellular starch degradation resulting in receiving a lot of electrons for H₂ production. Under atmospheric air, *S. obliquus* TISTR 8546 gave the highest H₂ production when incubated in potassium-deprived TAP (pH 7.2) medium containing 17.4 mM acetic acid under a continuous light with 30 μmol photon m⁻² s⁻¹ at 30 °C. The reducing agents, ascorbic acid, cysteine, sodium dithionite and oxalic acid, were found to promote H₂ production in *S. obliquus* TISTR 8546. The maximum H₂ production of 1,153.783 ± 52.651 μmolH₂ mg chl⁻¹ was found in *S. obliquus* TISTR 8546 in cells incubated in potassium-deprived TAP with an addition of 0.1 mM cysteine at 144 h of aerobic incubation.

Keywords : H₂ production, Green algae, *Scenedesmus* sp., Aerobic condition



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากข้าพเจ้าได้รับการอนุเคราะห์ ความช่วยเหลือ คำแนะนำ แรงกำลังใจ และการถ่ายทอดความรู้จากบุคคลผู้มีพระคุณต่างๆ ดังนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คำปรึกษา การถ่ายทอดองค์ความรู้ต่างๆ ตลอดการดำเนินงานวิจัย และมอบแนวทางการแก้ไขข้อบกพร่องเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ เสาวรัตน์ จันทะโร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความกรุณาสละเวลาทำการ สอบวิทยานิพนธ์นี้ และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินงานวิจัย พร้อมกับมอบแนวทาง แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เป็นไปอย่างถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ นางสาวปรียานุช ศรีไพบูรณ์ นักวิทยาศาสตร์ และนางสาวพัชรินทร์ ขาวสวย เจ้าหน้าที่ธุรการประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มอบคำแนะนำ เอื้อเพื่ออุปกรณ์สารเคมี เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ตลอดการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณ นางสาวอังคนางค์ โสวจิตสตากุล นางสาวสุนิสา บันสุข นางสาวณิชนันท์ ทินปราณี นางสาวอมรรัตน์ พวงพลับ นางสาวยุวดี คำแหง นายณัฐนนท์ ชินชูศักดิ์ นายรชานนท์ มั่นกิจ และนายกิตติพัฒน์ วาริชนันท์ นักศึกษาประจำห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำปรึกษาและการช่วยเหลือต่างๆ

กราบขอบพระคุณ นายคณิต เสรีตระกูล บิดา และนางชนิษฐา เสรีตระกูล มารดา ที่มอบกำลังใจที่ดีเสมอมาและสนับสนุนทุกอย่างตลอดการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้

นางสาวกชพร เสรีตระกูล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญรูป	ท
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 พลังงานไฮโดรเจน	5
2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	7
2.2.1 กระบวนการทางความร้อนเคมี	7
2.2.2 กระบวนการทางเคมีไฟฟ้าหรือการแยกโมเลกุลน้ำด้วยไฟฟ้า	8
2.2.3 กระบวนการผลิตทางชีวภาพ	9
2.2.3.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis)	10
2.2.3.2 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis)	11
2.2.3.3 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง (Photo-fermentation)	12
2.2.3.4 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark-fermentation)	13
2.2.3.5 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการเปลี่ยนรูปวอเตอร์แก๊ส (Water gas shift reaction)	13
2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจน	14
2.3.1 แบคทีเรีย (Bacteria)	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.1.1 แบคทีเรียที่สังเคราะห์แสง	14
2.3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมัก	14
2.3.2 ไชยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)	14
2.3.3 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)	15
2.4 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว	17
2.4.1 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ขึ้นกับระบบแสงที่สอง	17
2.4.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ขึ้นกับระบบแสงที่สอง	19
2.5 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว	20
2.6 เอนไซม์ FeFe-hydrogenase	22
2.7 ความไวต่อออกซิเจนของเอนไซม์ FeFe-hydrogenase	23
2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	25
2.8.1 สภาวะการขาดแหล่งอาหารและแร่ธาตุ	25
2.8.1.1 สภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์ (Sulfur deprivation)	25
2.8.1.2 สภาวะการขาดแหล่งฟอสฟอรัส (Phosphorus deprivation)	26
2.8.1.3 สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen deprivation)	26
2.8.1.4 สภาวะการขาดแหล่งโพแทสเซียม (Potassium deprivation)	26
2.8.2 แหล่งคาร์บอน (Carbon source)	27
2.8.3 แสง (Light)	27
2.8.4 อุณหภูมิ (Temperature)	27
2.8.5 พีเอช (pH)	27
2.8.6 สารตัวให้อิเล็กตรอน (Reducing agent)	28
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	28
2.9.1 งานวิจัยความไวต่อออกซิเจนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสต่อการผลิตไฮโดรเจน	28
2.9.2 งานวิจัยผลของการขาดอาหารและแร่ธาตุต่อการผลิตไฮโดรเจน	29
2.9.3 งานวิจัยผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจน	30
2.9.4 งานวิจัยผลของสารยับยั้งและสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจน	31
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง	33
3.2 อุปกรณ์	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว	36
3.4 สารเคมี	37
3.4.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	37
3.4.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์	37
3.4.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส	38
3.4.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแป้ง	38
3.4.5 สารรีดิวซ์สำหรับให้อิเล็กตรอนแก่เซลล์สาหร่าย	38
3.5 ก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนและออกซิเจน	38
3.6 วิธีการทดลอง	39
3.6.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว	39
3.6.1.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวบนอาหารแข็ง	39
3.6.1.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว	39
3.6.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์	39
3.6.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน	40
3.6.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนบริเวณ Headspace	41
3.6.5 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส	41
3.6.6 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและหายใจ	42
3.6.7 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแป้ง	42
3.6.8 วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจน	43
3.6.9 วิธีการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดเลือก	43
3.6.9.1 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	43
3.6.9.2 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	44
3.6.9.3 วิธีการศึกษาอายุเซลล์ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	44
3.6.9.4 วิธีการศึกษาความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6.9.5 วิธีการศึกษาการขาดธาตุอาหารต่างๆต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	45
3.6.9.6 วิธีการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	45
3.6.9.7 วิธีการศึกษาผลของความเข้มแสงและรูปแบบการให้แสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	46
3.6.9.8 วิธีการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	46
3.6.9.9 วิธีการศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	46
3.6.9.10 วิธีการศึกษาผลของสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	47
บทที่ 4 ผลวิจัยและอภิปรายผล	
4.1 การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน	48
4.1.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว	48
4.1.2 ผลการคัดเลือกเบื้องต้นของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน	50
4.1.3 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกเบื้องต้นภายใต้สภาวะที่มีแสง	53
4.1.4 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีแสงและออกซิเจนในบรรยากาศ	59
4.2 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	61
4.2.1 ผลของการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	61
4.2.2 ผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.3 ผลของความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย สีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	70
4.2.4 ผลของการขาดแหล่งอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	73
4.2.5 ผลของการขาดธาตุอาหารร่วมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย สีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	77
4.2.6 ผลการศึกษาเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย สีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ภายใต้สภาวะการขาดธาตุโพแทสเซียม	82
4.2.6.1 ปริมาณไฮโดรเจนและปริมาณออกซิเจนใน headspace ภายใต้สภาวะการขาดโพแทสเซียม	82
4.2.6.2 ผลการเปลี่ยนแปลงออกซิเจนจากการสังเคราะห์แสง และหายใจภายใต้สภาวะการขาดโพแทสเซียม	84
4.2.6.3 ผลการศึกษาปริมาณแป้งภายใต้สภาวะการขาดโพแทสเซียม	85
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ	86
4.3.1 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต ไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ	87
4.3.1.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน	87
4.3.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	91
4.3.2 ผลการศึกษาความเข้มแสงและรูปแบบการให้แสงต่อการผลิตไฮโดรเจน ของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ	93
4.3.2.1 ผลการศึกษาความเข้มแสง	93
4.3.2.2 ผลการศึกษารูปแบบการให้แสง	95
4.3.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ	97
4.3.4 ผลการศึกษาพีเอชของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ	99

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.5 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารที่ให้อิเล็กตรอนในอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ	102
4.3.6 การเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในสภาวะที่เหมาะสมและสภาวะปกติ	109
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย	117
5.1.1 การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนต่างๆ	117
5.1.2 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	117
5.1.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ	119
5.2 ข้อเสนอแนะ	119
เอกสารอ้างอิง	120
ภาคผนวก ก สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง	135
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP)	141
ภาคผนวก ค วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณออกซิเจน	144
ภาคผนวก ง วิธีการนับเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์	145
ภาคผนวก จ ปริมาณไฮโดรเจน	146
ภาคผนวก ฉ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA	147
ประวัติผู้เขียน	176

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การเปรียบเทียบปริมาณไฮโดรเจนอะตอมในโมเลกุลและค่าพลังงานความร้อนจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ	6
2.2 เอนไซม์ที่ใช้, แหล่งพลังงานและตัวให้อิเล็กตรอนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	16
3.1 สาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย	33
3.2 สาหร่ายสีเขียวที่ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย	34
3.3 สาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ที่ใช้ในการศึกษาที่ซื้อมาจาก Chlamydomonas resource center	35
3.4 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph Thermal Conductivity Detector (GC-TCD))	41
4.1 ความกว้างและความยาวโดยประมาณของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 24 สายพันธุ์ที่ถูกแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา	49
4.2 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 24 สายพันธุ์ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนเริ่มต้น 0, 10, 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	51
4.3 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 5 สายพันธุ์ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนเริ่มต้น 0, 1, 2.5, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	54
4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 5 สายพันธุ์ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนเริ่มต้น 0, 1, 2.5, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	56
4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดและปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 5 สายพันธุ์ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.6 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (D_t) ของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	63
4.7 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเทียบกับความหนาแน่นของเซลล์จากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 และสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่เวลา 24 ชั่วโมง	72
4.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 และสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	74
4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K, TAP-KN, TAP-KP, TAP-KS, TAP-KNP, TAP-KNS และ TAP-KPS ภายใต้แสงที่มีความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) บ่มเป็นเวลา 0-168 ชั่วโมง	81
4.10 ปริมาณของแป้งสะสมในเซลล์จากสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-K	86
4.11 อัตราการผลิตและปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 บ่มที่ในอาหาร TAP-K ที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ภายใต้แสงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง	88
4.12 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดและค่าพีเอชที่ควบคุมฟอสเฟตบัฟเฟอร์	100
4.13 ค่าพีเอชของอาหารที่มีสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ซึ่งบ่มในอาหาร TAP-K และอาหาร TAP-K ที่เติมสารรีดิวซ์ 4 ชนิด ได้แก่ กรดออกซาลิก กรดแอสคอร์บิก ซิสเทอีน และโซเดียมไดไฮโอไนต์ ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 12, 48, 96 และ 144 ชั่วโมง	108
4.14 การเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร TAP, TAP (Air), TAP-K และ Optimized TAP-K และสถานะของการบ่มเซลล์	110
4.15 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 เปรียบเทียบกับสาหร่าย <i>Scenedesmus</i> sp. สายพันธุ์อื่นๆ ภายใต้สภาวะการบ่มที่ต่างกัน	114

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข 1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ที่ขาดแหล่งอาหารต่างๆ	142
ข 2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ขาดซัลเฟอร์ (TAP-S) ร่วมกับขาดแหล่งอาหารอื่น	142
ข 3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ขาดโพแทสเซียม (TAP-K) ร่วมกับขาดแหล่งอาหารอื่น	143
จ 1 ปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 5 สายพันธุ์ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่ความเข้มข้นของออกซิเจนเริ่มต้น 0, 1, 2.5, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	146
ฉ 1 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อ ปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีดของสาหร่ายจำนวน 21 สายพันธุ์	147
ฉ 2 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อ ปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีดของสาหร่ายจำนวน 21 สายพันธุ์	148
ฉ 3 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อ ปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีดของสาหร่ายจำนวน 21 สายพันธุ์	149
ฉ 4 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อ ปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีดของสาหร่ายจำนวน 21 สายพันธุ์	150
ฉ 5 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อ ปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีแสงของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์	151
ฉ 6 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อ ปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีแสงของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์	151
ฉ 7 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อ ปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีแสงของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์	152

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ฉ 8 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีแสงของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์	152
ฉ 9 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีแสงของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์	153
ฉ 10 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีแสงของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์	153
ฉ 11 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาค่า O_2 จากกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ ที่มีความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 0-20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)	154
ฉ 12 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์	154
ฉ 13 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์	155
ฉ 14 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์	155
ฉ 15 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์	156
ฉ 16 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์	156

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ฉ 17 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์	157
ฉ 18 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์	157
ฉ 19 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ เวลา 24 ชั่วโมง	158
ฉ 20 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ เวลา 48 ชั่วโมง	158
ฉ 21 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ เวลา 72 ชั่วโมง	159
ฉ 22 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ เวลา 96 ชั่วโมง	159
ฉ 23 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาอายุเซลล์ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125	160
ฉ 24 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาอายุเซลล์ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	160
ฉ 25 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125	161
ฉ 26 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	161

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ฉ 27 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง)	162
ฉ 28 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง)	162
ฉ 29 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 (มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง)	163
ฉ 30 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 (มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง)	163
ฉ 31 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที่)	164
ฉ 32 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที่)	164
ฉ 33 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 (มิลลิลิตรต่อลิตรต่อนาที่)	165
ฉ 34 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 (มิลลิลิตรต่อลิตรต่อนาที่)	165
ฉ 35 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารร่วมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง)	166

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ฉ 36 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารร่วมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 (มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง)	166
ฉ 37 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP ต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง	167
ฉ 38 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง	167
ฉ 39 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP ต่อกระบวนการหายใจ	168
ฉ 40 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ต่อกระบวนการหายใจ	168
ฉ 41 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 เมื่อบ่มเซลล์ 24 ชั่วโมง	169
ฉ 42 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 เมื่อบ่มเซลล์ 48 ชั่วโมง	169
ฉ 43 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 เมื่อบ่มเซลล์ 72 ชั่วโมง	170
ฉ 44 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 เมื่อบ่มเซลล์ 96 ชั่วโมง	170

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ฉ 45 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 เมื่อบ่มเซลล์ 24 ชั่วโมง	171
ฉ 46 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 เมื่อบ่มเซลล์ 48 ชั่วโมง	171
ฉ 47 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 เมื่อบ่มเซลล์ 72 ชั่วโมง	172
ฉ 48 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 เมื่อบ่มเซลล์ 96 ชั่วโมง	172
ฉ 49 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซิติกต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	173
ฉ 50 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มแสงต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	173
ฉ 51 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาอุณหภูมิต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	174
ฉ 52 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	174
ฉ 53 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาชนิดของสารให้อิเล็กตรอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	175
ฉ 54 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาสถานะการบ่มเซลล์ที่เหมาะสมของสาหร่ายต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน	175

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การปลดปล่อยของคาร์บอนของการเผาไหม้เซลล์เชื้อเพลิงชนิดต่างๆ (หน่วยต่อกิโลเมตร)	7
2.2 กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า	9
2.3 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง	10
2.4 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม	11
2.5 การผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง	12
2.6 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ที่ขึ้นกับระบบแสงที่สอง	18
2.7 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ที่ไม่ขึ้นกับระบบแสงที่สอง	19
2.8 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ Fe-hydrogenase และ NiFe-hydrogenase	21
2.9 โครงสร้าง H-cluster ของเอนไซม์ Fe-hydrogenase	23
2.10 การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวในสถานะที่มีและไม่มีก๊าซออกซิเจน	24
2.11 การขัดขวางการทำงานของ Fe-hydrogenase เมื่อมีก๊าซออกซิเจน	24
4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ <i>C. reinhardtii</i> CC-125 (□) และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP จากการวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร(A) จากความเข้มข้นคลอโรฟิลล์(B) และจากการนับความหนาแน่นของเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์(C)	62
4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ <i>C. reinhardtii</i> CC-125 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่มีอายุเซลล์ 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง ที่บ่มภายใต้สภาวะมีออกซิเจน ในบรรยากาศ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	67
4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่มีการปรับค่าความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD ₇₅₀) ที่แตกต่างกันและบ่มภายใต้สภาวะที่มีความ เข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	70

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.4 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (A) และหน่วยมิลลิลิตรต่อลิตร (B) ของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125 ที่บ่มในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ร่วมกับขาดธาตุอาหารชนิดอื่นๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 0-168 ชั่วโมง	78
4.5 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (A) และหน่วยมิลลิลิตรต่อลิตร (B) ของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมร่วมกับขาดธาตุอาหารชนิดอื่นๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 0-168 ชั่วโมง	79
4.6 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณของออกซิเจนใน headspace (A) และกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (B) ของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-K ภายใต้สภาวะที่มีแสงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน)	83
4.7 อัตราของกระบวนการสังเคราะห์แสงและหายใจจากสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-K ภายใต้แสงที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 0-96 ชั่วโมง	85
4.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซิติก ภายใต้สภาวะที่มีแสงและที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	91
4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ และมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	94
4.10 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ภายใต้แสงที่แปรผันรูปแบบการให้แสงต่างๆ โดยพื้นหลังสีขาวแสดงการบ่มเซลล์ในที่มีแสงที่ความเข้ม 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และพื้นหลังสีเทาแสดงการบ่มเซลล์ในที่มืด เซลล์สาหร่ายถูกบ่มภายใต้สภาวะมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 0-100 ชั่วโมง	96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11 อัตราการการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้ม 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีการแปรผันอุณหภูมิของการบ่มที่ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส และให้ออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	98
4.12 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่แปรผันพีเอชเริ่มต้นที่ 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.2, 7.5, 8, 8.5 และ 9 ภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	100
4.13 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K และแปรผันของสารให้อิเล็กตรอน ภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	103
4.14 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K และแปรผันของสารให้อิเล็กตรอน 4 ชนิด ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก (A), ซิสเทอีน (B), โซเดียมไดไฮโอไนต์ (C) และ กรดออกซาลิก (D) ที่ปรับความเข้มข้นของสารรีดิวซ์เป็น 0.1, 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้ม 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 0-168 ชั่วโมง	106
4.15 ปริมาณออกซิเจนบริเวณ headspace ของขวดที่มีสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่แปรผันของสารให้อิเล็กตรอน 4 ชนิด ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก (A), ซิสเทอีน (B), โซเดียมไดไฮโอไนต์ (C) และ กรดออกซาลิก (D) ที่ปรับความเข้มข้นของสารรีดิวซ์เป็น 0.1, 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้ม 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 0-168 ชั่วโมง	107
4.16 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (A) และปริมาณไฮโดรเจนสะสมทั้งหมด (B) ของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP (Air), TAP-K และ Optimized TAP-K ภายใต้สภาวะการบ่มเซลล์ที่แตกต่างกัน	111

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ก 1 สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. 1SinS1(A), <i>Chlorella</i> sp. 2SinS4(B), <i>Chlorella</i> sp. 2TKS2.2(C), <i>Chlorella</i> sp. ChiW1(D) และ <i>Chlorella</i> sp. KMITL CirG(E)	135
ก 2 สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiS4(A), <i>Chlorella</i> sp. LSD-W1(B), <i>Coelastrum microporum</i> TISTR 8568(C), <i>Coelastrum reticulatum</i> TISTR 8562(D), <i>Coelastella</i> sp. CH(E), <i>Coelastrum</i> sp. SD(F), <i>Micractinium</i> sp. A25.1(G), <i>Scenedesmus obliquus</i> TISTR 8546(H), <i>Tetraspora</i> sp. CU2551(I) และ Undetected WTK-W3.1(J)	136
ก 3 สาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> sp. KMITL OVG-1 และ Undetected B35.1	138
ก 4 สาหร่ายสีเขียว <i>Monoraphidium branuii</i> TISTR 8553	139
ก 5 สาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus armatus</i> TISTR 8641 และ <i>Scenedesmus</i> sp. L	139
ก 6 สาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124 (A), <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-125 (B), <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-4147 (C) และ <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-503 (D)	140
ง 1 อีโมไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	145

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ในปัจจุบัน จากการศึกษาพบว่าประชากรเพิ่มขึ้น มีการขยายตัวทางเศรษฐกิจและมีความเจริญก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมากขึ้น พลังงานจึงจัดเป็นสิ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์และยังทวีความสำคัญเพิ่มมากขึ้น แหล่งพลังงานที่มนุษย์ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิลหรือเชื้อเพลิงจากซากดึกดำบรรพ์ ซึ่งเชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดตามสถานะของเชื้อเพลิง คือ (1) ถ่านหินซึ่งมีสถานะเป็นของแข็ง (2) น้ำมันดิบซึ่งมีสถานะเป็นของเหลว และ (3) ก๊าซธรรมชาติซึ่งมีสถานะเป็นก๊าซ เชื้อเพลิงฟอสซิลที่กล่าวมาข้างต้นมีอยู่ในปริมาณที่จำกัดและไม่สามารถหมุนเวียนนำกลับมาใช้ใหม่ หากมนุษย์ยังคงใช้เชื้อเพลิงเหล่านี้อย่างฟุ่มเฟือยและไม่แสวงหาพลังงานทางเลือกมาทดแทน เชื้อเพลิงเหล่านี้จะหมดลงในระยะเวลาอันใกล้ นอกจากนี้ การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิลยังก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการปลดปล่อยก๊าซพิษต่างๆ ซึ่งได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เป็นต้น การสะสมของก๊าซเหล่านี้ในบรรยากาศโลกทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก (Greenhouse effect) และนำไปสู่ภาวะโลกร้อน (Global warming) ประเทศไทยประสบปัญหาที่สำคัญ คือ ปัญหาการขาดแคลนแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิล ถึงแม้ว่าประเทศไทยจะมีแหล่งพลังงานเหล่านี้อยู่บ้าง แต่ยังมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการอุปโภคในประเทศ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องนำเข้าพลังงานเชื้อเพลิงจากต่างประเทศ ทำให้น้ำมันเชื้อเพลิงมีราคาสูงขึ้น ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยที่เกี่ยวข้องจึงมีความพยายามแสวงหาแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่เพื่อมาทดแทนแหล่งพลังงานเดิม โดยพลังงานทางเลือกนี้ควรเป็นพลังงานหมุนเวียนและไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิง พลังงานทางเลือกที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานน้ำ พลังงานลม พลังงานจากมวลชีวภาพ และพลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น

พลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen: H_2) จัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากการเผาไหม้ไฮโดรเจนจะให้ค่าพลังงานสูง โดยให้ค่าความร้อนมากกว่าเชื้อเพลิงอื่นๆ 2-3 เท่า นอกจากนี้ ไฮโดรเจนยังเป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด ไม่ก่อให้เกิดมลพิษใดๆ จากการเผาไหม้ เมื่อเผาไหม้ด้วยออกซิเจนจะได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์ และไม่ปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นต้นเหตุสำคัญของภาวะโลกร้อน พลังงานไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากหลายกระบวนการ เช่น กระบวนการทางความร้อนเคมี กระบวนการเคมีไฟฟ้า และ กระบวนการทางชีวภาพ เป็นต้น กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพเป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์

หรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ผู้ใดเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไชยาโนแบคทีเรีย และ สาหร่ายสีเขียว เป็นต้น สาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการผลิตไฮโดรเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยพลังงานจากแสงอาทิตย์ผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงและใช้เพียงน้ำเป็นแหล่งอิเล็กตรอน นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวยังสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้สารอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนได้เช่นเดียวกับแบคทีเรีย

สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต (Eukaryote) ซึ่งสามารถสร้างอาหารเองได้จากกระบวนการการสังเคราะห์ด้วยแสง สาหร่ายสีเขียวจัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Chlorophyta) ซึ่งเป็นกลุ่มสาหร่ายที่พบมากที่สุดคือมีประมาณ 8,000 สปีชีส์ สาหร่ายสีเขียวสามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำ มีทั้งเป็นเซลล์เดี่ยวและกลุ่มเซลล์ และสามารถใช้อินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโต สาหร่ายสีเขียวมีกลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากอิเล็กตรอนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการสลายคาร์โบไฮเดรตที่สะสมภายในเซลล์ในกระบวนการสังเคราะห์แสง เมื่อศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาระบบแสงที่สอง (Photosystem II: PSII) ได้รับพลังงานแสง โมเลกุลของน้ำจะแตกตัวได้ผลิตภัณฑ์เป็น ออกซิเจน โปรตอน และ อิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไปและส่งต่อกันเป็นลำดับถัดๆ ไป โดยส่งอิเล็กตรอนผ่านพลาสโทควิโนน (Plastoquinone) ไซโทโครมคอมเพล็กซ์ (Cytochrome complex) ระบบแสงที่หนึ่ง (Photosystem I: PSI) จนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย คือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) เฟอร์รีดอกซินจะส่งอิเล็กตรอนให้กับโปรตอนเพื่อผลิตเป็นไฮโดรเจนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) สำหรับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการสลายคาร์โบไฮเดรตที่สะสมภายในเซลล์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการย่อย ดังนี้ (1) กระบวนการสลายแป้งไปเป็นไพรูเวท โดยจะมีการสร้าง ATP และ NAD(P)H เกิดขึ้น จากนั้น เอนไซม์เอ็นเอดีพี/พลาสโทควิโนนออกซิโดรีดักเทส (NADPH plastoquinone oxidoreductase: NPQR) นำอิเล็กตรอนออกจาก NADPH ไปให้พลาสโทควิโนน และส่งต่ออิเล็กตรอนไปยังระบบแสงที่หนึ่งเพื่อผลิตไฮโดรเจนจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (2) กระบวนการสลายไพรูเวทให้ได้อะซิลโคเอ (Acetyl-CoA) และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวท:เฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส (Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase : PFOR) จากนั้น ส่งอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจนต่อไป

เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนและเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับ โดยเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนได้ผลิตภัณฑ์เป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ตามชนิดของไอออนของโลหะที่อยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น (Active site) ของเอนไซม์ คือ (1) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีนิกเกิลและเหล็กอยู่ในบริเวณกระตุ้น (NiFe-hydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในแบคทีเรียและไชยาโนแบคทีเรีย (2) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สที่มีเหล็กอยู่ในบริเวณกระตุ้น (FeFe-hydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในสาหร่ายสีเขียว และ (3) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ปราศจากไอออนของโลหะในบริเวณกระตุ้น (Metal-free hydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตอาร์เคียกลุ่มเมทาโนเจน (Methanogenic archaea)

เอนไซม์ FeFe-hydrogenase ประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็กไอออน (Fe^{2+}) 2 อะตอมอยู่ที่ศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น โดยเหล็กไอออนจะจับกับอะตอมของซัลเฟอร์ของกรดอะมิโนซิสเทอีนของเอนไซม์ เอนไซม์ FeFe-hydrogenase ประกอบด้วยคลัสเตอร์ของ $2Fe-2S$ และ $4Fe-4S$ โดยซัลเฟอร์เปรียบเสมือนเป็นสะพานในการเชื่อมระหว่างโลหะ นอกจากอะตอมของเหล็กไอออนที่อยู่บริเวณศูนย์กลางของเอนไซม์ที่จับกับกรดอะมิโนซิสเทอีนแล้ว เหล็กไอออนยังจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และไซยาไนด์ (CN) อีกด้วย เมื่ออิเล็กตรอนจากเฟอร์ริดอกซินถูกส่งมาบริเวณเร่งของเอนไซม์ อิเล็กตรอนจะส่งผ่านไปยังเหล็กไอออน และในที่สุดจะไปรวมกับโปรตอนได้เป็นไฮโดรเจนเกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม หากมีก๊าซออกซิเจนซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานแบบแข่งขัน (Competitive Inhibitor) ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเกิดขึ้น ออกซิเจนจะเข้าไปจับกับเหล็กไอออนแทนโปรตอน ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีความไวต่อก๊าซออกซิเจนสูง โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และมีผลต่อการแสดงออกของยีนไฮโดรจีเนส ถ้าความเข้มข้นของออกซิเจนในระบบต่ำ จะส่งผลให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง ในทางตรงกันข้าม หากมีความเข้มข้นของออกซิเจนในระบบสูง จะส่งผลให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณต่ำ ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวจึงมักเกิดภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศ (Anaerobic condition) งานวิจัยนี้ จึงสนใจศึกษาการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในอากาศ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการพ่นอาร์กอนที่ทำให้ระบบอยู่ในสภาวะปราศจากอากาศ โดยทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการจำนวน 24 ไอโซเลทภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนความเข้มข้นต่างๆและสภาวะ ดังนี้ (1) ปัจจัยทางกายภาพ เช่น อายุเซลล์ ความเข้มข้นของเซลล์ พีเอช ความเข้มข้น อุณหภูมิ เป็นต้น (2) ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ การขาดแร่ธาตุชนิดต่างๆ เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ฯลฯ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และชนิดและความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่ให้อิเล็กตรอน เป็นต้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) คัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน
- 2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) คัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว Tris-Acetate-Phosphate (TAP) นำสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงไปบ่มในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนเท่ากับ 0, 1, 2.5, 5, 10, 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่ผ่านอาร์กอน) จากนั้น วัดการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสผ่านสารเมธิลไวโอโลเจน (Methylviologen) และไดไทโอไนท์ (Dithionite) ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

2) ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก โดยทำการแปรผัน ระดับความเข้มข้นของออกซิเจน อายุเซลล์ ความเข้มข้นของเซลล์ พีเอช ความเข้มแสง อุณหภูมิ การขาดแร่ธาตุชนิดต่างๆ เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และชนิดและความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่ให้อิเล็กทรอนิกส์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทำให้ทราบสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน
- 2) ทำให้ทราบปัจจัยที่เหมาะสมต่อผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือกภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลังงานไฮโดรเจน

พลังงานเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์และมีความสำคัญต่อการพัฒนาประเทศ ในปัจจุบัน ประชากรโลกมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ทำให้ต้องมีการขยายตัวทางเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม รวมทั้งมีความต้องการในการใช้พลังงานสูงขึ้น แหล่งพลังงานที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิลหรือเชื้อเพลิงจากซากดึกดำบรรพ์ ซึ่งเชื้อเพลิงฟอสซิลสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดตามสถานะของเชื้อเพลิง คือ (1) ถ่านหินซึ่งมีสถานะเป็นของแข็ง (2) น้ำมันดิบซึ่งมีสถานะเป็นของเหลว และ (3) ก๊าซธรรมชาติซึ่งมีสถานะเป็นก๊าซ การใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นแหล่งเชื้อเพลิงหลักมีข้อจำกัดที่สำคัญคือ ปริมาณของเชื้อเพลิงมีจำกัด ซึ่งคาดว่าพลังงานฟอสซิลเหล่านี้จะหมดลงในระยะเวลาอันใกล้ นอกจากนี้ เชื้อเพลิงฟอสซิลยังไม่สามารถหมุนเวียนนำกลับมาใช้ได้อีก รวมทั้งการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลที่เมืองค์ประกอบของไฮโดรคาร์บอนจะปลดปล่อยก๊าซเสียต่างๆ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ก๊าซมีเทน เป็นต้น การสะสมของก๊าซเหล่านี้ในชั้นบรรยากาศโลกก่อให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจกและนำไปสู่สภาวะโลกร้อน

ประเทศไทยมีแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลที่สำคัญ คือ น้ำมันดิบและก๊าซธรรมชาติ มีรายงานพบว่าประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตน้ำมันดิบประมาณ 151 พันบาร์เรลต่อวัน หรือคิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ของความต้องการอุปโภคภายในประเทศ ด้วยเหตุนี้ ประเทศไทยจึงต้องนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศสูงถึง 866 พันบาร์เรลต่อวัน หรือคิดเป็น 85 เปอร์เซ็นต์ของความต้องการ (สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน, 2560) นอกจากนี้ การเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลยังปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ emission) โดยจากงานวิจัยปี ค.ศ. 2004 พบว่าการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 7 กิกะตันของคาร์บอนต่อปี (GtC/year) และนักวิจัยคาดว่าในปี ค.ศ. 2050 จะมีการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงถึง 14 กิกะตันของคาร์บอนต่อปี (Pacala and Socolow, 2004) ดังนั้น นักวิจัยจึงต้องคิดค้นแสวงหาแหล่งพลังงานทางเลือก แหล่งใหม่มาทดแทนแหล่งพลังงานเดิมที่กำลังจะหมดลง โดยปัจจัยต่างๆ ที่นักวิจัยควรคำนึงถึงในการแสวงหาแหล่งพลังงานทางเลือก ได้แก่ ค่าพลังงาน ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ความยั่งยืนของพลังงาน หรือสามารถหมุนเวียนได้ ความปลอดภัย วัสดุที่ใช้ การใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า และราคาต้นทุนการผลิต เป็นต้น พลังงานทางเลือกแหล่งใหม่ที่ได้รับ ความสนใจในปัจจุบัน ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานน้ำ พลังงานลม มวลชีวภาพ และพลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

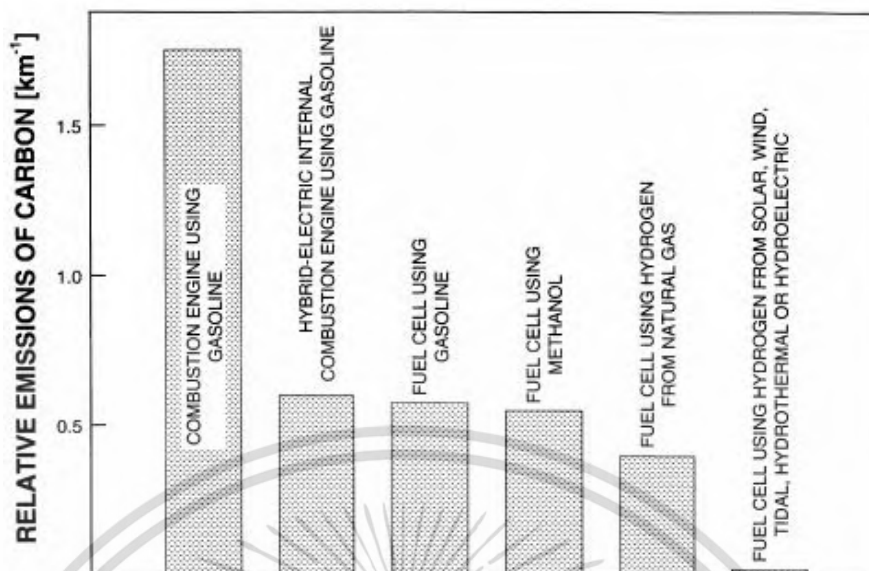
ไฮโดรเจนอะตอม (Hydrogen atom, H) ถูกค้นพบโดยเฮนรี คาเวนดิช (Henry Cavendish) ในปี ค.ศ. 1766 ไฮโดรเจนเป็นธาตุเคมีที่มีเลขอะตอมเท่ากับ 1 มีสัญลักษณ์ธาตุคือ H (^1H) ไฮโดรเจนมีน้ำหนักอะตอมเฉลี่ย 1.00794 กรัมต่อโมล ไฮโดรเจนอะตอมถือว่าเป็นธาตุที่เบาที่สุดและพบมากที่สุดในเอกภพ เมื่อไฮโดรเจนอะตอม 2 ตัวเชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนต์จะได้เป็นสสารสถานะใหม่คือ ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ก๊าซไฮโดรเจนถูกตั้งชื่อในปี ค.ศ. 1783 โดยองตวน ลาวัวซิเอ (Antoine-Laurent de Lavoisier) ก๊าซไฮโดรเจนมีจุดเดือด -252.87 องศาเซลเซียส มีจุดหลอมเหลว -259.16 องศาเซลเซียส (Wilt and Collier, 2001) คุณสมบัติโดยทั่วไปของก๊าซไฮโดรเจน คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ไม่มีความเป็นพิษ และเป็นก๊าซที่ไวไฟสูง ก๊าซไฮโดรเจนมีค่าพลังงานความร้อนจากการเผาไหม้สูงถึง 141.41 เมกะจูลต่อกิโลกรัม (Ali and Basit, 1993) โดยมีค่าพลังงานเชื้อเพลิงจากการเผาไหม้สูงกว่าพลังงานชนิดอื่นถึง 2-3 เท่า (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบปริมาณไฮโดรเจนอะตอมในโมเลกุลและค่าพลังงานความร้อนจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ (Ali and Basit, 1993)

เชื้อเพลิง	ปริมาณไฮโดรเจน (เปอร์เซ็นต์)	พลังงานความร้อน (เมกะจูลต่อกิโลกรัม)
ไฮโดรเจน (Hydrogen)	100.00	141.41
มีเทน (Methane)	25.00	51.61
อีเทน (Ethane)	20.00	51.80
โพรเพน (Propane)	18.18	50.17
น้ำมันก๊าด (Kerosene)	~ 10.00	~ 44.10
ไม้ (Wood)	~ 6.00	~ 16.25
ขี้เลื่อย (Sawdust)	~ 6.00	~ 15.75
ลิกไนต์ (Lignite)	< 6.00	16.00–22.00
แอนทราไซต์ (Anthracite)	< 3.00	34.49–35.00
ถ่านโค้ก (Coke)	< 1.00	29.00–31.00

การเผาไหม้ของไฮโดรเจนจะปลดปล่อยสารประกอบคาร์บอนที่น้อยกว่าการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงชนิดอื่น (รูปที่ 2.1) ไฮโดรเจนสามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับคริวเรือ สำหรับอุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมอากาศยานและยานยนต์ อุตสาหกรรมกลั่นน้ำมันเชื้อเพลิง และนำไปผลิตไฟฟ้า เป็นต้น ข้อได้เปรียบของก๊าซไฮโดรเจนคือสามารถผลิตจากแหล่งพลังงานแสงอาทิตย์ ลม น้ำ และความร้อนใต้พิภพ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 การปลดปล่อยของคาร์บอนของการเผาไหม้เซลล์เชื้อเพลิงชนิดต่างๆ (หน่วยต่อกิโลเมตร)
ที่มา: Bak *et al.*, 2002

2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน

ในปัจจุบัน ไฮโดรเจน (Hydrogen, H₂) สามารถผลิตได้จาก 3 กระบวนการหลัก คือ กระบวนการทางความร้อนเคมี กระบวนการทางเคมีไฟฟ้าหรือการแยกโมเลกุลน้ำด้วยไฟฟ้า และ กระบวนการทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิต

2.2.1 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางความร้อนเคมี

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีการทางความร้อนเคมี (Thermo-chemical process) เป็นการผลิตไฮโดรเจนจากการใช้ความร้อนในการเปลี่ยนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ชีวมวล หรือถ่านหิน ให้เป็นก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และ ก๊าซมีเทน จากนั้น ก๊าซผสมจะผ่านกระบวนการอื่นเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนที่บริสุทธิ์มากขึ้น กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางความร้อนเคมีสามารถแบ่งได้เป็นหลายกระบวนการ เช่น กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam reforming) กระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification) เป็นต้น (Saxena *et al.*, 2008)

กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำเป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการนำวัตถุดิบคือก๊าซธรรมชาติ ชีวมวล และเอทานอล มาทำปฏิกิริยากับไอน้ำที่มีความร้อนสูง ในอุตสาหกรรม ก๊าซมีเทน (CH₄) ที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการกลั่นน้ำมันปิโตรเลียมจะทำปฏิกิริยากับไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูงถึง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

700-1,000 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 3-25 บาร์ โดยปริมาณของไอน้ำจะมีผลต่อชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ เมื่อมีน้ำ 1 โมเลกุลมาทำปฏิกิริยากับมีเทนจะได้คาร์บอนมอนอกไซด์และไฮโดรเจน (สมการที่ 2.1) ถ้ามีน้ำ 2 โมเลกุลจะได้คาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (สมการที่ 2.2) เรียกกระบวนการนี้ว่า (Steam methane reforming)



กระบวนการแก๊สซิฟิเคชันเป็นการนำก๊าซธรรมชาติ ชีวมวล และเอทานอลมาทำปฏิกิริยากับออกซิเจนภายใต้อุณหภูมิสูงถึง 800-900 องศาเซลเซียสและปลดปล่อยก๊าซผสม เช่น คาร์บอนมอนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน น้ำ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น ปริมาณของออกซิเจนจะมีผลต่อชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน เมื่อก๊าซมีเทนทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (สมการที่ 2.3) ในบางกรณี ก๊าซมีเทนอาจทำปฏิกิริยาออกซิเดชันเพียงบางส่วน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และน้ำ (สมการที่ 2.4)



2.2.2 กระบวนการทางเคมีไฟฟ้าหรือการแยกโมเลกุลน้ำด้วยไฟฟ้า

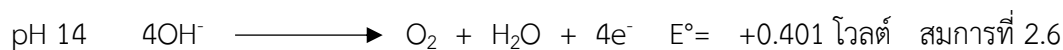
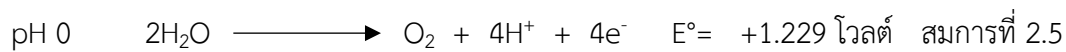
กระบวนการทางเคมีไฟฟ้า (Electro-chemical process) หรือการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrolysis of water) เป็นกระบวนการแยกองค์ประกอบของน้ำออกเป็นก๊าซออกซิเจนและก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในส่วนที่เรียกว่าอิเล็กโทรไลเซอร์ (Electrolyzer) ที่ทำหน้าที่เกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรไลซิสโดยการเติมสารอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte) เช่น กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ปฏิกิริยาการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยไฟฟ้าเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำและรีดักชันของโปรตอนที่ขั้วไฟฟ้าที่แตกต่างกัน ดังนี้

(1) ที่ขั้วแอโนด ในพีเอชที่เป็นกรด น้ำจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นก๊าซออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน โดยมีค่าศักย์ไฟฟ้าจากปฏิกิริยารีดักชัน (E°) ที่ขั้วอิเล็กโทรดเท่ากับ 1.229 โวลต์ (สมการที่ 2.5) ในพีเอชที่เป็นเบส ไฮดรอกไซด์ไอออนเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นก๊าซออกซิเจน น้ำ และอิเล็กตรอน โดยมีค่า E° เท่ากับ 0.401 โวลต์ (สมการที่ 2.6)

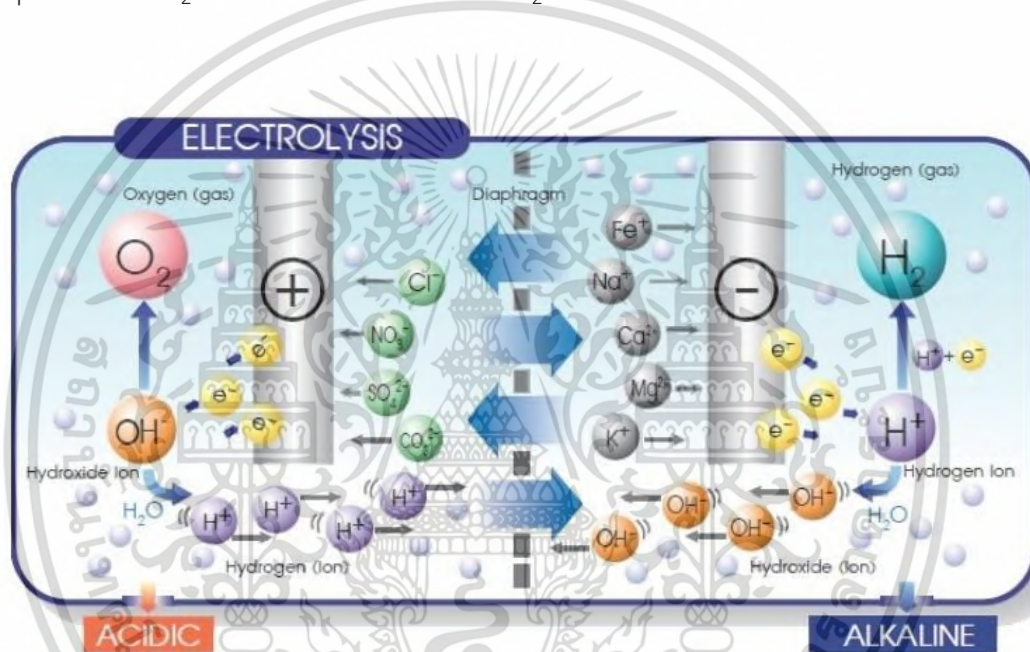
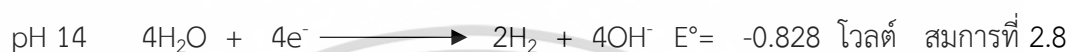
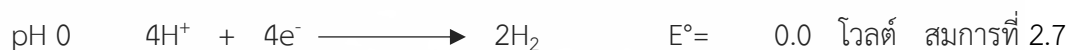
(2) ที่ขั้วแคโทด ในพีเอชที่เป็นกรด โปรตอนจะเกิดปฏิกิริยารีดักชัน ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นก๊าซไฮโดรเจน (สมการที่ 2.7) โดยมีค่า E° เท่ากับ 0.0 โวลต์ ในพีเอชที่เป็นเบส น้ำจะเกิดปฏิกิริยา

รีดักชัน ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นก๊าซไฮโดรเจนและไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) โดยมีค่า E° เท่ากับ 0.828 โวลต์ (สมการที่ 2.8) (Chaplin 2017) (รูปที่ 2.2)

ที่ขั้วแอโนด (Anode)



ที่ขั้วแคโทด (Cathode)



รูปที่ 2.2 กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า
ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางเคมีความร้อนและกระบวนการทางเคมีไฟฟ้ามีต้นทุนค่าใช้จ่ายสูง รวมทั้งต้องใช้พลังงานในการผลิตเป็นจำนวนมาก จึงเป็นอุปสรรคสำคัญในการผลิตไฮโดรเจน นักวิจัยจึงหันมาให้ความสนใจไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ

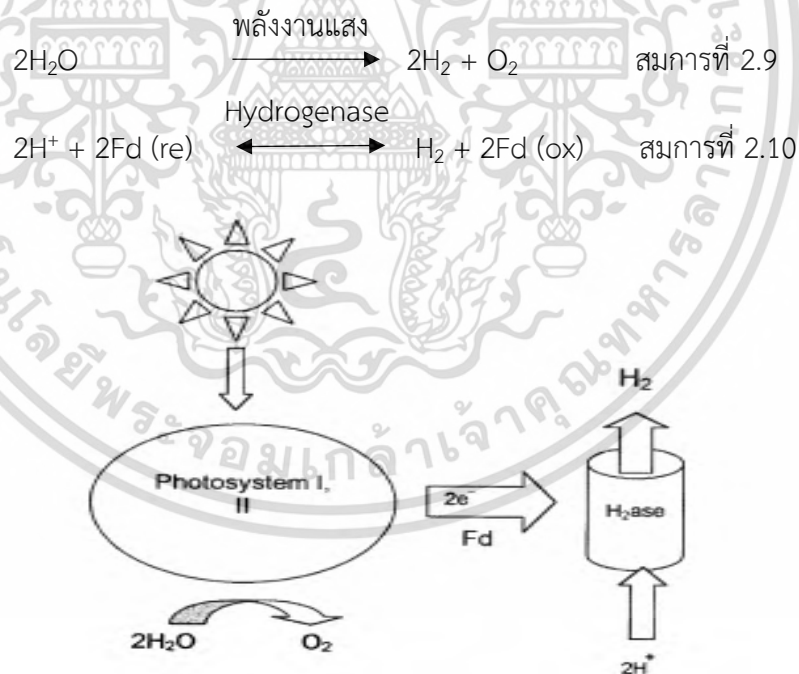
2.2.3 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ

ไฮโดรเจนที่ผลิตมาจากสิ่งมีชีวิตด้วยกระบวนการทางชีวภาพสามารถเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “ไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen)” จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด เช่น แบคทีเรียแบบที่เรียสเคราะหแสง ไชยานแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว เป็นต้น โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะผลิตไฮโดรเจนขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้อง เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซยาโนแบคทีเรีย สามารถผลิตไฮโดรเจนจากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) ส่วนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว สามารถผลิตไฮโดรเจนจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพสามารถแบ่งเป็น 5 กระบวนการหลักๆ ดังนี้

2.2.3.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis)

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง สามารถพบได้ในสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เมื่อระบบแสงที่สอง (Photosystem II, PSII) ของสาหร่ายได้รับพลังงานแสงจะเกิดการกระตุ้นการแตกตัวของโมเลกุลของน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน (O_2) โปรตอน (H^+) และอิเล็กตรอน (e^-) (สมการที่ 2.9) จากนั้น อิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังระบบแสงที่หนึ่ง (Photosystem I, PSI) และส่งต่อไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป จนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย คือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin, Fd) เฟอร์รีดอกซินจะส่งอิเล็กตรอนให้กับโปรตอนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (สมการที่ 2.10) (รูปที่ 2.3)

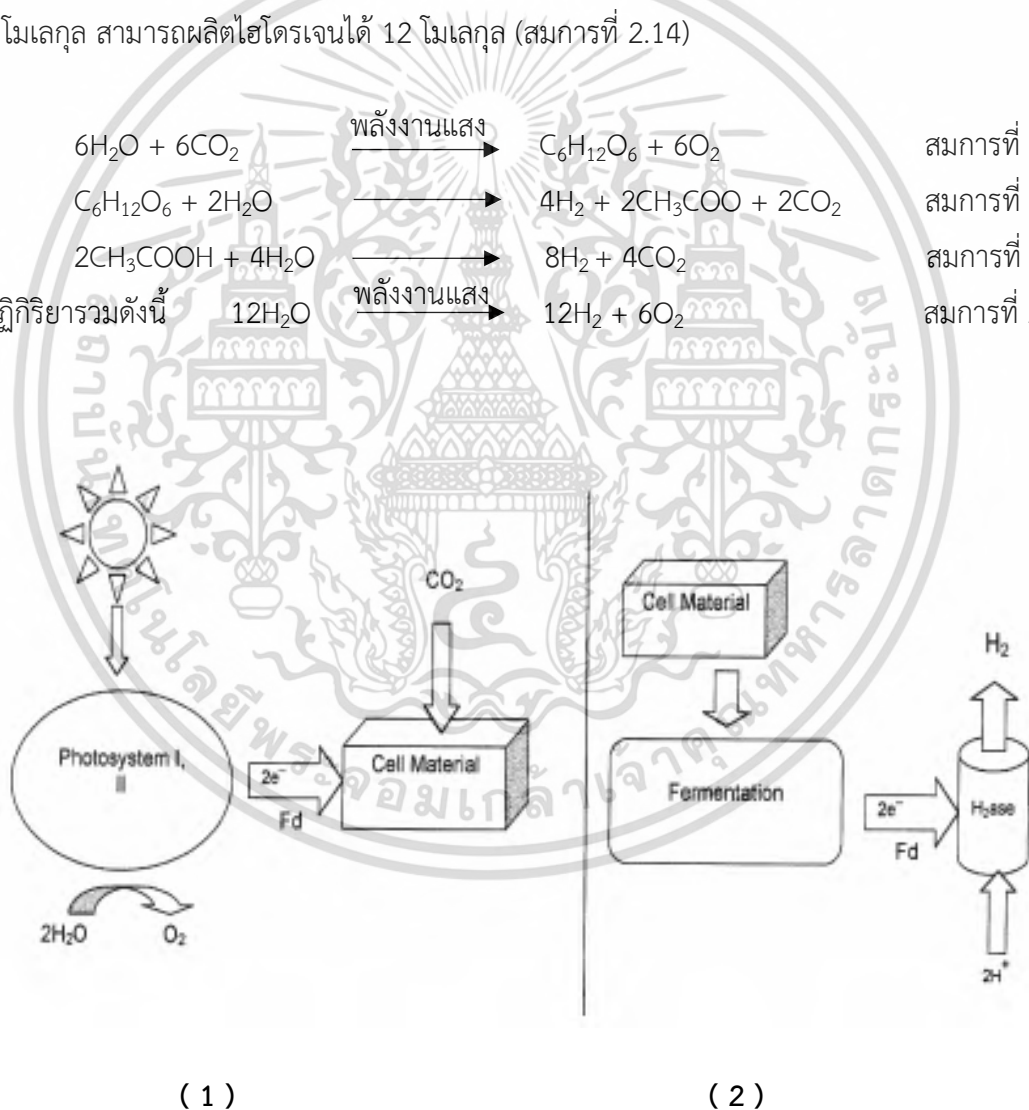
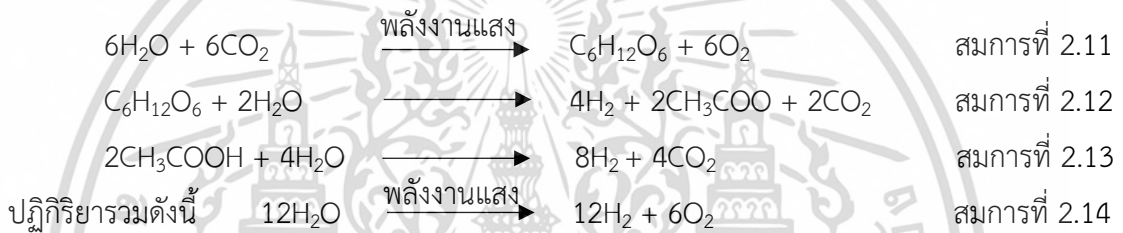


รูปที่ 2.3 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง
ที่มา: Hallenbeck and Benemann, 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.2 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis)

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการสลายโมเลกุลของน้ำด้วยพลังงานแสงแบบทางอ้อมสามารถพบได้ในสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการย่อยคือ (1) กระบวนการผลิตคาร์โบไฮเดรตโดยอาศัยการสังเคราะห์แสงในระบบแสงที่หนึ่งและสองร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (สมการที่ 2.11) (รูปที่ 2.4 (1)) (2) คาร์โบไฮเดรตจะถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซไฮโดรเจนและอะซีเตท (สมการที่ 2.12) (รูปที่ 2.4 (2)) อะซีเตทที่ผลิตได้จะถูกสลายไปเป็นโมเลกุลของไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ (สมการที่ 2.13) จากปฏิกิริยารวมทั้งหมด จะเห็นได้ว่าการสลายโมเลกุลของน้ำ 12 โมลหรือการสลายโมเลกุลของกลูโคส 1 โมเลกุล สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 12 โมเลกุล (สมการที่ 2.14)

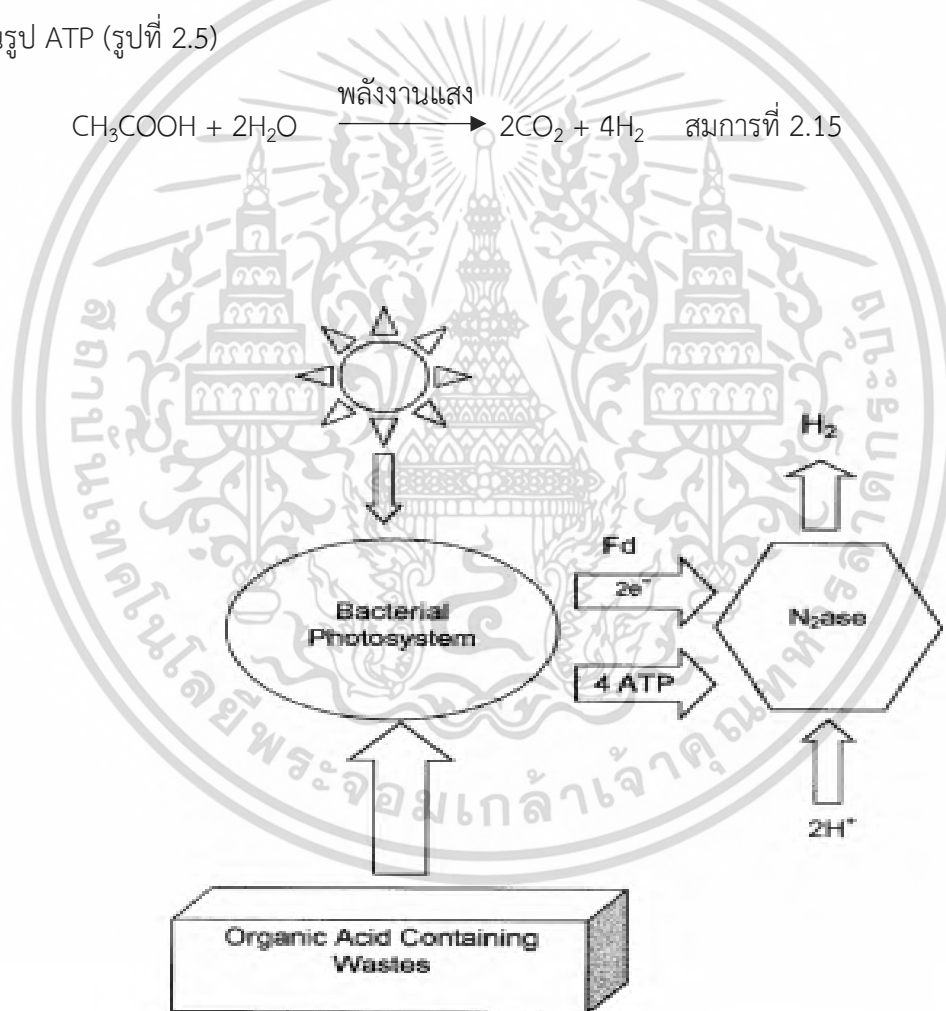
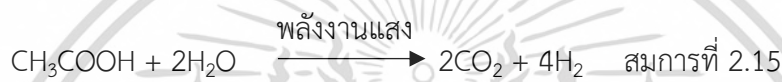


รูปที่ 2.4 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม
 ที่มา: Hallenbeck and Benemann, 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.3 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง (Photo-fermentation)

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง สามารถพบได้ในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Rhodobacter* sp. และ *Rhodospirillum* sp. กระบวนการนี้อาศัยการสังเคราะห์แสงและการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในการเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์จำพวกชีวมวล ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมหรือเกษตรกรรม เช่น อะซีเตท แลคเตท บิวทีเรท เป็นต้น ไปเป็นไฮโดรเจน (สมการที่ 2.15) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักในกลุ่มนี้จะมีระบบสังเคราะห์แสงเพียงระบบเดียว ภายใต้สภาวะไร้อากาศ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้กรดอินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่เฟอร์รีดอกซิน เฟอร์รีดอกซินจะส่งต่ออิเล็กตรอนไปยังเอนไซม์ไนโตรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน กระบวนการนี้อาศัยพลังงานในรูป ATP (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง

ที่มา: Hallenbeck and Benemann, 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.4 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark-fermentation)

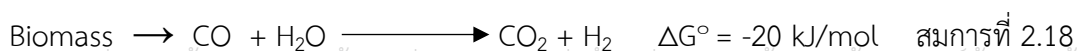
การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงสามารถพบในแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ กระบวนการนี้เป็นการย่อยสลายสารตั้งต้นจำพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น ของเสียอินทรีย์ ชีวมวล ของเสียทางการเกษตรกรรมและโรงงานอุตสาหกรรม และ น้ำตาลกลูโคส ให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก ฯลฯ นอกจากนี้ พลังงานและอิเล็กตรอนที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายยังสามารถนำไปผลิตไฮโดรเจนโดยผ่านทางการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส แบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง เช่น แบคทีเรีย *Clostridium* sp. (Hawkes *et al.*, 2002), *Escherichia coli* (Chittibabu *et al.*, 2006) และ *Alcaligenes eutrophus* เป็นต้น

ในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงนี้ เมื่อทำการหมักสารตั้งต้นกลูโคส 1 โมลจนได้ผลิตภัณฑ์หลักคือกรดอะซิติก จะสามารถสังเคราะห์ไฮโดรเจนได้ 4 โมล (สมการที่ 2.16) นอกจากนี้จะได้ผลิตภัณฑ์หลักคือกรดบิวทีริกแล้วยังได้ผลิตผลพลอยได้เป็นไฮโดรเจน 2 โมล (สมการที่ 2.17) (Hawkes *et al.*, 2002)



2.2.3.5 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการ Water gas shift reaction

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการ Water gas shift reaction เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการทำปฏิกิริยาของน้ำและคาร์บอนมอนอกไซด์ แบคทีเรียกลุ่มโฟโตเฮเทอโรโทรฟ (Photo-heterotrophic bacteria) เช่น *Rubrivivax gelatinosus*, และ *Rhodospirillaceae* sp. ฯลฯ สามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการนี้ โดยแบคทีเรียจะย่อยสลายชีวมวลเป็นคาร์บอนมอนอกไซด์และน้ำ จากนั้น แบคทีเรียใช้คาร์บอนมอนอกไซด์ทำปฏิกิริยากับน้ำ โดยอาศัยพลังงานในรูปอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosinetriphosphate, ATP) ได้ผลิตภัณฑ์คือก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (สมการที่ 2.18) มีรายงานวิจัยพบว่าแบคทีเรียในกระบวนการ Water gas shift reaction สามารถผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 96 มิลลิโมลของไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง ($\text{mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ซึ่งมากกว่าปริมาณไฮโดรเจนที่ถูกผลิตจากแบคทีเรียในกระบวนการหมักในที่มีดเท่ากับ 20-50 $\text{mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ รวมทั้งราคาต้นทุนการผลิตไฮโดรเจนของกระบวนการ Water gas shift reaction ถูกกว่ากระบวนการหมักในที่มีดประมาณ 4-5 เท่า (Saxena *et al.*, 2009)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามใด ๆ ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจน

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถจัดจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

2.3.1 แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในกลุ่มโพรคาริโอต (Prokaryote) สามารถพบทั่วไปในธรรมชาติ มีลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงหลายรูปแบบ แบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสง และ แบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมัก

2.3.1.1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสังเคราะห์แสงโดยใช้สารประกอบซัลเฟอร์ ซัลไฟด์ ไทโอซัลเฟต กรดอินทรีย์หรือคาร์บอนอื่นๆ เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเพื่อรีดิวซ์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ดังนั้น การสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงไม่ให้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยอาศัยการทำงานของ เอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) แบคทีเรียสีม่วงที่ไม่สะสมกำมะถัน (Non-sulfur purple bacteria) เช่น *Rhodobacter* sp. (Miyake and Kawamura, 1987) (2) แบคทีเรียสีม่วงที่สะสมกำมะถัน (Sulfur purple bacteria) เช่น *Chromatium* sp. (Ikemoto and Mitsui, 1984) และ (3) แบคทีเรียสีเขียวสะสมกำมะถัน (Sulfur green bacteria) เช่น *Chlorobiaceae* sp.

2.3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมัก

แบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมักสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักน้ำตาลและการใช้แหล่งคาร์บอนที่มาจากชีวมวลหรือน้ำเสียผ่านการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน 2 ชนิด คือ (1) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบในแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobic bacteria) เช่น *Escherichia* sp. และ *Enterobacter* sp. (2) เอนไซม์ไนโตรจีเนสที่พบในแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixing bacteria) เช่น *Azotobacter* sp. และ *Klebsiella* sp. (Basak and Das, 2007)

2.3.2 ไชยานแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไชยานแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสงแล้วได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ ไชยานแบคทีเรียสามารถจัดจำแนกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ไชยานแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว (Unicellular cyanobacteria) และไชยานแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย (Filamentous cyanobacteria) โดยปกติแล้ว ไชยานแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวจะไม่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศโดยตรง ในขณะที่ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายจะพบทั้งชนิดที่ตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนและหรือกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้แก่ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Synechocystis* sp. เป็นต้น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วย (1) เอนไซม์ไนโตรจีเนส เร่งปฏิกิริยาตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนียและได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ เอนไซม์ไนโตรจีเนสพบในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน (2) เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenase) เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนที่ผลิตจากการตรึงไนโตรเจนไปเป็นโปรตอน เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสพบในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนเช่นกัน และ (3) เอนไซม์ไบเดเรกชันนอลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน เอนไซม์นี้สามารถพบในไซยาโนแบคทีเรียทั่วไป (Tamagnini *et al.*, 2002)

2.3.3 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

สาหร่ายสีเขียวจัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Division Chlorophyta) เป็นกลุ่มสาหร่ายกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดคือมีประมาณ 8,000 สปีชีส์ สาหร่ายสีเขียวสามารถพบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติ อาทิ น้ำตก ทะเล บ่อน้ำ ฯลฯ เซลล์สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างหลายลักษณะ ได้แก่ เซลล์เรียงตัวเป็นสาย (Filamentous body) เช่น *Ulothrix* sp. เซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้ (Motile colony) เช่น *Chlamydomonas* sp. เซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ (Non-motile colony) เช่น *Chlorella* sp. เซลล์เรียงตัวเป็นแผ่น (Membranous body) เซลล์มีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อพาราเอนไคมา (Parenchymatous body) และเซลล์มีลักษณะเป็นท่อหรือเป็นถุง (Siphonous body) รังควัตถุที่พบได้ในสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี แคโรทีน ซึ่งได้แก่ แอลฟา-แคโรทีน เบต้า-แคโรทีน แกมมา-แคโรทีน เป็นต้น และแซนโทฟิลล์ ได้แก่ ลูทีน ไวโอลาแซนทิน เป็นต้น สาหร่ายสีเขียวมีคลอโรพลาสต์หลายรูปแบบ เช่น รูปถ้วย รูปเกือบกลม ตาข่าย ขดเป็นเกลียว แฉกรูปดาวและเป็นแถบ ผนังเซลล์ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น ประกอบไปด้วยเซลลูโลสและเพกติน อาหารที่สะสมของเซลล์สาหร่ายสีเขียว คือ อะไมโลสและอะไมโลเพกติน โดยมีการสะสมอยู่ในไฮโดพลาสซึมหรือคลอโรพลาสต์

วัฏจักรชีวิตของสาหร่ายสีเขียวมี 2 แบบ คือ แฮปพลอนติก (Haplontic) ซึ่งเป็นวัฏจักรที่เซลล์มีจำนวนโครโมโซม n ที่เกิดขึ้นในระยะไซโกตจากการแบ่งตัวเพื่อสร้างสปอร์ และแบบที่ 2 คือ ดิพลอนติก (Diplontic) ซึ่งเป็นวัฏจักรที่เซลล์มีจำนวนโครโมโซม $2n$ ที่เกิดขึ้นในเซลล์ปกติ การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศซึ่งเกิดจากการรวมกันของแกมีต (Gamete) และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น การแบ่งเซลล์และสร้างสปอร์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายสีเขียวเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสงแล้วได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ เช่นเดียวกับไซยาโนแบคทีเรียและพืชชั้นสูง นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวยังสามารถผลิตไฮโดรเจน จากกระบวนการสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน มีรายงานพบว่าการผลิต ไฮโดรเจนถูกค้นพบครั้งแรกในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* (Gaffron and Rubin, 1942) ต่อมา มีรายงานวิจัยพบว่าสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน สูงทั้งในที่มืดและที่สว่าง (Miura *et al.*, 1982) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจะอาศัยเอนไซม์ที่สำคัญ คือเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นก๊าซไฮโดรเจน การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจะขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนในระบบ เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของ สาหร่ายสีเขียวมีความไวต่อออกซิเจน ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวมักจะเกิดขึ้น ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน ในปัจจุบัน สาหร่ายสีเขียวได้รับความสนใจนำมาผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรปสามารถเพาะเลี้ยง ในน้ำเสียจึงทำให้สามารถลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงได้ ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง แหล่งพลังงาน และตัวให้อิเล็กตรอน แสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 เอนไซม์ที่ใช้ แหล่งพลังงานและตัวให้อิเล็กตรอนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Basak and Das, 2007)

กลุ่มของจุลินทรีย์	จีโนมของจุลินทรีย์	เอนไซม์	แหล่งพลังงาน	ตัวให้อิเล็กตรอน
สาหร่ายสีเขียว	<i>Chlamydomonas</i> <i>Chlorella</i>	ไฮโดรจีเนส	แสง	น้ำ
ไซยาโนแบคทีเรีย	<i>Anabaena</i> <i>Oscillatoria</i>	ไฮโดรจีเนสและ ไนโตรจีเนส	แสง	น้ำ
แบคทีเรียที่สังเคราะห์แสง	<i>Rhodobacter</i> <i>Rhodospirillum</i> <i>Chromatium</i>	ไนโตรจีเนส	แสง	กรดอินทรีย์ ซัลเฟต
แบคทีเรียต้องการและไม่ ต้องการออกซิเจน	<i>Escherichia</i> <i>Enterobacter</i> <i>Methanobacterium</i>	ไฮโดรจีเนส	อินทรีย์ คาร์บอน	น้ำตาล
แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน	<i>Azotobacter</i> <i>Klebsiella</i>	ไนโตรจีเนส	อินทรีย์ คาร์บอน	น้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว

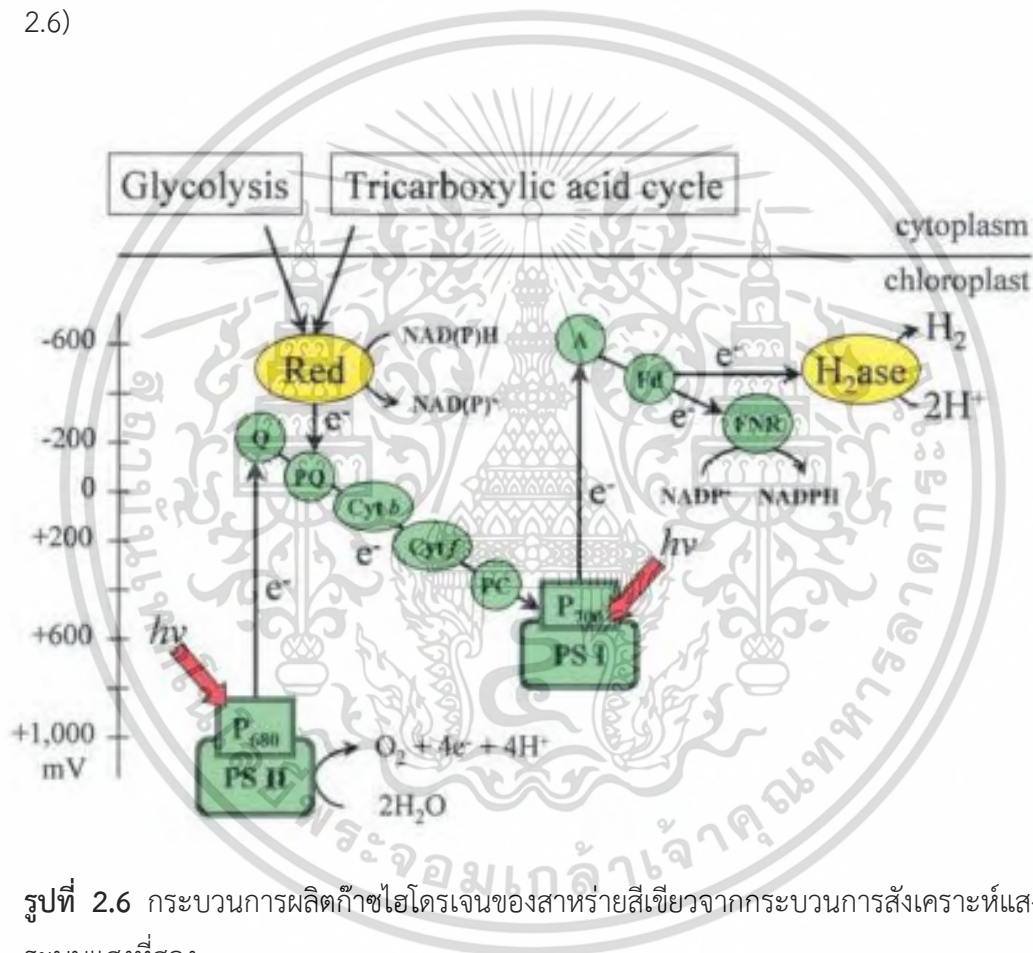
สาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนทั้งในที่มืดและที่มีแสง โดยมีกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน 2 กระบวนการ (1) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ขึ้นกับระบบแสงที่สองของกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการนี้จะใช้วัตถุดิบคือน้ำเป็นแหล่งอิเล็กตรอนและแสงเป็นแหล่งพลังงาน โดยอาจเรียกระบวนการผลิตไฮโดรเจนนี้ว่า กระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางตรง (Direct H₂ production) (2) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่ขึ้นกับระบบแสงที่สอง โดยผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมืดจากอิเล็กตรอนของกระบวนการสลายแป้งหรือกระบวนการอื่น อิเล็กตรอนถูกส่งต่อไปให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนเปลี่ยนให้เป็นไฮโดรเจน การผลิตไฮโดรเจนนี้อาจเรียกระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางอ้อม (Indirect H₂ production) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนทั้ง 2 กระบวนการ สามารถอธิบายได้ดังนี้

2.4.1 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ขึ้นกับระบบแสงที่สอง

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ขึ้นกับระบบแสงที่สองนี้เป็นการผลิตไฮโดรเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของเซลล์สาหร่าย กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวจะพบในบริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ โดยมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิด ได้แก่ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสงและส่งต่อไปยังศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยา (Reaction center) สาหร่ายสีเขียวมีระบบในการรับพลังงานแสงสำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสง 2 ระบบ คือ ระบบแสงที่หนึ่ง (Photosystem I, PSI) ที่สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร และระบบแสงที่สอง (Photosystem II, PSII) ที่สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายเกิดขึ้นเมื่อระบบแสงที่สองได้รับพลังงานแสง แสงจะกระตุ้นการปลดปล่อยอิเล็กตรอนในศูนย์กลางปฏิกิริยาของระบบแสงที่สองในคลอโรฟิลล์ให้หลุดออก อิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Q : primary electron acceptor of PSII) อิเล็กตรอนในศูนย์กลางปฏิกิริยาของระบบแสงที่สองในคลอโรฟิลล์จะถูกแทนที่ด้วยอิเล็กตรอนที่ได้มาจากการออกซิโดซ์หรือการแตกตัวของน้ำที่เรียกว่า “Water splitting” ในกระบวนการแตกตัวของน้ำ นอกจากจะได้อิเล็กตรอนเป็นผลิตภัณฑ์แล้ว ยังได้ออกซิเจนและโปรตอนเป็นผลิตภัณฑ์อีกด้วย ระบบการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง เริ่มจากการขนส่งอิเล็กตรอนจาก PSII ไปยังควิโนน (Quinone, Q) และอิเล็กตรอนจะถูกขนส่งต่อไปเป็นทอดๆ ไปยังพลาสโตควิโนน (Plastoquinone, PQ) ไซโตโครม บี 6 เอฟ (Cytochrome b₆f, Cyt b₆f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin, PC) และเข้าไปยังระบบแสงที่หนึ่ง เมื่อศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของระบบแสงที่หนึ่งถูกกระตุ้นด้วยแสง อิเล็กตรอนจะถูกกระตุ้นและปลดปล่อยอิเล็กตรอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวอื่นๆ ทำให้อิเล็กตรอนจากระบบแสงที่สองเข้ามาแทนที่อิเล็กตรอนที่ถูกปล่อยไป ส่วนอิเล็กตรอนที่ปลดปล่อยจากระบบแสงที่หนึ่งจะถูกส่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาดเห็นาไปไซบะระเษนดานการค้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป จนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย คือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin, Fd) อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินสามารถส่งต่อไปยัง 2 วิธี โดยมีวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน วิธีแรกเพื่อสร้างคาร์โบไฮเดรต กล่าวคืออิเล็กตรอนจะถูกส่งให้ NADP^+ เกิดปฏิกิริยารีดักชันได้ผลผลิตเป็น NADPH NADPH ที่ได้จะถูกนำไปใช้ร่วมกับพลังงาน ATP ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้เป็นคาร์โบไฮเดรตโดยผ่านวัฏจักรเคลวิน (Calvin cycle) วิธีที่สองเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน กล่าวคือ โปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำจะเคลื่อนจากสโตรมาที่ความเข้มข้นของโปรตอนต่ำ (Low H^+) ไปยังลูเมนที่ความเข้มข้นของโปรตอนที่สูงกว่า (High H^+) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจน (รูปที่ 2.6)



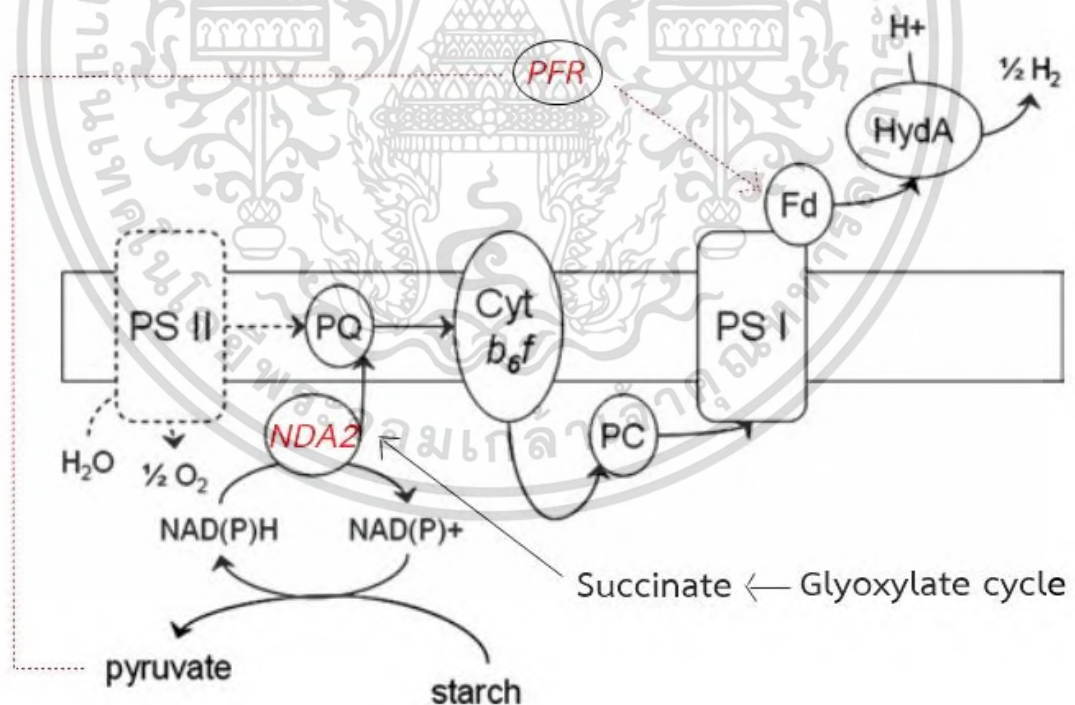
รูปที่ 2.6 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจากกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ขึ้นกับระบบแสงที่สอง

ที่มา: Melis and Happe, 2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่ขึ้นกับระบบแสงที่สอง

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่ขึ้นกับระบบแสงที่สองอาจกล่าวได้ว่าเป็นการผลิตไฮโดรเจนทางอ้อมจากการย่อยสลายแป้ง กระบวนการนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ (1) การย่อยสลายแป้งให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์ (Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) หรือการใช้ซักซิเนต (Succinate) ที่ได้มาจากวัฏจักรไกลออกซีเลท (Glyoxylate cycle) เป็นแหล่งอิเล็กตรอน (Mus *et al.*, 2005) อิเล็กตรอนที่ได้มาจาก NADPH หรือซักซิเนตจะถูกส่งไปยังพลาสโตควิโนน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Plastoquinone-reducing Type II NAD(P)H dehydrogenase (NDA2) จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านไปยังไซโตโครมบี 6 เอฟ ระบบแสงที่หนึ่ง จนไปถึงเฟอร์ริดอกซินซึ่งจะรีดิวซ์โปรตอนให้เป็นไฮโดรเจนจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (2) การย่อยสลายแป้งเป็นไพรูเวท (Pyruvate) อิเล็กตรอนจากไพรูเวทจะส่งไปที่เอนไซม์ Pyruvate : ferredoxin oxidoreductase (PFR) จากนั้น อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังเฟอร์ริดอกซินเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1 เฟอร์ริดอกซินจะรีดิวซ์โปรตอนให้เป็นไฮโดรเจนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hemschemeier and Happe, 2005) (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจากกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ไม่ขึ้นกับระบบแสงที่สอง

ที่มา: ดัดแปลงจาก Hemschemeier and Happe, 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนในจุลินทรีย์สามารถแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

1. เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอน ได้ผลิตก๊าซไฮโดรเจน ปฏิกิริยาสามารถผันกลับได้ง่ายเนื่องจากมีค่า ΔG^0 ต่ำ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ในแบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว

2. เอนไซม์ไนโตรจีเนส

เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศให้เป็นแอมโมเนีย และได้ผลิตผลพลอยได้เป็นก๊าซไฮโดรเจน ปฏิกิริยานี้ต้องใช้พลังงานในรูป ATP จำนวนมากและไม่สามารถผันกลับได้ เอนไซม์ไนโตรจีเนสสามารถพบในแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน และไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายบางชนิด

ในสาหร่ายสีเขียว กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นหลัก โดยปกติ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะมีไอออนของโลหะทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ หรืออาจจะกล่าวได้ว่าเป็น “เมทัลโลเอนไซม์ (Metalloenzyme)” โดยทั่วไป เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจัดจำแนกได้เป็น 3 ชนิดขึ้นกับชนิดของไอออนของโลหะที่บริเวณศูนย์กลางการกระตุ้นของเอนไซม์ ดังนี้

1. เอนไซม์ไอรอนไฮโดรจีเนส

เอนไซม์ไอรอนไฮโดรจีเนส (Fe-hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยไอออนของเหล็กอยู่ในบริเวณศูนย์กลางการกระตุ้นของเอนไซม์ หรืออาจเรียกชื่อเอนไซม์นี้ว่าเอนไซม์ FeFe-hydrogenase เนื่องจากประกอบด้วยเหล็ก 2 อะตอมอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น (รูปที่ 2.8) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ในสาหร่ายสีเขียว

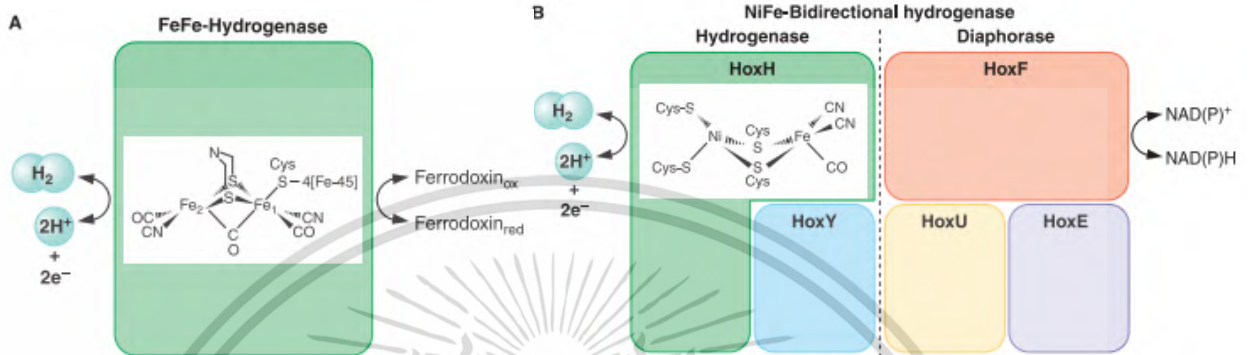
2. เอนไซม์นิกเกิลไอรอนไฮโดรจีเนส

เอนไซม์นิกเกิลไอรอนไฮโดรจีเนส (NiFe-hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยไอออนของนิกเกิลและเหล็กอยู่ในบริเวณศูนย์กลางของการกระตุ้นของเอนไซม์ เอนไซม์นี้ประกอบด้วยโปรตีน 5 หน่วยย่อย ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้เป็น 2 เอนไซม์ที่ทำงานร่วมกันคือ (1) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีโปรตีน 2 หน่วยย่อย คือ โปรตีน HoxH ประกอบด้วยเหล็กและนิกเกิลอย่างละ 1 อะตอมอยู่ในศูนย์กลางบริเวณกระตุ้น โปรตีน HoxY ที่มีคลัสเตอร์ของ 4Fe-4S (2) เอนไซม์ไดอะฟอเรส (Diaphorase) ประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อย คือ โปรตีน HoxF, HoxU และ HoxE ซึ่งจะทำหน้าที่ส่งอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (รูปที่ 2.8) เอนไซม์ชนิดนี้มีความทนต่อออกซิเจนสูงกว่า FeFe-hydrogenase (Cracknell *et al.*, 2008) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ในแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ปราศจากโลหะ

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ปราศจากโลหะ (Metal-free hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่ไม่พบโลหะ เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลบริเวณกระตุ้น เอนไซม์นี้พบในสิ่งมีชีวิตพวกอาร์เคียที่จัดอยู่ในกลุ่มเมทาโนเจน (Methanogenic archea)



รูปที่ 2.8 บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ Fe-hydrogenase และ NiFe-hydrogenase ที่มา: Maness et al., 2009

นอกจากนี้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถจำแนกได้เป็น 2 ชนิด ตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

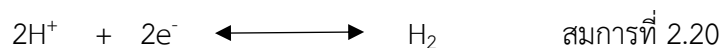
1. เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenase) เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน (สมการที่ 2.19) ปฏิกิริยานี้ไม่สามารถผันกลับได้ จึงอาจเรียกชื่อเอนไซม์นี้ว่าเป็นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสแบบทิศทางเดียว (Unidirectional hydrogenase)



2. เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส

เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (Reversible hydrogenase) เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน และปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน (สมการที่ 2.20) ปฏิกิริยานี้สามารถผันกลับได้ จึงอาจเรียกชื่อเอนไซม์นี้ว่าเป็นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสแบบสองทิศทาง (Bidirectional hydrogenase)



ในสาหร่ายสีเขียว การผลิตไฮโดรเจนถูกพบครั้งแรกใน *Scenedesmus obliquus* ในปี ค.ศ. 1939 (Gaffron 1939) หลังจากนั้น มีรายงานการศึกษาเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนเวลาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับผูกพันหาใบเซอร์ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขียวจำนวนมาก โดยพบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวคือ เอนไซม์ไฮโดรอนไฮโดรจีเนส เอนไซม์ไฮโดรอนไฮโดรจีเนสประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อยคือ HYDA1 และ HYDA2 โดยมีขนาดประมาณ 47 กิโลดาลตัน เอนไซม์ชนิดนี้สามารถรับอิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินหรือจากกระบวนการหมักแป้งและไพรูเวทด้วยเอนไซม์ไพรูเวทเฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส (Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase, PFR)

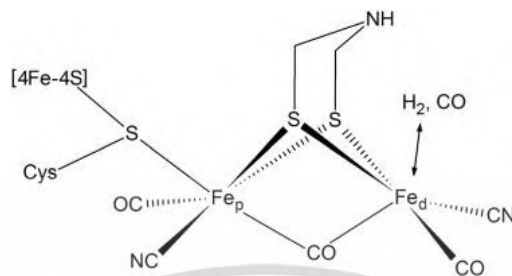
2.6 เอนไซม์ FeFe-hydrogenase

เอนไซม์ไฮโดรอนไฮโดรจีเนส (FeFe-hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจน โดยสามารถพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน เช่น *Clostridium* sp. พบในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว เช่น *Chlamydomonas* sp. และพบในไฮโดรจีโนโซม (Hydrogenosome) ของโปรโตซัวและรา (Vignais and Billoud, 2007) แบคทีเรีย *Clostridium pasteurianum* เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่ถูกค้นพบว่า บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีเพียงไอออนของโลหะเหล็กเท่านั้น แต่ไม่มีไอออนของโลหะนิกเกิลเหมือนที่พบในแบคทีเรียชนิดอื่น (Chen and Mortenson, 1974) เอนไซม์ไฮโดรอนไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวสามารถกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าเอนไซม์นิกเกิลไฮโดรอนไฮโดรจีเนสหรือเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากเอนไซม์ในไซยาโนแบคทีเรียมีแนวโน้มในการเกิดปฏิกิริยาการสลายโมเลกุลของไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้สูงกว่าปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอน (Vincent *et al.*, 2007)

เอนไซม์ไฮโดรอนไฮโดรจีเนสประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 2 ส่วน คือ (1) เอฟคลัสเตอร์ (F-cluster) คือ คลัสเตอร์ที่มี $[Fe_4S_4]$ subunit ซึ่งอยู่ติดกับเฟอร์รีดอกซิน (2) เฮชคลัสเตอร์ (Hydrogen activating cluster, H-cluster) เป็นบริเวณที่มีการเกิดปฏิกิริยารีดักชันระหว่างโปรตอนจากเฟอร์รีดอกซินกับอิเล็กตรอนในโครงสร้างเกิดเป็นผลิตภัณฑ์คือก๊าซไฮโดรเจน H-cluster ประกอบด้วยอะตอมของโลหะเหล็ก 6 ตัว ซึ่งมาจาก $[2Fe]_H$ subunit กับ $[Fe_4S_4]$ subunit หน่วยย่อยทั้ง 2 ส่วนจะเชื่อมกันด้วยอะตอมของซัลเฟอร์ในกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cystenyl sulfur) $[2Fe]_H$ subunit ประกอบด้วย (1) Promimal Fe center (Fe_p) เป็นอะตอมของเหล็กที่เชื่อมกับ $[Fe_4S_4]$ subunit (2) Distal Fe center (Fe_d) เป็นบริเวณที่เกิดการผลิตไฮโดรเจนหรือบริเวณที่ถูกยับยั้งด้วยออกซิเจนหรือคาร์บอนมอนอกไซด์ อะตอมของเหล็กใน $[2Fe]_H$ subunit ยังจับกับคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และไซยาไนด์ (CN) อีกด้วย กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนจะเริ่มจากอิเล็กตรอนถูกส่งมาจากเฟอร์รีดอกซิน อิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ภายในโครงสร้างเอนไซม์ เริ่มเข้าสู่ F-cluster ก่อน จากนั้น อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยัง H-cluster เพื่อรวมตัวกับโปรตอนเกิดปฏิกิริยารีดักชันกลายเป็นก๊าซไฮโดรเจน (รูปที่ 2.9) แต่หากมีก๊าซออกซิเจนอยู่ในระบบ ออกซิเจนจะมีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไวในการแย่งจับกับเหล็กบริเวณ Fe_d ของ H-cluster ทำให้ Fe_d ไม่สามารถถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปยังโปรตอน ส่งผลให้ไม่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน



รูปที่ 2.9 โครงสร้าง H-cluster ของเอนไซม์ Fe-hydrogenase

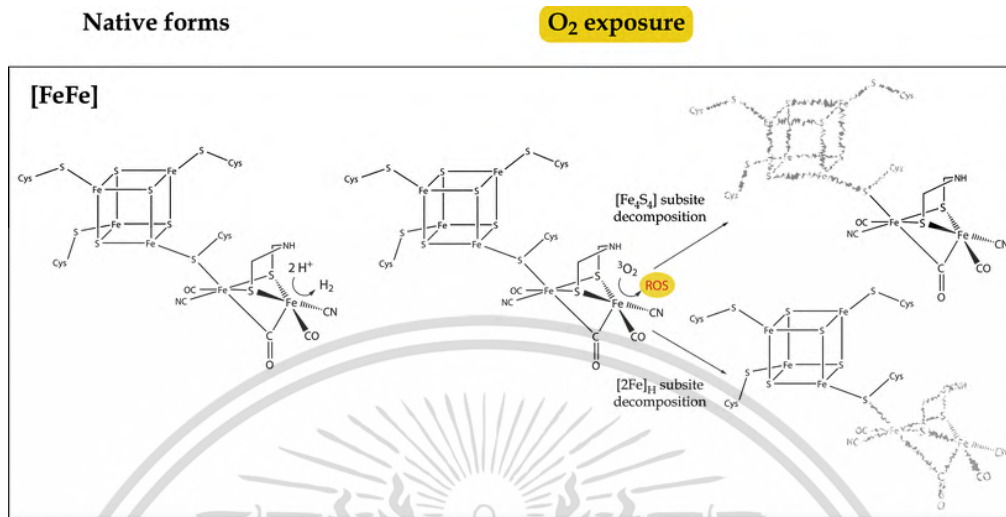
ที่มา: Morra et al., 2016

2.7 ความไวต่อออกซิเจนของเอนไซม์ Fe-hydrogenase

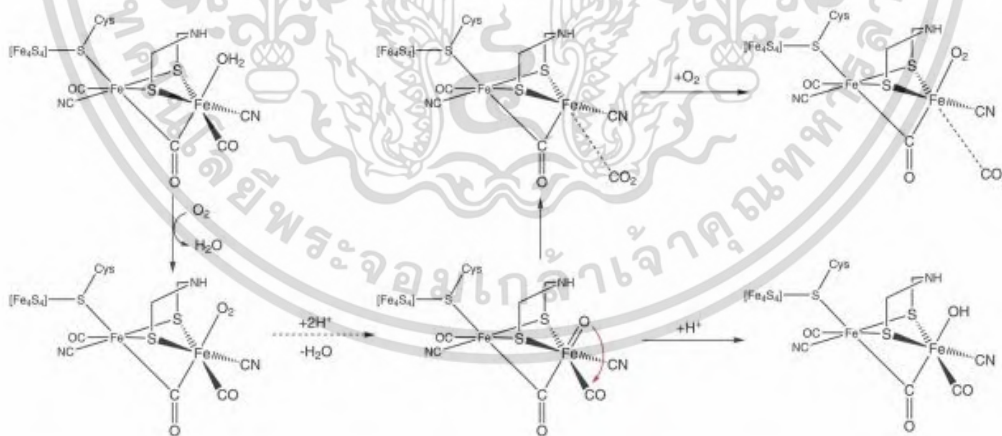
สำหรับสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Fe-hydrogenase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีความไวต่อก๊าซออกซิเจน ก๊าซออกซิเจนจัดเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแข่งขัน (Competitive inhibitor) โดยออกซิเจนจะเข้าไปจับกับเหล็กไอออนแทนโปรตอน ทำให้กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนเกิดชะงัก เอนไซม์จึงไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (รูปที่ 2.10) เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีความไวต่อก๊าซออกซิเจนสูง ถ้ามีความเข้มข้นของออกซิเจนในระบบต่ำ จะส่งผลให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง ในทางตรงกันข้าม หากมีความเข้มข้นของออกซิเจนในระบบสูง จะส่งผลให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณต่ำ ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวจึงมักเกิดภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน โดยต้องรักษาระดับก๊าซออกซิเจนให้มีค่าต่ำกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้มีปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนสูง (Hallenbeck and Benemann, 2002)

เมื่อก๊าซออกซิเจนมีปริมาณมากเกินไปสำหรับกระบวนการหายใจของเซลล์สาหร่ายสีเขียว ออกซิเจนจะแย่งโปรตอนจับกับเอนไซม์ Fe-hydrogenase ในบริเวณ $2[Fe]_H$ subsite ของ H-cluster ที่ Fe_d ออกซิเจนจะเข้าไปแทนที่โมเลกุลของน้ำจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน หลังจากนั้นเอนไซม์ได้รับโปรตอนจากเฟอร์ริดอกซินอีกครั้ง โครงสร้างที่มีลิแกนด์จับกับโมเลกุลออกซิเจนนั้นจะเหลือเพียงแค่อะตอมของออกซิเจน หลังจากนั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างตามโมเลกุลต่างๆ ที่เข้าจับกับบริเวณกระตุ้น โดยเมื่อมีการรวมกันระหว่างออกซิเจนอะตอม (O ligand) กับคาร์บอนมอนอกไซด์อะตอม (CO moiety) ที่ปลายลิแกนด์ข้างหนึ่งจะเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) (รูปที่ 2.11) สำหรับโครงสร้างของเอนไซม์ในลักษณะนี้เป็นสภาพไม่สมบูรณ์เป็นการทำลายสภาพไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธรรมชาติของเอนไซม์ชนิดนี้ไป โดยจะไม่สามารถให้อิเล็กตรอนแก่โปรตอนในการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน เปลี่ยนเป็นก๊าซไฮโดรเจน



รูปที่ 2.10 การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะที่มีและไม่มีก๊าซออกซิเจน
ที่มา: Stiebritz and Reiher, 2012



รูปที่ 2.11 การขัดขวางการทำงานของ Fe-hydrogenase เมื่อมีก๊าซออกซิเจน
ที่มา: Stiebritz and Reiher, 2012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายอย่างมีประสิทธิภาพประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ (1) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตชีวมวล สาหร่ายจะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารปกติภายใต้สภาวะที่มีแสงและอากาศ ในระหว่างการเจริญเติบโต เซลล์จะสังเคราะห์แสงได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์โบไฮเดรตและได้ออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำ ออกซิเจนจะเข้าจับกับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง จึงมีการผลิตไฮโดรเจนเพียงเล็กน้อย (2) การผลิตไฮโดรเจน ขั้นตอนนี้จะเกิดภายหลังการเพาะเลี้ยงสาหร่าย โดยจะบ่มภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนเพื่อกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจน การลดปริมาณออกซิเจนในระบบอาจทำได้โดยการระงับการทำงานของระบบแสงที่สองโดยการใส่สารยับยั้งการทำงานของระบบแสงหรือการบ่มเซลล์ในสภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์ (Wykoff *et al.*, 1998) และไม่ควรส่งผลกระทบต่อกระบวนการหายใจของเซลล์ในไมโทคอนเดรีย (Melis *et al.*, 2000) ซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโนซิสเทอีนกับเมไทโอนีนในโปรตีน D1 ของระบบแสงที่สอง การขาดซัลเฟอร์ทำให้ไม่มีการซ่อมแซมการทำงานของโปรตีน D1 ส่งผลให้การแตกตัวของน้ำและการผลิตออกซิเจนลดลง ถ้าออกซิเจนในระดับต่ำนี้เพียงพอต่อการหายใจระดับเซลล์เท่านั้น ทำให้ไม่มีออกซิเจนเหลือพอในการเข้าจับกับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้มีปริมาณไฮโดรเจนสูงขึ้น นอกจากการขาดซัลเฟอร์แล้ว การขาดธาตุไนโตรเจนยังมีผลทำให้การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสูงขึ้น (Philippis *et al.*, 2012) นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัยพบว่า สารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) สามารถลดการผลิตก๊าซออกซิเจนให้ลดลงภายใน 3-4 วัน (Laurinavichene *et al.*, 2004) และหากทำให้เซลล์เพิ่มกระบวนการหายใจ จะทำให้เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Kruse *et al.*, 2005)

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

2.8.1 สภาวะการขาดแหล่งอาหารและแร่ธาตุ

การขาดแหล่งอาหารและแร่ธาตุชนิดต่างๆ มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว ดังนี้

2.8.1.1 สภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์ (Sulfur deprivation)

ซัลเฟอร์มีความสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโนซิสเทอีนและเมไทโอนีน ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์และการซ่อมแซมโปรตีน D1 ที่อยู่ในศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยา (Reaction center) ของระบบแสงที่สองในไทลาคอยด์ (Wykoff *et al.*, 1998) ดังนั้น เมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายในอาหารที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ จะทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมในระบบแสงที่สอง โดยหยุดการซ่อมแซมหรือการสังเคราะห์โปรตีน D1 ส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงที่ระบบแสงที่สองลดลง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิเจนมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการเข้าไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น

2.8.1.2 สภาวะการขาดแหล่งฟอสฟอรัส (Phosphorus deprivation)

การขาดแหล่งฟอสฟอรัสทำให้การทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ที่สำคัญในวิถีเพนโทส ฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) ลดลง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อการขนส่งของ อิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงที่สองเช่นเดียวกับการขาดแหล่งซัลเฟอร์ โดยอิเล็กตรอน จากตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก Q_A (Primary quinone acceptor) จะไม่ส่งอิเล็กตรอนไปยังตัวรับ อิเล็กตรอนตัวถัดไป Q_B (Secondary quinone acceptor) (Chylla and Whitmarsh, 1989)

2.8.1.3 สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen deprivation)

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนทุกชนิด การขาดแหล่งไนโตรเจนทำให้เซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมภายในเซลล์หลายประการ คือ (1) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์สืบพันธุ์ (Gametes) (2) การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของระบบแสงที่สอง คือ ไซโตโครมบี 6 เอพ (Cytochrome b₆f complex) จะเสียหายไป การเสียหายของไซโตโครมบี 6 เอพมีผลทำให้ ปริมาณออกซิเจนที่เกิดขึ้นในระบบแสงที่สองลดลง ทำให้การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่ถูก ยับยั้ง (3) การทำงานของเอนไซม์ Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisco) ลดลง (Herzig and Falkowski, 1989) (4) มีการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ NADH-PQ oxidoreductase (Peltier *et al.*, 1991) เป็นต้น

2.8.1.4 สภาวะการขาดแหล่งโพแทสเซียม (Potassium deprivation)

โพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบสำคัญของเอนไซม์และโปรตีนในสิ่งมีชีวิต การขาดโพแทสเซียมในอาหารมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำให้มีประสิทธิภาพในการทำงานลดลง เนื่องจาก โปรตีน D1 ที่อยู่บริเวณศูนย์กลางเกิดปฏิกิริยาไม่ถูกสังเคราะห์ และระบบแสงสองข้อมแซมตัวเอง ไม่ได้ ทำให้ปริมาณของอิเล็กตรอน โปรตอน และออกซิเจนลดลง นอกจากนี้ กระบวนการสังเคราะห์ ATP ลดลงเช่นกัน ส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบคาร์โบไฮเดรตขาดซับซ้อนให้การ ดำเนินปฏิกิริยา ดังนั้น การสะสมแป้งจึงลดลง นอกจากนี้ การขาดโพแทสเซียมยังส่งเสริมการเพิ่ม อัตราการหายใจ ท้ายที่สุดแล้วเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงได้รับอิเล็กตรอนจากการสลายแป้งเป็นหลัก และเซลล์อยู่ในสภาวะปราศจากออกซิเจน ทำให้มีการเหนี่ยวนำเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเกิดปฏิกิริยา รีดักชันให้ผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Papazi *et al.*, 2014)

2.8.2 แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในรูปแป้งหรือไกลโคเจน จะให้อิเล็กตรอนจำนวนมากภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสงและออกซิเจน สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนจากการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 3 แบบ คือ (1) ใช้สารอินทรีย์คาร์บอน เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นแหล่งคาร์บอนหรืออยู่ในสภาวะออโตโทรฟ (Autotrophic condition) (2) ใช้สารอินทรีย์คาร์บอน เช่น กลูโคส ซูโครส อะซีเตท และสารอินทรีย์ในน้ำเสีย เป็นต้น เป็นแหล่งคาร์บอนหรืออยู่ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟ (Heterotrophic condition) และ (3) ใช้ทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนหรืออยู่ในสภาวะมิกโซโทรฟ (Mixotrophic condition) (Jurado-Oller *et al.*, 2015)

2.8.3 แสง (Light)

แสงมีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงสำหรับใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างพลังงานให้แก่เซลล์ พลังงานที่ได้นี้มาจากการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศเปลี่ยนเป็นคาร์โบไฮเดรตและเก็บสะสมในรูปของแป้งในสาหร่ายสีเขียวและไกลโคเจนในไซยาโนแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสะสมต่อไป อย่างไรก็ตาม ความเข้มแสงที่มากเกินไปสามารถยับยั้งต่อการสังเคราะห์แสงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว (Kim *et al.*, 2006) การผลิตออกซิเจนและอัตราการสังเคราะห์แสงจะขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายและความเข้มแสง

2.8.4 อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนและเอนไซม์ในกระบวนการต่างๆ อาทิเช่นกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหายใจ เมื่ออุณหภูมิสูงเกินไป ทำให้เซลล์ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน และลดการสะสมของแป้ง ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ รวมทั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเสียสภาพ ทำให้ไม่มีการผลิตไฮโดรเจน (Juneja *et al.*, 2013) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส (Happe and Naber, 1993) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะมีกิจกรรมที่ยาวนานขึ้น เมื่อบ่มสาหร่ายสีเขียวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Hemschemeier *et al.*, 2009)

2.8.5 พีเอช (pH)

พีเอชเป็นปัจจัยหนึ่งสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว เนื่องจาก พีเอชสามารถชี้วัดปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกตรึงและถูกผลิตได้ และมีผลต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญได้อย่างเต็มที่เมื่อบ่มในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็นกลาง พีเอชมีผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการ

ทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเท่ากับของสาหร่ายสีเขียว 7.2-7.7 (Kosourov *et al.*, 2003) การเปลี่ยนแปลงพีเอชทำให้สาหร่ายไม่มีการเจริญเติบโต เนื่องจาก เมแทบอลิซึมต่างๆ ถูกยับยั้ง

2.8.6 สารให้อิเล็กตรอน (Reducing agent)

สารให้อิเล็กตรอนหรือสารรีดิวซ์ คือ สารที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่สารอื่นๆ ได้ดี กล่าวคือ ถูกออกซิไดซ์ง่าย สารรีดิวซ์ในที่นี้จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) เป็นน้ำตาลที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (Aldehyde) หรือคีโตน (Ketone) ที่เป็นอิสระอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาล สารให้อิเล็กตรอนสามารถเป็นตัวช่วยยับยั้งการเกิดของอนุมูลอิสระ (Reactive O₂ species (ROS)) โดยการลดปริมาณของออกซิเจนอิสระภายในเซลล์สาหร่าย ทำให้เซลล์อยู่ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน ดังนั้น อิเล็กตรอนถูกถ่ายทอดไปยังตัวรับอิเล็กตรอนต่างๆ จนถึงเฟอร์รีดอกซินซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์แสง จากนั้น เฟอร์รีดอกซินส่งอิเล็กตรอนต่อให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสและเกิดปฏิกิริยารีดักชันกลายเป็นไฮโดรเจนจำนวนมาก ตัวอย่างของสารให้อิเล็กตรอน ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ซิสเทอีน (Cysteine) โซเดียมซัลไฟต์ (Sodium sulfite) ไฮโดรควิโนน (Hydroquinone) และ เบตา-เมอร์แคปโตเอทานอล (β -mercaptoethanol) เป็นต้น (Mer and Rideal, 1924; Hartman *et al.*, 1962; Davey *et al.*, 2000; Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010; Marquez-Reyes *et al.*, 2015)

ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารรีดิวซ์จะพิจารณาจากค่ารีดอกซ์โพเทนเชียล (Redox potential) หรือจากศักย์ภาพในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน (Oxidation reduction potential, Eh) ซึ่งการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากสารชนิดหนึ่งไปยังสารอีกชนิดหนึ่งจะเกิดความต่างศักย์ไฟฟ้า ค่าดังกล่าววัดได้ด้วยเครื่องมือวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าโดยมีหน่วยเป็นมิลลิโวลต์ (mV) สารที่มีความสามารถเป็นตัวออกซิไดซ์ที่ดีจะมีค่า Eh เป็นบวกมาก ในทางตรงกันข้าม สารที่เป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีจะมีค่า Eh เป็นลบมาก (พิมพ์เพ็ญ, 2560)

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.9.1 งานวิจัยความไวต่อออกซิเจนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสต่อการผลิตไฮโดรเจน

Bingham *et al.*, (2011) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ Fe-hydrogenase จากแบคทีเรีย *Clostridium pasteurianum* สายพันธุ์กลายในการลดความไวของเอนไซม์ต่อก๊าซออกซิเจน พบว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสายพันธุ์กลายมีความไวต่อออกซิเจนต่ำ โดยสามารถทำปฏิกิริยากับเมทิลไวโอโลเจนได้สูงกว่าเอนไซม์ในสายพันธุ์ปกติ

Jurado-Oller *et al.*, (2015) ศึกษาปริมาณออกซิเจนที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ภายใต้สภาวะมิกโซโทรปภายใต้ความเข้มแสง 0-100 PAR เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสายพันธุ์กลายมีความไวต่อออกซิเจนต่ำ โดยไม่วัฏจักรใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Photosynthetically active radiation) พบว่าที่ความเข้มแสง 22 PAR เซลล์ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด และเมื่อมีการฟันทออกซิเจนเข้าสู่ระบบ การผลิตไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งทันที นอกจากนี้สำหรับสายสีเขียว *C. reinhardtii* ยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอน อินทรีย์เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนดีกว่าแหล่งคาร์บอน อนินทรีย์

Fan *et al.*, (2016) เปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนในสายสีเขียว 2 สายพันธุ์ คือ *Chlorella pyrenoidosa* และ *Chlamydomonas reinhardtii* ในสถานะที่มีก๊าซออกซิเจนในระบบ โดยแปรผันระดับความเข้มข้นของออกซิเจนที่ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 21 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่า *Chlorella pyrenoidosa* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงและนานกว่า *Chlamydomonas reinhardtii* โดยโครงสร้างของเซลล์และกระบวนการหายใจมีผลต่อการผลิตออกซิเจนที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

Noone *et al.*, (2017) ศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ Clostridial Fe-hydrogenase ในสายสีเขียว *C. reinhardtii* เพื่อเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนจากการแตกตัวของน้ำ โดยออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำในกระบวนการสังเคราะห์แสงจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ในงานวิจัยนี้ มีการนำยีนที่ถอดและแปลรหัสของเอนไซม์ Fe-hydrogenase ของสาย *C. reinhardtii* ออกไป (Δ HYD) และแทนที่ด้วยยีน Clostridial Fe-hydrogenase (Cal) ของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ที่ทนต่อออกซิเจน จากการทดลองพบว่า *C. reinhardtii* สายพันธุ์ D66 Δ HYD ที่ตัดต่อยีนแล้วมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าสายพันธุ์เดิมถึง 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ายีนของแบคทีเรียสามารถแสดงออกในสายสีเขียวได้และทำให้เอนไซม์สามารถกระตุ้นการขนส่งอิเล็กตรอนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงได้ สายสีเขียวสายพันธุ์นี้จึงสามารถผลิตไฮโดรเจนสูงภายใต้สถานะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนต่างๆ

2.9.2 งานวิจัยผลของการขาดอาหารและแร่ธาตุต่อการผลิตไฮโดรเจน

Melis *et al.*, (2000) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสายสีเขียว *C. reinhardtii* จากกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยอาศัยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสถานะการขาดซัลเฟอร์ โดยกระบวนการนี้ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ (1) การผลิตชีวมวลจากการสังเคราะห์แสงที่มีการผลิตออกซิเจนและการสะสมของสารประกอบคาร์โบไฮเดรต (2) การผลิตไฮโดรเจนภายในเซลล์สาหร่าย จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ที่ไปยับยั้งการทำงานของระบบแสงที่สองและลดการผลิตออกซิเจนให้มีออกซิเจนในปริมาณที่แค่เพียงพอสำหรับกระบวนการหายใจระดับเซลล์ พบว่าไม่มีการผลิตออกซิเจนเกิดขึ้นในระยะเวลามากกว่า 120 ชั่วโมง และเซลล์มีการใช้น้ำตาลกลูโคสต่ำเมื่อเทียบกับการใช้อะซิเตท

Chader *et al.*, (2009) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella sorokiniana* สายพันธุ์ Ce, *Chlorella salina* สายพันธุ์ Mt และ *Chlorella* sp. สายพันธุ์ Pt6 ภายใต้สภาวะขาดซัลเฟอร์ พบว่า *C. sorokiniana* สายพันธุ์ Ce ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงที่สุดคือ 147 มิลลิลิตร ภายใต้การบ่ม 222 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของออกซิเจนในระบบ 2 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกับนี้ ยังพบอีกว่าสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้แม้ความเข้มข้นของออกซิเจนสูงถึง 11-15.4 เปอร์เซ็นต์

Philippis *et al.*, (2012) ศึกษาผลของการขาดธาตุไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* จากการทดลองพบว่า อิเล็กตรอนที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและมาจากกระบวนการสลายแป้ง และพบว่าเซลล์ที่บ่มในอาหารที่ขาดไนโตรเจนผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าเซลล์ที่อยู่ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ใน 2 วันแรกของการบ่ม นอกจากนี้ การขาดไนโตรเจนทำให้สาหร่ายมีการสะสมแป้งในปริมาณที่สูงขึ้นและมีการสลายแป้งในปริมาณที่ต่ำกว่า สาหร่ายที่บ่มในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์

He *et al.*, (2015) ศึกษาการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. pyrenoidosa* สายพันธุ์ 689S และ 707S ในอาหารน้ำทะเลธรรมชาติกับน้ำทะเลสังเคราะห์ที่มีการเติมกรดอะซิติก โดยพบว่าสาหร่าย *C. pyrenoidosa* สายพันธุ์ 689S และ 707S ผลิตไฮโดรเจนได้ 20.77 และ 25.51 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ อาหารที่ขาดธาตุไนโตรเจนหรือซัลเฟอร์ช่วยเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนใน *C. pyrenoidosa* สายพันธุ์ 707S ในขณะที่อาหารที่ขาดไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสไม่เหนี่ยวนำการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *C. pyrenoidosa* สายพันธุ์ 689S นอกจากนี้ ยังพบว่าสาหร่าย *C. pyrenoidosa* ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหาร TAP ที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นแหล่งไนโตรเจนในความเข้มข้นเดียวกับก๊าซไนโตรเจนที่ถูกเติมในอาหารน้ำทะเล และสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนในอาหารน้ำทะเลที่มีการเติมกรดอะซิติก

2.9.3 งานวิจัยผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจน

Gaffron and Rubin, (1942) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนในที่มืดและสว่าง พบว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* สามารถลดคาร์บอนไดออกไซด์และสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนในที่มืด โดยไฮโดรเจนสามารถผันกลับเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีแสงมากกว่าภายใต้สภาวะมืดถึง 10 เท่า สารไดไนโตรฟีนอล (Dinitrophenol) สามารถยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนในที่มืดได้

Winkler *et al.*, (2002) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของเอนไซม์ Fe-hydrogenase ในสาหร่ายสีเขียวที่บ่มในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด พบว่า *C. reinhardtii* ผลิตไฮโดรเจนได้ในที่มืดมากกว่าในที่สว่าง และพบว่าเอนไซม์ Fe-hydrogenase สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในที่มืดมากกว่าในที่สว่าง นอกจากนี้ ยังพบว่าเอนไซม์ Fe-hydrogenase สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในที่มืดมากกว่าในที่สว่าง

ไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงเมื่อบ่มเซลล์ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ และออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงมีปริมาณต่ำกว่าที่ใช้ในกระบวนการหายใจ

Kim *et al.*, (2006) ศึกษาการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์โดยการแปรผันความเข้มแสง จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียวผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดภายใต้ความเข้มแสง 200 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ภายหลังกบ่มในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ ความเข้มแสงที่มากเกินไปจะมีผลไปทำลายระบบแสงที่สอง สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดเท่ากับ 225 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร และอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 2.01 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมต่อเวลา ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนจาก *C. reinhardtii* UTEX 90 ต้องควบคุมความเข้มแสงให้เหมาะสม

Tsygankov *et al.*, (2006) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *C. reinhardtii* โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. reinhardtii* ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์และให้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะที่มีแสง โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้ความเข้มแสงต่ำ 25 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง พบว่าสาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 56.4 ± 16.7 มิลลิลิตรต่อลิตร ถ้าให้ความเข้มแสงสูงประมาณ 110-120 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที จะส่งผลให้มีการผลิตออกซิเจนมากขึ้น แต่ถ้าให้ความเข้มแสงในปริมาณต่ำประมาณ 20-25 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ออกซิเจนจะถูกใช้ ส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น

2.9.4 งานวิจัยผลของสารยับยั้งและสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจน

Schnackenberg *et al.*, (1993) ศึกษาตัวให้อิเล็กตรอนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* สายพันธุ์ D3 ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป ตัวให้อิเล็กตรอนที่ทดสอบ ได้แก่ เมทิลไวโอลเจน (Methylviologen) ฟีนอสฟรานีน (Phenosafuranine) เบนซิลไวโอลเจน (Benzylviologen) เจนัส-กรีน (Janus-green) เมทิลีนบลู (Methylene blue) และโซเดียมไดไทโอไนท์ (Na-dithionite) พบว่าเมทิลไวโอลเจนกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้เพิ่มขึ้น 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่มีศักย์รีดิวซ์คล้ายกับเพอร์รีดอกซินที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus*

Scoma *et al.*, (2012) ศึกษาผลของสารยับยั้งระบบแสงที่สองของการสังเคราะห์แสงสองของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ต่อการผลิตไฮโดรเจนภายใต้การบ่มในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ พบว่าเมื่อเติม DCMU ลงในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ในระยะเวลาแตกต่างกัน คือ ในชั่วโมงที่ 14 และ 24 ก่อนย้ายเซลล์ของสาหร่ายลงสู่อาหาร สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ไม่พบการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 14 แต่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 70 มิลลิลิตรต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Márquez-Reyes *et al.*, (2015) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlamydomonas gloeopara* และ *Scenedesmus obliquus* พบว่าการใส่กรดอะมิโนซิสเทอีนซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารรีดิวซ์ที่สามารถให้อิเล็กตรอนแก่เซลล์โดยไม่ต้องอาศัยการแตกตัวของน้ำ สามารถลดปริมาณการผลิตออกซิเจนในระบบและส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิด

Liu *et al.*, (2016) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. pyrenoidosa* ที่อยู่ในสภาวะโฟโตออโตโทรป โดยใช้อาหารที่มีโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) 10 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งคาร์บอนและเติม DCMU แทนที่การขาดซัลเฟอร์ จากการทดลองพบว่าการผลิตออกซิเจนของสาหร่ายถูกยับยั้งด้วยการเติม DCMU การเติม DCMU จะทำภายใน 9 ชั่วโมงของการให้แสงเซลล์ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 9 โดยผลิตได้ 93.86 มิลลิลิตรต่อลิตรเมื่อเติม DCMU เทียบกับปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ 23.12 มิลลิลิตรต่อลิตรเมื่อบ่มในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวนทั้งหมด 24 สายพันธุ์ โดยสามารถจัดแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ (1) สาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยจำนวน 15 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.1) (2) สาหร่ายสีเขียวที่ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.2) และ (3) สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ที่ซื้อมาจาก Chlamydomonas Resource Center ประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 4 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.1 สาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย

ลำดับที่	ชนิดของสาหร่ายสีเขียว	ไอโซเลท	แหล่งที่มาของตัวอย่าง
1	<i>Chlorella</i> sp.	1SinS1.1	น้ำจากนาข้าว จังหวัดสิงห์บุรี แยกโดย รัตติกษณ์ และคณะ, 2556
2	<i>Chlorella</i> sp.	2TKS2.2	น้ำจากนาข้าว อำเภอดาคลี จังหวัดนครสวรรค์ แยกโดย รัตติกษณ์ และคณะ, 2556
3	<i>Chlorella</i> sp.	2SinS4	น้ำจากนาข้าว จังหวัดสิงห์บุรี แยกโดย รัตติกษณ์ และคณะ, 2556
4	<i>Chlorella</i> sp.	ChiS4	น้ำจากนาข้าว จังหวัดชัยนาท แยกโดย รัตติกษณ์ และคณะ, 2556
5	<i>Chlorella</i> sp.	ChiW1	น้ำจากนาข้าว จังหวัดชัยนาท แยกโดย รัตติกษณ์ และคณะ, 2556
6	<i>Chlorella</i> sp.	KMITL CirG	แหล่งน้ำจืด สจล. จังหวัดกรุงเทพฯ แยกโดย รัตติกษณ์ และคณะ, 2556
7	<i>Chlorella</i> sp.	LSD-W2	น้ำจากนาข้าว หาดแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี แยกโดย Tinpranee <i>et al.</i> , 2016
8	<i>Coelastella</i> sp.	CH	แหล่งน้ำจืด สจล. จังหวัดกรุงเทพฯ แยกโดย รัตติกษณ์ และคณะ, 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1(ต่อ) สาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย

ลำดับที่	ชนิดของสาหร่าย สีเขียว	ไอโซเลท	แหล่งที่มาของตัวอย่าง
9	<i>Coelastrum</i> sp.	SD	แหล่งน้ำจืด สจล. จังหวัดกรุงเทพฯ แยกโดย รัตน์ลักษณ์ และคณะ, 2556
10	<i>Micractinium</i> sp.	A25.1	แหล่งน้ำจืด จังหวัดชัยนาท แยกโดย รัตน์ลักษณ์ และคณะ, 2556
11	<i>Scenedesmus</i> sp.	L	แหล่งน้ำจืด สจล. จังหวัดกรุงเทพฯ แยกโดย รัตน์ลักษณ์ และคณะ, 2556
12	<i>Scenedesmus</i> sp.	KMITL OVG-1	แหล่งน้ำจืด สจล. จังหวัดกรุงเทพฯ แยกโดย รัตน์ลักษณ์ และคณะ, 2556
13	<i>Tetraspora</i> sp.	CU2551	แหล่งน้ำจืด จังหวัดปทุมธานี แยกโดย Maneeruttanarungroj et al., 2010
14	Undetected	B35.1	แหล่งน้ำจืด จังหวัดมหาสารคาม แยกโดย รัตน์ลักษณ์ และคณะ, 2556
15	Undetected	WTK-W3.1	แหล่งน้ำจืด อุทยานวังตะไคร้ จังหวัดนครนายก แยกโดย ชลาลัย และ, 2558

หมายเหตุ : สจล. คือ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 3.2 สาหร่ายสีเขียวที่ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ลำดับที่	สายพันธุ์ ของสาหร่ายสีเขียว	สปิชีส์	แหล่งที่มาของตัวอย่าง
1	<i>Coelastrum microporum</i>	TISTR 8568	แหล่งน้ำจืด เขตหนองจอก จังหวัด กรุงเทพฯ
2	<i>Coelastrum reticulatum</i>	TISTR 8562	แหล่งน้ำจืด สจล. จังหวัดกรุงเทพฯ
3	<i>Monoraphidium branuii</i>	TISTR 8553	แหล่งน้ำจืด เขตลาดกระบัง จังหวัด กรุงเทพฯ
4	<i>Scenedesmus armatus</i>	TISTR 8641	แหล่งน้ำจืด อำเภอบางกรวย จังหวัด นนทบุรี
5	<i>Scenedesmus obliquus</i>	TISTR 8546	แหล่งน้ำจืด เขตลาดพร้าว จังหวัด กรุงเทพฯ

หมายเหตุ : สจล. คือ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ที่ใช้ในการศึกษาที่ซื้อมาจาก Chlamydomonas resource center

ลำดับที่	สายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว	ลักษณะของสาหร่าย	อ้างอิง
1	<i>C. reinhardtii</i> CC-124	สายพันธุ์ดั้งเดิม Mating type -	Pröschold <i>et al.</i> , 2005
2	<i>C. reinhardtii</i> CC-125	สายพันธุ์ดั้งเดิม Mating type +	Pröschold <i>et al.</i> , 2005
3	<i>C. reinhardtii</i> CC-4147	สายพันธุ์กลาย ไม่มียีน <i>psbA</i>	Bennoun <i>et al.</i> , 1980 Bennoun <i>et al.</i> , 1986 Minagawa and Crofts, 1994
4	<i>C. reinhardtii</i> CC-503	สายพันธุ์กลาย ไม่มีผนังเซลล์	Wollman <i>et al.</i> , 1980 Hyams and Devies, 1972 Voigt <i>et al.</i> , 1997

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 กระบอกตวง (Cylinder) (Kartell, Italy)
- 3.2.2 กระจกครอบ (GF/C) (GE Healthcare companies, UK)
- 3.2.3 กล้องจุลทรรศน์ชนิดถ่ายภาพได้ (Camera microscope) (Nikon Eclipse Ci-L, Japan)
- 3.2.4 กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่าง (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)
- 3.2.5 ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร (Headspace vial) (National Scientific, USA)
- 3.2.6 เข็มฉีดยา (Gas syringe) (Scientific Glass Engineering, Australia)
- 3.2.7 คิวเวตควอตซ์ (Semi-microquartz cuvette) (Starna Scientific, UK)
- 3.2.8 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)
- 3.2.9 เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hot plate with magnetic stirrer) (Vision VS130SH, Korea)
- 3.2.10 เครื่องแก้วต่างๆ (Glassware)
- 3.2.11 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)) (Hewlett-Packard, HP5890A GC, Japan)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.12 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)
- 3.2.13 เครื่องชั่งสาร (Balance) (Sartorius SI-234, Germany)
- 3.2.14 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)
- 3.2.15 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortech Z38K, Germany)
- 3.2.16 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Genie-2, Scientific Industries, USA)
- 3.2.17 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 3.2.18 เครื่องวัดออกซิเจน Clark-type oxygen electrode (Hansatech, UK)
- 3.2.19 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-601, Japan)
- 3.2.20 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)
- 3.2.21 เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (Heat block) (Labnet, USA)
- 3.2.22 คิวเวตควอตซ์ (Quartz cuvette) (Starna Scientific, UK)
- 3.2.23 จานเพาะเลี้ยง (Plate) (Pyrex, USA)
- 3.2.24 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
- 3.2.25 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 3.2.26 โถดูดความชื้นเดซิเคเตอร์ (Desiccator)
- 3.2.27 บีกเกอร์ (Beaker)
- 3.2.28 ปิเปตทิป (Pipette tip)
- 3.2.29 พาราฟิล์ม (Parafilm) (Bemis company, USA)
- 3.2.30 ฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) (Pyrex, USA)
- 3.2.31 ไมโครปิเปต (Micropipette) (Labnet, USA)
- 3.2.32 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.2.33 หลอดเซ็นตริฟิวจ์ (Centrifuge tube)
- 3.2.34 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) (Precicolor HBG, Germany)

3.3 อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate Medium (TAP) (Harris, 1989) (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 สารเคมี

3.4.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.4.1.1 กรดบอริก (H_3BO_3) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.2 กรดอะซิติก (Glacial acetic acid) (Ajax Finechem, Australia)
- 3.4.1.3 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (Mallinckrodt Baker, USA)
- 3.4.1.4 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.5 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) (Fluka, Switzerland)
- 3.4.1.6 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka, Switzerland)
- 3.4.1.7 โซเดียมคลอไรด์ ($NaCl$) (Merck, Germany)
- 3.4.1.8 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) (British Drug Houses, England)
- 3.4.1.9 โซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa) (Merck, Germany)
- 3.4.1.10 ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA) (Promega, USA)
- 3.4.1.11 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.12 ทริสเบส (Tris-base) (Vivantis, Malaysia)
- 3.4.1.13 น้ำตาลกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) (Merck, Germany)
- 3.2.2.14 น้ำตาลซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.15 น้ำตาลฟรักโทส ($C_6H_{12}O_6$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.2.16 น้ำตาลมอลโทส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Merck, Germany)
- 3.2.2.17 น้ำตาลแลกโทส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Sigma, USA)
- 3.4.1.18 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.19 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.20 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.21 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.1.22 อะการ์ (Agar) (Difco, USA)
- 3.4.1.23 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (Carlo Erba, Italy)

3.4.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

- 3.4.2.1 เมทานอล (CH_3OH) (Analytical grade, RCI Labscan, Thailand)
- 3.4.2.2 อะซีโตน (CH_3COCH_3) (Analytical grade, Fisher Scientific, England)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

- 3.4.3.1 ไตรตัน เอ็กซ์-100 (Triton X-100)
- 3.4.3.2 โซเดียมไดไฮโอไนต์ ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (Sigma, Singapore)
- 3.4.3.3 เมทิลไวโอลเจนไดคลอไรด์ไฮเดรต ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Sigma, Singapore)

3.4.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

- 3.4.4.1 เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase) (Sigma, USA)

3.4.5 สารรีดิวซ์สำหรับให้อิเล็กตรอนแก่เซลล์สาหร่าย

- 3.4.5.1 กรดฟอร์มิก (CH_2O_2) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.5.2 กรดแอสคอร์บิก ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (Sigma, China)
- 3.4.5.3 กรดออกซาลิก ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) (Sigma, USA)
- 3.4.5.4 ซิสเทอีน ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$) (Sigma, USA)
- 3.4.5.5 โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.5.6 โซเดียมไดไฮโอไนต์ ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (Sigma, Singapore)
- 3.4.5.7 โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (NaBH_4) (Sigma, USA)
- 3.4.5.8 โซเดียมไฮโดรซัลไฟต์ ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$) (Sigma, USA)
- 3.4.5.9 ไดไทโอทรีอิตอล ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$) (Sigma, USA)
- 3.4.5.10 เบต้า-เมอแคปโทเอทานอล (HSCH₂CH₂OH) (Pharmacia Biotech, Sweden)
- 3.4.5.11 โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรตไตรไฮเดรต ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Sigma, USA)
- 3.4.5.12 เมทิลไวโอลเจนไดคลอไรด์ไฮเดรต ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) (Sigma, USA)

3.5 ก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนและออกซิเจน

- 3.5.1 ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาร์กอน (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Praxair, Thailand)
- 3.5.2 ก๊าซอาร์กอนความบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Thonburiwattana, Thailand)
- 3.5.3 ก๊าซออกซิเจนในบรรยากาศ 20.95 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว

3.6.1.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวบนอาหารแข็ง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวจำนวน 24 สายพันธุ์จากหัวเชื้อ โดยการเชื้อหรือลาก (Streak) เชื้อบนจานอาหารที่มีอาหารแข็ง Tris-Acetate-Phosphate (TAP) (ภาคผนวก ข) นำจานอาหารแข็งไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3-5 วัน

3.6.1.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวจำนวน 24 สายพันธุ์ โดยการเชื้อเซลล์สาหร่ายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและให้แสงสว่างตลอดเวลาที่ความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำสารแขวนลอยเซลล์ใส่ในหลอดเซนต์ริฟัจ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ล้างตะกอนเซลล์ด้วยอาหาร TAP จำนวน 2 รอบ นำเซลล์สาหร่ายจำนวน 24 สายพันธุ์ไปกระจายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 จากนั้น นำฟลาสก์ไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

3.6.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาใส่ในหลอดไมโครเซนต์ริฟัจขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้น นำตะกอนเซลล์มาเติมตัวทำละลายอะซิโตนที่มีความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) สำหรับการสกัดคลอโรฟิลล์ในสาหร่าย *Chlamydomonas* และเติมตัวทำละลายเมทานอลที่มีความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) สำหรับการสกัดคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่น ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex mixer) บ่มในที่มีมืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำหลอดมาปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 647 และ 664 นาโนเมตร สำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นคลอโรฟิลล์ของสาหร่าย *Chlamydomonas* ที่เติมอะซิโตน ทำการคำนวณความเข้มข้นคลอโรฟิลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ควรนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ผ่านการอนุมัติจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามวิธีของ Jeffrey and Humphrey (1975) ดังสมการที่ 3.1 ส่วนสำหรับยีสี่เขี้ยวสายพันธุ์อื่นที่เติมเมทานอล นำสารละลายส่วนใส่ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 650 และ 665 นาโนเมตร ทำการคำนวณความเข้มข้นคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Lee and Shen (2004) ดังสมการที่ 3.2

$$\begin{aligned} & \text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดจากการใช้ตัวทำละลายอะซีโตน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} \\ & = ((11.93 \times E_{664}) - (1.93 \times E_{647})) + ((20.36 \times E_{647}) - (5.50 \times E_{664})) \end{aligned} \quad \text{สมการที่ 3.1}$$

$$\begin{aligned} & \text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดจากการใช้ตัวทำละลายเมทานอล (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} \\ & = (4.0 \times A_{665}) + (25.5 \times A_{650}) \end{aligned} \quad \text{สมการที่ 3.2}$$

3.6.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดเซนต์ริฟวี่ขนาด 85 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยใส่ลงในขวดแก้วปริมาตร 10 มิลลิลิตรและปิดฝา ทำการบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนบริเวณช่องอากาศด้านบนในขวดทดลอง (Headspace) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีเทอร์มอลคอนดักทีวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector, GC-TCD) เปรียบเทียบกับก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ ในก๊าซอาร์กอน (ปริมาตรต่อปริมาตร) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนแสดงในตารางที่ 3.4 จากนั้น คำนวณอัตราการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณไฮโดรเจนตามวิธีดังแสดงในภาคผนวก ค ในหน่วยมิลลิลิตรต่อลิตร (mL L^{-1}) และไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ($\mu\text{molH}_2 \text{ mg chl}^{-1}$)

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์โมลอคอนดักทีวิตีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)) (Taikhao *et al.*, 2013)

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Detector	Thermal conductivity detector (TCD)
Column	Packed SS column 2m x 4mm OD x 3mm ID p/w Molecular sieve 5 Å 60/80 mesh
Temperature program	Injector temperature at 100 °C Column temperature at 50 °C Detector temperature at 100 °C
Carrier gas	Argon gas (99.999% purity) with flow rate 20 mL min ⁻¹

3.6.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนบริเวณ Headspace

นำเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในพลาสติกที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 85 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยใส่ลงในขวดแก้วปริมาตร 10 มิลลิลิตรและปิดฝา ทำการบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้น วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนบริเวณช่องอากาศด้านบนในขวดทดลอง (Headspace) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์โมลอคอนดักทีวิตีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector, GC-TCD) เปรียบเทียบกับก๊าซออกซิเจนในบรรยากาศปกติ 20.95 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนแสดงในตารางที่ 3.4 จากนั้น คำนวณปริมาณออกซิเจนตามวิธีดังแสดงในภาคผนวก ค ในหน่วยไมโครโมลออกซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ($\mu\text{molO}_2 \text{ mg chl}^{-1}$)

3.6.5 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวจำนวน 24 สายพันธุ์ในพลาสติกที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยใส่ลงในขวดแก้วและปิดฝา วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส โดยนำเซลล์สาหร่ายมา 500 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาดูเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใส่ในขวดแก้วปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ซึ่งมีไตรตันเอ็กซ์-100 (Triton X-100) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) โซเดียมไดไธโอนิต (Sodium dithionite) ความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิโมลาร์ และเมทิลไวโอลเจนไดคลอไรด์ไฮเดรต (Methyl viologen dichlorohydrate) ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่มีด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น ทำการคำนวณปริมาณ การผลิตไฮโดรเจนที่แสดงในภาคผนวก ค

3.6.6 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและหายใจ

นำเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในพลาสติกที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 85 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยใส่ลงในขวดแก้วปริมาตร 10 มิลลิลิตรและปิดฝา จากนั้น ทำการบ่มเซลล์ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและหายใจ ด้วยเครื่อง Clark-type oxygen electrode (Hansatech, UK) โดยเติมสารโซเดียมไดไธโอนิต (Sodium dithionite) ปริมาณ 1 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่นลงใน Chamber สำหรับปรับค่าเริ่มต้นของ เครื่อง Clark-type oxygen electrode เท่ากับศูนย์ จากนั้น แทนที่ด้วยการเติมเซลล์แขวนลอย 2 มิลลิลิตร และบ่มภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสงเท่ากับ 300 ไมโครโมลโฟตอนต่อ ตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 15 นาที สำหรับการวิเคราะห์ออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง จากนั้น บ่มเซลล์ที่มีดเป็นเวลา 15 นาที สำหรับการวิเคราะห์ออกซิเจนจากกระบวนการหายใจ (Mattos *et al.*, 2015) อัตราการเปลี่ยนแปลงออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและหายใจ จะถูกคำนวณในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ($\mu\text{molO}_2 \text{ mg chl}^{-1}$)

3.6.7 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแป้ง

นำสารแขวนลอยเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็น- ตริฟิวจ์ นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการทิ้งส่วนใส จากนั้น เติมน้ำทำละลายเมทานอลเพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ ทำการปั่นเหวี่ยงสาร แขวนลอยเซลล์ของสาหร่ายอีกครั้ง จากนั้น นำตะกอนเซลล์ของสาหร่ายมาเติมน้ำบัฟเฟอร์ โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร แล้วนำสาร แขวนลอยเซลล์ของสาหร่ายมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic Homogenizer Sonicator เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ทำละลายแป้งภายในเซลล์สาหร่ายโดยใช้ความร้อนสูงด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อ ด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำโซเดียมอะซิเตท 2.2 เอกสารนี้เยือนิตต่อมิลลิลิตร แล้วนำเซลล์ไปแช่ในอ่างที่ควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากนั้น ปรับปริมาตร ไม้ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิลิตร ตามวิธีของ Gfeller และ Gibbs (1984) จากนั้น ทำการปั่นเหวี่ยง นำตะกอนเซลล์ไปตรวจหาความเข้มข้นของกลูโคสด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS method) (Miller GL, 1959)

3.6.8 วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนในสถานะที่มีออกซิเจน

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวจำนวน 24 สายพันธุ์ ตามวิธีการในหัวข้อ 3.6.1 ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP จำนวน 2 ครั้ง กระจายเซลล์ในอาหาร TAP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารแขวนลอยเซลล์ลงในขวดแก้วและปิดฝา จากนั้น พ่นด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อไล่อากาศในขวดแก้ว ก่อนนำมาฉีดก๊าซออกซิเจนโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายในขวดแก้วเท่ากับ 10, 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มในที่มืด ทำการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในช่วงที่ 24 ด้วยเครื่อง GC-TCD ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.6.3 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียวตามวิธีในหัวข้อ 3.6.2 คัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงภายใต้สถานะที่มีออกซิเจนมาทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสต่อไป

3.6.9 วิธีการศึกษาปัจจัยที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดเลือก

3.6.9.1 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกจากหัวข้อ 3.6.8 และเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP จำนวน 2 ครั้ง กระจายเซลล์ในอาหาร TAP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารแขวนลอยใส่ลงในขวดแก้วและปิดฝา จากนั้น พ่นด้วยก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อไล่อากาศในขวดแก้ว นำมาฉีดก๊าซออกซิเจนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในขวดแก้วเท่ากับ 1, 2.5, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เทียบกับความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ชั่วโมงที่เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนและมีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงที่สุดด้วยเครื่อง GC-TCD ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.6.3 และ 3.6.5 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียวตามวิธีในหัวข้อ 3.6.2 จากนั้น วิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนที่ถูกเติมในเซลล์แล้วทำให้ค่าการผลิตไฮโดรเจนปริมาณสูงสุดลดลงครึ่งหนึ่ง (O_{2150})

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.9.2 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกจากหัวข้อ 3.6.9.1 ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 จากนั้น ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุกๆ 6 ชั่วโมง จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 72 จำนวน 3 ข้าง นำเซลล์แขวนลอยไปศึกษาความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ ดังแสดงในภาคผนวก ง และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

3.6.9.3 วิธีการศึกษาอายุเซลล์ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกจากหัวข้อ 3.6.9.1 ตามวิธีในหัวข้อ 3.6.1.2 เป็นเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วและปิดฝา บ่มเซลล์ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ชั่วโมงที่เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดด้วยเครื่อง GC-TCD ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.6.3 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียวตามวิธีในหัวข้อ 3.6.2

3.6.9.4 วิธีการศึกษาความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวที่มีอายุเซลล์ที่เหมาะสมจากหัวข้อ 3.6.9.3 ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP จำนวน 2 ครั้ง แปรผันค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของเซลล์แขวนลอยให้เท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 และ 2.0 จากนั้น นำไปเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและให้แสงต่อเนื่อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์แขวนลอยและล้างเซลล์อีกครั้ง จากนั้น กระจายเซลล์ในอาหาร TAP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ใส่ลงในขวดแก้วและปิดฝา แล้วบ่มเซลล์ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ชั่วโมงที่เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดด้วยเครื่อง GC-TCD ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.6.3 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียวตามวิธีในหัวข้อ 3.6.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.9.5 วิธีการศึกษาการขาดธาตุอาหารต่างๆต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย สีเขียวที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกและมีอายุเซลล์ที่เหมาะสม จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยว เซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ จำนวน 2 ครั้งด้วยอาหาร TAP แต่ละชนิดที่จะนำมาทดสอบ ได้แก่อาหาร TAP เป็นอาหารควบคุม, อาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (TAP-N), อาหาร TAP ที่ขาดแหล่ง ซัลเฟอร์ (TAP-S), อาหาร TAP ที่ขาดแหล่งฟอสฟอรัส (TAP-P) และอาหาร TAP ที่ขาดแหล่ง โพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารมากกว่า 1 แหล่ง โดยการขาดธาตุอาหารจะ แสดงในตาราง ข (ภาคผนวก ข) จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วและ ปิดฝา แล้วบ่มเซลล์ภายใต้ด้วยความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีความ เข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ เป็นเวลา 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง จากนั้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ชั่วโมงที่เซลล์มีการ ผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดด้วยเครื่อง GC-TCD ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.6.3 และ 3.6.5 และวิเคราะห์ปริมาณ คลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียวตามวิธีในหัวข้อ 3.6.2

3.6.9.6 วิธีการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต ไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกและมีอายุเซลล์ที่เหมาะสม จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยว เซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้งด้วยอาหาร TAP-K ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของแหล่ง คาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลแลค โทส โซเดียมอะซิเตท เปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนเดิม คือ กรดอะซิติก โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่ง คาร์บอนเท่ากับ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร นำเซลล์มากระจายในอาหารทดสอบและ ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วและปิดฝา แล้วบ่มเซลล์ภายใต้ด้วยความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ชั่วโมงที่เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดด้วย เครื่อง GC-TCD ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.6.3 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียวตามวิธี ในหัวข้อ 3.6.2 จากนั้น คัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมมาทำการแปรผันความเข้มข้น ของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือก โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 0, 8.7, 17.4, 34.8 และ 174 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร

3.6.9.7 วิธีการศึกษาผลของความเข้มแสงและรูปแบบการให้แสงต่อการผลิต

ไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกที่มีอายุเซลล์ที่เหมาะสม จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP-K จำนวน 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วและปิดฝา จากนั้น นำขวดไปบ่มที่มีแสงโดยการแปรผันความเข้มแสงเท่ากับ 0, 30, 60, 120, 240 และ 480 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น ทำการแปรผันรูปแบบการให้แสง (มีดสลับสว่าง) ในสถานะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ เป็นเวลา 100 ชั่วโมง จากนั้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ชั่วโมงที่เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดด้วยเครื่อง GC-TCD ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.6.3 วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียวตามวิธีในหัวข้อ 3.6.2

3.6.9.8 วิธีการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่

คัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกที่มีอายุเซลล์ที่เหมาะสม จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP-K จำนวน 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วและปิดฝา จากนั้น นำขวดไปบ่มที่มีแสงโดยการแปรผันความเข้มแสงเท่ากับ 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ นำขวดไปวางบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ชั่วโมงที่เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดด้วยเครื่อง GC-TCD ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.6.3 วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียวตามวิธีในหัวข้อ 3.6.2

3.6.9.9 วิธีการศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของ

สาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกที่มีอายุเซลล์ที่เหมาะสม จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้ง และกระจายลงในอาหาร TAP-K ที่มีการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับพีเอช 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.2, 7.5, 8, 8.5 ถึง 9 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.2 เป็นพีเอชปกติของอาหาร TAP-K ใช้เป็นตัวแปรควบคุม) จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วและปิดฝา จากนั้น นำขวดไปบ่มที่มีแสงทำการบ่มภายใต้การให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง จากนั้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ชั่วโมงที่เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดด้วยเครื่อง GC-TCD ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.6.3 วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียวตามวิธีในหัวข้อ 3.6.2

3.6.9.10 วิธีการศึกษาผลของสารรีดิวซ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกที่มีอายุเซลล์ที่เหมาะสม จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP จำนวน 2 ครั้ง โดยทำการทดสอบสารรีดิวซ์ ได้แก่ แอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ซิสเทอีน (Cysteine) ไดไธโอไทรโธล (Dithiothreitol) กรดฟอร์มิก (Formic acid) เมทิลไวโอโลเจน (Methylviologen) โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอไรต์ (II) ไตรไฮเดรต (Potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate) โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (Sodium borohydride) โซเดียมไดไธโอไนต์ (Sodium dithionite) โซเดียมซัลไฟด์นาโนไฮเดรต (Sodium Sulfide nanohydrate) กรดออกซาลิก (Oxalic acid) เบตา-เมอร์แคปโตเอทานอล (β -mercaptoethanol) ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลต่อลิตร จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วและปิดฝา แล้วบ่มเซลล์ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ เป็นเวลา 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง จากนั้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ชั่วโมงที่เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดด้วยเครื่อง GC-TCD ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.6.3 วิเคราะห์การลดลงของปริมาณออกซิเจนตามวิธีในหัวข้อที่ 3.6.4 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียวตามวิธีในหัวข้อ 3.6.2

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

4.1.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 24 สายพันธุ์ ซึ่งเก็บรวบรวมไว้ในห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยนำเซลล์สาหร่ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Tris-acetate phosphate (TAP) ที่พีเอช 7.2 เป็นเวลา 3 วัน นำเซลล์มาศึกษารูปร่างและลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่างชนิดถ่ายภาพ (Nikon Eclipse Ci) ที่กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า และบันทึกภาพโดยใช้โปรแกรม NIS-Elements D 3.2 พบว่าสาหร่ายสีเขียวมีลักษณะรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถจัดกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวได้เป็น 6 กลุ่ม (ตารางที่ 4.1) คือ กลุ่มที่ 1 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวที่มีโคโลนีลักษณะกลมและมีเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่า 5 ไมโครเมตร ได้แก่ *Chlorella* sp. 1SinS1, *Chlorella* sp. 2SinS4, *Chlorella* sp. 2TKS2.2, *Chlorella* sp. ChiW1 และ *Chlorella* sp. KMITL CirG กลุ่มที่ 2 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวที่มีโคโลนีกลมและมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 ไมโครเมตร ได้แก่ *Chlorella* sp. ChiS4, *Chlorella* sp. LSD-W1, *Coelastrum microporum* TISTR 8568, *Coelastrum reticulatum* TISTR 8562, *Coelastella* sp. CH, *Coelastrum* sp. SD, *Micractinium* sp. A25.1, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546, *Tetraspora* sp. CU2551 และ Undetected WTK-W3.1 กลุ่มที่ 3 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวที่มีโคโลนีเป็นวงรี ปลายเซลล์มีความโค้งงอและบิดเบี้ยว มีความกว้างประมาณ 2.5 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 5.5 ไมโครเมตร ได้แก่ *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ Undetected B35.1 กลุ่มที่ 4 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวที่มีโคโลนีลักษณะพระจันทร์เสี้ยว ปลายเซลล์มีความเรียวยาวแหลม มีความกว้าง 4.4 ไมโครเมตรและความยาว 31.4 ไมโครเมตร ได้แก่ *Monoraphidium branuii* TISTR 8553 กลุ่มที่ 5 สาหร่ายสีเขียวรูปร่างรี เซลล์เรียงติดกัน 2, 4 หรือ 8 เซลล์คล้ายกระสวย มีแฟลกเจลลาทั้ง 4 มุมเซลล์ มีความกว้างประมาณ 14 ไมโครเมตรและความยาวประมาณ 25 ไมโครเมตร ได้แก่ *Scenedesmus armatus* TISTR 8641 และ *Scenedesmus* sp. L กลุ่มที่ 6 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวที่มีโคโลนีกลม มี eyespot ชัดเจน และด้านบนมีแฟลกเจลลา 2 เส้น มีความกว้าง 8 ไมโครเมตรและความยาว 10 ไมโครเมตร ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chlamydomonas reinhardtii CC-4147 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503
ภาพถ่ายแต่ละสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวแสดงในภาคผนวก ก

ตารางที่ 4.1 ความกว้างและความยาวโดยประมาณของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 24 สายพันธุ์ที่ถูกแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ชนิดของสาหร่าย	สายพันธุ์	ความกว้าง (ไมโครเมตร)	ความยาว (ไมโครเมตร)
ทรงกลม (< 5 ไมโครเมตร)	<i>Chlorella</i> sp.	1SinS1.1	4.375 ± 0.361	5.234 ± 0.393
	<i>Chlorella</i> sp.	2SinS4	3.221 ± 0.184	3.462 ± 0.314
	<i>Chlorella</i> sp.	2TKS2.2	2.955 ± 0.262	3.750 ± 0.572
	<i>Chlorella</i> sp.	ChiW1	3.571 ± 0.583	4.107 ± 0.684
	<i>Chlorella</i> sp.	KMITL CirG	4.107 ± 0.899	5.179 ± 0.357
ทรงกลม (> 5 ไมโครเมตร)	<i>Chlorella</i> sp.	ChiS4	10.690 ± 0.890	11.379 ± 1.195
	<i>Chlorella</i> sp.	LSD-W1	5.893 ± 0.899	6.429 ± 0.583
	<i>Coelastrum microporum</i>	TISTR 8568	9.167 ± 2.357	10.000 ± 2.357
	<i>Coelastrum reticulatum</i>	TISTR 8562	9.200 ± 1.033	10.000 ± 1.033
	<i>Coelastella</i> sp.	CH	7.778 ± 0.907	9.722 ± 1.064
	<i>Coelastrum</i> sp.	SD	4.583 ± 1.076	9.583 ± 0.481
	<i>Micractinium</i> sp.	A25.1	6.250 ± 0.481	6.250 ± 0.481
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	TISTR 8546	8.056 ± 2.922	11.389 ± 2.103
	<i>Tetraspora</i> sp.	CU2551	6.875 ± 0.417	7.500 ± 0.680
	Undetected	WTK-W3.1	5.000 ± 0.962	5.833 ± 1.179
ทรงกลมรี	<i>Scenedesmus</i> sp.	KMITL OVG-1	1.900 ± 0.159	5.000 ± 0.385
	Undetected	B35.1	3.333 ± 0.680	6.667 ± 0.680
ทรงพระจันทร์เสี้ยว	<i>Monoraphidium branuii</i>	TISTR 8553	4.435 ± 1.397	31.452 ± 5.349
ทรงกระบอกและมี	<i>Scenedesmus armatus</i>	TISTR 8641	14.800 ± 1.033	21.200 ± 1.532
แฟลกเจลลา	<i>Scenedesmus</i> sp.	L	13.571 ± 0.825	28.214 ± 0.714
ทรงกลมและมี	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CC-124	8.051 ± 0.981	9.012 ± 0.812
แฟลกเจลลา	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CC-125	9.103 ± 1.017	10.800 ± 1.562
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CC-4147	9.612 ± 0.312	10.276 ± 0.644
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CC-503	5.981 ± 0.341	6.712 ± 0.479

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลการคัดเลือกเบื้องต้นของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้ สภาวะที่มีออกซิเจน

จากการนำสาหร่ายสีเขียวจำนวน 24 สายพันธุ์ มาศึกษาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนจากการฉีด (Injection) เท่ากับ 0, 10, 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใน headspace โดยบ่มในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถตรวจวัดการผลิตไฮโดรเจนได้ในสาหร่ายสีเขียวจำนวน 21 สายพันธุ์ ส่วนสาหร่ายสีเขียวที่เหลือจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Coelastrum reticulatum* TISTR 8562, *Scenedesmus armatus* TISTR 8641 และ *Scenedesmus* sp. L ไม่พบการผลิตไฮโดรเจน แม้อยู่ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน (ตารางที่ 4.2) ในบรรดาสาหร่ายสีเขียว 21 สายพันธุ์ที่สามารถตรวจพบการผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 34.546 ± 0.838 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เมื่อบ่มเซลล์ในสภาวะมืดที่ปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.2) สาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนรองลงมาคือ สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551, *C. reinhardtii* CC-125, *Chlorella* sp. 2SinS4 และ *C. reinhardtii* CC-124 โดยผลิตไฮโดรเจนได้ 29.125 ± 0.534 , 25.549 ± 0.149 , 24.771 ± 0.606 และ 23.953 ± 0.276 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้ความเข้มข้นของออกซิเจนใน headspace ที่แตกต่างกัน พบว่า สาหร่ายสีเขียวทุกสายพันธุ์ผลิตไฮโดรเจนลดลง เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนใน headspace เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.2) สาหร่ายสีเขียวทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *C. reinhardtii* CC-124, *C. reinhardtii* CC-125, *Chlorella* sp. 2SinS4, *S. obliquus* TISTR 8546 และ *Tetraspora* sp. CU2551 มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 30.2-38.7, 64.9-77.3 และ 77.6-90.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนเพิ่มขึ้นจาก 0 ไปเป็น 10, 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ตามลำดับ)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสายพันธุ์ที่ไม่ในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนเริ่มต้น 0, 10, 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ลำดับที่	สายพันธุ์ของสายพันธุ์ไฮโดรเจน	ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์) (เปอร์เซ็นต์การลดลงของไฮโดรเจน)			
		0	10	20	50
1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124	23.953 ± 0.276 ^c (100%)	16.435 ± 0.857 ^c (31.4%) ²	5.433 ± 0.831 ^d (77.3%) ⁵	2.899 ± 0.201 ^b (87.9%) ²
2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-125	25.549 ± 0.149 ^c (100%)	17.835 ± 0.022 ^b (30.2%) ¹	6.272 ± 0.120 ^{bc} (75.5%) ²	3.086 ± 0.107 ^b (87.9%) ³
3	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-4147	4.288 ± 0.295 ^{ij} (100%)	1.922 ± 0.344 ^h (55.2%)	0.658 ± 0.100 ^h (84.7%)	0.156 ± 0.008 ^{hi} (96.4%)
4	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-503	11.775 ± 0.559 ^{is} (100%)	3.945 ± 0.219 ^s (66.5%)	2.037 ± 0.086 ^{ef} (82.7%)	0.510 ± 0.065 ^{gh} (95.7%)
5	<i>Chlorella</i> sp. 15inS1.1	8.947 ± 0.360 ^h (100%)	0.699 ± 0.017 ^{ij} (92.2%)	0.258 ± 0.080 ^h (97.1%)	0.153 ± 0.036 ^{hi} (98.3%)
6	<i>Chlorella</i> sp. 25inS4	24.771 ± 0.606 ^c (100%)	15.204 ± 0.145 ^d (38.6%) ⁴	6.066 ± 0.153 ^{cd} (75.5%) ³	2.457 ± 0.089 ^c (90.1%) ⁵
7	<i>Chlorella</i> sp. 2TKS2.2	1.243 ± 0.121 ^k (100%)	0.612 ± 0.011 ^l (50.8%)	0.205 ± 0.034 ^h (83.5%)	0.110 ± 0.015 ⁱ (91.2%)
8	<i>Chlorella</i> sp. ChiS4	0.887 ± 0.057 ^k (100%)	0.490 ± 0.024 ^l (44.7%)	0.137 ± 0.016 ^h (84.6%)	0.070 ± 0.005 ⁱ (92.1%)
9	<i>Chlorella</i> sp. ChiW1	17.679 ± 0.158 ^d (100%)	6.488 ± 0.174 ^e (63.3%)	2.746 ± 0.015 ^e (84.5%)	1.569 ± 0.066 ^d (91.1%)
10	<i>Chlorella</i> sp. KMITL CirG	7.931 ± 0.195 ^h (100%)	3.946 ± 1.269 ^s (50.2%)	1.510 ± 0.036 ^{fs} (81.0%)	0.599 ± 0.125 ^{fs} (92.4%)
11	<i>Chlorella</i> sp. LSD-W1	5.066 ± 0.080 ⁱ (100%)	1.874 ± 0.172 ^h (63.0%)	0.902 ± 0.047 ^{gh} (82.2%)	0.264 ± 0.044 ^{ghi} (94.8%)
12	<i>Coelastrum microporum</i> TISTR 8568	3.985 ± 0.243 ^{ij} (100%)	1.552 ± 0.108 ^{hi} (61.0%)	0.703 ± 0.056 ^h (82.4%)	0.307 ± 0.038 ^{ghi} (92.3%)
13	<i>Coelastrum reticulatum</i> TISTR 8562	ND	ND	ND	ND
14	<i>Coelastella</i> sp. CH	4.178 ± 0.243 ^{ij} (100%)	1.836 ± 0.084 ^h (56.1%)	0.665 ± 0.064 ^h (84.1%)	0.120 ± 0.012 ⁱ (97.1%)
15	<i>Coelastrum</i> sp. SD	3.280 ± 0.050 ^{ijk} (100%)	1.764 ± 0.156 ^{hi} (46.2%)	0.504 ± 0.028 ^h (84.6%)	0.263 ± 0.004 ^{ghi} (92.0%)

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสายพันธุ์ที่ไม่ในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนเริ่มต้น 0, 10, 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ลำดับที่	สายพันธุ์ของสายพันธุ์เชื้อ	ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์) (เปอร์เซ็นต์การลดลงของไฮโดรเจน)			
		0	10	20	50
16	<i>Microctinium</i> sp. A25.1	9.358 ± 0.715 ^{gh}	4.499 ± 1.006 ^{fs}	1.783 ± 0.085 ^f	0.192 ± 0.025 ^{hi}
17	<i>Monoraphidium branuii</i> TISTR 8553	1.706 ± 0.446 ^k	0.231 ± 0.008 ^l	0.208 ± 0.038 ^h	0.112 ± 0.019 ⁱ
18	<i>Scenedesmus armatus</i> TISTR 8641	ND	ND	ND	ND
19	<i>Scenedesmus obliquus</i> TISTR 8546	34.546 ± 0.838 ^a	22.738 ± 0.024 ^a	12.118 ± 1.413 ^a	7.727 ± 0.811 ^a
20	<i>Scenedesmus</i> sp. L	ND	ND	ND	ND
21	<i>Scenedesmus</i> sp. KMITL OVG-1	14.693 ± 0.902 ^e	5.736 ± 0.846 ^{ef}	2.768 ± 0.270 ^e	1.234 ± 0.075 ^e
22	<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	29.125 ± 0.534 ^b	17.862 ± 0.326 ^b	6.843 ± 0.097 ^b	3.207 ± 0.044 ^b
23	Undetected B35.1	12.197 ± 0.166 ^{ef}	4.718 ± 0.662 ^{fs}	2.227 ± 0.163 ^{ef}	0.846 ± 0.046 ^f
24	Undetected WTK-W3.1	18.445 ± 0.867 ^d	4.575 ± 0.189 ^s	0.230 ± 0.027 ^h	0.139 ± 0.074 ⁱ

หมายเหตุ ND: ไม่สามารถตรวจวัดได้ (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสทมภ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของปริมาณการผลิตไฮโดรเจน)

จากผลการทดลองพบว่า ออกซิเจนมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว โดยเมื่อมีความเข้มข้นออกซิเจนใน headspace เพิ่มขึ้น สาหร่ายจะผลิตไฮโดรเจนลดลง ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากออกซิเจนเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว (Melis *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2020) โดยออกซิเจนจะเข้าไปจับกับบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบในสาหร่ายสีเขียว ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนให้ผลิตไฮโดรเจนได้ ผลการทดลองที่ได้เป็นไปตามทฤษฎี โดยพบว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายลดลงตามความเข้มข้นของออกซิเจนที่เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม สาหร่ายสีเขียวแต่ละสายพันธุ์มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีความสามารถในการทนต่อออกซิเจนได้แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์สาหร่ายที่แตกต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้ สนใจศึกษาชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะที่มีแสง จึงได้ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *C. reinhardtii* CC-124, *C. reinhardtii* CC-125, *Chlorella* sp. 2SinS4, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 และ *Tetraspora* sp. CU2551 ไปทำการคัดเลือกชนิดของสาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในสภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนที่แตกต่างกันภายใต้สภาวะที่มีแสงต่อไป

4.1.3 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกเบื้องต้นภายใต้สภาวะที่มีแสง

จากการนำสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกเบื้องต้นจากหัวข้อ 4.1.2 จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *C. reinhardtii* CC-124, *C. reinhardtii* CC-125, *Chlorella* sp. 2SinS4, *S. obliquus* TISTR 8546 และ *Tetraspora* sp. CU2551 มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนจากการฉีด (injection) เท่ากับ 0, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายใต้ที่มีแสงความเข้ม 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายมาศึกษาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรจีเนส พบว่า สาหร่ายสีเขียวทุกสายพันธุ์มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน (ตารางที่ 4.3) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในหัวข้อ 4.1.2 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทุกสายพันธุ์ที่บ่มในสภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนเท่ากันพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดในทุกความเข้มข้นของออกซิเจน โดยมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 119.761 ± 1.334 , 102.122 ± 2.838 , 82.948 ± 3.281 , 55.383 ± 5.518 , 39.658 ± 4.027 และ 32.448 ± 4.952 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ภายใต้ความเข้มข้นของออกซิเจน 0, 1, 2.5, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสายรหัสชีวจำนวน 5 สายพันธุ์ที่ไม่ในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีที่ความเข้มข้นของออกซิเจนเริ่มต้น 0, 1, 2.5, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สายพันธุ์ของ สาหร่ายสีเขียว	ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์) (เปอร์เซ็นต์การลดลงของไฮโดรเจน)					
	0	1	2.5	5	10	20
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	99.839 ± 0.916 ^c (100%)	82.933 ± 3.121 ^c (16.9%)	57.744 ± 2.620 ^c (42.2%)	34.910 ± 8.585 ^{b,c} (65.0%)	24.801 ± 1.119 ^c (75.2%)	16.593 ± 1.886 ^c (83.4%)
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	106.061 ± 1.713 ^b (100%)	89.330 ± 1.179 ^b (15.8%)	69.841 ± 2.809 ^b (34.2%)	41.916 ± 1.791 ^b (60.5%)	31.835 ± 2.309 ^b (70.0%)	24.820 ± 2.836 ^b (76.6%)
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	89.306 ± 1.065 ^e (100%)	77.130 ± 2.208 ^d (13.6%)	50.098 ± 1.680 ^d (43.9%)	27.516 ± 5.482 ^c (69.2%)	21.714 ± 2.865 ^c (75.7%)	12.881 ± 0.302 ^c (85.6%)
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	119.761 ± 1.334 ^a (100%)	102.122 ± 2.838 ^c (14.7%)	82.948 ± 3.281 ^a (30.7%)	55.383 ± 5.518 ^c (53.8%)	39.658 ± 4.027 ^a (66.9%)	32.448 ± 4.952 ^d (72.9%)
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	94.213 ± 2.823 ^d (100%)	60.724 ± 2.815 ^e (35.6%)	31.253 ± 1.236 ^e (66.8%)	16.295 ± 1.954 ^d (82.7%)	10.961 ± 0.639 ^d (88.4%)	6.771 ± 0.200 ^d (92.8%)

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสมรภูมิแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของปริมาณการผลิตไฮโดรเจน

เมื่อนำเซลล์สาหร่ายสีเขียวทั้ง 5 สายพันธุ์ไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจน 0, 1, 2.5, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวทุกสายพันธุ์ลดลง เมื่อบ่มในสภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.4) ในบรรดาสาหร่ายสีเขียวทั้ง 5 สายพันธุ์ สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงสุด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเท่ากับ 8.624 ± 0.183 , 7.495 ± 0.226 , 6.498 ± 0.181 , 5.473 ± 0.208 , 4.876 ± 0.110 และ 4.103 ± 0.096 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที่ ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจน 0, 1, 2.5, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) จากการทดลองพบว่าปริมาณการผลิตไฮโดรเจนที่สาหร่ายผลิตได้สอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส กล่าวคือ เมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะลดลง ทำให้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนลดลง (ตารางที่ 4.4)

สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว ซึ่งมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์จำนวน 2, 4, 8 และ 32 เซลล์ มีรูปร่างของเซลล์เป็นรูปไข่ รูปกระสวย หรือรูปกระบอก และสามารถพบได้ในแหล่งน้ำจืดทั่วไป สาหร่าย *S. obliquus* เป็นสาหร่ายชนิดแรกที่ถูกค้นพบว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ทั้งในที่มืดและที่มีแสง ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน จากการดำเนินงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Gaffron and Rubin 1942; Florin 2001) มีรายงานพบว่า สาหร่าย *S. obliquus* UTEX 393 สามารถผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้ความเข้มข้นของออกซิเจนได้ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเท่ากับ 0.02 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที่ (Fan *et al.*, 2016) ซึ่งน้อยกว่าค่าที่ได้จาก *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้ความเข้มข้นของออกซิเจน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับ 6.50 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที่ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจิเนสของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 5 สายพันธุ์ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีที่ความเข้มข้นของออกซิเจนเริ่มต้น 0, 1, 2.5, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว	ค่า O_2 (เปอร์เซ็นต์)	กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจิเนส (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที)					
		0	1	2.5	5	10	20
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	12.91 ± 1.50 ^b	5.831 ± 0.124 ^c	5.315 ± 0.257 ^c	4.389 ± 0.191 ^c	3.577 ± 0.395 ^c	2.960 ± 0.413 ^c	2.079 ± 0.324 ^c
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	15.09 ± 0.33 ^a	6.979 ± 0.145 ^b	5.967 ± 0.293 ^b	5.149 ± 0.116 ^b	4.532 ± 0.300 ^b	4.003 ± 0.260 ^b	3.053 ± 0.110 ^b
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	9.84 ± 0.54 ^c	5.604 ± 0.304 ^c	4.887 ± 0.269 ^c	4.189 ± 0.205 ^c	2.676 ± 0.148 ^d	1.977 ± 0.119 ^d	1.463 ± 0.030 ^d
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	15.93 ± 0.24 ^a	8.624 ± 0.183 ^a	7.495 ± 0.226 ^a	6.498 ± 0.181 ^a	5.473 ± 0.208 ^a	4.876 ± 0.110 ^a	4.103 ± 0.096 ^a
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	7.61 ± 0.46 ^d	5.089 ± 0.211 ^d	3.517 ± 0.147 ^d	3.153 ± 0.190 ^d	2.122 ± 0.276 ^e	1.443 ± 0.073 ^e	1.102 ± 0.130 ^e

หมายเหตุ ค่า O_2 แสดงความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนระดับบึงที่มีผลไปยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจิเนสให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสทมภ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรจิเนส)

สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว ซึ่งมีรูปร่างเป็นทรงกลม โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-100 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลลา 2 เส้น และมีอายุสปีดช่วยในการรับแสง สาหร่ายชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปทั้งแหล่งน้ำและดิน สาหร่าย *C. reinhardtii* ถูกใช้เป็นตัวแบบในการศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์สาหร่ายสีเขียว เนื่องจากมีฐานข้อมูลลำดับเบสของจีโนมทั้งหมด รวมทั้งเป็นสาหร่ายที่ได้รับความนิยมสำหรับการศึกษากระบวนการผลิตไฮโดรเจน (Harris 2001; Scranton *et al.*, 2015) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสใน *C. reinhardtii* ถูกพบว่ามีความไวต่อออกซิเจน โดยทำงานได้ดีเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน (Roessler and Lien 1984) เมื่อบ่มสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของออกซิเจนพบว่า เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานลดลง เมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนในระบบเพิ่มขึ้น โดยผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 35 และ 5 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มในออกซิเจนความเข้มข้น 0 และ 1.4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ (Fan *et al.*, 2016) จากการทดลองนี้พบว่า สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 4.16 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่ออยู่ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน (ตารางที่ 4.3) ซึ่งค่าที่ได้น้อยกว่าค่าที่ได้จากการทดลองของ Fan และคณะ (2016) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและสภาวะที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 และ *C. reinhardtii* CC-125 พบว่า *C. reinhardtii* CC-125 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่า *C. reinhardtii* CC-124 เล็กน้อย โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Khamheang และคณะ (2017) ที่พบว่า *C. reinhardtii* CC-125 ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่า *C. reinhardtii* CC-124 ประมาณ 1.5 เท่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (Khamheang *et al.*, 2017)

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว ซึ่งมีรูปร่างของเซลล์เป็นทรงกลมหรือรูปไข่ สามารถพบได้ในแหล่งน้ำจืดและน้ำเค็ม *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายที่ได้รับความนิยมสำหรับการศึกษากระบวนการผลิตไขมัน (Sorigué *et al.*, 2017) และถูกพบว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ (Winkler *et al.*, 2002) สาหร่าย *Chlorella vulgaris* YSL01 สามารถผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเท่ากับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยผลิตได้เท่ากับ 2.0 มิลลิตรต่อลิตร (Hwang *et al.*, 2013) จากผลการทดลองพบว่า *Chlorella* sp. 2SinS4 ซึ่งเมื่อเทียบกับงานวิจัยฉบับนี้ จะมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 3.924 ± 0.092 มิลลิตรต่อลิตร เมื่อบ่มภายใต้ความเข้มข้นออกซิเจน 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แสดงในตาราง จ 1 โดยแสดงให้เห็นว่า *Chlorella* sp. 2SinS4 มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติหรือมีความเข้มข้นออกซิเจน 1, 2.5, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ส่วน *Chlorella pyrenoidosa* FACHB-1222 มีเอนไซม์ไฮโดร

เอกสารนี้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จีเนสที่ทนต่อออกซิเจนอย่างมาก โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีค่าคงที่ เมื่อบ่มเซลล์ภายใต้บรรยากาศที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนตั้งแต่ 0-21 เปอร์เซ็นต์ (Fan *et al.*, 2016) ส่วนสาย *Chlorella pyrenoidosa* 707S มีการผลิตไฮโดรเจนใกล้เคียงกันภายใต้ความเข้มข้นของออกซิเจน 9.7, 16.7 และ 21 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ที่บ่มภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนประมาณ 2 เท่า (Shastik *et al.*, 2019)

สายสีเขียว *Tetraspora* sp. เป็นสายสีเขียวเซลล์เดี่ยวที่มีลักษณะคล้ายถุงใส ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์จำนวน 2-4 เซลล์ รูปร่างของเซลล์เป็นทรงกลม โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 ไมโครเมตร สายชนิดนี้สามารถพบได้ในแหล่งน้ำไหลที่มีอุณหภูมิที่เย็นหรือแหล่งน้ำจืด มีรายงานพบว่าสาย *Tetraspora* sp. CU2551 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) นอกจากนี้ เซลล์สาย *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ตรึงด้วยอัลจินต์ในอาหาร TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ภายใต้สภาวะมีออกซิเจนในบรรยากาศมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูง และมีปริมาณไฮโดรเจนสูงถึง 12.8 ± 0.9 มิลลิลิตรต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหาร ซึ่งมากกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหารภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนประมาณ 1.5 เท่า แต่เซลล์ที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจะใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้นในการผลิตไฮโดรเจนให้ได้ปริมาณสูงสุด โดยเพิ่มจากเดิม 108 ชั่วโมง เป็น 1,034 ชั่วโมง เนื่องจากออกซิเจนในปริมาณสูงมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Maswanna *et al.*, 2018; 2020) จากรายงานข้างต้นพบว่า การขาดธาตุซัลเฟอร์จะช่วยส่งเสริมให้ปริมาณออกซิเจนลดลง และการตรึงเซลล์ยังป้องกันไม่ให้ออกซิเจนเข้ามาภายในเซลล์ ออกซิเจนจึงไม่สามารถจับกับโมเลกุลของเหล็กบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานได้มากขึ้น ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น

จากการนำกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมาคำนวณค่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ทำให้กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (O_{2150}) พบว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาย *S. obliquus* TISTR 8546 มีค่า O_{2150} เท่ากับ 15.93 ± 0.24 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาย *C. reinhardtii* CC-125, *C. reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2SinS4 และ *Tetraspora* sp. CU2551 โดยมีค่า O_{2150} เท่ากับ 15.09 ± 0.33 , 12.91 ± 1.50 , 9.84 ± 0.54 และ 7.61 ± 0.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *S. obliquus* TISTR 8546 มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ทนต่อออกซิเจนได้ดีกว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจากสายชนิดอื่น นอกจากนี้ มีรายงานวิจัยพบว่า จลนศาสตร์ของการยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเร็วขึ้นจากความเข้มข้นของออกซิเจนในสายสีเขียวเพิ่มขึ้น (Goldet *et al.*, 2009)

มีรายงานค่า O_{2150} ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสายสีเขียวที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนแตกต่างกันตั้งแต่ 0-21 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสายที่ทนต่อออกซิเจนมากที่สุดคือเอนไซม์ในสาย *S. obliquus* UTEX 393 รองลงมาคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ในสาหร่าย *C. fusca* UTEX 292 และ *C. reinhardtii* CC-124 โดยมีค่า O_2 ต่อหน่วยเท่ากับ 1.23, 0.88 และ 0.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Fan et al., 2016) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยดังกล่าวโดยพบว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสใน *S. obliquus* TISTR 8546 มีค่า O_2 สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ในสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นที่ทำการทดลอง จากผลการทดลอง สาหร่ายยังสามารถเกิดกระบวนการผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจน 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณต่อปริมาณ) ถึงแม้ว่า ปริมาณไฮโดรเจนจะลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ป่มในสภาวะปราศจากออกซิเจนประมาณ 2-4 เท่า แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายที่คัดเลือกมีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนใกล้เคียงกับออกซิเจนในบรรยากาศคือเท่ากับ 21 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ทนต่อออกซิเจน โดยการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติเพื่อเน้นการลดต้นทุนในการซื้อก๊าซเฉื่อย และยังช่วยลดขั้นตอนในการไล่ออกซิเจนออกจากระบบอีกด้วย

4.1.4 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีแสงและออกซิเจนในบรรยากาศ

จากการนำสาหร่ายสีเขียวที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในปริมาณสูงจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *C. reinhardtii* CC-124, *C. reinhardtii* CC-125, *Chlorella* sp. 2SinS4, *S. obliquus* TISTR 8546 และ *Tetraspora* sp. CU2551 มาศึกษาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีแสงและมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ในช่วงเวลาที่ 24, 48, 72 และ 96 พบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.979 ± 0.017 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 34.601 ± 1.239 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในช่วงเวลาที่ 48 รองลงมาคือ *C. reinhardtii* CC-125 ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 0.642 ± 0.001 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 17.760 ± 0.594 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในช่วงเวลาที่ 48 (ตารางที่ 4.5) ส่วนสาหร่ายสีเขียวอีก 3 สายพันธุ์ สามารถตรวจวัดการผลิตไฮโดรเจนได้เช่นเดียวกัน โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ต่ำกว่าสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 และ *C. reinhardtii* CC-125 จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดทั้งในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนในที่มืด (ตารางที่ 4.2) ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนในที่ที่มีแสง (ตารางที่ 4.3) และในสภาวะที่มีออกซิเจนในบรรยากาศในที่ที่มีแสง (ตารางที่ 4.5) รองลงมาคือ *C. reinhardtii* CC-125 ที่มีการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงเช่นกัน จากผลการทดลองข้างต้นจึงได้ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 และ *C. reinhardtii* CC-125 มาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ

ปกติดต่อไป เอกสารนี้ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดและปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสายเชื้อเพลิงจำนวน 5 สายพันธุ์ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีและมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

สายพันธุ์ของ สาหร่ายสีเขียว	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อ มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง)	ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์)		
		24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
<i>Creinhardtii</i> CC-124	0.456 ± 0.015 ^c	10.945 ± 0.366 ^c	13.192 ± 0.922 ^c	8.873 ± 0.526 ^c
<i>Creinhardtii</i> CC-125	0.642 ± 0.001 ^b	15.406 ± 0.031 ^b	17.760 ± 0.594 ^b	12.200 ± 0.883 ^b
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	0.339 ± 0.007 ^d	8.145 ± 0.163 ^d	11.412 ± 0.898 ^d	6.502 ± 0.640 ^d
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	0.979 ± 0.017 ^a	23.506 ± 0.397 ^a	34.601 ± 1.239 ^a	33.159 ± 1.345 ^a
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	0.142 ± 0.027 ^e	3.397 ± 0.656 ^e	4.008 ± 0.553 ^e	1.899 ± 0.178 ^e

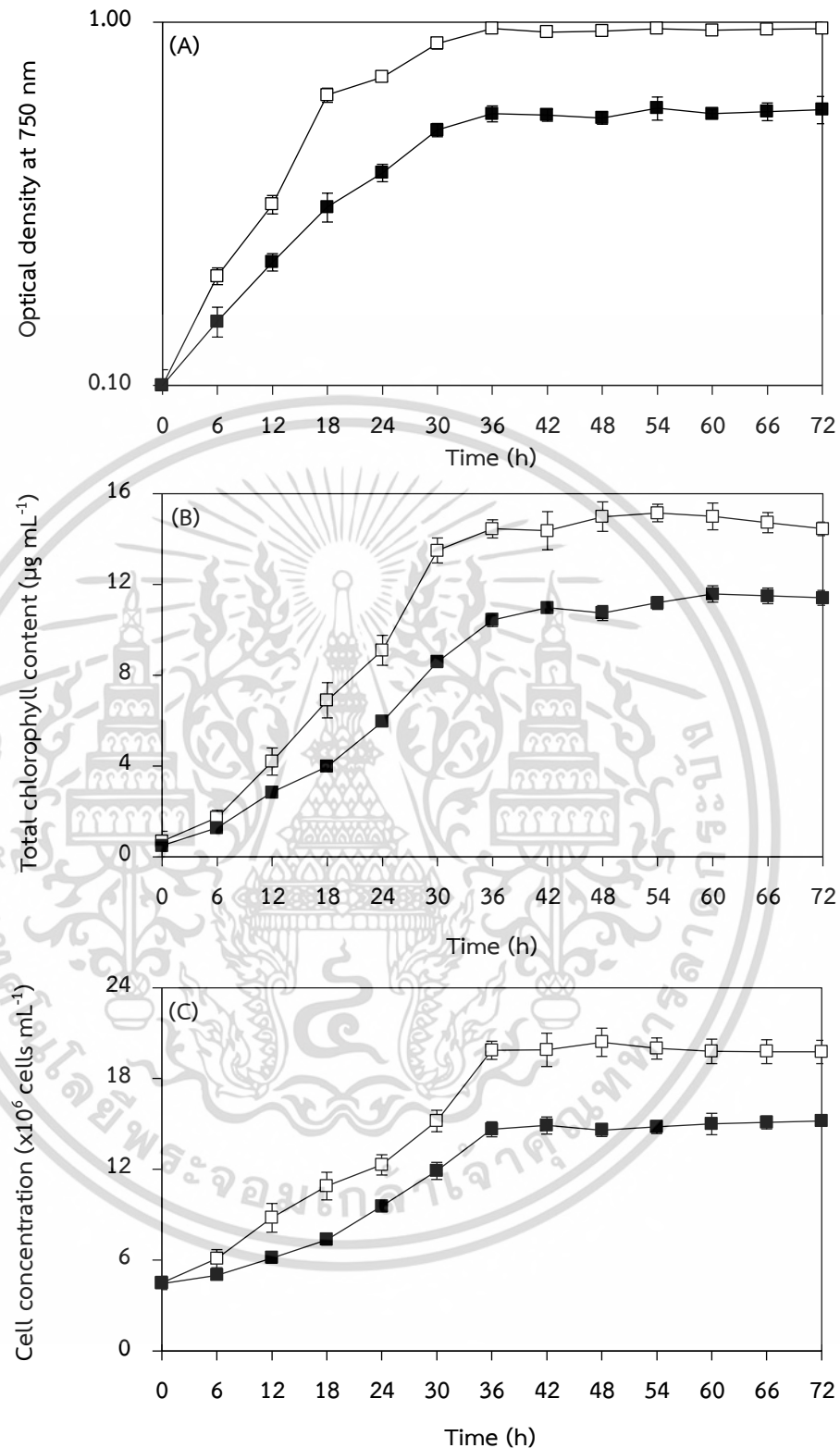
หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสทมภ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ย
ของอัตราการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณการผลิตไฮโดรเจน

4.2 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

C. reinhardtii CC-125 และ *S. obliquus* TISTR 8546

4.2.1 ผลของการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และ *S. obliquus* TISTR 8546

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์แขวนลอยสาหร่ายทุกๆ 6 ชั่วโมงมาศึกษาการเจริญเติบโตด้วยวัดความขุ่นของเซลล์ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ และนับความหนาแน่นของเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ พบว่าสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร TAP โดยสามารถแบ่งระยะการเจริญเติบโตออกเป็น 3 ระยะ คือ (1) ระยะการปรับตัวของเซลล์ (Lag phase) ซึ่งพบในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ระยะนี้เป็นระยะที่เซลล์ทำการปรับตัวให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเพาะเลี้ยงก่อนจะเริ่มต้นแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโตต่อไป จากการทดลองพบว่าเซลล์สาหร่ายมีปริมาณของคลอโรฟิลล์ต่ำและมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (2) ระยะการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (Logarithmic phase) ระยะนี้ เซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยจะพบในช่วง 6 ถึง 36 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากอาหารมีสารอาหารที่สมบูรณ์ (3) ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (Stationary phase) พบภายหลังจาก 36 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากเซลล์สาหร่ายมีความหนาแน่นของเซลล์มากขึ้นและสารอาหารลดลง ส่งผลให้มีอัตราการเกิดของเซลล์เท่ากับอัตราการตายจึงทำให้เซลล์มีปริมาณเท่าเดิม (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 (□) และ *S. obliquus* TISTR 8546 (■) ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (B) และความหนาแน่นของเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ (C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (รูปที่ 4.1A) มาวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของ *C. reinhardtii* CC-125 และ *S. obliquus* TISTR 8546 มีค่าเท่ากับ 0.052 ± 0.002 และ 0.044 ± 0.001 ต่อชั่วโมง และมีระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time, D_t) เท่ากับ 13.290 ± 0.484 และ 15.614 ± 0.246 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) นอกจากนี้ จากผลการทดลองในรูปที่ 4.1 พบว่าสาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 สายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่หรือเข้าสู่ระยะเฉื่อย (Late-Logarithmic phase) ในชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง และมีการเจริญเติบโตคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 ถึง 72 ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารที่อยู่ในอาหาร TAP ซึ่งสาหร่ายจำเป็นต้องใช้ในการเจริญเติบโตได้หมดลง ทำให้สาหร่ายหยุดการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์

ตารางที่ 4.6 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (D_t) ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และ *S. obliquus* TISTR 8546

สายพันธุ์	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	ระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (h)
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	0.052 ± 0.002^a	13.290 ± 0.484^b
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	0.044 ± 0.001^b	15.614 ± 0.246^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสทมภ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ด้วยวิธี Independent t-test

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 สามารถเจริญเติบโตในอาหาร TAP ได้สูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang และ Gao (2003) พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* Dang มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* (Turpin) Kutzing ซึ่งเท่ากับ 2.5 และ 1.5 ต่อวัน ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Bristol ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 293 ไมโครโมลาร์ ภายใต้ความเข้มข้นของแสง 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อย่างไรก็ตาม สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* (Turpin) Kutzing มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *C. pyrenoidosa* สายพันธุ์ Chick (Yang and Gao 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงกว่า *S. obliquus* TISTR 8546 (รูปที่ 4.1B) ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์สอดคล้องกับผลการวัดค่าความหนาแน่นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (รูปที่ 4.1A) เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้น ส่งผลให้เซลล์มีศักยภาพในการดูดซับพลังงานแสงได้มากขึ้น แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงสูงขึ้น ทำให้ได้พลังงานเคมีในรูป ATP และ NADPH จำนวนมาก ซึ่งสารเหล่านี้จะถูกนำไปใช้ในวัฏจักร Calvin-Benson ในการสังเคราะห์สารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว (Hemschemeier *et al.*, 2009) ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเซลล์ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4.1A ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ โดยพบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas mexicana* FR751193 มีปริมาณคลอโรฟิลล์มากกว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* HM103383 ประมาณ 1.7 เท่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Bold Basal ภายใต้ความเข้มข้นแสง 45-50 มิลลิโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เนื่องจาก สาหร่ายสีเขียว *C. mexicana* FR751193 สามารถใช้สารอาหารได้สูงกว่าและมีประสิทธิภาพในการรับพลังงานแสงอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการเจริญเติบโตที่สูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* HM103383 (Xiong *et al.*, 2016) มีรายงานพบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้ความเข้มข้นแสง 70 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus quadricauda* ประมาณ 2 เท่า และสามารถสร้างชีวมวลในปริมาณสูงกว่า (Bacova *et al.*, 2018) ในทางตรงกันข้าม มีรายงานพบว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* SAG 276-10 มีการสะสมของแป้ง โปรตีน และคลอโรฟิลล์ มากกว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sorokiniana* SAG 211-32 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้ความเข้มข้นแสง 70 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เนื่องจากสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* SAG 276-10 มีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ในอาหารที่สมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงได้ดี จึงสามารถสร้างแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตได้สูง รวมทั้ง ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า น้อยกว่าสาหร่ายสีเขียว *C. sorokiniana* SAG 211-32 ประมาณ 19.2 ชั่วโมง (Vigeolas *et al.*, 2012)

จากการวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์พบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 มีความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ประมาณ 1.4 เท่า (รูปที่ 4.1C) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hu และคณะ (2014) ได้ศึกษาผลของกรดเพอร์ฟลูออโรออกทานอิก (Perfluorooctanoic acid; PFOA) ที่แปรผันความเข้มข้นเท่ากับ 0, 5, 10, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิซึมภายในเซลล์สาหร่ายสีเขียว ในอาหาร HB-4 ภายใต้ความเข้มข้นของแสงเท่ากับ 85-90 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* มีการเจริญเติบโตและมีความหนาแน่นเซลล์สูงกว่า เมื่อเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทียบกับสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* โดยมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 1.2×10^6 และ 0.7×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ผ่านไป 120 ชั่วโมง พบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ในทุกความเข้มข้นของกรดเพอร์ฟลูออโรออกโทนาอิก แต่สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* ยังคงมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องไปจนถึงชั่วโมงที่ 192 และให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์ในทุกความเข้มข้นของกรดเพอร์ฟลูออโรออกโทนาอิกใกล้เคียงกันประมาณ 4×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* มีความทนต่อความเป็นพิษของกรดเพอร์ฟลูออโรออกโทนาอิกได้เป็นอย่างดีจนไม่สามารถเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ได้ (Hu *et al.*, 2014)

ในการทดลองนี้ สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ภายใต้ที่มีแสงเนื่องจาก อาหาร TAP เป็นอาหารที่มีความสมบูรณ์ของธาตุอาหาร รวมทั้ง มีแหล่งอินทรีย์คาร์บอน ซึ่งได้แก่ กรดอะซีติก สำหรับใช้เป็นแหล่งพลังงานของสาหร่าย การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะที่มีแสงจัดเป็นการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก (Photoheterotrophic condition) นอกจากนี้ สาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ สามารถเจริญเติบโตได้ภายใต้สภาวะแบบโฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic condition) โดยตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศมาสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตซึ่งใช้เป็นแหล่งพลังงานภายในเซลล์ของสาหร่าย แต่การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศทำให้สาหร่ายใช้เวลานานในการเจริญเติบโต งานวิจัยของ Deng และคณะ (2011) ได้นำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 มาเพาะเลี้ยงในอาหารในอาหาร BG11 เทียบกับ TAP ภายใต้ความเข้มข้นแสง 150 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP จะให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 12×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในเวลา 4 วัน ส่วนสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 พบความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 1.3×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในเวลา 6 วัน (Deng *et al.*, 2011) ซึ่งในงานวิจัยฉบับนี้ *C. reinhardtii* CC-125 ให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ $19.087 \pm 0.600 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP และภายใต้ความเข้มข้นของแสงเท่ากับ 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (รูปที่ 4.1C) ซึ่งสูงกว่าผลการทดลองของ Deng และคณะ (2011) นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* สายพันธุ์ 276.7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ภายใต้ความเข้มข้นแสง 150 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.036 ± 0.001 ต่อชั่วโมง (Sforza *et al.*, 2014) ซึ่งต่ำกว่าอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในงานวิจัยที่ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.044 ± 0.001 ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.6) เนื่องจาก BG11 เป็นอาหารที่ไม่มีการเติมอินทรีย์คาร์บอน ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตช้า ปริมาณคลอโรฟิลล์มีน้อยเกิด

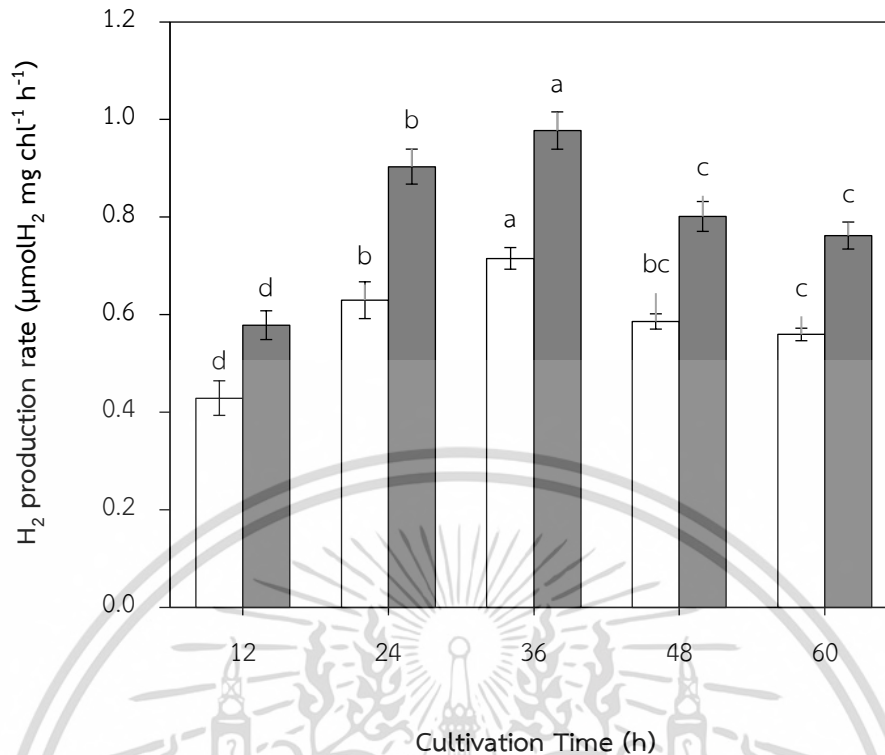
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการสังเคราะห์แสงอย่างไม่เพียงพอ และเสียเวลาที่ต้องตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จาก อากาศมาสร้างเป็นแหล่งพลังงาน

อาหาร TAP มีแหล่งอินทรีย์คาร์บอนที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึมต่างๆของสาหร่ายสีเขียว นอกจากนี้ อาหาร TAP ยังมีธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและเป็นสารประกอบประเภท โปรตีนที่ควบคุมการทำงานของเมแทบอลิซึมต่างๆภายในเซลล์ของสาหร่าย ธาตุเหล่านี้จำเป็นต่อ กระบวนการสังเคราะห์แสง การสังเคราะห์รงควัตถุ และการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species (ROS)) ที่จะไปมีผลทำลายโครงสร้างและหยุดการทำงานของเซลล์ (Grossman and Takahashi 2001)

4.2.2 ผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และ *S. obliquus* TISTR 8546

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอน ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงระยะการเจริญเติบโต ของเซลล์ต่างๆ มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการ ผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 (รูปที่ 4.2) สาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์มีอัตรา การผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่อายุเซลล์ 36 ชั่วโมง โดย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิต ไฮโดรเจนเท่ากับ 0.978 ± 0.038 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และ *C. reinhardtii* CC-125 อัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.716 ± 0.022 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อ มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 (□) และ *S. obliquus* TISTR 8546 (■) ที่มีอายุเซลล์ 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

จากผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่อยู่ในระยะ Early-logarithmic phase หรืออายุเซลล์เท่ากับ 12 ชั่วโมงจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.429 ± 0.035 และ 0.579 ± 0.029 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.2) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า เซลล์สาหร่ายในระยะนี้จำเป็นต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับอาหารและสภาวะแวดล้อมใหม่สำหรับการเจริญเติบโต ภายใต้สภาวะที่มีแสง สาหร่ายจะเกิดกระบวนการสังเคราะห์แสงเพื่อปลดปล่อยพลังงานเคมีในรูป ATP และสร้าง NADPH เพื่อใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบคาร์โบไฮเดรตผ่านวัฏจักร Calvin-Bassham-Benson สำหรับการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโต ดังนั้นจึงมีอิเล็กตรอนที่มาจาก การแตกตัวของโมเลกุลน้ำที่ระบบแสงสองจากสังเคราะห์แสง และจากการสลายคาร์โบไฮเดรตผ่านวิถีไกลโคไลซิสที่ถ่ายทอดและส่งไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในปริมาณน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณน้อย รวมทั้ง มีออกซิเจนไปยับยั้งกิจกรรมของการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสอีกด้วย (Greenbaum *et al.*, 1983)

สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโต Mid-logarithmic phase และ Late-logarithmic phase หรือมีอายุเซลล์เท่ากับ 24 และ 36 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่มีอายุเซลล์ชั่วโมงอื่นๆ (รูปที่ 4.2) ในระยะนี้ สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด เนื่องจากสาหร่ายสามารถใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่ ตลอดจนมีการกระจายของเซลล์ในขวดแก้วอย่างเหมาะสมต่อการได้รับพลังงานแสงอย่างทั่วถึงทุกเซลล์ ส่งผลให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นการเพิ่มหน่วยรับพลังงานแสงเพิ่มมากขึ้น ดังนั้น สาหร่ายในระยะนี้จึงมีกระบวนการสังเคราะห์แสงมากที่สุด ส่งผลให้มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนสูงสุด โดยอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ไปยังกระบวนการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลประเภทคาร์โบไฮเดรตและไขมันสำหรับการเจริญเติบโตและอยู่รอดของเซลล์ หากมีการเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระบบที่ปราศจากออกซิเจน จะเกิดกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังนั้น อิเล็กตรอนจากการแตกตัวของโมเลกุลน้ำที่ระบบแสงสองจึงถูกเหนี่ยวนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตไฮโดรเจนผ่านเอนไซม์ไฮโดรจีเนส นอกจากนี้ อิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนยังได้มาจากการสลายแป้งอีกด้วย (Hankamer *et al.*, 2007) คลอโรฟิลล์เป็นปัจจัยหลักของกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว เนื่องจาก รังควัตถุคลอโรฟิลล์เป็นหน่วยดูดซับพลังงานแสง เมื่อเซลล์มีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น จะเกิดการแตกตัวของน้ำในกระบวนการสังเคราะห์แสงมากขึ้น ส่งผลให้มีอิเล็กตรอนและโปรตอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของการผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น งานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่พบว่าเซลล์ที่มีปริมาณของคลอโรฟิลล์เริ่มต้นเท่ากับ 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่บ่มในอาหาร TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์จะเข้าสู่ระยะการผลิตไฮโดรเจนอย่างรวดเร็วภายใน 20 ชั่วโมงแรกของการบ่มเซลล์ และมีการผลิตไฮโดรเจนที่ยาวนานถึง 140 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับเซลล์ที่มีคลอโรฟิลล์เริ่มต้นเท่ากับ 4.4, 8.1 และ 9.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจาก สาหร่ายมีอิเล็กตรอนและโปรตอนซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณมาก (Kosourov *et al.*, 2002) นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยพบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* UTEX 90 ในระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ Late-logarithmic phase หรืออายุเซลล์ 5 วัน มีปริมาณไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 160 มิลลิลิตรต่อกรัม โดยมีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.96 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตแบบ Early-logarithmic phase, Mid-logarithmic phase และ Stationary phase ประมาณ 1.8, 1.2 และ 1.6 เท่า ตามลำดับ เนื่องจาก เซลล์ในระยะเจริญเติบโตแบบ Late-logarithmic phase มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุด ทำให้เกิดการแตกตัวของโมเลกุลน้ำที่ระบบแสงสองจากการสังเคราะห์แสงได้อย่างเต็มที่ ส่งผลทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (Kim *et al.*, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

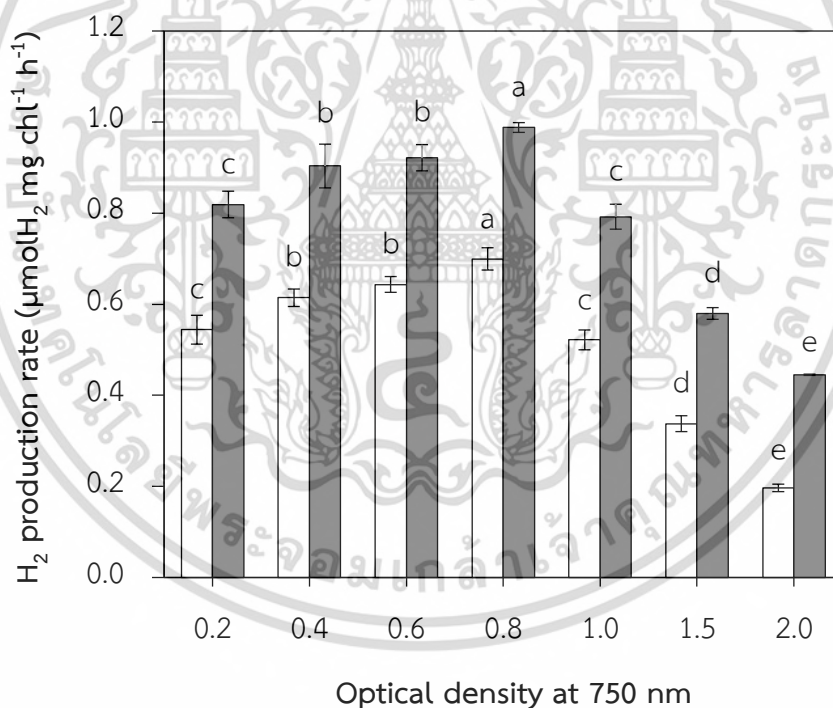
เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะเจริญเติบโตแบบคงที่หรือ Stationary phase หรือมีอายุ 48 และ 60 ชั่วโมง เซลล์สำหรับทั้ง 2 สายพันธุ์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงอย่างชัดเจน เนื่องจาก สาหร่ายที่มีปริมาณมากขึ้น เซลล์จะเกิดการบดบังกันเองระหว่างเซลล์ ทำให้ได้รับพลังงานแสงไม่ทั่วถึงมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง และส่งผลให้ประสิทธิภาพของกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง นอกจากนี้ สารอาหารในอาหาร TAP เริ่มหมดลง จนเกิดสภาวะขาดแคลนสารอาหาร เซลล์สาหร่ายจึงจำเป็นต้องลดเมแทบอลิซึมของการสังเคราะห์สารต่างๆ ภายในเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต เปลี่ยนเป็นการเพิ่มเมแทบอลิซึมของการสลายพลังงานเพื่อการประทังชีวิตให้อยู่รอดมากกว่า ดังนั้น อิเล็กตรอนจึงมีปริมาณต่ำเพราะอิเล็กตรอนได้มาจากกระบวนการสลายแป้งมากกว่าอิเล็กตรอนที่ได้มาจากการสังเคราะห์แสง (Hankamer *et al.*, 2007) เมื่อแป้งถูกสลายอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีแป้งไม่เพียงพอต่อการสลายอีกต่อไป รวมทั้ง อาหารเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของพีเอช โดยระบบจะมีพีเอชลดลง เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดมากขึ้น ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงของสาหร่ายมีสภาวะไม่เหมาะสมที่จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตอนและอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน ส่งผลอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายในระยะนี้ลดต่ำลง ดังนั้น จึงนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมงมาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่อไป

นอกจากนี้ ผลการทดลองยังพบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า *C. reinhardtii* CC-125 (รูปที่ 4.2) แม้ว่าจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์และการเจริญเติบโตต่ำกว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 (รูปที่ 4.1) มีรายงานวิจัยพบว่า สาหร่าย *S. obliquus* WH 50 มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่า *C. reinhardtii* CC-125 ประมาณ 1.5 เท่าเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงเท่ากับ 80 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (Sorokin and Krauss 1958) และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าและมีการสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตมาเป็นน้ำตาลและอิเล็กตรอนน้อยกว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas gloeopara* แต่พบว่าสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่าปริมาณการผลิตไฮโดรเจนใกล้เคียงกัน เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน โดยให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 100 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (Márquez-Reyes *et al.*, 2015) ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าสาหร่ายสีเขียวแต่ละชนิดจะมีเมแทบอลิซึมของการผลิตไฮโดรเจน รวมถึงเมแทบอลิซึมอื่นๆ เช่น กระบวนการสังเคราะห์แสงหรือกระบวนการหายใจที่แตกต่างกัน รวมทั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 อาจมีความทนออกซิเจนได้ดีกว่าสาหร่ายสีเขียวอื่นๆ

4.2.3 ผลของความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

C. reinhardtii CC-125 และ *S. obliquus* TISTR 8546

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาปรับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 และ 2.0 และทำการบ่มภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปศึกษาการผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่ความหนาแน่นเซลล์จากการวัดมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 0.8 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.988 ± 0.011 และ 0.700 ± 0.024 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า *C. reinhardtii* CC-125 ประมาณ 1.4 เท่า (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 (□) และ *S. obliquus* TISTR 8546 (■) ที่มีการปรับค่าความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ที่แตกต่างกันและบ่มภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เพิ่มขึ้นจาก 0.2 ถึง 0.8 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น สาหร่ายสีเขียวที่มีความหนาแน่นของเซลล์ภายในขวดแก้วที่เหมาะสมและบ่มภายใต้แสงต่อเนื่อง สามารถรับพลังงานแสงอย่างทั่วถึง มีการสังเคราะห์รงควัตถุคลอโรฟิลล์มากเพื่อใช้เป็นตัวดูดซับพลังงานแสงและส่งเสริมให้กระบวนการสังเคราะห์แสงทำงานอย่างเต็มประสิทธิภาพ โมเลกุลของน้ำที่ระบบแสงสองมีการแตกตัวได้โปรตอนและอิเล็กตรอนซึ่งใช้เป็นซับสเตรตในการผลิตไฮโดรเจนผ่านกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสปริมาณมาก นอกจากนี้ การบ่มเซลล์โดยการเขย่าตลอดเวลาจะลดการซ้อนทับกันเป็นชั้นๆของเซลล์และเพิ่มการกระจายเซลล์ให้ได้รับพลังงานแสงอย่างมีประสิทธิภาพ สาหร่ายที่มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำสุด เนื่องจากเซลล์สาหร่ายที่มีความหนาแน่นของเซลล์ต่ำจะมีคลอโรฟิลล์ต่ำสุด โดยมีค่าเท่ากับ 8.20 ± 0.28 และ 7.85 ± 0.26 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจาก สาหร่ายที่มีความหนาแน่นของเซลล์น้อยไม่สามารถดูดซับพลังงานแสงได้อย่างเต็มที่ ทำให้ปริมาณอิเล็กตรอนและโปรตอนน้อย เซลล์จึงมีการผลิตไฮโดรเจนน้อยตามไปด้วย ในทางตรงกันข้าม สาหร่ายที่มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นสูง โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ตั้งแต่ 1.0, 1.5 จนถึง 2.0 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงตามลำดับ เนื่องจาก สาหร่ายที่มีความหนาแน่นของเซลล์มากเกินไปจะเกิดการบดบังหรือซ้อนทับกันของเซลล์ภายในภาชนะ ส่งผลให้แสงไม่สามารถผ่านไปยังเซลล์ได้ ถึงแม้ว่าเซลล์สาหร่ายจะมีปริมาณของรงควัตถุคลอโรฟิลล์มาก แต่ประสิทธิภาพการดูดซับพลังงานแสงนั้นลดลงจากการถูกบดบัง ส่งผลให้ปริมาณโปรตอนและอิเล็กตรอนลดลง รวมทั้ง เมื่อการสังเคราะห์แสงลดลงทำให้พลังงานเคมีในรูป ATP และ NADPH ลดต่ำลง ซึ่งเมื่อเซลล์ขาดสารพลังงานสูงดังกล่าว จะส่งผลทำให้กระบวนการหายใจภายในเซลล์ลดลง นำไปสู่ปริมาณออกซิเจนในระบบสูง เพราะออกซิเจนไม่ได้ถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นของกระบวนการหายใจ ดังนั้น ออกซิเจนจะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส นอกจากนี้ เซลล์ที่มีความหนาแน่นมากจะเกิดการแย่งสารอาหารขึ้น ทำให้เกิดสภาวะขาดแคลนสารอาหาร ส่งผลให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง และมีเมแทบอลิซึมภายในเซลล์เพื่อความอยู่รอดมากกว่าการสังเคราะห์สารเคมีอื่นๆ ที่ไม่จำเป็น ดังนั้น อิเล็กตรอนจึงถูกนำไปใช้ในเมแทบอลิซึมอื่นๆ มากกว่านำไปผลิตไฮโดรเจน ทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่าลดลง

ตารางที่ 4.7 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเทียบกับความหนาแน่นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD₇₅₀) ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546

ความหนาแน่นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD ₇₅₀)	ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	สาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-125	สาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546
0.2	8.20 ± 0.28 ^s	7.85 ± 0.26 ^s
0.4	19.82 ± 1.08 ^f	17.10 ± 0.51 ^f
0.6	32.18 ± 1.42 ^e	27.44 ± 0.38 ^e
0.8	42.44 ± 0.49 ^d	35.26 ± 0.69 ^d
1.0	56.48 ± 0.64 ^c	51.24 ± 0.77 ^c
1.5	82.47 ± 0.63 ^b	73.69 ± 1.00 ^b
2.0	108.93 ± 1.56 ^a	89.16 ± 1.17 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์

งานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่มีรายงานในสาหร่าย *C. reinhardtii* UTEX 90 โดยพบว่า *C. reinhardtii* UTEX 90 ที่มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.96 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 160 มิลลิลิตรต่อกรัม เมื่อเทียบกับสาหร่ายที่มีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 0.44, 0.71 และ 1.40 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 110, 135 และ 60 มิลลิลิตรต่อกรัม (Kim *et al.*, 2005) และสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-OVG1 ที่มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 0.78 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเทียบกับเซลล์ที่มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6 และ 1 (Warichanan and Phunpruch, 2019) ซึ่งอัตราการผลิตไฮโดรเจนนี้จะน้อยกว่าค่าที่ได้จากผลการทดลองที่บ่ม *S. obliquus* TISTR 8546 ในอาหาร TAP ที่มีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 0.8 เท่ากับ 0.82 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้น จึงได้ทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8 ไปศึกษาผลการทดลองต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 ผลของการขาดแหล่งอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

C. reinhardtii CC-125 และ *S. obliquus* TISTR 8546

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาบ่มในอาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ ได้แก่ อาหาร TAP ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N), อาหาร TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ (TAP-S), อาหาร TAP ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P) และอาหาร TAP ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) โดยมีอาหาร TAP ที่มีธาตุอาหารครบถ้วนเป็นตัวแปรควบคุม ภายใต้สภาวะที่มีแสงไม่พ่นอาร์กอน เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์มีการปรับตัวกับอาหารใหม่ ก่อนนำเซลล์สาหร่ายมาศึกษาอัตราการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส พบว่าสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 และ *C. reinhardtii* CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารที่แตกต่างกัน โดยสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-K โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 3.974 ± 0.379 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเท่ากับ 5.169 ± 0.146 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาทิต (ตารางที่ 4.8) ส่วนสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-S โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 2.431 ± 0.078 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเท่ากับ 3.837 ± 0.377 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาทิต (ตารางที่ 4.8)

จากผลการทดลองพบว่า การขาดธาตุอาหารมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มในอาหาร TAP-K ซึ่งสูงกว่าเมื่อบ่มในอาหาร TAP ประมาณ 4 เท่า แต่การขาดธาตุซัลเฟอร์ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสจะทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำการบ่มเซลล์ในอาหารที่ขาดธาตุทุกประเภท โดยการขาดธาตุซัลเฟอร์จะมีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *C. reinhardtii* CC-125 มากที่สุด รองมาเป็นการขาดธาตุไนโตรเจน โพแทสเซียม และฟอสฟอรัส ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสายสเตรปโตไมซิน *C. reinhardtii* CC-125 และสายสเตรปโตไมซิน *S. obliquus* TISTR 8546 ที่ 24 ชั่วโมง

ชนิดของอาหาร	อัตราการผลิตไฮโดรเจน			กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส		
	(ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัม คลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง)			(ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัม คลอโรฟิลล์ต่อนาที่)		
	<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	<i>C. reinhardtii</i> CC-125	<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	<i>C. reinhardtii</i> CC-125	<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	<i>C. reinhardtii</i> CC-125
TAP	0.710 ± 0.088 ^d	0.972 ± 0.071 ^b	0.262 ± 0.032 ^c	0.305 ± 0.022 ^b	0.996 ± 0.058 ^d	1.368 ± 0.027 ^b
TAP-K	1.593 ± 0.093 ^c	3.974 ± 0.379 ^a	0.660 ± 0.039 ^b	1.157 ± 0.111 ^a	2.234 ± 0.192 ^c	5.169 ± 0.146 ^a
TAP-N	1.981 ± 0.087 ^b	0.008 ± 0.001 ^c	0.708 ± 0.031 ^b	0.001 ± 0.000 ^c	3.359 ± 0.190 ^b	0.326 ± 0.012 ^d
TAP-P	1.559 ± 0.146 ^c	0.007 ± 0.001 ^c	0.577 ± 0.054 ^c	0.002 ± 0.000 ^c	1.978 ± 0.199 ^c	0.252 ± 0.089 ^d
TAP-S	2.431 ± 0.078 ^a	0.083 ± 0.080 ^c	0.825 ± 0.026 ^a	0.009 ± 0.001 ^c	3.837 ± 0.377 ^a	0.480 ± 0.036 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

ภายใต้สภาวะการขาดโพแทสเซียม สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (ตารางที่ 4.8) เนื่องจาก การขาดโพแทสเซียมทำให้โปรตีน D1 ในระบบแสงสองที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมการทำงานของระบบแสงสองมีปริมาณลดลง ซึ่งโปรตีน D1 นี้มีช่วงชีวิตสั้นแต่มีการสร้างใหม่ตลอดเวลา ดังนั้น เมื่อขาดโพแทสเซียมทำให้ระบบแสงสองของเซลล์สาหร่ายทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ ทำให้สาหร่ายเกิดการอึดตัวของแสงลดลง ดังนั้น ปริมาณของออกซิเจนที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำลดลง เมื่อตัวยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสลดลงเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ การขาดโพแทสเซียมยังส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวทไคเนส (Pyruvate kinase) ในวิถีไกลโคลิซิส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนฟอสโฟอินอลไพรูเวทให้กลายเป็นสารไพรูเวท เมื่อเซลล์อยู่ในอาหารที่ขาดโพแทสเซียม เซลล์จะยุติการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ (Evans and Sorger, 1966) ส่งผลให้มีปริมาณกลูโคสในเซลล์เพิ่มขึ้น อิเล็กตรอนส่วนเกินของเมแทบอลิซึมของกลูโคสจะถูกส่งผ่านไปยังแหล่งอิเล็กตรอนที่พลาสโตควิโนนพูล (PQ-pool) จากนั้น จึงมีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตเป็นไฮโดรเจนต่อไป

มีรายงานพบว่าสาหร่าย *S. obliquus* D3 ที่บ่มในอาหารขาดโพแทสเซียมให้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหารสมบูรณ์ ทั้งนี้เนื่องมาจากการขาดโพแทสเซียมส่งผลให้ระบบแสงสองของกระบวนการสังเคราะห์แสงมีการทำงานลดลง มีการแตกตัวของน้ำลดลง แต่มีกิจกรรมของกระบวนการหายใจเพิ่มขึ้น ดังนั้น เซลล์ที่บ่มในอาหารขาดโพแทสเซียมจึงเข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจนได้อย่างรวดเร็ว เกิดการเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส การผลิตไฮโดรเจนจึงสูงขึ้น นอกจากนี้ การขาดธาตุโพแทสเซียมยังส่งผลให้เซลล์เกิดการสะสมแป้งลดลง เมื่อการสะสมแป้งลดลงจึงได้อิเล็กตรอนจำนวนมาก (Papazi *et al.*, 2014) เมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนและมีความอุดมสมบูรณ์ของอิเล็กตรอนและโปรตอน จึงทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น

จากผลการทดลอง การขาดไนโตรเจนทำให้สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น ตรงกันข้ามกับในสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง (ตารางที่ 4.8) ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของกรดอะมิโน โปรตีน รังควัตถุ และกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ การขาดไนโตรเจนส่งผลต่อการทำงานของระบบแสงสอง นั่นคือ โปรตีนที่หน่วยดูดซับพลังงานแสง (Antenna) และโปรตีนที่ศูนย์กลางของระบบแสงสอง D1 ถูกทำลายและไม่สามารถสร้างขึ้นมาใหม่ได้ ส่งผลทำให้ระบบแสงสองไม่ถูกซ่อมแซม นอกจากนี้ ยังทำให้โครงสร้างของ Oxygen-evolving complex ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการแตกตัวน้ำได้รับความเสียหาย ดังนั้น การผลิตออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำจึงลดลง นอกจากนี้ การขาดไนโตรเจนทำให้เซลล์ของสาหร่ายมีการสะสมของแป้งเพิ่มมากขึ้น จากการที่เอนไซม์ ADP-glucose pyrophosphorylase ถูกกระตุ้นให้ทำงานมากขึ้น (Zhu *et al.*, 2014) เมื่อเซลล์สลายแป้ง จะได้อิเล็กตรอนจำนวนมากซึ่งสามารถนำไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนได้ มีรายงานพบว่า ขาดไนโตรเจนทำให้สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella protothecoides* และ *Chlorella protothecoides* มีการผลิตไฮโดรเจนได้ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนสูงขึ้น (He *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ผ่านมา ที่พบว่า การขาดธาตุไนโตรเจนในอาหารจะส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Chlorella* sp. มากกว่าในสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. และ *Scenedesmus* sp. (Zhang *et al.*, 2014; Pongpadung *et al.*, 2015)

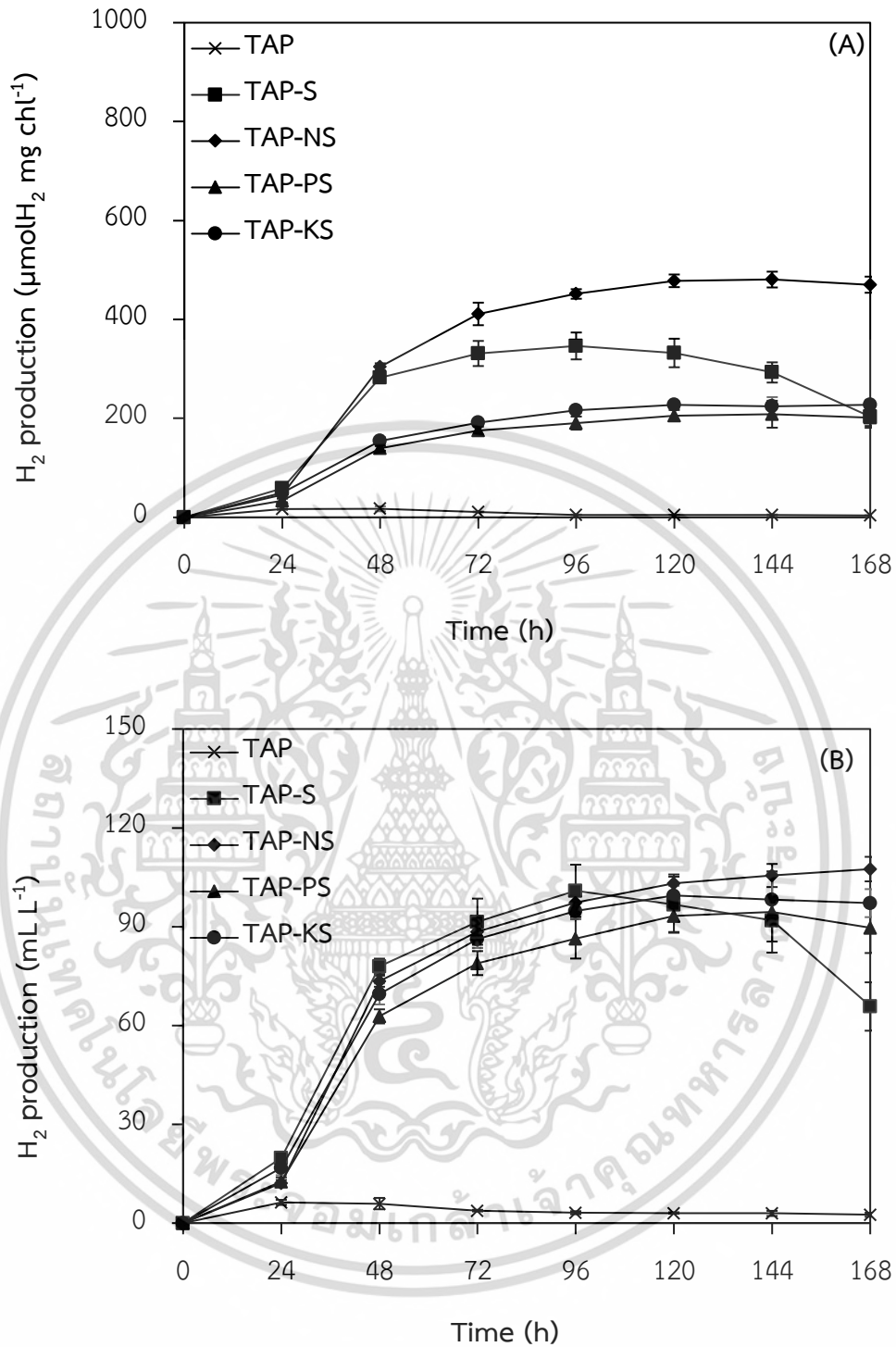
ในการขาดฟอสฟอรัส สาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสลดลง (ตารางที่ 4.8) เนื่องจากการขาดฟอสฟอรัสทำให้มีกิจกรรมของระบบแสงสองลดลง เลยส่งผลมีปริมาณออกซิเจนลดลง อย่างไรก็ตาม ปริมาณออกซิเจนที่ลดลงของเซลล์ที่บ่มในอาหารขาดฟอสฟอรัสน้อยกว่าในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ ซึ่งเป็นผลมาจาก การขาดซัลเฟอร์มีผลต่อระบบแสงสองมากกว่าการขาดฟอสฟอรัส (Wykoff *et al.*, 1988) ฟอสฟอรัสเป็นสารประกอบหลักในการเกิดปฏิกิริยาฟอสฟอรีเลชัน (Phosphorylation) การขาดฟอสฟอรัสส่งผลต่อปฏิกิริยาที่ต้องเติมหมู่ฟอสเฟตของเมแทบอลิซึมต่างๆ อาทิเช่น กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ วิถีเพนโตสฟอสเฟต และการสังเคราะห์สารประกอบพลังงานสูงที่เป็นสารตัวกลางซึ่งก็คือ ATP และ NADPH ดังนั้น เมื่อขาดฟอสฟอรัสจะทำให้สารตัวกลางลดลง นำไปสู่การลดกิจกรรมของการถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปยัง PQ-pool เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะได้รับอิเล็กตรอนจากแหล่งอิเล็กตรอนเพียงแหล่งเดียวคือจากระบบแสงสองซึ่งทำงานได้เพียงเล็กน้อย ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง

ในการขาดซัลเฟอร์ สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-S แต่ในสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงเมื่อเทียบกับการผลิตของเซลล์ในอาหาร TAP (ตารางที่ 4.8) ซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบหลักของกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) และ เมไทโอนีน (Methionine) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของโปรตีน D1 ที่อยู่ในบริเวณศูนย์กลางของระบบแสงสอง ดังนั้น เมื่อขาดซัลเฟอร์จึงส่งผลให้การแตกตัวของน้ำไม่เกิดขึ้น นอกจากนี้ การขาดซัลเฟอร์ส่งผลให้กระบวนการหายใจภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ดังนั้น อัตราการผลิตออกซิเจนต่ำกว่าอัตราการใช้ออกซิเจน ส่งผลให้เซลล์เข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจนได้เร็วขึ้น จึงมีการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น (Wykoff *et al.*, 1998; Melis *et al.*, 2000) จากผลการทดลองข้างต้น จึงคัดเลือก สภาวะการขาดธาตุอาหารที่เหมาะสมสำหรับสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ การขาดอาหารซัลเฟอร์สำหรับสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 และการขาดอาหารโพแทสเซียมสำหรับสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มาศึกษาผลการขาดธาตุอาหารร่วมกันต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.2.5 ผลของการขาดธาตุอาหารร่วมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

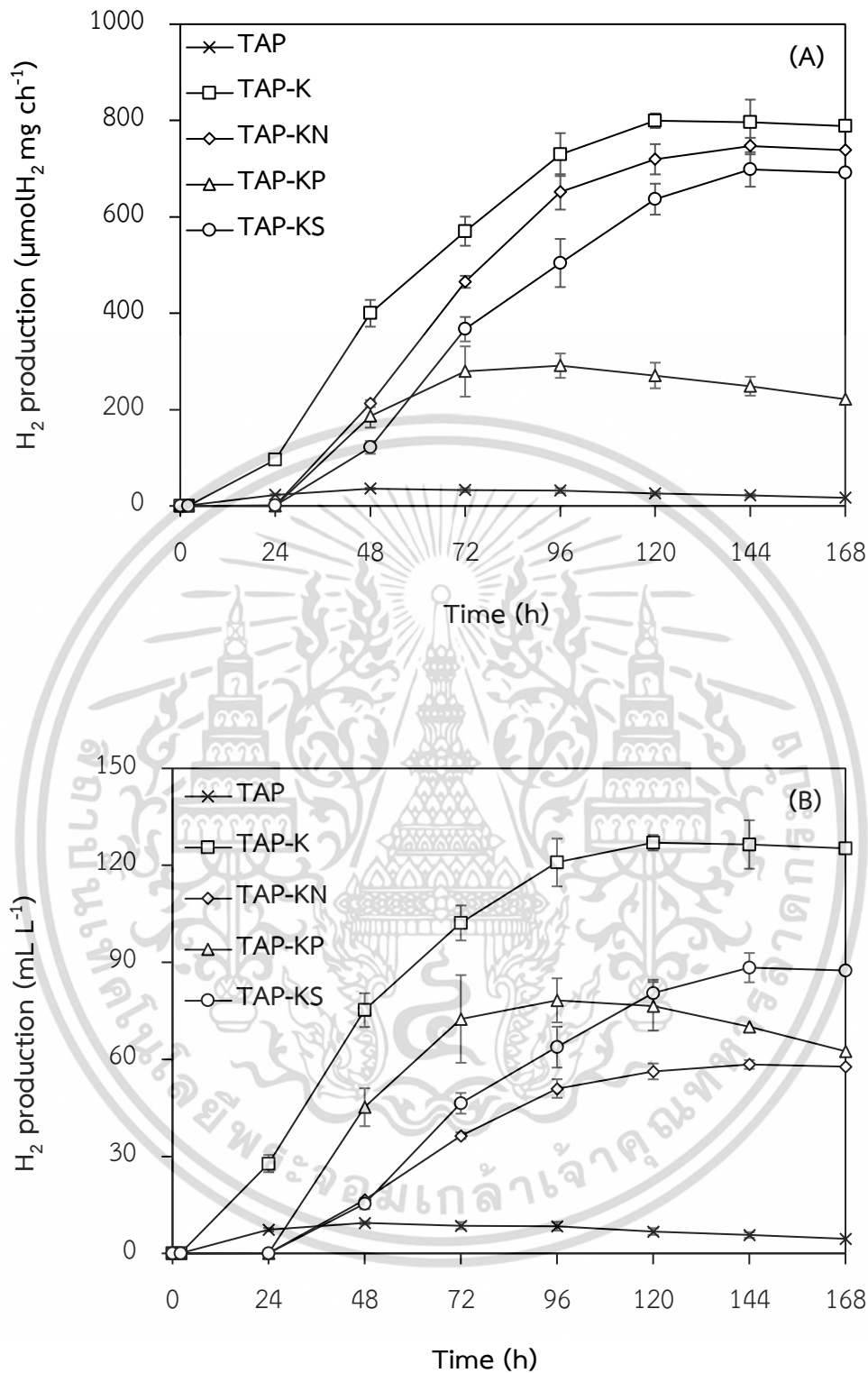
C. reinhardtii CC-125 และ *S. obliquus* TISTR 8546

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 มาบ่มในอาหาร TAP ที่ขาดธาตุซัลเฟอร์ ร่วมกับการขาดธาตุชนิดอื่น ได้แก่ อาหาร TAP-KS, TAP-NS และ TAP-PS และนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาบ่มในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมร่วมกับการขาดธาตุชนิดอื่น ได้แก่ อาหาร TAP-KN, TAP-KP และ TAP-KS โดยมีอาหาร TAP ที่มีธาตุอาหารครบถ้วนเป็นตัวแปร ควบคุม ภายใต้สภาวะที่มีแสงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ เป็นเวลา 0-168 ชั่วโมง จากนั้น ทำการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 สายพันธุ์ทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่า สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่บ่มในอาหารที่ขาดธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ (TAP-NS) ให้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด โดยผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 480.722 ± 15.970 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในชั่วโมงที่ 144 และ 107.470 ± 3.722 มิลลิลิตรต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 168 (รูปที่ 4.4) ในขณะที่สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหารที่ขาด โพแทสเซียม (TAP-K) การผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า *C. reinhardtii* CC-125 ประมาณ 1.2-1.7 เท่า โดยผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 799.650 ± 15.061 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในชั่วโมงที่ 120 ชั่วโมง และ 127.015 ± 1.035 มิลลิลิตรต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.4 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (A) และ หน่วยมิลลิลิตรต่อลิตร (B) ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 ที่บ่มในอาหาร TAP และ อาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ร่วมกับขาดธาตุอาหารชนิดอื่นๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่ผ่านอาร์กอน) เป็นเวลา 0-168 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการใช้งานเท่านั้น มิอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (A) และ หน่วยมิลลิลิตรต่อลิตร (B) ของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP และ อาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมร่วมกับขาดธาตุอาหารชนิดอื่นๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 0-168 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่า สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่บ่มในอาหารขาดธาตุซัลเฟอร์ และขาดซัลเฟอร์ร่วมกับธาตุต่างๆ (TAP-S, TAP-KS, TAP-NS และ TAP-PS) มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ประมาณ 17-27 เท่า ภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจนร่วมกับซัลเฟอร์ กิจกรรมของระบบแสงสองจะถูกยับยั้ง โดยโปรตีน D1 ในศูนย์กลางของระบบแสงสองได้รับความเสียหายและไม่สามารถสร้างโปรตีนขึ้นมาใหม่มาทดแทนได้ สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่บ่มในอาหาร TAP-NS จึงเข้าสู่ภาวะปราศจากออกซิเจนได้รวดเร็วขึ้น ในสภาวะนี้ แบ่งจะถูกสลายเป็นจำนวนมากเพื่อใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน ส่งผลทำให้ได้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด อย่างไรก็ตาม การบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-NS ส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง เนื่องจากหน่วยรับพลังงานแสงและการสังเคราะห์รงควัตถุคลอโรฟิลล์ถูกทำลาย ทำให้สีของเซลล์เปลี่ยนจากสีเขียวในตอนเริ่มต้นไปเป็นสีเหลืองในภายหลัง ถึงแม้ว่า เซลล์ได้รับพลังงานแสงอย่างต่อเนื่องแต่ไม่มีประสิทธิภาพในการดูดซับพลังงานแสง จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้และมีอัตราการตายเร็วขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยในสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. ที่พบว่าสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ร่วมกับการปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนให้ลดลงเหลือ 0.7 มิลลิโมลต่อลิตร ซึ่งมากกว่าเซลล์ที่อยู่ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์เพียงอย่างเดียวประมาณ 0.5-2.5 เท่า (Pongpadung *et al.*, 2015) นอกจากนี้ สาหร่าย *Chlorella protothecoides* ที่บ่มในอาหาร TAP-S มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-S ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.7 มิลลิโมลต่อลิตร (He *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014) สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ที่บ่มในอาหาร TAP-NS จะมีการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-N และ TAP-S (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) นอกจากนี้ มีงานวิจัยพบว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่บ่มในอาหาร TAP-PS และ TAP-S มีปริมาณไฮโดรเจนไม่แตกต่างกัน คือประมาณ 60 มิลลิลิตรต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 120 (Batyrovo *et al.*, 2012) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่พบว่า *C. reinhardtii* CC-125 ที่บ่มในอาหาร TAP-PS และ TAP-S ให้การผลิตไฮโดรเจนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงเวลาที่ 120

ในขณะที่ สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มในอาหาร TAP-K (รูปที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าการขาดโพแทสเซียมร่วมกับการขาดธาตุชนิดอื่นๆ ไม่ส่งเสริมการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนใน *S. obliquus* TISTR 8546 แสดงให้เห็นว่า การขาดโพแทสเซียมแต่เพียงชนิดเดียวส่งผลต่อเมแทบอลิซึมของการผลิตไฮโดรเจนอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ยังศึกษาอิทธิพลของการขาดโพแทสเซียมร่วมกับการขาดธาตุอื่นๆ ได้แก่ TAP-KN, TAP-KP, TAP-KS, TAP-KNP, TAP-KNS และ TAP-KPS ต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 พบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 8.330 ± 0.579 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อเอกซาร์นี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมงและ 1.567 ± 0.109 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาเป็นการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ที่บ่มอาหาร TAP-KNS และ TAP-KPS เนื่องจาก เซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-K จะได้รับความเสียหายต่อเมแทบอลิซึมต่างๆ อาทิเช่น การสังเคราะห์แสง การหายใจ และการสังเคราะห์สารประกอบคาร์โบไฮเดรต น้อยกว่าการขาดธาตุอาหารร่วมกับธาตุอื่นๆ เซลล์จึงใช้ระยะเวลาในการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดอย่างรวดเร็ว เพราะใช้เวลาในการปรับตัวในอาหารขาดธาตุเพียงชนิดเดียวได้ง่ายและไวกว่าการขาดธาตุอาหารร่วม ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่า สาหร่าย *Scenedesmus* sp. ที่บ่มในอาหารขาดธาตุอาหารเดี่ยวให้ปริมาณไฮโดรเจนสูงกว่าเมื่อบ่มเซลล์ในขาดธาตุอาหารร่วมกัน (Pongpadung *et al.*, 2015) นอกจากนี้ การขาดธาตุอาหารร่วมไม่เหมาะสมต่อการเกี่ยวกับเซลล์ในระยะยาว เพราะปริมาณของซัลเฟตไม่เพียงพอต่อการผลิตไฮโดรเจน รวมทั้ง เซลล์มีโอกาสตายเร็วขึ้น ดังนั้น ในการทดลองถัดไป จึงนำสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ไปศึกษาปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

ตารางที่ 4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K, TAP-KN, TAP-KP, TAP-KS, TAP-KNP, TAP-KNS และ TAP-KPS ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) บ่มเป็นเวลา 0-168 ชั่วโมง

ชนิดของอาหาร	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด	
	(ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง)	(มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง)
TAP-K	8.330 ± 0.579^a	1.567 ± 0.109^a
TAP-KN	6.790 ± 0.382^b	0.531 ± 0.030^d
TAP-KP	3.892 ± 0.505^d	1.007 ± 0.188^c
TAP-KS	5.307 ± 0.268^c	0.671 ± 0.034^d
TAP-KNP	3.254 ± 0.126^d	0.301 ± 0.012^e
TAP-KNS	8.498 ± 0.704^a	1.300 ± 0.108^b
TAP-KPS	7.824 ± 0.302^a	1.189 ± 0.046^b

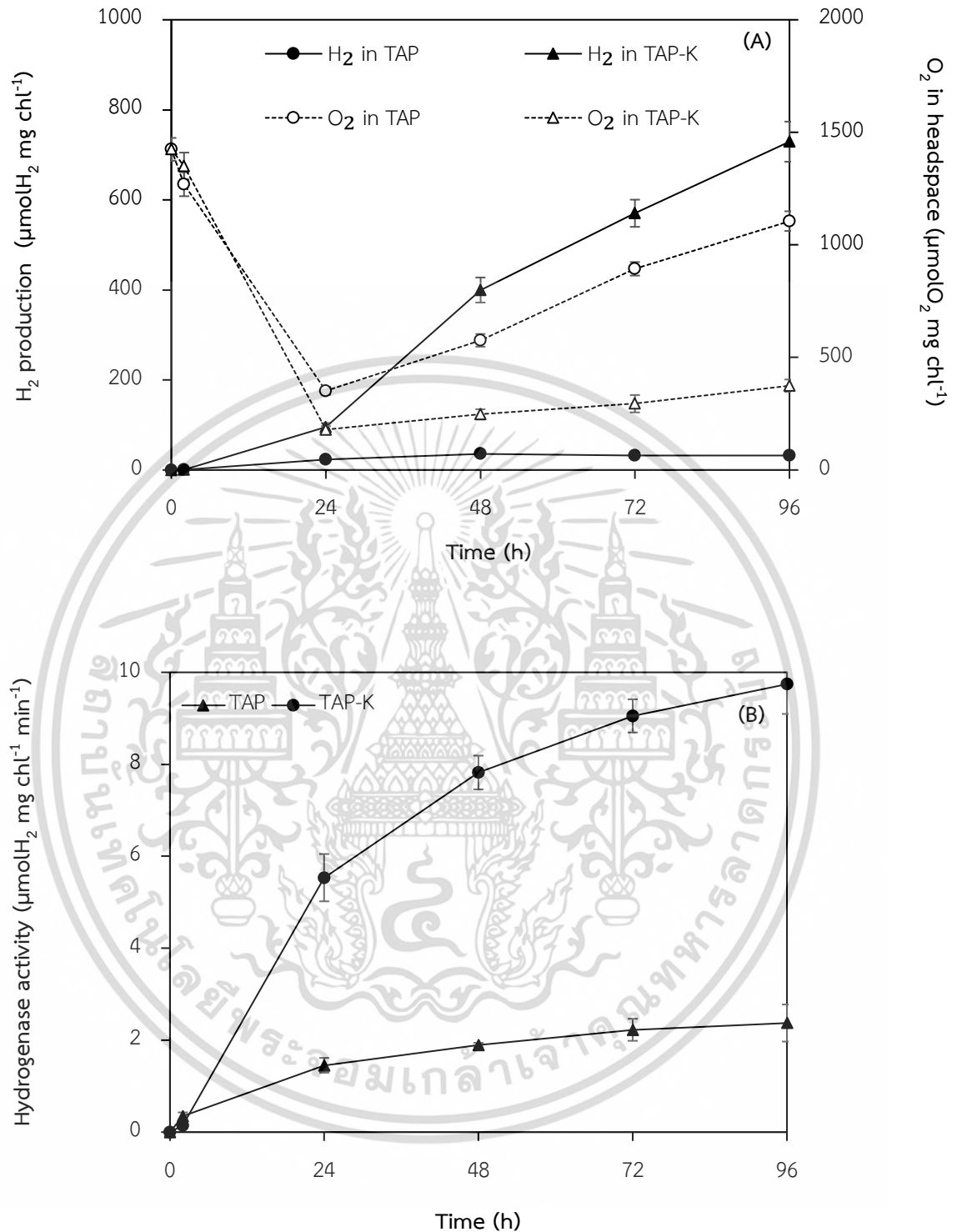
หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสทมภ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน

4.2.6 ผลการศึกษาเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ภายใต้สภาวะการขาดธาตุโพแทสเซียม

จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.4 และ 4.2.5 พบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 สามารถผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในสภาวะการขาดธาตุโพแทสเซียม ดังนั้น จึงสนใจศึกษาปริมาณไฮโดรเจนและออกซิเจนใน headspace และการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนของ *S. obliquus* TISTR 8546 ได้แก่ การสังเคราะห์แสง การหายใจในที่มืด การสังเคราะห์และการสลายแป้ง

4.2.6.1 ปริมาณไฮโดรเจนและปริมาณออกซิเจนใน headspace ภายใต้สภาวะการขาดโพแทสเซียม

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K เป็นเวลา 96 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน ปริมาณออกซิเจนใน headspace รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในชั่วโมงที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 พบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K มีการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าในอาหาร TAP อย่างเห็นได้ชัด โดยปริมาณของการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 729.31 ± 44.50 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในชั่วโมงที่ 96 ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มอาหาร TAP ให้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 35.79 ± 1.92 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 4.6A) จากการทดลองพบว่า ปริมาณออกซิเจนใน headspace ของเซลล์สาหร่ายจะลดลงอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรกของการบ่ม โดยเซลล์ที่บ่มในขวดที่มีอาหาร TAP-K จะมีออกซิเจนใน headspace ลดลงมากกว่าเซลล์ที่มีอยู่ในขวดที่มีอาหาร TAP (รูปที่ 4.6A) หลังจากนั้น ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้น โดยจะพบว่าออกซิเจนใน headspace ของเซลล์ที่บ่มในขวดที่มีอาหาร TAP จะสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของเซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-K มีค่าเพิ่มสูงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีความมากกว่ากิจกรรมของเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ประมาณ 20 เท่า ในชั่วโมงที่ 96 (รูปที่ 4.6B)



รูปที่ 4.6 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณของออกซิเจนใน headspace (A) และกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (B) ของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-K ภายใต้สภาวะที่มีแสงและความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน)

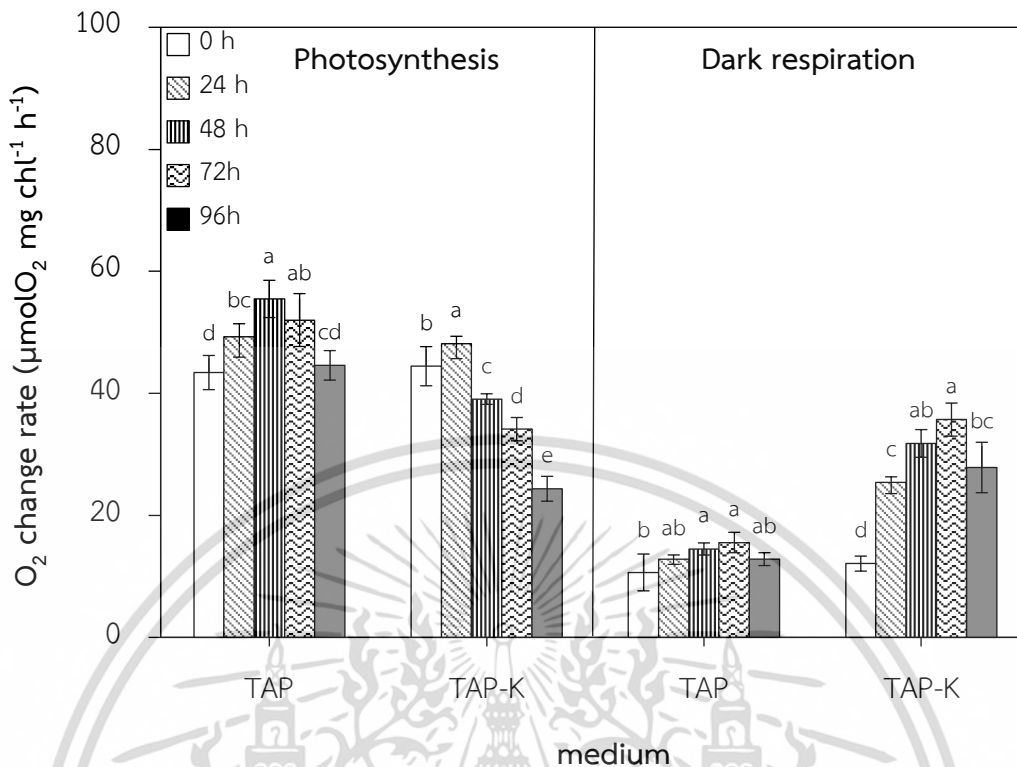
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณออกซิเจนใน headspace ลดลงอย่างเห็นได้ชัดภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการบ่ม ทั้งในเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-K (รูปที่ 4.6A) อาจเนื่องมาจาก เซลล์มีการใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจมากขึ้น รวมถึงมีการผลิตออกซิเจนจากการสังเคราะห์แสงลดลง จึงทำให้ปริมาณออกซิเจนใน headspace ลดลง ปริมาณออกซิเจนที่ลดลงมีผลทำให้ กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น สำหรับที่บ่มในอาหาร TAP-K มี ปริมาณออกซิเจนต่ำกว่าเซลล์ที่อยู่ในอาหาร TAP อย่างชัดเจน ภายหลังจาก 48 ชั่วโมงที่ ปริมาณออกซิเจนใน headspace เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย จาก 247.149 ± 22.929 ถึง 374.798 ± 27.268 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (รูปที่ 4.6A) ในขณะที่ ปริมาณออกซิเจนในเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP เพิ่มขึ้นมาจาก 351.630 ± 18.053 ถึง $1,105.685 \pm 43.662$ ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในชั่วโมงที่ 24 และ 96 ตามลำดับ (รูปที่ 4.6A) สนับสนุนผลของกิจกรรมของไฮโดรจีเนสที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณออกซิเจนในระบบลดลง แสดงให้เห็นว่า การขาดโพแทสเซียมส่งผลให้มีปริมาณของออกซิเจนในระบบลดลง สันนิษฐานว่าการลดลงของปริมาณออกซิเจนอาจเกิดจาก (1) การสังเคราะห์แสงที่ลดลง (2) การหายใจที่เพิ่มขึ้น (3) การสลายแบ่งที่มากขึ้นและการสะสมแบ่งที่ลดลง

4.2.6.2 ผลการเปลี่ยนแปลงออกซิเจนจากการสังเคราะห์แสงและหายใจภายใต้สภาวะการขาดโพแทสเซียม

จากการนำสายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-K มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของออกซิเจน โดยศึกษาการผลิตออกซิเจนจากการสังเคราะห์แสงและการใช้ออกซิเจนจากกระบวนการหายใจในที่มีด้วยเครื่อง Clark-type oxygen electrode พบว่าอัตราการผลิตออกซิเจนจากการสังเคราะห์แสงของ *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ภายหลังจาก 24 ชั่วโมงของการบ่ม เมื่อเทียบกับเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP (รูปที่ 4.7) ในทางตรงกันข้าม อัตราการสลายออกซิเจนจากการหายใจในที่มีจะเพิ่มขึ้น เมื่อบ่ม *S. obliquus* TISTR 8546 ในอาหาร TAP-K (รูปที่ 4.7) ผลการทดลองนี้สนับสนุนข้อสันนิษฐานที่ว่า การขาดโพแทสเซียมส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง แต่อัตราการหายใจสูงขึ้น การลดลงของการสังเคราะห์แสงเกิดจากการที่โปรตีน D1 ในระบบแสงสองถูกทำลาย ทำให้ออกซิเจนมีปริมาณลดลง และเข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจนได้ไวกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่จะเหนี่ยวนำให้เซลล์สายเขียวมีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Papazi และคณะ (2014) พบว่า *S. obliquus* D3 มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มในอาหาร TAP-K สูงกว่าเซลล์บ่มในอาหาร TAP เนื่องจาก เซลล์มีกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลงอย่างชัดเจน นอกจากนี้ พบว่าการเติมแหล่งคาร์บอนลงในอาหารจะทำให้เซลล์มีกระบวนการหายใจสูงขึ้น ดังนั้น ปริมาณของออกซิเจนของ *S. obliquus* D3 ในอาหาร TAP-K จึงมีปริมาณต่ำกว่าเซลล์บ่มในอาหาร TAP ตลอดการทดลอง 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 อัตราของกระบวนการสังเคราะห์แสงและหายใจจากสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-K ภายใต้แสงที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 0-96 ชั่วโมง (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสมมุติแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงออกซิเจน)

4.2.6.3 ผลการศึกษาปริมาณแป้งภายใต้สภาวะการขาดโพแทสเซียม

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP และ TAP-K มาวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่สะสมในเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีแสงและมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ด้วยวิธีของ Gfeller and Gibbs (1984) พบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP มีการสะสมแป้งในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจนถึงชั่วโมงที่ 96 ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-K มีการสะสมแป้งสูงสุดเท่ากับ 775.310 ± 33.499 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ชั่วโมงที่ 24 จากนั้น ปริมาณแป้งที่สะสมภายในเซลล์จะลดลงอย่างเห็นได้ชัดจนมีปริมาณแป้งเท่ากับ 205.000 ± 59.203 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในชั่วโมงที่ 96 (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 ปริมาณของแป้งสะสมในเซลล์จากสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-K

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณของแป้ง (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์)	
	อาหาร TAP	อาหาร TAP-K
0	573.37 ± 867.879 ^d	562.258 ± 40.382 ^b
24	623.994 ± 35.009 ^{cd}	775.310 ± 33.499 ^a
48	693.9683 ± 5.495 ^{bc}	543.622 ± 41.907 ^b
72	765.016 ± 22.071 ^{ab}	358.496 ± 52.212 ^c
96	814.884 ± 58.239 ^a	205.000 ± 59.203 ^d

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของปริมาณแป้ง

จากการทดลองพบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีปริมาณการสะสมแป้งในเซลล์ลดลงตามระยะเวลาของการบ่มสาหร่ายในอาหาร TAP-K แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการนำแป้งที่สะสมไปสลายให้กลายเป็นน้ำตาล น้ำตาลจะถูกออกซิไดซ์ได้เป็นไพรูเวท จากนั้น เอนไซม์ Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase เร่งปฏิกิริยาปล่อยไพรูเวทไปเป็นอะซีติล-โคเอนไซม์เอ ปฏิกิริยาจะได้อิเล็กตรอนเป็นผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ วิถีไกลโคไลซิสยังได้ผลิตภัณฑ์คือ NADH ซึ่งสามารถส่งต่ออิเล็กตรอนไปยัง PQ และส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้มีการผลิตไฮโดรเจน (Jurado-Oller *et al.*, 2015) มีรายวิจัยพบว่า สาหร่าย *C. reinhardtii* ที่บ่มในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ แมกนีเซียมและไนโตรเจน มีการสลายแป้งเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนเช่นกัน (Fouchard *et al.*, 2005; Volgusheva *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2012)

4.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ

จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2 สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในบรรยากาศมากที่สุด ดังนั้น จึงทำการนำสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K โดยศึกษาสภาวะต่างๆ ดังนี้ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ความเข้มแสงและรูปแบบการให้แสง อุณหภูมิของการบ่ม และพีเอชของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจน

4.3.1 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของ สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ

4.3.1.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-K ที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ดังนี้ กรดอะซิติก โซเดียมอะซิเตท น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลแลกโทส และน้ำตาลซูโครส ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร จากนั้น ทำการบ่มภายใต้แสงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศเป็นเวลา 96 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-K ที่ใส่กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 8.582 ± 0.283 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง รองลงคือเซลล์ที่บ่ม TAP-K ในอาหาร TAP-K ที่ใส่โซเดียมอะซิเตทและน้ำตาลกลูโคส โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 5.440 ± 0.273 และ 4.379 ± 0.281 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11) เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตของไฮโดรเจนก็พบว่ามีความสอดคล้องกัน กล่าวคือสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่ใส่กรดอะซิติกจะให้ปริมาณของไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 722.823 ± 26.779 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าอาหาร TAP-K ที่ใส่โซเดียมอะซิเตทและน้ำตาลกลูโคสประมาณ 2 เท่า (ตารางที่ 4.11) ในขณะที่สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่ถูกบ่มในอาหาร TAP-K ที่ใส่น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลแลกโทส และน้ำตาลซูโครส จะไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในชั่วโมงที่ 24 แต่พบการผลิตไฮโดรเจนในระดับต่ำตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณไฮโดรเจนของสายสาย S. *obliquus* TISTR 8546 ที่ปมอาหาร TAP-K ซึ่งแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ภายใต้แสงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	อัตราการผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง)				ปริมาณไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์)			
	24	48	72	96	24	48	72	96
กรดอะซีติก	3.887 ± 0.144 ^a	8.582 ± 0.283 ^a	7.952 ± 0.503 ^a	7.529 ± 0.279 ^a	93.294 ± 3.464 ^a	411.944 ± 13.566 ^a	572.550 ± 36.251 ^a	722.823 ± 26.779 ^a
โซเดียมอะซีเตท	1.848 ± 0.141 ^b	5.440 ± 0.273 ^b	4.509 ± 0.195 ^b	3.734 ± 0.164 ^b	44.361 ± 3.387 ^b	261.135 ± 13.108 ^b	324.619 ± 14.029 ^b	358.442 ± 15.761 ^b
น้ำตาลกลูโคส	0.886 ± 0.246 ^c	4.379 ± 0.281 ^c	3.960 ± 0.401 ^c	3.263 ± 0.194 ^c	21.269 ± 5.894 ^c	210.172 ± 13.490 ^c	285.087 ± 28.903 ^c	313.248 ± 18.653 ^c
น้ำตาลฟรักโทส	ND	0.051 ± 0.004 ^d	0.109 ± 0.012 ^e	0.139 ± 0.010 ^f	ND	2.438 ± 0.189 ^d	7.866 ± 0.846 ^e	13.303 ± 0.947 ^f
น้ำตาลมอลโทส	ND	ND	0.282 ± 0.012 ^{de}	0.413 ± 0.058 ^e	ND	ND	20.270 ± 0.858 ^{de}	39.674 ± 5.586 ^e
น้ำตาลแล็กโทส	ND	0.113 ± 0.001 ^d	0.196 ± 0.009 ^{de}	0.224 ± 0.071 ^{ef}	ND	5.402 ± 0.056 ^d	14.113 ± 0.646 ^{de}	21.471 ± 6.77 ^{ef}
น้ำตาลซูโครส	ND	0.184 ± 0.015 ^d	0.582 ± 0.086 ^d	0.934 ± 0.037 ^d	ND	8.823 ± 0.740 ^d	41.915 ± 6.163 ^d	89.712 ± 3.535 ^d
ไม่เติมแหล่งคาร์บอน	ND	0.049 ± 0.011 ^d	0.0814 ± 0.004 ^e	0.109 ± 0.011 ^f	ND	3.334 ± 0.749 ^d	5.861 ± 0.262 ^e	9.686 ± 1.025 ^f

หมายเหตุ ND : ไม่สามารถตรวจสอบได้ (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสลับกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณไฮโดรเจน)

จากการทดลองพบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 จะผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-K ที่ใส่กรดอะซิติก ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก กรดอะซิติกเป็นสารอินทรีย์คาร์บอนที่มีคาร์บอน 2 อะตอม เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่ภายในเซลล์แล้ว กรดอะซิติก (CH_3COOH) จะแตกตัวเป็นอะซิเตท (CH_3COO^-) และโปรตอน (H^+) ซึ่งโปรตอนนี้จะใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตไฮโดรเจนผ่านการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังนั้น เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำจากการขาดโพแทสเซียม เซลล์จะหยุดการสังเคราะห์โปรตีน D1 ที่ระบบแสงสองและเพิ่มอัตราการหายใจ เมื่อเพิ่มปริมาณซับสเตรตคือโปรตอน จึงทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณมากขึ้น นอกจากการสลายตัวของกรดอะซิติกจะได้ซับสเตรตคือโปรตอนแล้ว อะซิเตทที่เกิดขึ้นพร้อมกันนั้น จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติล-โคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) โดยอาศัยพลังงาน ATP แล้วจะเข้าวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid (TCA) cycle) ได้ซัคซิเนต (Succinate) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของวัฏจักรไกลออกซีเลท (Glyoxylate cycle) จากกระบวนการที่กล่าวมา เซลล์จะได้ปริมาณของ NADH และ FADH_2 เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณอิเล็กตรอนและโปรตอน การผลิตไฮโดรเจนจึงเพิ่มมากขึ้น (Johnson and Alric 2012)

นอกจากนี้ การเติมกรดอะซิติกไม่เพียงแต่เป็นการเพิ่มปริมาณของซับสเตรตในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน แต่ยังสามารถลดปริมาณของออกซิเจนซึ่งเป็นตัวยับยั้งของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ กล่าวคือเมื่อกรดอะซิติกถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์แล้ว เกิดการสลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซิเตท อะซิเตทจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติล-โคเอนไซม์เอโดยอาศัยพลังงาน ATP แล้วเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก ได้ผลิตภัณฑ์คือ NADH และ FADH_2 ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอไรเลชัน (Oxidative phosphorylation) หรือการหายใจระดับเซลล์ที่ไม่โตคอนเดรีย ทำให้กระบวนการหายใจของเซลล์ทำงานเพิ่มมากขึ้น (Degrenne *et al.*, 2010; Jurado-Oller *et al.*, 2015) มีรายงานพบว่า การเติมกรดอะซิติกในอาหารส่งเสริมให้สาหร่ายสีเขียว *C. pyrenoidosa* มีกระบวนการหายใจเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เซลล์คงอยู่ในสภาวะปราศจากออกซิเจน ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนจึงเพิ่มสูงและยาวนานมากขึ้น (He *et al.*, 2015) และอาหารที่บ่มสาหร่าย *C. reinhardtii* ที่เติมอะซิเตทในอาหารจะช่วยส่งเสริมให้สาหร่ายมีกระบวนการหายใจมากขึ้น เมื่อควบคู่กับการขาดธาตุซัลเฟอร์ที่ช่วยเร่งการสลายแป้งให้อิเล็กตรอนแก่เอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้ได้ปริมาณไฮโดรเจนสูง (Kosourov *et al.*, 2003)

ผลการทดลองในตารางที่ 4.11 พบว่า สาหร่ายที่บ่มในอาหารใส่โซเดียมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณไฮโดรเจนและอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหารที่ใส่กรดอะซิติก เนื่องจาก โซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa) เป็นเกลือของกรดอะซิติก ดังนั้น เมื่อโซเดียมอะซิเตทถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์แล้ว จะสลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซิเตท (CH_3COO^-) และโซเดียมไอออน (Na^+) ซึ่งแตกต่างจากการแตกตัวของกรดอะซิติกที่จะได้โปรตอน ดังนั้น ปริมาณของซับสเตรตของการผลิตไฮโดรเจนจึงต่ำกว่าเซลล์ที่ใส่กรดอะซิติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

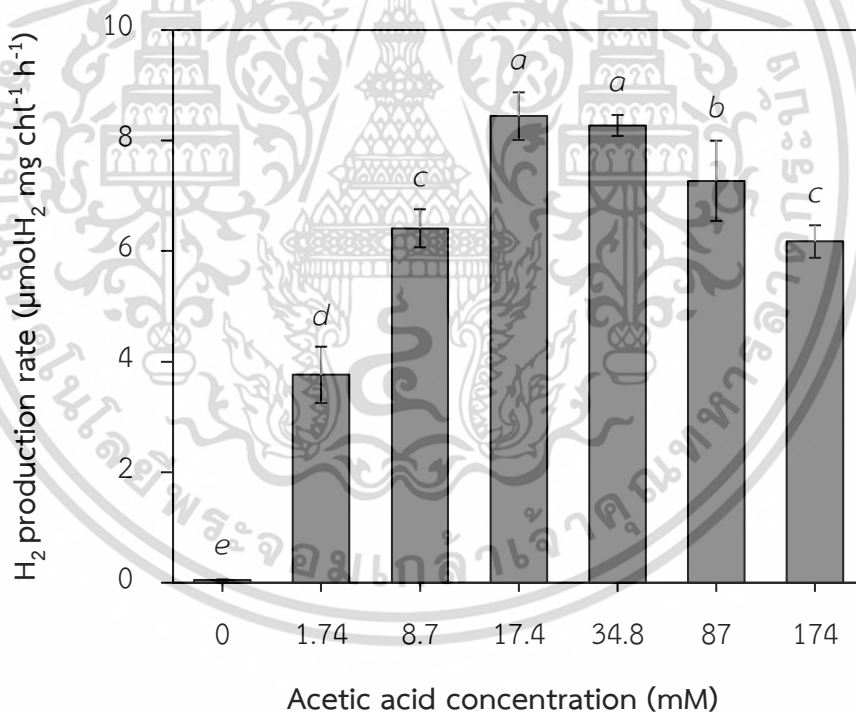
ไฮโดรเจนจึงลดลง ถึงแม้ว่า อะซีเตทจะเข้าสู่วัฏจักรต่างๆ เพื่อให้ได้อิเล็กตรอนหรือโปรตอนแก่เซลล์ แต่ไม่สามารถส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่เติมกรดอะซีติก อย่างไรก็ตาม อิเล็กตรอนจะได้มาจากการแตกตัวของน้ำที่ระบบแสงสองมากกว่าการสลายแป้ง ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว (Shastik *et al.*, 2020)

กรดอะซีติกและโซเดียมอะซีเตทมีคาร์บอนเพียง 2 อะตอม และมีโครงสร้างเล็กไม่มีกิ่งก้าน ทำให้สาหร่ายดูดซึมกรดอะซีติกและโซเดียมอะซีเตทเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่นพบว่า น้ำตาลที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียวกับโมเลกุลคู่ที่มีคาร์บอน 6 และ 12 อะตอม มีโครงสร้างมีขนาดใหญ่และมีกิ่งก้าน ทำให้สาหร่ายดูดซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ยากกว่า อย่างไรก็ตาม น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่น โดยปกติ กลูโคสเป็นสารตั้งต้นของวิถีไกลโคไลซิส เมื่อถูกย่อยสลายจะได้เป็นไพรูเวทซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย จากนั้น เมื่อไพรูเวทถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase เปลี่ยนเป็นอะซีติล-โคเอนไซม์เอและอิเล็กตรอน โดยอิเล็กตรอนถูกส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เกิดปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยนเป็นก๊าซไฮโดรเจนได้ ในสภาวะการขาดโพแทสเซียมมีรายงานพบว่าสาหร่าย *S. obliquus* D3 ที่บ่มในอาหารที่ขาดโพแทสเซียมแล้วเติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนไม่สามารถย่อยสลายกลูโคสด้วยวิถีไกลโคไลซิสได้ เนื่องจาก การขาดโพแทสเซียมทำให้เอนไซม์ไพรูเวทโคเนสในวิถีไกลโคไลซิสไม่ทำงาน และกลูโคสยังไม่สามารถเปลี่ยนเป็นแป้งได้ ดังนั้น จึงมีปริมาณของกลูโคสสะสมในเซลล์มาก อิเล็กตรอนส่วนเกินของเมแทบอลิซึมของกลูโคสจะถูกส่งผ่านไปยังแหล่งอิเล็กตรอนที่พลาสโตควิโนนพูล แล้วอิเล็กตรอนถูกถ่ายทอดต่อไปยังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนทำให้ได้ไฮโดรเจนมากขึ้น (Papazi *et al.*, 2014) โดยสรุปสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่เติมกลูโคสจะได้อิเล็กตรอนจากเมแทบอลิซึมของกลูโคสเพียงอย่างเดียว ซึ่งต่ำกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่เติมกรดอะซีติกและโซเดียมอะซีเตท (ตารางที่ 4.10) ส่วนน้ำตาลชนิดอื่นๆ ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของสาหร่ายได้ในทันที ทำให้ได้ผลผลิตของไฮโดรเจนช้า โดยใช้เวลานานถึง 48 ชั่วโมงจึงเริ่มมีการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจาก เซลล์ต้องเปลี่ยนจากน้ำตาลโมเลกุลคู่ต้องเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน เพื่อให้ง่ายต่อการดูดซึม และมีโอกาสที่น้ำตาลเหล่านี้จะมีการสลายตัวเป็นพลังงานในรูป NADH แล้วให้อิเล็กตรอนแก่กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่ากระบวนการผลิตไฮโดรเจน

จากผลการทดลองนี้ พบว่าอาหารที่ใช้บ่มสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ให้มีการผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุดคืออาหารที่เติมกรดอะซีติก ดังนั้น จึงนำสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอนมาทำการศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.3.1.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-K ที่เติมกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซิติกดังนี้ 0, 1.74, 8.7, 17.4, 34.8, 87 และ 174 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร จากนั้น ทำการบ่มภายใต้แสงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศใน headspace เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในอาหาร TAP-K ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ซึ่งให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 8.441 ± 0.431 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่บ่มใน TAP-K ที่มีกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 8.274 ± 0.189 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.8) เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซิติกในอาหารส่งผลให้สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงต่อเนื่อง ในขณะที่การขาดกรดอะซิติกในอาหารจะทำให้เซลล์สาหร่ายไม่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซิติก ภายใต้สภาวะที่มีแสงและที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกรดอะซีติกมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย โดยสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 และ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (รูปที่ 4.8) เนื่องจาก กรดอะซีติกที่ความเข้มข้นสูงส่งผลให้ได้อิเล็กตรอนและโปรตอนมากขึ้นตามทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น นอกจากนี้ เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซีติกในอาหาร TAP-K เป็น 87 และ 174 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ทำให้เซลล์สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง (รูปที่ 4.8) เนื่องจาก เมื่อมีความเข้มข้นของกรดอะซีติกในอาหารมาก กรดอะซีติกจะเกิดการแตกตัวทำให้ได้โปรตอนซึ่งเป็นไอออนบวก ในปริมาณมากขึ้นส่งผลให้พีเอชของอาหารลดต่ำลงจากความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้น สาหร่ายจึงหยุดการเจริญเติบโต และเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเสียสภาพในการทำงาน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยพบว่า *C. reinhardtii* CC-125 ที่เติมโซเดียมอะซีเตทความเข้มข้น 29.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าเซลล์ที่อยู่ในอาหารที่เติมโซเดียมอะซีเตทความเข้มข้น 3.7, 7.4 และ 14.7 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร และความเข้มข้นของอะซีเตทสูงจะส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยทำให้โมเลกุลของน้ำแตกตัวน้อยลง (Heifetz *et al.*, 2000) นอกจากนี้ สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 ที่ใช้คาร์บอนจากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์และเติมอะซีเตทลงในอาหาร ทำให้สาหร่ายมีการเจริญได้เป็นอย่างดีและสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ พีเอชในอาหารมีค่าเพิ่มขึ้นจากการที่คาร์บอนถูกใช้ แต่เมื่อเวลาผ่านไป เซลล์เกิดกระบวนการหมักของอะซีเตทมากขึ้น ทำให้พีเอชอาหารลดลง การผลิตไฮโดรเจนจึงลดลง (Kosourov *et al.*, 2002)

นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่ไม่เติมกรดอะซีติก มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุด (รูปที่ 4.8) แสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญหนึ่งของกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว มีรายงานวิจัยพบว่า การที่อาหารมีกรดอะซีติกในปริมาณน้อยส่งผลให้เซลล์ลดกระบวนการหายใจ ซึ่งจะให้ออกซิเจนในระบบเพิ่มสูงขึ้น รวมทั้ง สาหร่ายได้รับออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำที่ระบบแสงสอง ดังนั้น เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงมีศักยภาพในการทำงานต่ำลง และได้ปริมาณของไฮโดรเจนต่ำ (Lakatos *et al.*, 2017) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยในสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่พบว่าเมื่อบ่มเซลล์ในอาหารที่เติมอะซีเตทความเข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับเซลล์ที่บ่มในอาหารที่เติมอะซีเตทความเข้มข้นเท่ากับ 17 และ 34 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร (Laurinavichene *et al.*, 2004) ดังนั้น เซลล์สาหร่ายควรบ่มในอาหารที่มีความเข้มข้นของแหล่งอิเล็กตรอนที่เหมาะสม เพื่อลดโอกาสเกิดความเป็นกรดในอาหาร และป้องกันการขาดแหล่งอิเล็กตรอนและลดการส่งเสริมการทำงานของกระบวนการหายใจ จากผลการทดลองนี้ พบว่าสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหารที่เติมกรดอะซีติกความเข้มข้น 17.4 และ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร เพื่อชะลอระยะเวลาของการสะสมคาร์บอนภายในเซลล์ที่ทำให้พีเอชของอาหารเป็น

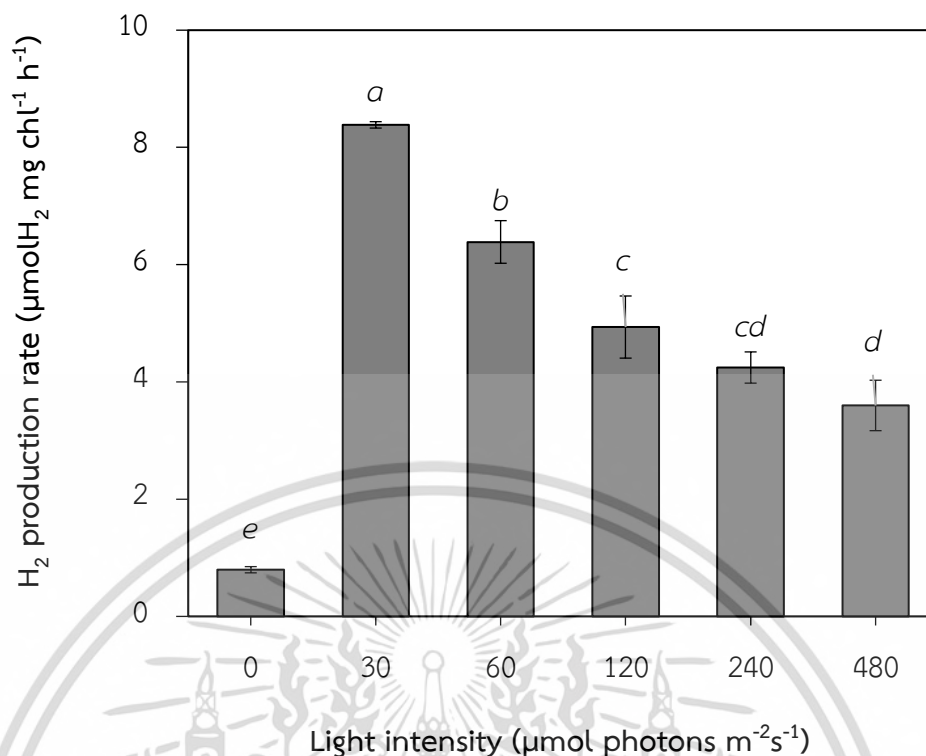
กรด และเพื่อเพิ่มระยะเวลาการผลิตไฮโดรเจนให้นานขึ้น จึงเลือกความเข้มข้นของกรดอะซีติก 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร มาทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อไป

4.3.2 ผลของความเข้มแสงและรูปแบบการให้แสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ

4.3.2.1 ผลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-K ที่เติมกรดอะซีติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร จากนั้น ทำการบ่มภายใต้ความเข้มแสง 0, 30, 60, 120, 240 และ 480 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด เท่ากับ 8.385 ± 0.363 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (รูปที่ 4.9) และเมื่อเพิ่มความเข้มแสงเป็น 60, 120, 240 และ 480 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที จะส่งผลต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายมีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 4.9) สาหร่ายที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุดเมื่อบ่มในอาหาร TAP-K ภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสงหรืออยู่ในที่มืด (รูปที่ 4.9)

โดยทั่วไป สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ทั้งภายใต้สภาวะที่มีแสงและในที่มืด โดยผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าในสภาวะที่มีแสง (Melis and Happe 2004) เนื่องจาก สาหร่ายมีหน่วยรับพลังงานแสงที่สามารถดูดซับพลังงานแสงและเกิดกระบวนการโฟโตไลซิส เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอนอื่นๆ จนถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือเฟอร์ริดอกซิน ซึ่งจะส่งต่ออิเล็กตรอนถูกส่งไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน จากการทดลอง สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในที่มืดให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำสุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.797 ± 0.055 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.9) เนื่องจาก สารตั้งต้นของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ซึ่งก็คือโปรตอนและอิเล็กตรอน ส่วนใหญ่จะได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ดังนั้น ในสภาวะมืด ปริมาณอิเล็กตรอนจะลดลงทำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนลดลง อย่างไรก็ตาม ยังสามารถพบการผลิตไฮโดรเจนได้เช่นกัน ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสาหร่ายสามารถใช้อิเล็กตรอนที่มาจากสลายแป้งได้โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยปัจจัยพลังงานแสงเป็นตัวกระตุ้น งานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาในสาหร่าย *C. reinhardtii* ที่พบว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวรับอิเล็กตรอนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงมากถึง 60-90 เปอร์เซ็นต์ และรับอิเล็กตรอนจากการสลายแป้งเพียง 20-30 เปอร์เซ็นต์ (Wang et al., 2020)



รูปที่ 4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ และมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

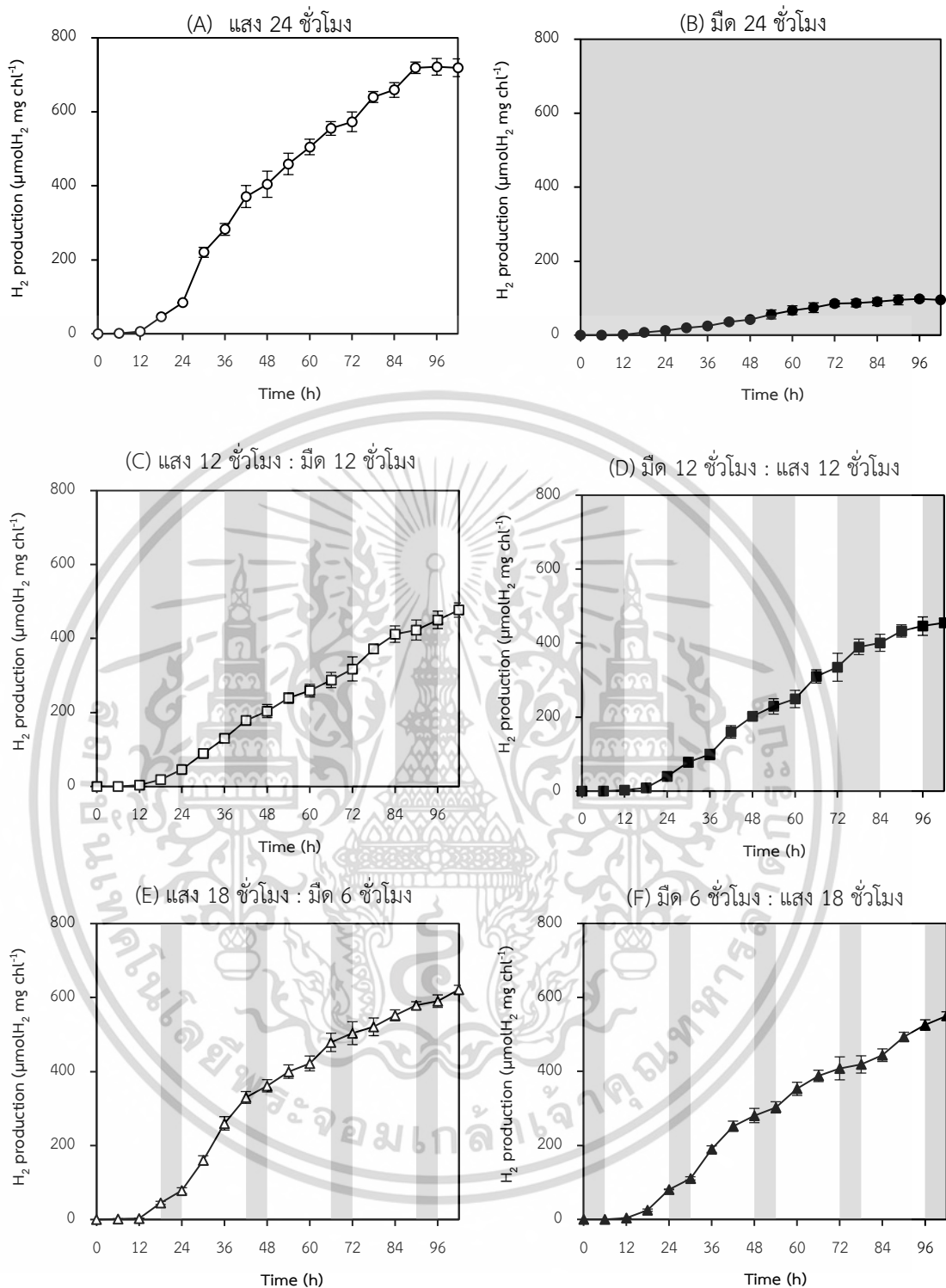
จากการทดลองพบว่า ความเข้มแสงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการผลิตไฮโดรเจน ความเข้มแสงที่เหมาะสมจะทำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด หากความเข้มแสงสูงเกินไปจะไปยังยังการผลิตไฮโดรเจน โดยสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลฟotonต่อตารางเมตรต่อวินาที ความเข้มแสงที่สูงกว่า 30 ไมโครโมลฟotonต่อตารางเมตรต่อวินาที จะมีผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง (รูปที่ 4.9) เนื่องจาก ความเข้มแสงที่มากเกินไปส่งผลทำให้เกิดปริมาณของออกซิเจนมาก และส่งผลไปยังยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสอย่างรุนแรง (Kosourov *et al.*, 2002) นอกจากนี้ ภายใต้ความเข้มแสงสูง เซลล์จะเกิดกระบวนการยับยั้งด้วยแสง (Photoinhibition) และความร้อนจากความเข้มแสงสูงทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงเกิดความเสียหายและไม่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ (Roach and Krieger-Liszkay 2014) ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลอง ที่ศึกษาสาหร่าย *C. reinhardtii* UTEX 90 ที่พบว่า เซลล์ที่บ่มภายใต้ความเข้มแสง 200 ไมโครโมลฟotonต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มแสงเป็น 300 ไมโครโมลฟotonต่อตารางเมตรต่อวินาที การสะสมของไฮโดรเจนของสาหร่ายจะลดลง เนื่องจากปริมาณโปรตีนและคลอโรฟิลล์ลดลง รวมทั้ง เอนไซม์เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรจีเนสทำงานลดลง (Kim et al., 2006) จากผลการทดลองพบว่าความเข้มแสงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 คือ 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ดังนั้น จึงนำสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที มาศึกษารูปแบบการให้แสงต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.3.2.2 ผลของรูปแบบการให้แสงต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-K ที่เติมกรดอะซีติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร จากนั้น ทำการบ่มภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยแปรผันรูปแบบการให้แสง 6 รูปแบบ ได้แก่ (1) การบ่มเซลล์ภายใต้แสง 24 ชั่วโมง (2) การบ่มเซลล์ภายใต้ที่มีมืด 24 ชั่วโมง (3) การบ่มเซลล์ภายใต้แสง 12 ชั่วโมงสลับมืด 12 ชั่วโมง (4) การบ่มเซลล์ภายใต้ที่มีมืด 12 ชั่วโมงสลับแสง 12 ชั่วโมง (5) การบ่มเซลล์ภายใต้แสง 18 ชั่วโมงสลับมืด 6 ชั่วโมง และ (6) การบ่มเซลล์ภายใต้แสง 6 ชั่วโมงสลับมืด 18 ชั่วโมง และมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศเป็นเวลา 100 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนสะสมทุกๆ 6 ชั่วโมง พบว่าสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้แตกต่างกันขึ้นกับรูปแบบการให้แสง โดยเซลล์ที่บ่มในอาหารภายใต้การให้แสงต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง ให้ปริมาณของไฮโดรเจนสะสมสูงสุด โดยผลิตได้ 721.679 ± 22.526 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในเวลาที่ 96 ชั่วโมง (รูปที่ 4.10A) ส่วนเซลล์ที่บ่มภายใต้สภาวะมืดให้การผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 97.819 ± 5.575 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (รูปที่ 4.10B)

นอกจากแสงจะเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวแล้ว รูปแบบการให้แสงยังมีส่วนสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวอีกด้วย งานวิจัยส่วนใหญ่เน้นการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีแสงต่อเนื่อง อย่างไรก็ตาม ออกซิเจนซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์แสงเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังนั้น เพื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนในระบบ จึงมีแนวคิดที่จะทำการบ่มเซลล์สาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะการให้แสงสลับกับมืด เพื่อศึกษารูปแบบการให้แสงต่อการผลิตไฮโดรเจน จากผลการทดลองพบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 สามารถผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีแสงสูงกว่าที่มีมืดในทุกรูปแบบของการให้แสง โดยสภาวะการให้แสง 18 ชั่วโมงสลับมืด 6 ชั่วโมง *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด แต่ยังคงต่ำกว่าการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีแสงต่อเนื่อง การให้รูปแบบของการให้แสงแบบสลับกับมืดและสว่าง ยังทำให้เซลล์ต้องใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้นถึงจะได้ปริมาณไฮโดรเจนใกล้เคียงกับการให้แสงแบบต่อเนื่อง

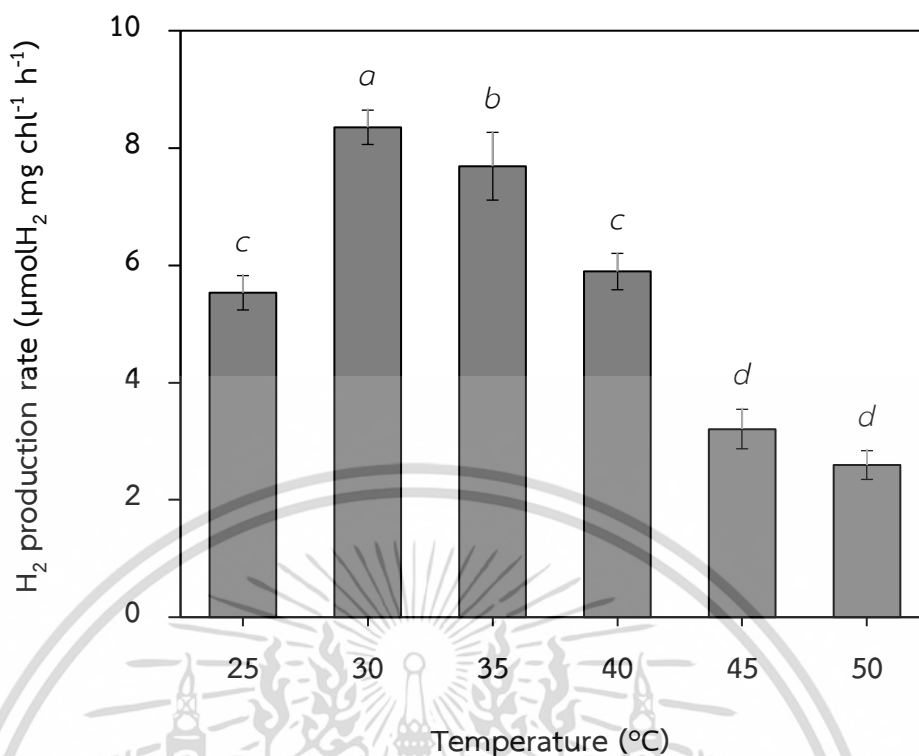


รูปที่ 4.10 ปริมาณการสะสมไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ภายใต้รูปแบบการให้แสงแบบต่างๆ โดยพื้นหลังสีขาวแสดงถึงการบ่มเซลล์ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และพื้นหลังสีเทาแสดงถึงการบ่มเซลล์ในที่มืด เซลล์สาหร่ายถูกบ่มภายใต้สภาวะมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 0-เอกสารนี้ 100 ชั่วโมงที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ ผลการทดลองยังพบว่า การบ่มเซลล์ที่มีด 12 ชั่วโมงสลับแสง 12 ชั่วโมง ต้องใช้ระยะเวลาปรับตัวก่อนการผลิตไฮโดรเจน (Lag phase) นานกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่บ่มโดยการให้แสงแบบอื่นๆ เนื่องจากเซลล์ยังไม่มีแสงและสะสมแป้ง ทำให้มีปริมาณของอิเล็กตรอนต่ำ จากนั้น เซลล์จึงเริ่มมีการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 16 ของการบ่มเซลล์ เพราะได้รับพลังงานแสงแล้ว ทั้งนี้ การได้รับพลังงานแสงในเวลาสั้นๆ จะส่งผลให้ประสิทธิภาพของการทำงานของระบบแสงสองมีค่าลดลง ทำให้เซลล์ต้องใช้เวลาปรับตัวนานขึ้น (รูปที่ 4.10) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษานำโดย C. reinhardtii ภายใต้รูปแบบการให้แสงที่แตกต่างกัน โดยพบว่า การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 50 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เซลล์จะใช้ระยะเวลาปรับตัวก่อนผลิตไฮโดรเจนสั้นกว่า และให้ปริมาณไฮโดรเจนเท่ากับ 210.91 ± 14.29 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับการบ่มเซลล์แบบแสงสลับมีด 18 ต่อ 6 ชั่วโมง, 12 ต่อ 12 ชั่วโมง และ 14 ต่อ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ (Oncel and Sukan, 2011) จากการทดลอง สรุปได้ว่า การให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ต่อเนื่องจะทำให้ *S. obliquus* TISTR 8546 ผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

4.3.3 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-K ที่เติมกรดอะซีติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร จากนั้น ทำการบ่มภายใต้สภาวะการให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยแปรผันอุณหภูมิของการบ่มเซลล์ตั้งแต่ 25, 30, 35, 40, 45 ถึง 50 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศใน headspace เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์อัตราการการผลิตไฮโดรเจน พบว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 8.353 ± 0.293 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.11) ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส จะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสาหร่ายที่บ่มที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำสุด (รูปที่ 4.11)



รูปที่ 4.11 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยแปรผันอุณหภูมิของการบ่มที่ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส และให้ออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสมมติแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

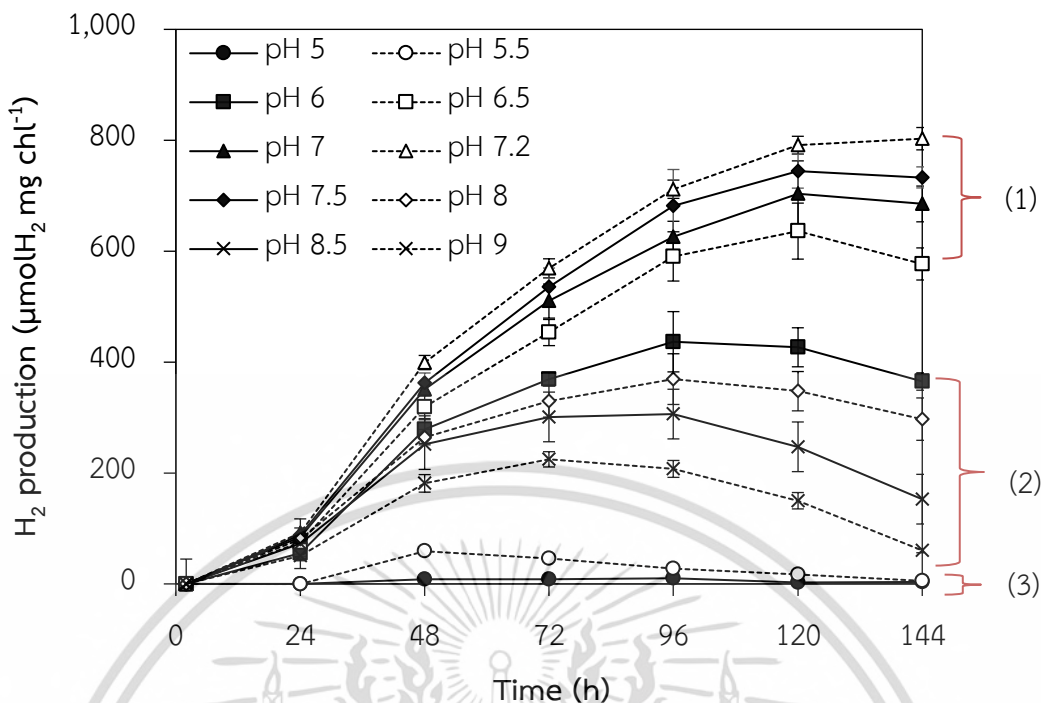
อุณหภูมิจัดเป็นปัจจัยทางกายภาพที่ส่งผลต่อเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต อาทิ เช่น การเจริญเติบโต การสะสมแป้ง การสะสมไขมัน รวมทั้งการผลิตไฮโดรเจน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจะขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยมักจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจกล่าวเป็นนัยว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของ *S. obliquus* TISTR 8546 นั้นจะมีกิจกรรมสูงสุดที่ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองนี้แตกต่างจากผลงานวิจัยที่พบในสาหร่าย *C. reinhardtii* 137C(+) ที่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะลดลงอย่างรวดเร็ว (Happe and Naber, 1993) เนื่องจาก เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และเซลล์จะถูกทำลายจากความร้อน เช่นเดียวกับผลการทดลองที่พบที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีการผลิตไฮโดรเจนลดลง เนื่องจาก เอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างเต็มที่ (รูปที่ 4.11) รวมทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์สาหร่ายที่บ่มที่อุณหภูมิสูงมีลักษณะเป็นสีเหลือง เนื่องจากมีการสังเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง ทำให้สาหร่ายไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ นอกจากนี้ เมื่อเซลล์บ่มภายใต้อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม จะทำให้เซลล์ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีน กรดไขมัน และลดศักยภาพการดูดซับคาร์บอน ทำให้เซลล์สาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตและขาดแคลนแหล่งออกซิเจนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน (Juneja *et al.*, 2013) จากผลการทดลอง สรุปได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *S. obliquus* TISTR 8546 คืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.3.4 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-K ที่เติมกรดอะซีติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร และปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับพีเอช 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.2, 7.5, 8, 8.5 ถึง 9 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.2 เป็นพีเอชปกติของอาหาร TAP-K ใช้เป็นตัวแปรควบคุม) จากนั้น ทำการบ่มภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศใน headspace เป็นเวลา 144 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนและค่าพีเอช พบว่า สาหร่ายที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 8.316 ± 0.268 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.12) เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-K ที่มีค่าพีเอช 7.2 และมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 802.871 ± 20.163 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในชั่วโมงที่ 96 (รูปที่ 4.12) จากผลการทดลองสามารถแบ่งการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ในอาหาร TAP-K ที่แปรผันพีเอช ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ (1) การผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง ซึ่งจะพบในเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่ค่ามีพีเอชเริ่มต้น 7.2, 7.5 และ 6.5 หรือในสภาวะพีเอชที่เป็นกลาง (2) การผลิตไฮโดรเจนในปริมาณปานกลาง ซึ่งจะพบในเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่ค่ามีพีเอชเริ่มต้น 6, 8, 8.5 และ 9 หรือในสภาวะกรดอ่อนและเบสอ่อน และ (3) การผลิตไฮโดรเจนในปริมาณน้อย ซึ่งจะพบในเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่ค่ามีพีเอชเริ่มต้นที่ 5 และ 5.5 หรือในสภาวะพีเอชที่เป็นกรดอ่อน (รูปที่ 4.12) นอกจากนี้ ในการทดลองยังได้วัดการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหาร เมื่อบ่มในชั่วโมงที่ 48 และ 144 พบพีเอชของอาหารเริ่มต้นที่เป็นกรดจะมีอัตราเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลามากขึ้น ในทางตรงกันข้าม พีเอชของอาหารเริ่มต้นที่เป็นเบสจะมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป (ตารางที่ 4.12)



รูปที่ 4.12 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่แปรผันพีเอชเริ่มต้นที่ 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.2, 7.5, 8, 8.5 และ 9 ภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.12 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดและค่าพีเอชที่ควบคุมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์

พีเอชที่ต้องการ	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัม คลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง)	พีเอชเริ่มต้น	พีเอช ชั่วโมง 48	พีเอช ชั่วโมง 144
5.0	0.180 ± 0.024 ^g	5.02 ± 0.02	5.81 ± 0.15	6.81 ± 0.04
5.5	1.226 ± 0.066 ^f	5.53 ± 0.01	5.99 ± 0.04	6.96 ± 0.07
6.0	5.797 ± 0.517 ^d	6.04 ± 0.02	7.09 ± 0.01	7.14 ± 0.06
6.5	6.639 ± 0.428 ^c	6.54 ± 0.01	7.12 ± 0.8	7.32 ± 0.08
7.0	7.314 ± 0.226 ^b	7.01 ± 0.03	7.19 ± 0.09	7.31 ± 0.17
7.2	8.316 ± 0.268 ^a	7.19 ± 0.01	7.29 ± 0.02	7.40 ± 0.09
7.5	7.552 ± 0.373 ^b	7.54 ± 0.04	7.46 ± 0.07	7.32 ± 0.03
8.0	5.514 ± 0.290 ^d	8.02 ± 0.06	7.72 ± 0.10	7.65 ± 0.00
8.5	5.234 ± 0.326 ^d	8.51 ± 0.02	7.93 ± 0.01	7.89 ± 0.01
9.0	3.777 ± 0.330 ^e	8.98 ± 0.04	8.21 ± 0.05	8.19 ± 0.09

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับเอกสารนี้ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีเอชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีค่าพีเอชในช่วง 7 ถึง 8 เมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายในอาหารที่มีพีเอชต่ำ มีโอกาสที่จะเกิดความพิษของเซลล์จากไอออนของโลหะ (Metal toxicity) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตและโปรตีนภายในเซลล์ มีการสลายและเพิ่มการสะสมของผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักมากขึ้น อาทิเช่น อะซีเตท พอร์เมต และเอทานอล ฯลฯ ลดกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการหายใจ และกระบวนการสังเคราะห์แป้ง ส่งผลให้สาหร่ายไม่มีซับสเตรตให้แก่เอนไซม์ไฮโดรจีเนส ในขณะที่เมื่อสาหร่ายบ่มในอาหารพีเอชสูง ทำให้วัฏจักรของเซลล์ดำเนินไปอย่างช้า เพราะเบสไปเพิ่มความยืดหยุ่นที่ผนังเซลล์ แต่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าพีเอชเป็นกรด เซลล์จะอยู่ในสภาวะขาดแคลนแหล่งซับสเตรตสำหรับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้ไฮโดรเจนจึงมีปริมาณต่ำ (Rotatore and colman, 1991; Kosourov *et al.*, 2003; Juneja *et al.*, 2013)

จากผลการทดลองพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 คือพีเอชระหว่าง 6.5-7.2 พีเอชในช่วงนี้จะมีค่าเพิ่มขึ้นภายหลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 144 ชั่วโมง เนื่องจาก แหล่งคาร์บอนในอาหารของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 คือกรดอะซิติก (CH_3COOH) เมื่อกรดอะซิติกถูกดูดซึมเข้าภายในเซลล์จะเกิดการแตกตัวเป็นอะซีเตท (CH_3COO^-) และโปรตอน (H^+) ซึ่งโปรตอนถูกใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ทำให้สภาวะนั้นไม่มีประจุบวก และมีความเป็นเบสมากขึ้น นอกจากนี้ กระบวนการสังเคราะห์แสงโดนทำลายจากการขาดโพแทสเซียมในอาหาร TAP-K ทำให้ไม่สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ ส่งผลให้มีการลดลงของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหาร (CO_2 partial pressure) นอกจากนี้ เซลล์มีการดูดซึมอะซีเตทไปใช้ในกระบวนการต่างๆ ทำให้ระดับของประจุบวกเพิ่มมากขึ้น ค่าพีเอชในอาหารจึงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Kosourov *et al.*, 2002)

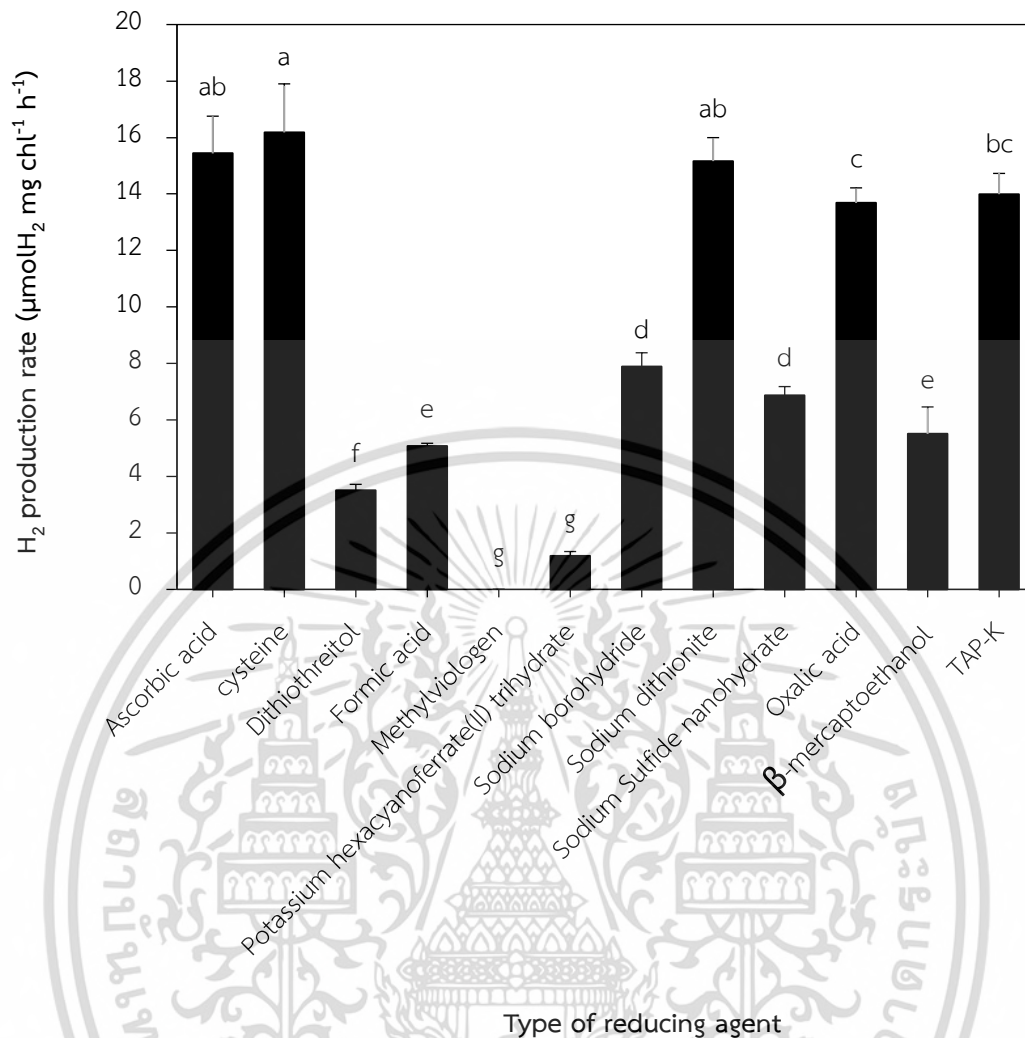
นอกจากนี้ จากผลการทดลองพบว่า สาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็นกรดอ่อน (พีเอช 5-6) และเบสอ่อน (พีเอช 8-9) มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำ เนื่องจาก สาหร่ายต้องใช้เวลาปรับตัวที่พีเอชนั้นๆ เกิดเมแทบอลิซึมในการปรับค่าพีเอชภายในเซลล์ให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต โดยพบว่าค่าพีเอชหลังจากบ่มเซลล์จะเข้าใกล้ความเป็นกลางเรื่อยๆ ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนแตกต่างกัน ดังนี้ สาหร่าย *C. reinhardtii* มีพีเอชที่เหมาะสมในช่วง 7.0-7.4 (Kosourov *et al.*, 2003) สาหร่าย *S. obtusiusculus* มีพีเอชที่เหมาะสมในช่วง 5.5-8 สาหร่าย *C. vulgaris* มีพีเอชที่เหมาะสมที่พีเอช 8 (Rashid *et al.*, 2013) สาหร่าย *Tetraspora* sp. มีพีเอชที่เหมาะสมที่พีเอช 6.5 (Maneeruttanarungroj and Phunpruch, 2017) และสาหร่าย *Platymonas subcordiformis* มีพีเอชที่เหมาะสมที่พีเอช 8 (Guan *et al.*, 2004) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.5 อิทธิพลของสารที่ให้อิเล็กตรอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

S. obliquus TISTR 8546 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในบรรยากาศ

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวและกระจายเซลล์ในอาหาร TAP-K ที่มีกรดอะซีติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลลาร์บดต่อลิตร และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.2 จากนั้น เติมน้ำที่ให้อิเล็กตรอนชนิดต่างๆดังนี้ กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ซิสเทอีน (Cysteine) ไดไธโอทรีออล (Dithiothreitol) กรดฟอร์มิก (Formic acid) เมทิลไวโอลเจน (Methylviologen) โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (II) ไตรไฮเดรต (Potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate) โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (Sodium borohydride) โซเดียมไดไธโอไนต์ (Sodium dithionite) โซเดียมซัลไฟด์นาโนไฮเดรต (Sodium Sulfide nanohydrate) กรดออกซาลิก (Oxalic acid) เบตา-เมอร์แคปโตเอทานอล (β -mercaptoethanol) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลลาร์ โดยใช้อาหาร TAP-K ที่ไม่เติมน้ำให้อิเล็กตรอนเป็นตัวแปรควบคุม ทำการบ่มภายใต้สภาวะการให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศใน head space เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจน พบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 15.435 ± 1.320 และ 16.179 ± 1.721 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-K ที่เติมกรดแอสคอร์บิกและซิสเทอีนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.13) รองลงมาคือสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่เติมน้ำโซเดียมไดไธโอไนต์และกรดออกซาลิก โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 15.164 ± 0.832 และ 13.681 ± 0.536 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.13) ในขณะที่การเติมน้ำรีดิวซ์บางชนิด เช่น โซเดียมโบโรไฮไดรด์ โซเดียมซัลไฟด์นาโนไฮเดรต เบตา-เมอร์แคปโตเอทานอล และกรดฟอร์มิก ไม่มีผลต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย ในทางตรงกันข้าม สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเติมน้ำ เมทิลไวโอลเจนและโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (II) ไตรไฮเดรต (รูปที่ 4.13)



รูปที่ 4.13 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่แปรผันชนิดของให้อิเล็กตรอน ภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมล โฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน)

จากผลการทดลองพบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้ เมื่อเติมสารรีดิวซ์ 4 ชนิด ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก ซิสเทอีน โซเดียมไดไธโธไนต์ และกรดออกซาลิก ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก สารให้อิเล็กตรอนเหล่านี้สามารถให้อิเล็กตรอนแก่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ ยังถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับสารตัวรับอิเล็กตรอนอื่นๆ เพื่อรักษาสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox balancing) ทำให้เฟอร์ริดอกซินซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สว่นไวสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

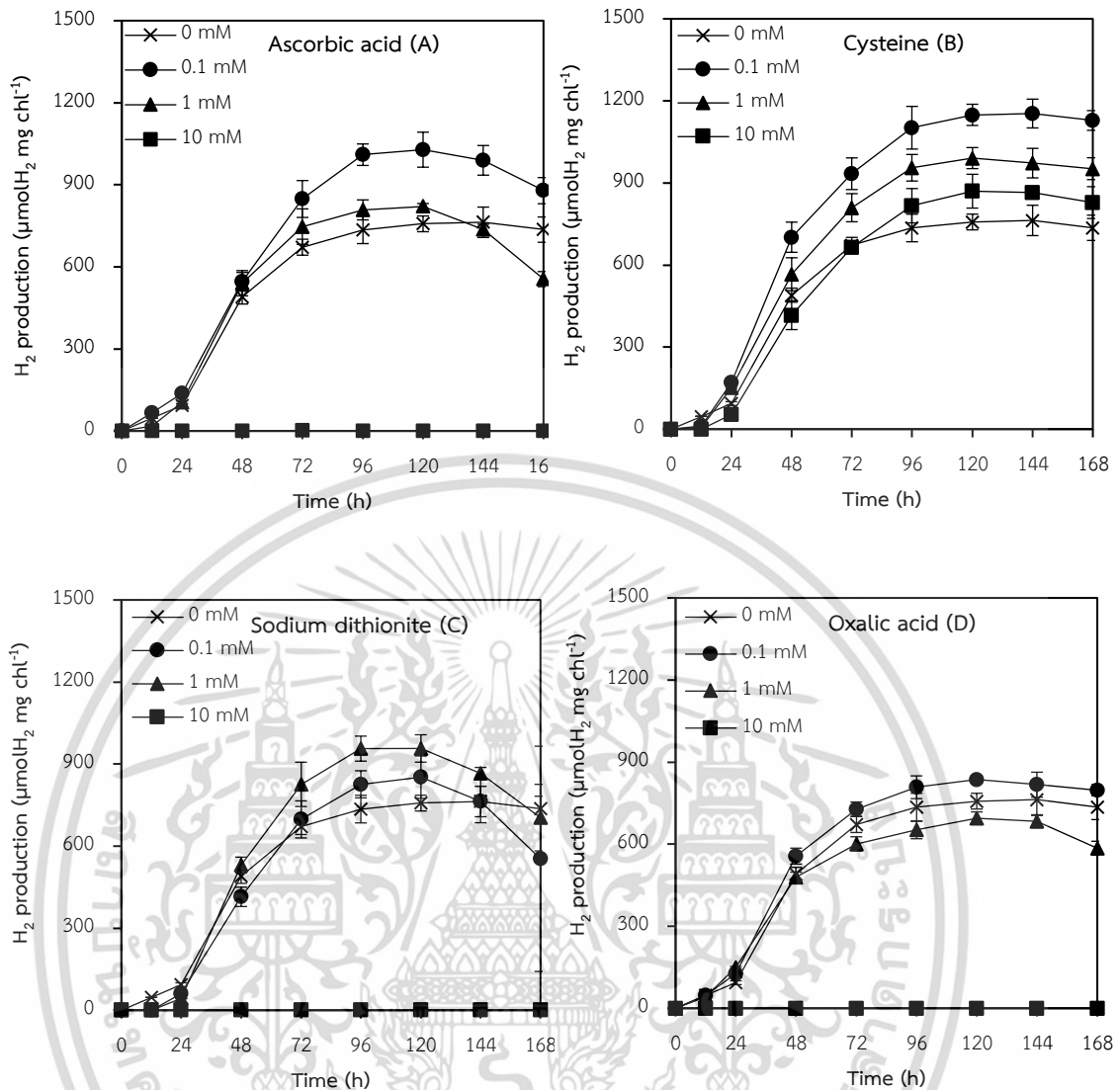
สุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์แสงส่งอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในอัตราที่เพิ่มขึ้น สำหรับจีเอ็มโออัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กรดแอสคอร์บิกและซิสเทอีนมีความสามารถในการส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดในสำหรับ *S. obliquus* TISTR 8546 ซึ่งสารทั้งคู่เป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ช่วยยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (Free radicals) อนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (Reactive oxygen species; ROS) ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) และไฮดรอกซิล (OH) เป็นต้น โดย ROS เกิดขึ้นจากกระบวนการฟอสฟอรีเลชันที่ไม่โตคอนเดรียและจากกระบวนการสังเคราะห์แสงที่คลอโรพลาสต์ ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์แสงนั้น เฟอร์ริดอกซินในสภาพรีดิวซ์จะให้อิเล็กตรอนพลังงานสูงแก่ออกซิเจนเปลี่ยนเป็น O_2^- ดังนั้น เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้ปริมาณ ROS ลดลง และออกซิเจนจากการสังเคราะห์แสงจึงลดลงเช่นกัน เมื่อสาหร่ายอยู่ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจึงทำงานได้มากขึ้น นอกจากนี้ การเติมสารต้านอนุมูลอิสระลดความพิษต่อเซลล์ได้ (Davey *et al.*, 2000; Hungate 1969)

ถึงแม้ว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะเป็นจุดศูนย์รวมของอิเล็กตรอนเพื่อปรับสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ภายในเซลล์สาหร่ายสีเขียว แต่สารบางชนิดไม่สามารถส่งอิเล็กตรอนไปยังเอนไซม์นี้ได้ เนื่องจาก มีค่าศักย์รีดอกซ์ที่ต่ำและอาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์สาหร่าย สารรีดิวซ์บางชนิดยังมีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่าง ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชยังมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซลล์และความสามารถในการแพร่ของสารผ่านเยื่อเลือกผ่าน จากผลการทดลองพบว่า สาหร่ายที่เติมเมทิลไวโอลोजেনและโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (II) ไตรไฮเดรต จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่ไม่มีการเติมสารให้อิเล็กตรอน (รูปที่ 4.13) เนื่องจาก เมทิลไวโอลोजেনเกิดออกซิไดซ์ได้อย่างรวดเร็วเมื่อมีออกซิเจนในระบบ ในการทดลองนี้ไม่ได้ทำการกำจัดออกซิเจนในระบบจึงทำให้มีออกซิเจนเหลือในระบบจำนวนมาก เมทิลไวโอลोजেনจึงไม่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาการให้อิเล็กตรอนได้ ส่งผลให้ปริมาณของไฮโดรเจนมีค่าต่ำสุด (Adams and Mortenson, 1984) นอกจากนี้ มีงานวิจัยพบว่าการเติมเมทิลไวโอลोजেনในสาหร่ายสีเขียวจะทำให้จลนศาสตร์ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสช้าลงกว่าที่ไม่เติมสารในสาหร่ายสีเขียว (Abendroth *et al.*, 2008) การเติมสารโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (II) ไตรไฮเดรตนั้น สารชนิดนี้สามารถแตกตัวเป็นไซยาไนด์ และเกิดปฏิกิริยากับไฮโดรเจนได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนไซยาไนด์ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ ไฮโดรเจนไซยาไนด์สามารถยับยั้งกิจกรรมของปฏิกิริยาออกเดชันที่ไซโตโครม (Wharton and Tzagoloff, 1967) ส่งผลต่อให้ประสิทธิภาพของกระบวนการหายใจของเซลล์ลดลง จึงทำให้ออกซิเจนมีปริมาณสูงขึ้นและจะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่ให้ผลิตไฮโดรเจน ส่วนกรดฟอร์มิกสามารถส่งเสริมให้มีการผลิตไฮโดรเจนผ่านเอนไซม์ Formate hydrogen lyase เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(FHL) ซึ่งพบในแบคทีเรีย (Yoshida *et al.*, 2005) นอกจากนี้ กรดฟอร์มิกยังมีฤทธิ์เป็นกรดเมื่อแตกตัวจะให้โปรตอนจำนวนมาก ส่งผลให้ค่าพีเอชของอาหารลดลง สารให้อิเล็กตรอนที่เป็นกรดจึงมีความเป็นพิษต่อเซลล์และไม่สามารถทำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้ ในขณะที่การดึงโปรตอนออกจากโครงสร้างของไซเตียมโบโรไฮโดรด์ด้วยวิธี Hydrolysis หรือ Methanolysis จะทำให้ผลิตไฮโดรเจนมากได้ในปริมาณสูง (Saka *et al.*, 2020) มีรายงานพบว่า ไซเตียมโบโรไฮโดรด์สามารถให้อิเล็กตรอนแก่พลาสโตควิโนนในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis sp.* แต่จากผลการทดลองนี้ เมื่อเติมไซเตียมโบโรไฮโดรด์ให้กับเซลล์ของ *S. obliquus* TISTR 8546 กลับไม่ส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 4.13) เช่นเดียวกับ เบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลไม่สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 แต่สารนี้สามารถส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Tetraspora sp.* CU2551 โดยผลิตสูงขึ้นประมาณ 2 เท่า (Maneeruttanarungroj *et al.*, 2010) ไตรโอโทรีโอทอลไม่ส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากสารนี้ดูดซึ่มยากและมีผลกระทบต่อเมแทบอลิซึมภายในเซลล์สาหร่าย จากผลการทดลองสรุปได้ว่า กรดแอสคอร์บิก ซิสเทอีน ไซเตียมไดไรโอไนต์ และกรดออกซาลิกเป็นสารรีดิวซ์หรือตัวให้อิเล็กตรอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 จึงนำสารให้อิเล็กตรอนทั้ง 4 ชนิดนี้มาศึกษาผลของความเข้มข้นของสารเหล่านี้ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายต่อไป

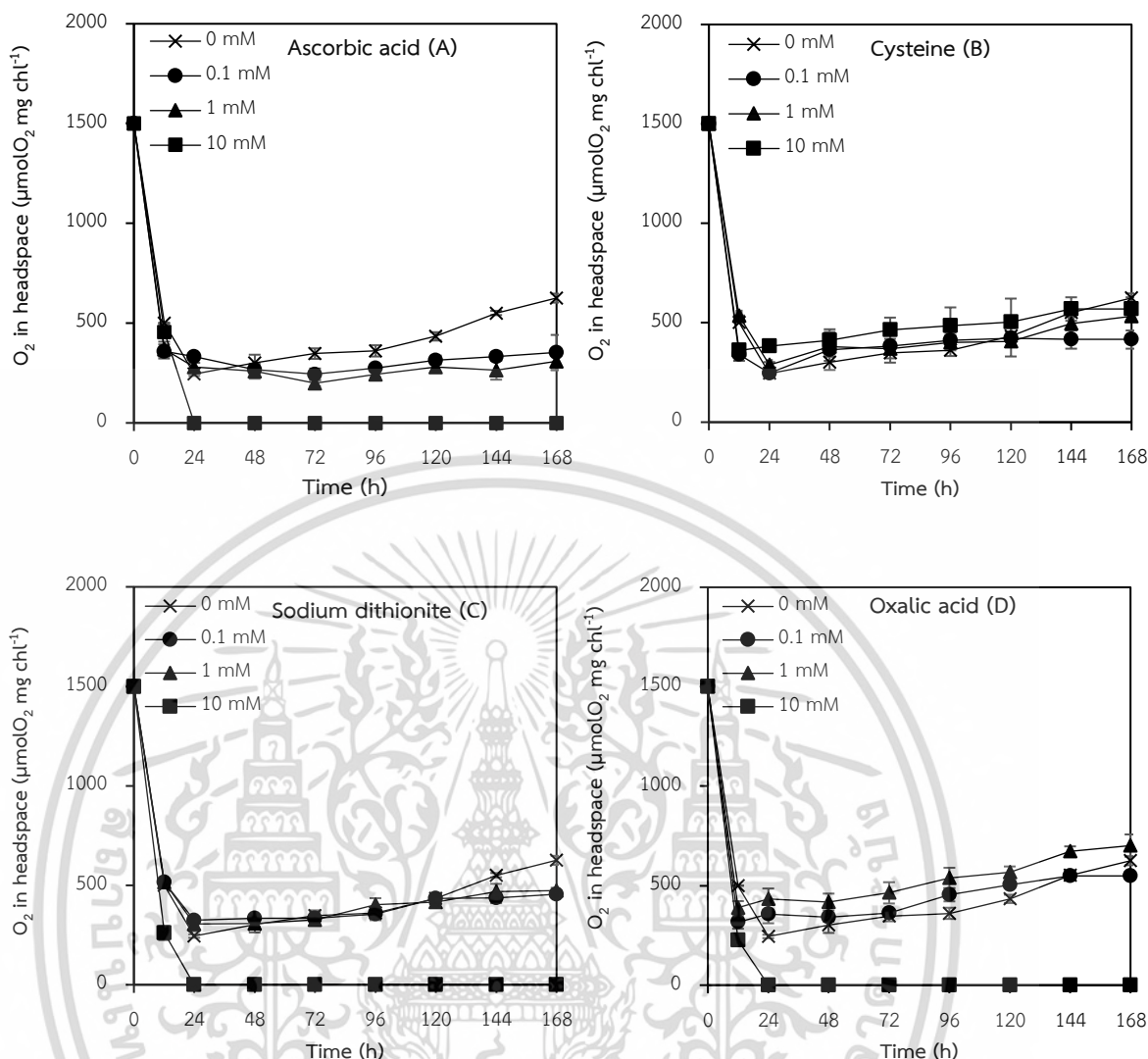
จากการนำสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K มาเติมสารให้อิเล็กตรอนคือ กรดแอสคอร์บิก ซิสเทอีน ไซเตียมไดไรโอไนต์ และกรดออกซาลิก โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1, 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ และไม่เติมสารให้อิเล็กตรอนเป็นตัวควบคุม นำไปวัดการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนพบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่เติมกรดแอสคอร์บิก ไซเตียมไดไรโอไนต์ และกรดออกซาลิก ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนและมีปริมาณออกซิเจนใน headspace เทียบเท่ากับศูนย์ (รูปที่ 4.14 และ 4.15) รวมทั้งค่าพีเอชของตัวอย่างมีความเป็นกรด โดยมีค่าพีเอชประมาณ 4-5 (ตารางที่ 4.13) เมื่อใช้สารเหล่านี้ที่มีความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดความเป็นกรดในตัวอย่าง ส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถปรับตัวกับพีเอชที่เปลี่ยนแปลงได้ ในขณะที่เมื่อบ่มเซลล์สาหร่ายในอาหารที่เติมสารให้อิเล็กตรอนที่มีความเข้มข้นของต่ำ สารเหล่านี้จะสามารถส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนได้ โดยเฉพาะ ซิสเทอีนสามารถให้อิเล็กตรอนแก่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ในทุกความเข้มข้น จากผลการทดลองพบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่เติมซิสเทอีนความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ให้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ $1,153.783 \pm 52.651$ ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ชั่วโมงที่ 144 (รูปที่ 4.14) นอกจากนี้ ซิสเทอีนจะเป็นสารให้อิเล็กตรอนแล้ว ซิสเทอีนยังมีหน้าที่สารต้านอนุมูลอิสระ สามารถกำจัดออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงหรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพื่อลดการเกิดของสาร ROS ซึ่งเป็นตัวทำลายหน่วยย่อยในระบบแสง (Hungate, 1969)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่แปรผันสารให้อิเล็กตรอน 4 ชนิด ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก (A), ซิสเทอีน (B), โซเดียมไดไธโอไนต์ (C) และกรดออกซาลิก (D) ความเข้มข้นของสารรีดิวซ์เป็น 0.1, 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมือออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 0-168 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 ปริมาณออกซิเจนบริเวณ headspace ของขวดที่มีสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่ป่มในอาหาร TAP-K ที่แปรผันของสารให้อิเล็กตรอน 4 ชนิด ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก (A), ซีสเทอีน (B), โซเดียมไดไธโอนิต (C) และกรดออกซาลิก (D) ที่ปรับความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ 0, 0.1, 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 0-168 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 ค่าพีเอชของอาหารที่มีสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ซึ่งบ่มในอาหาร TAP-K และอาหาร TAP-K ที่เติมสารรีดิวซ์ 4 ชนิด ได้แก่ กรดออกซาลิก กรดแอสคอร์บิก ซิสเทอีน และโซเดียมไดไธโอนิต์ ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) เป็นเวลา 12, 48, 96 และ 144 ชั่วโมง

ชนิดสารรีดิวซ์	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	พีเอช			
		12 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง	144 ชั่วโมง
Ascorbic acid (C ₆ H ₈ O ₆)	0.1	7.12 ± 0.03	7.47 ± 0.03	7.44 ± 0.05	7.43 ± 0.04
	1	7.05 ± 0.04	7.16 ± 0.01	7.22 ± 0.03	7.42 ± 0.01
	10	5.28 ± 0.01	5.11 ± 0.01	5.19 ± 0.02	5.23 ± 0.01
Cysteine (C ₃ H ₇ NO ₂ S)	0.1	7.29 ± 0.01	7.30 ± 0.14	7.31 ± 0.01	7.28 ± 0.03
	1	7.26 ± 0.06	7.26 ± 0.01	7.30 ± 0.13	7.28 ± 0.05
	10	7.13 ± 0.04	7.31 ± 0.01	7.42 ± 0.02	7.38 ± 0.04
Sodium dithionite (Na ₂ S ₂ O ₄)	0.1	7.33 ± 0.01	7.36 ± 0.01	7.51 ± 0.01	7.41 ± 0.01
	1	7.14 ± 0.01	7.14 ± 0.11	7.29 ± 0.13	7.32 ± 0.04
	10	5.72 ± 0.02	5.55 ± 0.03	5.65 ± 0.03	5.87 ± 0.01
Oxalic acid (C ₂ H ₂ O ₄)	0.1	7.28 ± 0.03	7.30 ± 0.01	7.43 ± 0.04	7.49 ± 0.01
	1	7.10 ± 0.01	7.17 ± 0.05	7.25 ± 0.07	7.33 ± 0.01
	10	4.25 ± 0.04	4.18 ± 0.01	4.31 ± 0.03	4.40 ± 0.02
Control (TAP-K)	-	7.23 ± 0.03	7.29 ± 0.01	7.34 ± 0.01	7.39 ± 0.01

กรดแอสคอร์บิกมีหน้าที่ลดสาร ROS โดยการจับกับออกซิเจน (O₂, O₃) ทำให้ลดการเกิด Photobleaching ของคลอโรฟิลล์ได้ สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้อย่างปกติในระยะแรกของการบ่มเซลล์ พอเวลานานขึ้น ทำให้พีเอชของอาหารมีความเป็นกรดมากขึ้นจากการที่กรดแอสคอร์บิกแตกตัวเป็นโปรตอน ซึ่งความเป็นกรดจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง การทำลายผนังเซลล์ การสะสมของคาร์บอน กระบวนการหายใจ ซึ่งทำให้ปริมาณของซัลเฟอร์หลักน้อยลง การผลิตไฮโดรเจนจึงลดลง เมื่อเอามาบ่มในกรดแอสคอร์บิก (รูปที่ 4.14A) จากผลการทดลอง สาหร่าย *S. obliquus* ที่บ่มในอาหารที่เติมกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 0.1 และ 1 มิลลิโมลาร์ มีปริมาณไฮโดรเจนลดลง ในชั่วโมงที่ 120 ในขณะเดียวกัน ปริมาณของออกซิเจนมีต่ำกว่าตัวแปรควบคุม ความเป็นไปได้ที่เซลล์สาหร่ายจะตายจากความเป็นกรด โดยพบว่าสีของเซลล์สาหร่ายมีสีเหลืองซีดมากขึ้น สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เติมกรดออกซาลิก 0.1 มิลลิโมลาร์ ให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น เนื่องจาก กรดออกซาลิกจะสามารถให้อิเล็กตรอนในปริมาณสูงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด (Yamada *et al.*, 2015) แต่เมื่อความเข้มข้นสูงเกินไป เซลล์สาหร่ายไม่สามารถทนต่อค่าพีเอชที่ต่ำได้ จึงไม่สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนให้สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซโตเดียมไดโรโอไนต์เป็นสารเคมีในกลุ่มซัลไฟด์หรือเรียกอีกชื่อว่าไซโตเดียมไฮโดรซัลไฟด์ ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระหรือการลดปริมาณของออกซิเจนโดยการเข้าไปจับกับออกซิเจนที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำที่ระบบแสง จนเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนได้ หลังจากนั้น เพอร์รีดอกซินจึงส่งอิเล็กตรอนไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจนขึ้น ไซโตเดียมไดโรโอไนต์สามารถลดปริมาณของออกซิเจนและเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายหลายชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Chlorella* sp., *Chlorococcum minutum* และ *Chlamydomonas* sp. เป็นต้น (Wang *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011; Kojima and Lin, 2004; Paramesh and Chandrasekhar *et al.*, 2020) แต่เมื่อเติมไซโตเดียมไดโรโอไนต์ปริมาณมาก จะทำให้เซลล์มีสารพิษอย่างซัลเฟอร์ไดออกไซด์จากการแตกตัวของไซโตเดียมไดโรโอไนต์ปริมาณสูงเช่นกัน โดยซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะมีผลเสียต่อการควบคุมการแลกเปลี่ยนภายในเซลล์ ยับยั้งปฏิกิริยารีดอกซ์ และจับกับโมเลกุลออกซิเจนเกิดเป็น Reactive Oxygen Species ทำให้เซลล์ตายได้ (Wei *et al.*, 2013) มีรายงานวิจัยพบว่า สาหร่าย *S. obliquus* และ *C. gloeopara* สามารถเจริญเติบโตได้ในความเข้มข้นของไซโตเดียมไดโรโอไนต์ต่ำ แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น สาหร่ายทั้งคู่จะตาย (Márquez-Reyes *et al.*, 2015) ในสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นของสาร 10 มิลลิโมลาร์ และมีปริมาณไฮโดรเจนจึงเท่ากับศูนย์ จากผลการทดลอง สรุปได้ว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 การผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มในอาหาร TAP-K ที่เติมซิสเทอีนความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าปริมาณไฮโดรเจนเท่ากับ $1,153.783 \pm 52.651$ ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ที่เวลา 144 ชั่วโมงของการบ่มเซลล์

4.3.6 การเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546

ในสภาวะที่เหมาะสมและสภาวะปกติ

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาบ่มในอาหารชนิดต่างๆ ดังนี้ (1) อาหาร TAP ปกติ (2) อาหาร TAP-K และ (3) อาหาร TAP-K ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Optimized TAP-K) ดังแสดงในตาราง 4.14 ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะต่างๆ พบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 20.044 ± 1.577 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ที่ชั่วโมง 48 เมื่อทำการบ่มเซลล์ในอาหาร optimized TAP-K ที่เติมกรดอะซิติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ มีพีเอชของอาหารเริ่มต้น 7.2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และมีออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (รูปที่ 4.16A) และเมื่อทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ทุกชั่วโมง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง พบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่เติมซิสเทอีน 0.1 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

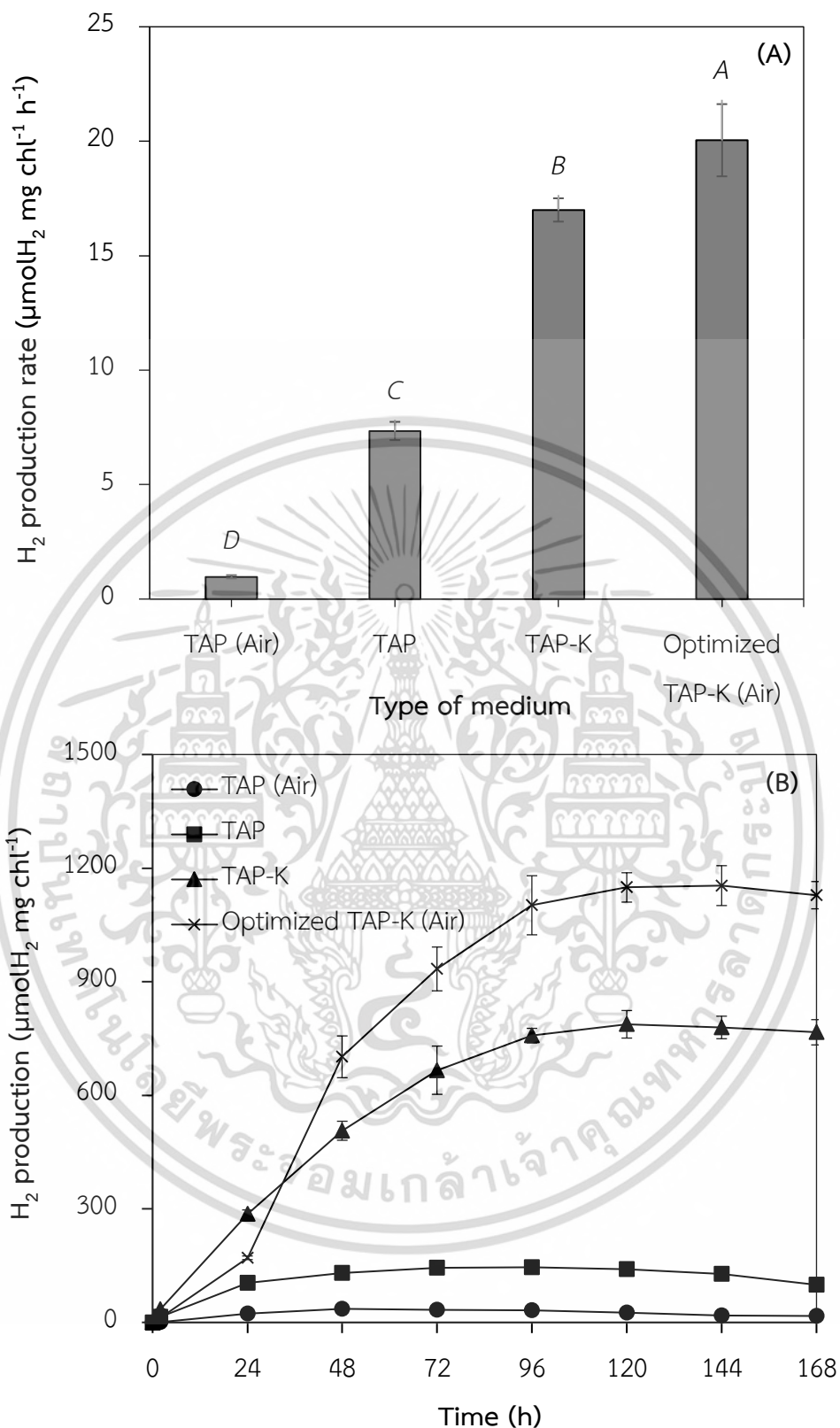
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ $1,153.783 \pm 52.651$ ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เมื่อบ่มเป็นเวลา 144 ชั่วโมง (รูปที่ 16B) โดยมากกว่าการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-K ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ ตามลำดับ ประมาณ 8.5 และ 1.5 เท่า (รูปที่ 4.16B)

ตารางที่ 4.14 การเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหาร TAP, TAP (Air), TAP-K และ Optimized TAP-K และสภาวะของการบ่มเซลล์

สภาวะ	ชนิดของอาหาร			
	TAP (Air)	TAP-K	TAP	Optimized TAP-K (Air)
- อายุเซลล์ (h)	36	36	36	36
- การขาดธาตุอาหาร	-	โพแทสเซียม	-	โพแทสเซียม
- ชนิดของแหล่งคาร์บอน	กรดอะซีติก	กรดอะซีติก	กรดอะซีติก	กรดอะซีติก
- ความเข้มข้นของชนิดของแหล่งคาร์บอน (mM)	17.4	17.4	17.4	17.4
- ความเข้มแสง ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	30	30	30	30
- อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	30	30	30	30
- พีเอชเริ่มต้นของอาหาร	7.2	7.2	7.2	7.2
- บรรยากาศบริเวณ headspace	อากาศ	อาร์กอน	อาร์กอน	อากาศ
- สารให้อิเล็กตรอน	-	-	-	ซิสเทอีน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (A) และปริมาณไฮโดรเจนสะสมทั้งหมด (B) ของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่ป้อนในอาหาร TAP, TAP (Air), TAP-K และ Optimized TAP-K ภายใต้สภาวะการบ่มเซลล์ที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่า ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ สาหร่ายที่บ่มในอาหารขาดธาตุโพแทสเซียมมีการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP ปกติ แสดงให้เห็นว่าการขาดธาตุโพแทสเซียมมีผลต่อการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 นอกจากนี้ การเติมสารให้อิเล็กตรอนคือซิสเทอีน จะส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ ถึงแม้ว่า การพ่นอาร์กอนทำให้เซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-K มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเทียบกับเซลล์ที่บ่มในอาหาร optimized TAP-K พบว่าเซลล์มีปริมาณไฮโดรเจนสะสมมากกว่าและยาวนานกว่า ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในระยะยาวนั่นเอง นอกจากนี้ การพ่นของอาร์กอนยังไม่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในระบบอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ เนื่องจากมีต้นทุนในการซื้อและต้องใช้ปริมาณการก๊าซอาร์กอนเป็นจำนวนมากสำหรับทำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจน การเติมซิสเทอีนในปริมาณเพียงเล็กน้อยมีความเหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน รวมทั้ง ซิสเทอีนยังเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งทำให้เซลล์มีการสร้างโปรตีนสำหรับการเจริญเติบโต (Hungate 1969)

จากการเปรียบเทียบอัตราการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณไฮโดรเจนสูงสุดจากสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 กับสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. สายพันธุ์อื่นๆ ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันพบว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูง เมื่อเทียบกับสาหร่าย *Scenedesmus* sp. สายพันธุ์อื่น (ตารางที่ 4.15) รายงานส่วนใหญ่ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน (จากการพ่นอาร์กอนเข้าสู่ระบบในระยะเริ่มต้นของการบ่มเซลล์) เพื่อทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่ถูกออกซิเจนขัดขวางการทำงานนั่นเอง นอกจากนี้ เซลล์สาหร่ายยังถูกบ่มในอาหารที่ทำการขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ คือ อาหารที่ขาดซิลเฟออร์ หรือ อาหารที่ขาดโพแทสเซียม เพื่อให้เซลล์สาหร่ายมีการทำงานของกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง ส่งผลต่อปริมาณของออกซิเจนลดต่ำลง ดังนั้น สาหร่ายจึงมีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (He *et al.*, 2012; Papazi *et al.*, 2014; Pongpadung *et al.*, 2015; Duangjan *et al.*, 2017; Warichanan and Phunpruch, 2019)

นอกจากนี้ รายงานวิจัยของ Warichanan and Phunpruch (2019) แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL-OVG1 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปราศจากออกซิเจน มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 2.093 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยฉบับนี้ เมื่อบ่มสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ในอาหาร TAP-K ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและไม่มีการพ่นอาร์กอนแต่มีการเติมซิสเทอีนความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 2.926 ± 0.230 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของซิสเทอีนในการลดปริมาณของออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากซิสเทอีนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การเติมซิสเทอีนจึงทำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจนได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ เซลล์สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้เพราะซิสเทอีนเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารสำหรับเซลล์ (Marquez-Reyes *et al.*, 2015) นอกจากการเติมสารให้อิเล็กตรอนคือซิสเทอีน จะส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Scenedesmus* sp. แล้ว การเติมสารโซเดียมไดไฮโอไนต์ยังส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* 393 อีกด้วย โดยให้ปริมาณไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ควบคุมประมาณ 2-5 เท่า (Rosenkrans 1983) แต่การเติมโซเดียมไดไฮโอไนต์ในอาหารของ *S. obliquus* TISTR 8546 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าตัวควบคุมประมาณ 1-1.5 เท่า เนื่องจาก สภาวะการบ่มสำหรับการผลิตไฮโดรเจนและสายพันธุ์ของสาหร่ายแตกต่างกัน นอกจากนี้ การเติมสาร 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) ซึ่งเป็นสารยับยั้งกิจกรรมของระบบแสงสองในสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* D3 ทำให้ปริมาณออกซิเจนในสาหร่ายมีปริมาณลดลง จึงมีการผลิตไฮโดรเจนจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงขึ้น แต่จากการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ คลอโรฟิลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่า มีการลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อทำการบ่มเซลล์นานขึ้น เพราะ DCMU เป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์ตายเร็ว (Papazi *et al.*, 2012) จึงไม่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตไฮโดรเจนในระยะยาว

ตารางที่ 4.15 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณไฮโดรเจนของสายพันธุ์เชื้อ *S. obliquus* TISTR 8546 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. สายพันธุ์อื่น ๆ ภายใต้สภาวะการบ่มที่ต่างกัน

สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	สภาวะการผลิตไฮโดรเจน	อัตราการผลิตไฮโดรเจน	ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน	เอกสารอ้างอิง
<i>Scenedesmus obliquus</i> TISTR 8546	TAP-K medium + 34.8 mM acetic acid, pH 7.2, 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30°C + 0.1 mM cysteine	20.044 $\mu\text{molH}_2 \text{ mg chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$, 26.372 $\mu\text{molH}_2 \text{ mg chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$, 2.926 mL L (culture) ⁻¹ h ⁻¹ , 35.76 mL mL (PCV) ⁻¹ h ⁻¹	1,153.783 $\mu\text{molH}_2 \text{ mg chl}^{-1}$, 1,480.941 $\mu\text{molH}_2 \text{ mg chl}^{-1}$, 230.548 mL L (culture) ⁻¹ , 114.50 mL mL (PCV) ⁻¹	This study
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Poultry Litter Effluent Medium (PLEM), 37.5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 25°C (+purged argon gas)	1.99 $\mu\text{molH}_2 \text{ mg chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$	ND	Unpaprom et al., 2017
<i>Scenedesmus obliquus</i> D3	Modified Bishop and Senger medium + 0.15 mM DCMU + 28 mM glucose, 50-60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 30°C	ND	12.3 mL mL (PCV) ⁻¹	Papazi et al., 2012
<i>Scenedesmus obliquus</i> D3	TAP-K medium + 5 g l ⁻¹ glucose, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 30°C	ND	9 mL mL (PCV) ⁻¹	Papazi et al., 2014
<i>Scenedesmus obliquus</i> D3	Cultivation cell for 16 h, 35 W m ² (+purged argon gas)	ND	2 $\mu\text{molH}_2 \text{ mL (PCV)}^{-1}$	Senger and Bishop, 1979
<i>Scenedesmus obliquus</i> IOAC039F	TAP-S medium, (induced dark) 35-50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 26°C (+purged argon gas)	0.05 mL L(culture) ⁻¹ h ⁻¹	3.72 mL L (culture) ⁻¹	He et al., 2012

หมายเหตุ ND: ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางที่ 4.15 (ต่อ) อัตราการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณไฮโดรเจนของสายพันธุ์ S. obliquus TISTR 8546 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ Scenedesmus sp. สายพันธุ์อื่นๆ ภายใต้สภาวะการบ่มที่ต่างกัน

สายพันธุ์สายพันธุ์สายพันธุ์	สภาวะการผลิตไฮโดรเจน	อัตราการผลิตไฮโดรเจน	ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน	เอกสารอ้างอิง
<i>Scenedesmus obliquus</i> 393	8.2 W m ² at 25°C + sodium dithionite (+purged argon gas)	ND	44 μmol H ₂ mg chl ⁻¹	Rosenkrans, 1983
<i>Scenedesmus obtusus</i>	Jaworski-S medium, 54 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ , 25°C (+purged argon gas)	0.38 μmol H ₂ mg chl a ⁻¹ h ⁻¹	ND	Duangian et al., 2017
AARL G020	TAP medium, 30 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ (+purged argon gas)	1.36 μmol H ₂ mg chl ⁻¹ h ⁻¹	ND	Rattana et al., 2010
<i>Scenedesmus</i> sp. KMITL-O1	TAP-K medium + 17.4 mM acetic acid, 30 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ , 30°C (+purged argon gas)	2.093 mL L(culture) ⁻¹ h ⁻¹	ND	Warichanan and Phunpruch, 2019
<i>Scenedesmus</i> sp. KMITL-OVG1	TAP-S medium, 35 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ (+purged argon gas)	ND	4.2 mL L (culture) ⁻¹	Pongpadung et al., 2015
<i>Scenedesmus</i> sp. WFY	Co-cultured with <i>Pseudomonas</i> sp. in TAP-S medium, 50 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ , 30°C	ND	11.1 mL L (culture) ⁻¹	Ban et al., 2018

หมายเหตุ ND: ไม่สามารถตรวจวัดได้

นอกจากการอาศัยปัจจัยทางเคมีคือการขาดธาตุอาหาร การเติมสารให้อิเล็กตรอน และการเติมสารยับยั้งกิจกรรมของระบบแสงสอง เพื่อแทนที่การพ่นอาร์กอนเข้าสู่ภาชนะ สำหรับการลดปริมาณของออกซิเจนลง พบว่ามีงานวิจัยที่อาศัยการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในการใช้ออกซิเจนเพื่อปรับให้เซลล์เข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจน โดยการเลี้ยงควบคู่กัน (Co-cultured) ซึ่งสำหรับ *Scenedesmus* sp. WFY เพาะเลี้ยงควบคู่กับ *Pseudomonas* sp. ทำให้ปริมาณของออกซิเจนลดลงเยอะ และมีปริมาณไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 11.1 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. WFY เพียงชนิดเดียว มีปริมาณไฮโดรเจนเท่ากับ 4 มิลลิลิตรต่อลิตร แต่ยังไม่สามารถในการผลิตไฮโดรเจนเท่า *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงเพียงชนิดเดียว ที่มีปริมาณไฮโดรเจนเท่ากับ 230.548 ± 10.521 มิลลิลิตรต่อลิตร นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ Co-cultured ในระยะท้ายๆของการบ่ม มีโอกาสที่เซลล์จะแย่งสารอาหารและมีการสะสมของสารพิษมากขึ้น (Ban *et al.*, 2018) จากการทดลองทั้งหมด สรุปได้ว่าสำหรับ *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร Optimized TAP-K ที่มีพีเอชเริ่มต้นอาหาร 7.2 เติมกรดอะซีติกที่มีความเข้มข้น 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร เติมซิสเทอีนที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร ภายใต้สภาวะบ่มแสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีออกซิเจนในบรรยากาศเริ่มต้นของการบ่มเซลล์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนที่สุด

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการนำสาหร่ายสีเขียวจำนวน 24 สายพันธุ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการมาคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนระดับต่างๆ จากนั้น นำสาหร่ายที่คัดเลือกมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติ สรุปผลการทดลองได้ดังนี้

5.1.1 การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนต่างๆ

1) ในบรรดาสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 24 สายพันธุ์ สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125, *Chlorella* sp. 2SinS4, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 และ *Tetraspora* sp. CU2551 มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อป้อนเซลล์สาหร่ายภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 0, 10, 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยสาหร่ายสีเขียวทั้ง 5 สายพันธุ์ผลิตไฮโดรเจนลดลง เมื่อป้อนเซลล์ภายใต้ความเข้มข้นของออกซิเจนที่เพิ่มขึ้น

2) ในสาหร่ายสีเขียว 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือก สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 และ *C. reinhardtii* CC-125 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงและมีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า O_2 เทียบเท่ากับ 15.93 ± 0.24 และ 15.09 ± 0.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ สาหร่าย 2 สายพันธุ์นี้มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนใกล้เคียงกับความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศ

5.1.2 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และ *S. obliquus* TISTR 8546

1) สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 และ *C. reinhardtii* CC-125 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในอาหาร TAP โดยสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 มีการเจริญเติบโตจากการวัดความหนาแน่นเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ปริมาณคลอโรฟิลล์และจำนวนเซลล์ สูงกว่าสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 นอกจากนี้ สาหร่าย *C. reinhardtii*

CC-125 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.052 ± 0.002 ต่อชั่วโมง ในขณะที่สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.044 ± 0.001 ต่อชั่วโมง

2) อายุเซลล์มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และ *S. obliquus* TISTR 8546 สาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า *C. reinhardtii* CC-125 และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.978 ± 0.038 และ 0.716 ± 0.022 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

3) ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และ *S. obliquus* TISTR 8546 โดยสาหร่ายที่มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นจากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

4) การขาดธาตุอาหารมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และ *S. obliquus* TISTR 8546 โดยการขาดซัลเฟอร์ในอาหารส่งเสริมอัตราการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ส่วนการขาดโพแทสเซียมในอาหารส่งเสริมอัตราการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP ที่ขาดธาตุอาหารจะเหนี่ยวนำให้มีการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ปกติ ประมาณ 3-4 เท่า

5) จากการศึกษาการขาดธาตุอาหารร่วมกันต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 และ *S. obliquus* TISTR 8546 สรุปว่า สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจนร่วมกับซัลเฟอร์ สามารถส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด ซึ่งมีปริมาณไฮโดรเจนเท่ากับ 480.722 ± 15.970 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในขณะที่การขาดธาตุโพแทสเซียมร่วมกับการขาดธาตุอาหารอื่น ไม่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 โดย *S. obliquus* TISTR 8546 มีปริมาณไฮโดรเจนสูงสุด ซึ่งเท่ากับ 799.650 ± 15.061 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เมื่อบ่มในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมอย่างเดียว

6) การขาดโพแทสเซียมมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 โดยทำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจนอย่างรวดเร็ว โดยจะไปลดอัตราการสังเคราะห์แสงและเพิ่มอัตราการหายใจ นอกจากนี้ การขาดโพแทสเซียมยังสามารถเร่งกระบวนการสลายแป้งภายในเซลล์ ส่งผลให้มีปริมาณของอิเล็กตรอนจากการสลายแป้งปริมาณมาก กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงสูงขึ้น

5.1.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ

1) จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ สรุปว่า สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 8.316 ± 0.268 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 802.871 ± 20.163 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในชั่วโมงที่ 96 เมื่อปมเซลล์ในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมและมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกสุดท้ายเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์ และปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2 โดยปมเซลล์ภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่มีความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2) จากการศึกษาการเติมสารให้อิเล็กตรอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศปกติ สรุปว่า กรดแอสคอร์บิก ซิสเทอีน โซเดียมไดไฮโอไนต์ และกรดออกซาลิก สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น โดยสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด 20.044 ± 1.577 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ $1,153.783 \pm 52.651$ ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในชั่วโมงที่ 144 ชั่วโมง เมื่อปมเซลล์ในอาหาร TAP-K ที่เติมซิสเทอีนความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการขาดโพแทสเซียมมีผลต่อการสังเคราะห์แสง การหายใจ และการสลายแป้งของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 อย่างไรก็ตาม โพแทสเซียมเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต การขาดโพแทสเซียมจึงทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลง ดังนั้น จึงควรศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพแทสเซียมในอาหารต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจน โดยไม่จำเป็นต้องขาดแหล่งโพแทสเซียม นอกจากนี้ ควรศึกษาโครงสร้างและการแสดงออกของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสายพันธุ์นี้ นอกจากนี้ ควรขยายขนาดการเพาะเลี้ยงใหญ่ขึ้นเพราะไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการซื้อก๊าซเฉื่อยเพื่อปรับให้เซลล์อยู่ในสภาวะปราศจากออกซิเจนตลอดเวลา และสามารถผลิตไฮโดรเจนในระยะยาว

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2557. **สารานุกรมพลังงานทดแทน**. กรุงเทพมหานคร. ประเทศไทย
- ชลาลัย ศรทอง, ทักษพร ปิยะ และ ภัคศรีณีย์ ยุทธพงษ์ 2556 “การคัดเลือกจุลสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงซึ่งแยกจากน้ำตกในจังหวัดนครนายก” โครงการพิเศษ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. **ปฏิริยาออกซิเดชันรีดักชัน**. [Online]. Available : <http://www.foodnetworksolution.com>.
- รัตนลักษณ์ หิรัญวิริยะ, อมรรัตน์ พ่วงพลับ และ อัจจิตา ใจธรรม 2556 “การผลิตไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จาก แหล่งดินและแหล่งน้ำของนาข้าวในประเทศไทย” โครงการพิเศษ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน. 2560. **การใช้พลังงานของประเทศไทย**. [Online]. Available : <http://www.eppo.go.th/index.php/th>.
- Abendroth, G., Stripp, S., Silakov, A., Croux, C., Soucaille, P., Girbal, L. and Happe, T. 2008. “Optimized over-expression of [FeFe] hydrogenases with high specific activity in *Clostridium acetobutylicum*.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 33(21) : 6076-6081.
- Adams, M. W. and Mortenson, L.E. 1984. “The physical and catalytic properties of hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. A comparison with hydrogenase I. *Journal of Biological Chemistry*. 259(11) : 7045-7055.
- Ali, L. and Basit, M.A. 1993. “Significance of hydrogen content in fuel combustion.” *International Association for Hydrogen Energy*. 18(12) : 1009-1111.
- Bacova, R., Klejdus, B., Ryant, P., Cernei, N., Adam, V. and Huska, D. 2019. “The effects of 5-azacytidine and cadmium on global 5-methylcytosine content and secondary metabolites in the freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus quadricauda*.” *Journal of Phycology*. 55(2) : 329-342.
- Bak, T., Nowotny, J., Rekas, M., and Sorrell, C.C., 2002. “Photo-electrochemical hydrogen generation from water using solar energy. Materials-related aspects.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 27(10) : 991-1022.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ban, S., Lin, W., Wu, F. and Luo, J. 2018. "Algal-bacterial cooperation improves algal photolysis-mediated hydrogen production." *Bioresource Technology*. 251 : 350-357.
- Basak, N., Das, D. 2007. "The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(1) : 31-42.
- Batyrova, K.A., Tsygankov, A.A. and Kosourov, S.N. 2012. "Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37(10) : 8834-8839.
- Bennoun, P., Masson, A. and Delosme, M. 1980. "A method for complementation analysis of nuclear and chloroplast mutants of photosynthesis in *Chlamydomonas*." *Genetics*. 95(1) : 39-47.
- Bennoun, P., Spierer-Herz, M., Erickson, J., Girard-Bascou, J., Pierre, Y., Delosme, M. and Rochaix, J.D. 1986. "Characterization of photosystem II mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the psbA gene." *Plant Molecular Biology*. 6(3) : 151-160.
- Bingham, A.S., Smith, P.R. and Swartz, J.R. 2012. "Evolution of an [FeFe]-hydrogenase with decreased oxygen sensitivity." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37(3) : 2965-2976.
- Chader, S., Hacene, H. and Agathos, S. N. 2009. "Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara." *International Journal of Hydrogen Energy*. 34(11) : 4941-4946.
- Chaplin Martin. 2017. **Electrolysis of water**. [Online]. Available : <http://www.lsbu.ac.uk/water/electrolysis.html>.
- Chen, J.S. and Mortenson, L.E. 1974. "Purification and properties of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5." *Biochimica et Biophysica Acta*. 371(2) : 283-298.
- Chittibabu, G., Nath, K. and Das, D. 2006. "Feasibility studies on the fermentative hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* BL-21 G." *Process Biochemistry*. 41(3) : 682-688.
- Chlamydomonas* Resource Center. 2017. ***Chlamydomonas* sp.** [Online]. Available : <http://www.chlamycollection.org>.
- Chylla, R.A. and Whitmarsh, J. 1989. "Inactive photosystem II complexes in leaves. Turnover rate and quantitation." *Plant Physiology*. 90(2) : 765-772.

- Cracknell, J.A., Vincent, K.A., Ludwig, M., Lenz, O., Friedrich, B. and Armstrong, F.A. 2008. "Enzymatic oxidation of H₂ in atmospheric O₂: The electrochemistry of energy generation from trace H₂ by aerobic microorganisms." *Journal of the American Chemical Society*. 130(2) : 424-425.
- Davey, M. W., Montagu, M. V., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Smirnoff, N., Benzie, I.J., Strain, J.J., Favell, D and Fletcher, J. 2000. "Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing." *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7) : 825-860.
- Degrenne, B., Pruvost, J. and Legrand, J. 2011. "Effect of prolonged hypoxia in autotrophic conditions in the hydrogen production by the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* in photobioreactor." *Bioresource Technology*. 102(2) : 1035-1043.
- Deng, X., Fei, X. and Li, Y. 2011. "The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*." *African Journal of Microbiology Research*. 5(3) : 260-270.
- Duangjan, K., Nakkhunthod, W., Pekkoh, J. and Pumas, C. 2017. "Comparison of hydrogen production in microalgae under autotrophic and mixotrophic media." *Botanica Lithuanica*. 23(2) : 169-177.
- Evans, H.J. and Sorger, G.J. 1966. "Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations." *Annual Review of Plant Physiology*. 17(1) : 47-76.
- Fan, X., Wang, H., Guo, R., Yang, D., Zhang, Y., Yuan, X., Qiu, Y., Yang, Z. and Zhao, X. 2016. "Comparative study of the oxygen tolerance of *Chlorella pyrenoidosa* and *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 in photobiological hydrogen production." *Algal Research*. 16 : 240-244.
- Florin, L., Tsokoglou, A., & Happe, T. 2001. "A novel type of Iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain." *Journal of Biological Chemistry*. 276(9) : 6125-6132.
- Fouchard, S., Hemschemeier, A., Caruana, A., Pruvost, J., Legrand, J., Happe, T., Peltier, G. and Cournac, L. 2005. "Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells." *Applied and Environmental Microbiology*. 71(10) : 6199-6205.
- Gaffron, H. 1939. "Reduction of carbon dioxide with molecular hydrogen in green algae." *Nature*. 143(3614) : 204-205.

- Gaffron, H. and Rubin, J. 1942. "Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae." *The Journal of General Physiology*. 26(2) : 219–240.
- Gfeller, R.P. and Gibbs, M. 1984 "Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Analysis of fermentative products from starch in dark and light." *Plant physiology*. 75(1) : 212-218.
- Goldet, G., Brandmayr, C., Stripp, S.T., Happe, T., Cavazza, C., Fontecilla-Camps, J.C. and Armstrong, F.A. 2009. "Electrochemical kinetic investigations of the reactions of [FeFe]-hydrogenases with carbon monoxide and oxygen: comparing the importance of gas tunnels and active-site electronic/redox effects." *Journal of the American Chemical Society*. 131(41) : 14979-14989.
- Greenbaum, E., Guillard, R.R. L. and Sunda, W.G. 1983. "Hydrogen and oxygen photoproduction by marine algae." *Photochemistry and Photobiology*. 37(6) : 649-655.
- Grossman, A. and Takahashi, H. 2001. "Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions." *Annual Review of Plant Biology*. 52(1) : 163-210.
- Guan, Y., Deng, M., Yu, X. and Zhang, W. 2004. "Two-stage photo-biological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis*." *Biochemical Engineering Journal*. 19(1) : 69-73.
- Hallenbeck, P.C. and Benemann, J.R. 2002. "Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes." *International Journal of Hydrogen Energy*. 27(11-12) : 1185-1193.
- Hankamer, B., Lehr, F., Rupprecht, J., Mussgnug, J. H., Posten, C. and Kruse, O. 2007. "Photosynthetic biomass and H₂ production by green algae: from bioengineering to bioreactor scale-up." *Physiologia Plantarum*. 131(1) : 10-21.
- Hartman, H. and Krasna, A.I. 1963. "Studies on the "adaptation" of hydrogenase in *Scenedesmus*." *Journal of Biological Chemistry*. 238(2) : 749-757.
- Happe, T. and Naber, J.D. 1993. "Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *European Journal of Biochemistry*. 214(2) : 475-481.
- Harris, E.H. 1989. **The *Chlamydomonas* Sourcebook. A comprehensive guide to biology and laboratory use.** San Diego : Academic Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Harris, E.H. 2001. “*Chlamydomonas* as a model organism.” *Annual Review of Plant Biology*. 52(1) : 363-406.
- Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L. and Hussy, I. 2002. “Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 27(11-12) : 1339-1347.
- He, M., Li, L. and Liu, J. 2012. “Isolation of wild microalgae from natural water bodies for high hydrogen producing strains.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 37(5) : 4046-4056.
- He, M., Li, L., Liu, J. and Zhang, L. 2015. “Improvement of H₂ photoproduction in *Chlorella pyrenoidosa* in artificial and natural seawater by addition of acetic acid and control of nutrients.” *Algal Research*. 10 : 104-109.
- Hemschemeier, A. and Happe, T. 2005. “The exceptional photofermentative hydrogen metabolism of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.” *Biochemical Society Transactions*. 33(1) : 39-41.
- Hemschemeier, A., Melis, A. and Happe, T. 2009. “Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae.” *Photosynthesis Research*. 102(2) : 523-540.
- Heifetz, P.B., Forster, B., Osmond, C.B., Giles, L. J. and Boynton, J.E. 2000. “Effects of acetate on facultative autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* assessed by photosynthetic measurements and stable isotope analyses.” *Plant Physiology*. 122(4) : 1439-1446.
- Herzig, R. and Falkowski, P.G. 1989. “Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (haptophyceae). I. Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies.” *Journal of Phycology*. 25(3) : 462-471.
- Hu, C., Luo, Q. and Huang, Q. 2014. “Ecotoxicological effects of perfluorooctanoic acid on freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus*.” *Environmental Toxicology and Chemistry*. 33(5) : 1129-1134.
- Hungate, R.E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris J.R., Robins D.W. (Ed.), **Methods in microbiology**. (pp 117-32). New York, USA : Academic Press.
- Hwang, J.H., Kim, H.C., Choi, J.A., Abou-Shanab, R.A. I., Dempsey, B.A., Regan, J.M., Kim, J.R., Song, H., Nam, I.H., Kim, S.N., Lee, W.J., Park, D.H., Kim, Y.J., Choi, J.Y., Ji, M.K., Jung, W.S. and Jeon, B.H. 2014. “Photoautotrophic hydrogen production

- by eukaryotic microalgae under aerobic conditions.” *Nature Communications*, 5(1) : 1-6.
- Hyams, J. and Davies, D.R. 1972. “The induction and characterisation of cell wall mutants of *Chlamydomonas reinhardi*.” *Mutation Research*. 14(4) : 381-389.
- Ikemoto, H. and Mitsui, A. 1984. “Continuous hydrogen photoproduction from sulfide by an Immobilized marine photosynthetic bacterium, *Chromatium* sp. Miami PBS 1071.” *Advances in Photosynthesis Research*. 2 : 789-792.
- Jeffrey, S.T., and Humphrey, G.F. 1975. “New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton.” *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 167(2): 191-194.
- Johnson, X. and Alric, J. 2012. “Interaction between starch breakdown, acetate assimilation, and photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*.” *Journal of Biological Chemistry*. 287(31) : 26445-26452.
- Juneja, A., Ceballos, R.M. and Murthy, G.S. 2013. “Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review.” *Energies*. 6(9) : 4607-4638.
- Jurado-Oller, J.L., Dubini, A., Galván, A., Fernández, E. and González-Ballester, D. 2015. “Low oxygen levels contribute to improve photohydrogen production in mixotrophic non-stressed *Chlamydomonas* cultures.” *Biotechnology for Biofuels*. 8(1) : 1-14.
- Khamheang, Y., Maneerattanarungroj, C., and Phunpruch, S. 2017. “Growth and hydrogen production by wild type and mutant strains of unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.” In 55. **Kasetsart University Annual Conference**. Bangkok : Kasetsart University.
- Kim, J.P., Kang, C.D., Sim, S.J., Kim, M.S., Park, T.H., Lee, D.H., Kim, D.J., Kim, J.H., Lee, Y.K. and PAK, D.W. 2005. “Cell age optimization for hydrogen production induced by sulfur deprivation using a green alga *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90.” *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15(1) : 131-135.
- Kim, J.P., Kang, C.D., Park, T.H., Kim, M.S. and Sim, S.J. 2006. “Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 31(11) : 1585-1590.

- Kojima, E. and Lin, B. 2004. "Effect of partial shading on photoproduction of hydrogen by *Chlorella*." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 97(5) : 317-321.
- Kosourov, S., Tsygankov, A., Seibert, M. and Ghirardi, M.L. 2002. "Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of culture parameters." *Biotechnology and Bioengineering*. 78(7) : 731-740.
- Kosourov, S., Seibert, M. and Ghirardi, M.L. 2003. "Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures." *Plant and Cell Physiology*. 44(2) : 146-155.
- Kruse, O., Rupprecht, J., Bader, K.P., Thomas-Hall, S., Schenk, P.M., Finazzi, G. and Hankamer, B. 2005. "Improved photobiological H₂ production in engineered green algal cells." *Journal of Biological Chemistry*. 280(40) : 34170-34177.
- Lakatos, G., Balogh, D., Farkas, A., Ördög, V., Nagy, P.T., Biró, T. and Maróti, G. 2017. "Factors influencing algal photobiohydrogen production in algal-bacterial co-cultures." *Algal Research*. 28 : 161-171.
- Laurinavichene, T., Tolstygina, I. and Tsygankov, A. 2004. "The effect of light intensity on hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*." *Journal of Biotechnology*. 114(1-2) : 143-151.
- Lee, K.Y., and Shen, H. 2004. Basic culturing techniques. In: Richmond, A. (Ed.), **Handbook of microalgal culture**. (pp 40-56). Oxford, UK : Blackwell Science.
- Liu, J.Z., Ge, Y.M., Xia, S.Y., Sun, J.Y. and Mu, J. 2016. "Photoautotrophic hydrogen production by *Chlorella pyrenoidosa* without sulfur-deprivation." *International Journal of Hydrogen Energy*. 41(20) : 8427-8432.
- Juneja, A., Ceballos, R.M. and Murthy, G.S. 2013. "Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review." *Energies*. 6(9) : 4607-4638.
- Jurado-Oller, J.L., Dubini, A., Galván, A., Fernández, E. and González-Ballester, D. 2015. "Low oxygen levels contribute to improve photohydrogen production in mixotrophic non-stressed *Chlamydomonas* cultures." *Biotechnology for Biofuels*. 8(1) : 1-14.
- Ma, W., Chen, M., Wang, L., Wei, L. and Wang, Q. 2011. "Treatment with NaHSO₃ greatly enhances photobiological H₂ production in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *Bioresource Technology*. 102(18) : 8635-8638.

- Maness, P.C., Yu, J., Eckert, C. and Ghirardi, M.L. 2009. "Photobiological hydrogen production - prospects and challenges." *Microbe*. 4 : 275-280.
- Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. 2010. "A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient." *International Journal of Hydrogen Energy*. 35(24) : 13193-13199.
- Maneeruttanarungroj, C. and Phunpruch, S. 2017. "Effect of pH on biohydrogen production in green alga *Tetraspora* sp. CU2551." *Energy Procedia*. 138 : 1085-1092.
- Márquez-Reyes, L.A., del Pilar Sánchez-Saavedra, M. and Valdez-Vazquez, I. 2015. "Improvement of hydrogen production by reduction of the photosynthetic oxygen in microalgae cultures of *Chlamydomonas gloeopara* and *Scenedesmus obliquus*." *International Journal of Hydrogen Energy*. 40(23) : 7291-7300.
- Maswana, T., Phunpruch, S., Lindblad, P. and Maneeruttanarungroj, C. 2018. "Enhanced hydrogen production by optimization of immobilized cells of the green alga *Tetraspora* sp. CU2551 grown under anaerobic condition." *Biomass and Bioenergy*. 111 : 88-95.
- Maswana, T., Lindblad, P. and Maneeruttanarungroj, C. 2020. "Improved biohydrogen production by immobilized cells of the green alga *Tetraspora* sp. CU2551 incubated under aerobic condition." *Journal of Applied Phycology*. 32(5) : 2937-2945.
- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M.L. and Seibert, M. 2000. "Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant Physiology*. 122(1) : 127-136.
- Melis, A. and Happe, T. 2001, "Hydrogen production. Green algae as a source of energy" *Plant Physiology*. 127(3) : 740-748.
- Melis, A., and Happe, T. 2004. "Trails of green alga hydrogen research—from Hans Gaffron to new frontiers." *Photosynthesis Research*. 80(1) : 401-409.
- Mer, V.K.L. and Rideal, E.K. 1924. "The influence of hydrogen concentration on the auto-oxidation of hydroquinone. A note on the stability of the quinhydrone electrode." *Journal of the American Chemical Society*. 46(1) : 223-231.
- Miller, G.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." *Analytical Chemistry*. 31(3) : 426-428.

- Minagawa, J., Crofts, A.R. 1994. "A robust protocol for site-directed mutagenesis of the D1 protein in *Chlamydomonas reinhardtii*: A PCR-spliced psbA gene in a plasmid conferring spectinomycin resistance was introduced into *apsbA* deletion strain." *Photosynthesis Research*. 42(2) : 121-131.
- Miura, Y., Yagi, K., Shoga, M. and Miyamoto, K.. 1982. "Hydrogen-production by a green-alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, in an alternating light dark cycle." *Biotechnology and Bioengineering*. 24(7) : 1555-1563.
- Miyake, J., and Kawamura, S., 1987. "Efficiency of light energy conversion to hydrogen by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*." *International Journal of Hydrogen Energy*. 12(3) : 147-149.
- Morra, S., Maurelli, S., Chiesa, M., Mulder, D.W., Ratzloff, M.W., Giamello, E., King, P.W., Gilardi, G. and Valetti, F. 2016. "The effect of a C298D mutation in CaHydA [FeFe]-hydrogenase: Insights into the protein-metal cluster interaction by EPR and FTIR spectroscopic investigation." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1857(1) : 98-106
- Mus, F., Cournac, L., Cardellini, V., Caruana, A., and Peltier, G., 2005. "Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H₂ photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1708(3) : 322-332.
- Noone, S., Ratcliff, K., Davis, R., Subramanian, V., Meuser, J., Posewitz, M.C., King, P.W. and Andhirardi, M.L. 2017. "Expression of a clostridial [FeFe]-hydrogenase in *Chlamydomonas reinhardtii* prolongs photo-production of hydrogen from water splitting." *Algal Research*. 22 : 116-121.
- Oncel, S. and Sukan, F.V. 2011. "Effect of light intensity and the light: dark cycles on the long term hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by batch cultures." *Biomass and Bioenergy*. 35(3) : 1066-1074.
- Papazi, A., Andronis, E., Ioannidis, N. E., Chaniotakis, N. and Kotzabasis, K. 2012. "High yields of hydrogen production induced by meta-substituted dichlorophenols biodegradation from the green alga *Scenedesmus obliquus*." *PLoS One*. 7(11) : e49037.
- Papazi, A., Gjindali, A. I., Kastanaki, E., Assimakopoulos, K., Stamatakis, K., and Kotzabasis, K. 2014. "Potassium deficiency, a "smart" cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus*." *International Journal of Hydrogen Energy*. 39(34) : 19452-19464.

- Pacala, S., Socolow, R. 2004. "Stabilization wedges: solving the climate problem for the next 50 Years with current technologies." *Science*. 305(5686) : 968-972.
- Paramesh, K. and Chandrasekhar, T. 2020. "Improvement of photobiological hydrogen production in *Chlorococcum minutum* using various oxygen scavengers." *International Journal of Hydrogen Energy*. 45(13) : 7641-7646.
- Peltier, G. and Schmidt, G.W. 1991. "Chlororespiration: an adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88(11) : 4791-4795.
- Philipps, G., Happe, T. and Hemschemeier, A. 2012. "Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Planta*. 235(4) : 729-745.
- Pongpadung, P., Liu, J., Yokthongwattana, K., Techapinyawat, S. and Juntawong, N. 2015. "Screening for hydrogen-producing strains of green microalgae in phosphorus or sulphur deprived medium under nitrogen limitation." *Science Asia*. 41 : 97-107.
- Pröschold, T., Harris, E.H. and Coleman, A.W. 2005. "Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*." *Genetics*. 170(4) : 1601-1610.
- Rashid, N., Lee, K., Han, J. I. and Gross, M. 2013. "Hydrogen production by immobilized *Chlorella vulgaris*: optimizing pH, carbon source and light." *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 36(7) : 867-872.
- Rattana, S., Junyapoon, S., Incharoensakdi, A. and Phunpruch, S. 2010. "Hydrogen production by the green alga *Scenedesmus* sp. KMITL-01 under heterotrophic conditions." 4-6. (pp 144). **Proceedings of the 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology**. Chonburi : Thailand.
- Roach, T. and Krieger-Liszkay, A. 2014. "Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition." *Current Protein and Peptide Science*. 15(4) : 351-362.
- Roessler, P.G., and Lien, S. 1984. "Activation and de novo synthesis of hydrogenase in *Chlamydomonas*." *Plant physiology*. 76(4) : 1086-1089.
- Rosenkrans, A.M., Rosen, M.M. and Krasna, A.I. 1983. "Effect of oxygen removal on hydrogen photoproduction in algae." *Biotechnology and bioengineering*. 25(7) : 1897-1904.

- Rotatore, C. and Colman, B. 1991. "The acquisition and accumulation of inorganic carbon by the unicellular green alga *Chlorella ellipsoidea*." *Plant, Cell and Environment*. 14(4) : 377-382.
- Saxena, R.C., Seal, D., Kumar, S. and Goyal, H.B. 2008. "Thermo-chemical routes for hydrogen rich gas from biomass: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 12(7) : 1909-1927.
- Saxena R.C., Adhikari, D.K. and Goya, H.B. 2009. "Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 13(1) : 167-178.
- Schnackenberg, J., Schulz, R. and Senger, H. 1993. "Characterization and purification of hydrogenase from the eukaryotic green glga *Scenedesmus obliquus*." *Federation of European Biochemrcal Societres*. 327(1) : 21-24.
- Scoma, A., Bertin, L., Pintucci, C., Raddi, S. and Fava, F. 2012. "Inhibition of photosystem 2 in starch-enriched *Chlamydomonas reinhardtii* cells prevents the efficient induction of H₂ production in sulfur-depleted cultures." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37(14) : 10604-10610.
- Scranton, M.A., Ostrand, J.T., Fields, F. J. and Mayfield, S.P. 2015. "*Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production." *The Plant Journal*. 82(3) : 523-531.
- Senger, H. and Bishop, N.I. 1979. "Observations on the photohydrogen producing activity during the synchronous cell cycle of *Scenedesmus obliquus*." *Planta*. 145(1) : 53-62.
- Sforza, E., Gris, B., de Farias Silva, C., Morosinotto, T. and Bertuccio, A. 2014. "Effects of light on cultivation of *Scenedesmus obliquus* in batch and continuous flat plate photobioreactor." *Chemical Engineering Transactions*. 38.
- Shastik, E., Li, L. and Liu, J. 2019. "New methods for hydrogen production by marine microalga *Chlorella pyrenoidosa* in natural seawater." *International Journal of Hydrogen Energy*. 44(29) : 14707-14714.
- Shastik, E., Li, L., Zhang, L., Qin, R., Yu, W. and Liu, J. 2020. "Some molecular aspects of hydrogen production by marine *Chlorella pyrenoidosa* under nitrogen deprivation condition in natural seawater." *International Journal of Hydrogen Energy*. 45(27) : 13876-13883.

- Sorigué, D., Légeret, B., Cuiné, S., Blangy, S., Moulin, S., Billon, E., Richaud, P., Brugière, S., Couté, Y., Nurizzo, D., Müller, P., Brettel, K., Pignol, D., Arnoux, P., Li-Beisson, Y., Peltier, G., and Beisson, F. (2017). “An algal photoenzyme converts fatty acids to hydrocarbons.” *Science*, 357(6354) : 903-907.
- Sorokin, C. and Krauss, R. W. 1958. “The Effects of light intensity on the growth rates of green algae.” *Plant physiology*. 33(2) : 109.
- Saka, C., Kaya, M. and Bekiroğullari, M. 2020. “*Chlorella vulgaris* microalgae strain modified with zinc chloride as a new support material for hydrogen production from NaBH₄ methanolysis using CuB, NiB, and FeB metal catalysts.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 45(3) : 1959-1968.
- Stiebritz, M.T. and Reiher, M. 2012. “Hydrogenases and oxygen.” *Chemical Science*. 3(6) : 1739-1751.
- Taikhao, S., Junyapoon, S., Incharoensakdi, A. and Phunpruch, S. 2013. “Factors affecting biohydrogen production by unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*.” *Journal of Applied Physiology*. 25(2) : 575-585.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R. and Lindblad, P. 2002. “Hydrogenases and hydrogen metabolism of Cyanobacteria.” *Microbiology Molecular Biology Review*. 66(1) : 1-20.
- Tinpranee N, Incharoensakdi A, Phunpruch S. 2016. “Hydrogen production by unicellular green algae *Chlorella* sp. LSD-W2 isolated from seawater in Thailand.” *KKU Reserach Journal*. 22(1) : 256-266.
- Tsygankov, A.A., Kosourov, S.N., Tolstygina, I.V., Ghirardi, M.L. and Seibert, M. 2006. “Hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 31(11) : 1574-1584.
- Unpaprom, Y., Ramaraj, R. and Whangchai, K. 2017. “A newly isolated green alga, *Scenedesmus acuminatus*, from Thailand with efficient hydrogen production.” *Chiangmai journal of science*. 44 : 1270-1278.
- Vignais, P.M. and Billoud, B., 2007. “Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases. An overview” *Chemical Reviews*. 107(10) : 4206–4272.
- Voigt, J. and Münzner, P. 1987. “The *Chlamydomonas* cell cycle is regulated by a light/dark-responsive cell-cycle switch.” *Planta*. 172(4) : 463-472.

- Vigeolas, H., Duby, F., Kaymak, E., Niessen, G., Motte, P., Franck, F. and Remacle, C. 2012. "Isolation and partial characterization of mutants with elevated lipid content in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus*." *Journal of Biotechnology*. 162(1) : 3-12.
- Vincent, K.A., Parkin, A. and Armstrong, F.A. 2007. "Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases." *Chemical Reviews*. 107(10) : 4366-4413.
- Volgusheva, A., Kukarskikh, G., Krendeleva, T., Rubin, A. and Mamedov, F. 2015. "Hydrogen photoproduction in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* under magnesium deprivation." *The Royal Society of Chemistry*. 5(8) : 5633-5637.
- Wang, L., Chen, M., Wei, L., Gao, F., Lv, Z., Wang, Q. and Ma, W. 2010. "Treatment with moderate concentrations of NaHSO₃ enhances photobiological H₂ production in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120." *International Journal of Hydrogen Energy*. 35(23) : 12777-12783.
- Wang, Y., Yang, H., Zhang, X., Han, F., Tu, W., & Yang, W. 2020. "Microalgal hydrogen production." *Small Methods*. 4(3) : 1900514.
- Warichanan, K. and Phunpruch, S. 2019. "Effect of cell density and nutrient deprivation on hydrogen production by unicellular green alga *Scenedesmus* sp. KMITL-OVG1." *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*. 24(2).
- Wei, A., Xin, X., Wang, Y., Zhang, C. and Cao, D. 2013. "Signal regulation involved in sulfur dioxide-induced guard cell apoptosis in *Hemerocallis fulva*." *Ecotoxicology and environmental safety*. 98 : 41-45.
- Wharton, D. C. and Tzagoloff, A. 1967. "Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria." In **Methods in enzymology** (pp. 245-250). Academic Press.
- Wilt, J.C. and Collier, S.J. 2001. "Hydrogen." *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. 1-18.
- Winkler, M., Hemschemeiera, A., Gotorb, C. and Melisc, A. Happe, T. 2002. "[Fe]-hydrogenases in green algae: photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation." *International Journal of Hydrogen Energy*. 27(11-12) : 1431-1439.
- Wollman, F.A., Olive, J., Bennoun, P. and Recouvreur, M. 1980. "Organization of the photosystem II centers and their associated antennae in the thylakoid membranes: a comparative ultrastructural, biochemical, and biophysical study

- of *Chlamydomonas* wild type and mutants lacking in photosystem II reaction centers.” *The Journal of Cell Biology*. 87(3) : 728-735.
- Wykoff, D.D., Davies, J.P., Melis, A. and Grossman, A.R. 1998. “The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*.” *Plant Physiology*. 117(1) : 129-139.
- Xiong, J.Q., Kurade, M.B., Abou-Shanab, R.A., Ji, M.K., Choi, J., Kim, J.O. and Jeon, B.H. 2016. “Biodegradation of carbamazepine using freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* and the determination of its metabolic fate.” *Bioresource Technology*. 205 : 183-190.
- Yamada, Y., Nomura, A., Tadokoro, H. and Fukuzumi, S. 2015. “A composite photocatalyst of an organic electron donor-acceptor dyad and a Pt catalyst supported on semiconductor nanosheets for efficient hydrogen evolution from oxalic acid.” *Catalysis science and technology*. 5(1) : 428-437.
- Yang, Y. and Gao, K. 2003. “Effects of CO₂ concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta).” *Journal of Applied Phycology*. 15(5) : 379-389.
- Yoshida, A., Nishimura, T., Kawaguchi, H., Inui, M. and Yukawa, H. 2005. “Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing *Escherichia coli* strains.” *Applied and environmental microbiology*. 71(11) : 6762-6768.
- Zhu, S., Wang, Y., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J. and Yuan, Z. 2014. “Enhanced accumulation of carbohydrate and starch in *Chlorella zofingiensis* induced by nitrogen starvation.” *Applied biochemistry and biotechnology*. 174(7) : 2435-2445.
- Zhang, L., He, M., Liu, J. and Li, L. 2014. “Role of the mitochondrial alternative oxidase pathway in hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides*.” *Planta*. 241(4) : 1005-1014.



ภาคผนวก

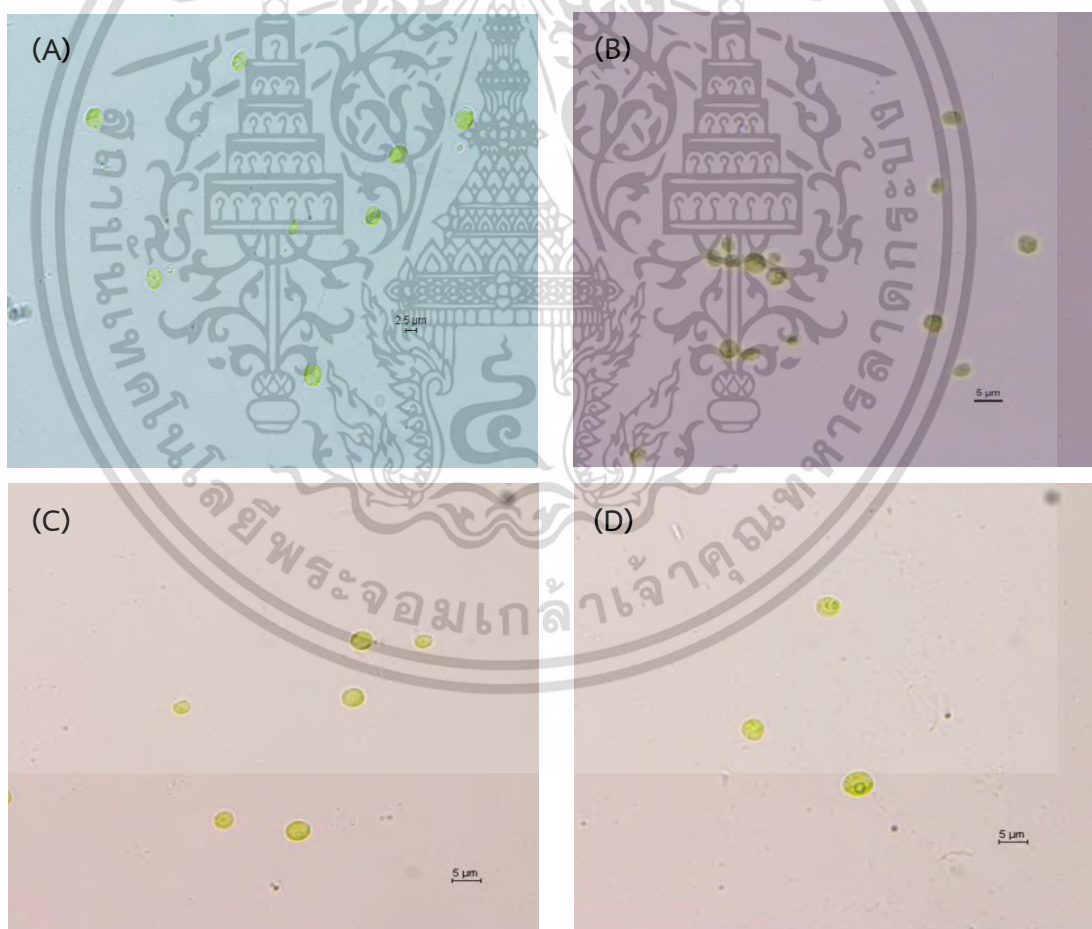
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง

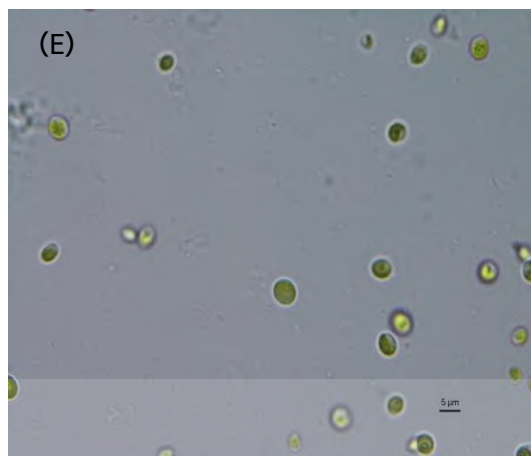
จากการนำเซลล์สาหร่ายทั้งหมด 24 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Tris-acetate phosphate pH 7.2 (TAP) เป็นเวลา 3 วัน มาศึกษารูปร่างและลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่างชนิดถ่ายภาพ (Nikon Eclipse Ci) โดยมีกำลังขยายภาพ 1,000 เท่า และบันทึกภาพโดยใช้โปรแกรม NIS-Elements D 3.2 พบว่าสาหร่ายสีเขียวมีลักษณะรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถจัดกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวได้เป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

1) กลุ่มที่ 1 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว โคโลนีลักษณะกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่า 5 ไมโครเมตร จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. 1SinS1, *Chlorella* sp. 2SinS4, *Chlorella* sp. 2TKS2.2, *Chlorella* sp. ChiW1 และ *Chlorella* sp. KMITL CirG



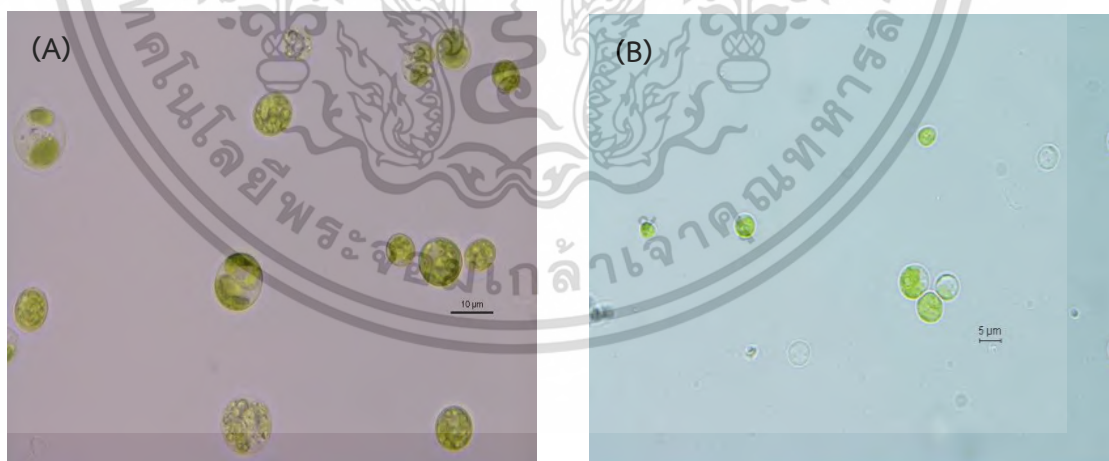
รูปที่ ก 1 สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. 1SinS1(A), *Chlorella* sp. 2SinS4(B), *Chlorella* sp. 2TKS2.2(C), *Chlorella* sp. ChiW1(D) และ *Chlorella* sp. KMITL CirG(E)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



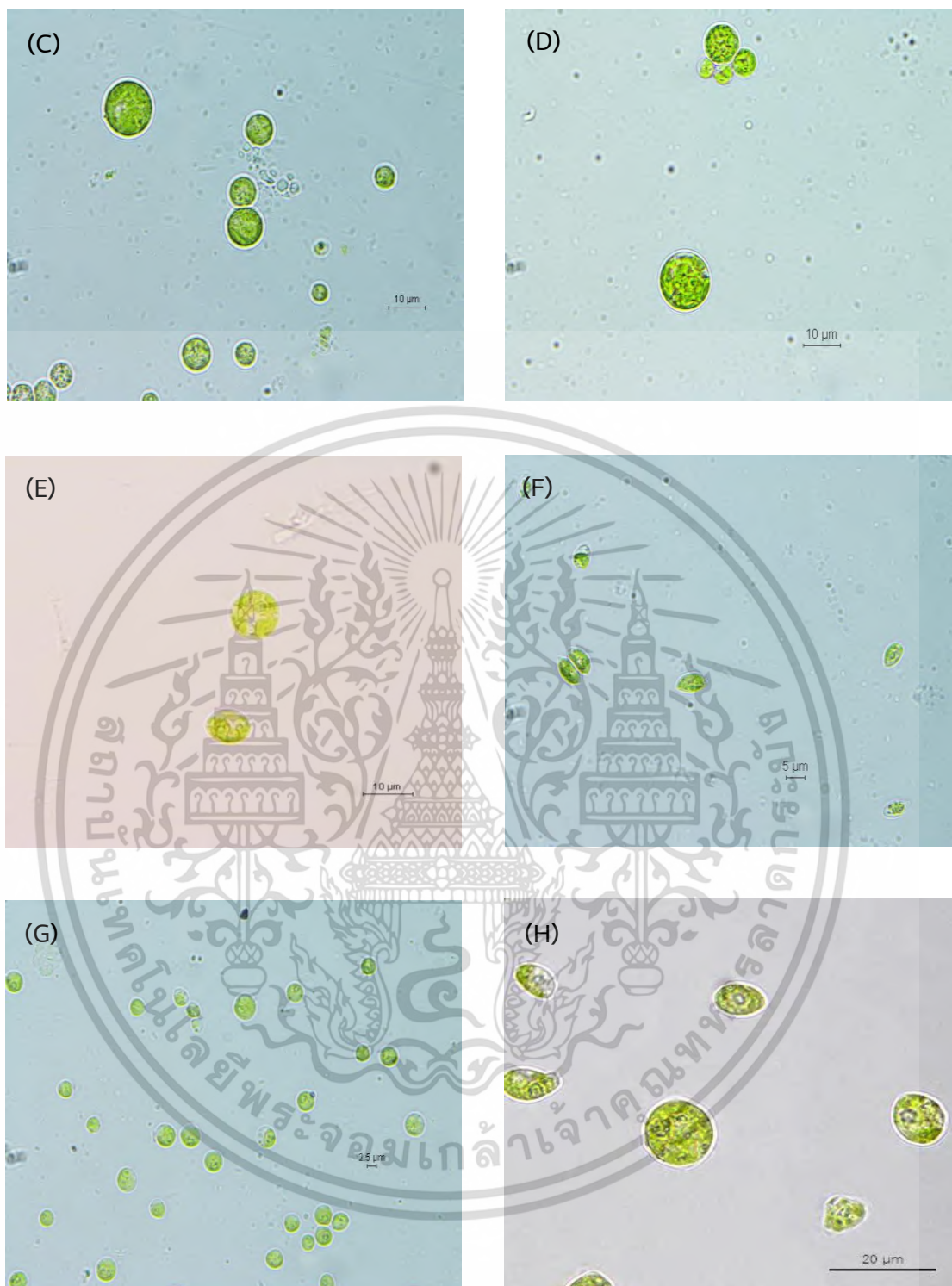
รูปที่ ก 1 (ต่อ) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. 1SinS1(A), *Chlorella* sp. 2SinS4(B), *Chlorella* sp. 2TKS2.2(C), *Chlorella* sp. ChiW1(D) และ *Chlorella* sp. KMITL CirG(E)

2) กลุ่มที่ 2 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว โคโลนีลักษณะกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 ไมโครเมตร จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. ChiS4, *Chlorella* sp. LSD-W1, *Coelastrum microporum* TISTR 8568, *Coelastrum reticulatum* TISTR 8562, *Coelastella* sp. CH, *Coelastrum* sp. SD, *Micractinium* sp. A25.1, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546, *Tetraspora* sp. CU2551 และ Undetected WTK-W3.1



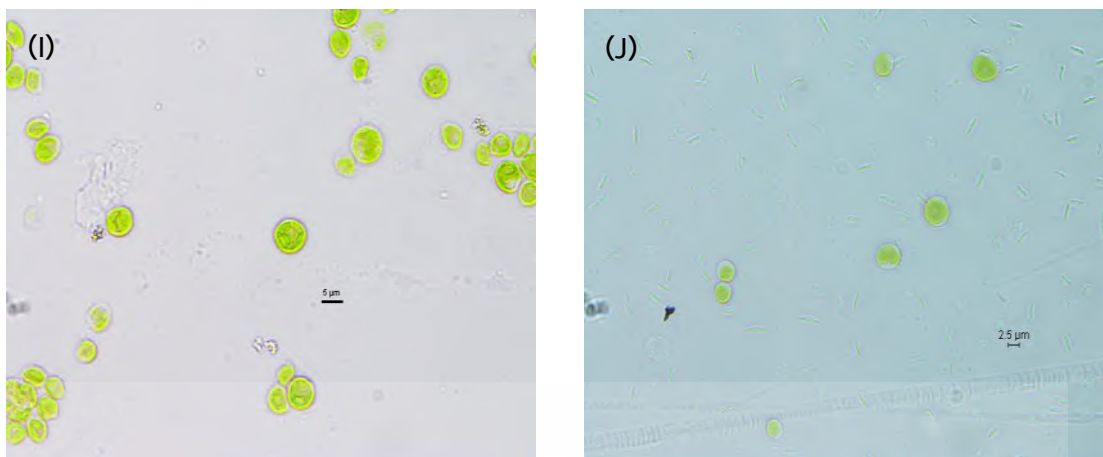
รูปที่ ก 2 สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiS4(A), *Chlorella* sp. LSD-W1(B), *Coelastrum microporum* TISTR 8568(C), *Coelastrum reticulatum* TISTR 8562(D), *Coelastella* sp. CH(E), *Coelastrum* sp. SD(F), *Micractinium* sp. A25.1(G), *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546(H), *Tetraspora* sp. CU2551(I) และ Undetected WTK-W3.1(J)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



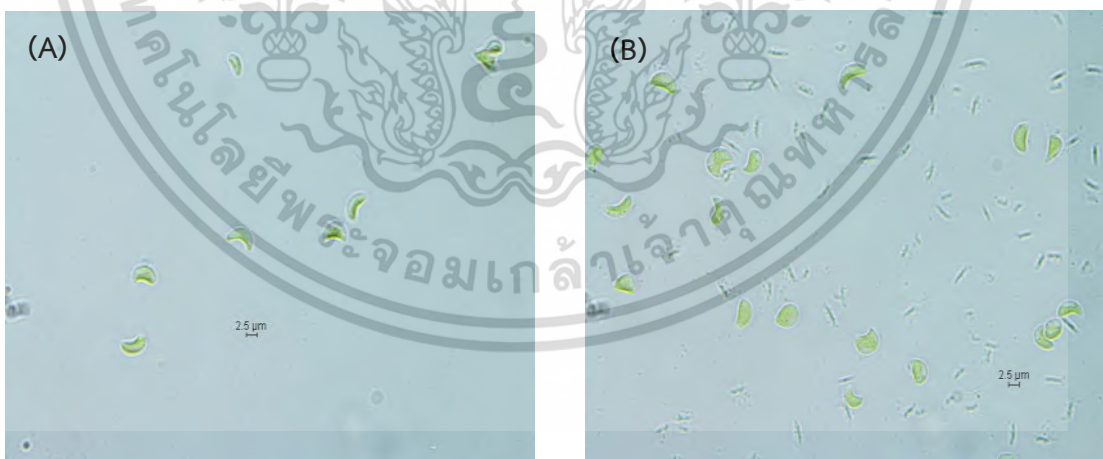
รูปที่ ๒ (ต่อ) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiS4(A), *Chlorella* sp. LSD-W1(B), *Coelastrum microporum* TISTR 8568(C), *Coelastrum reticulatum* TISTR 8562(D), *Coelastrum* sp. CH(E), *Coelastrum* sp. SD(F), *Microactinium* sp. A25.1(G), *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546(H), *Tetraspora* sp. CU2551(I) และ Undetected WTK-W3.1(J)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๒ (ต่อ) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiS4(A), *Chlorella* sp. LSD-W1(B), *Coelastrum microporum* TISTR 8568(C), *Coelastrum reticulatum* TISTR 8562(D), *Coelastella* sp. CH(E), *Coelastrum* sp. SD(F), *Micractinium* sp. A25.1(G), *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546(H), *Tetraspora* sp. CU2551(I) และ Undetected WTK-W3.1(J)

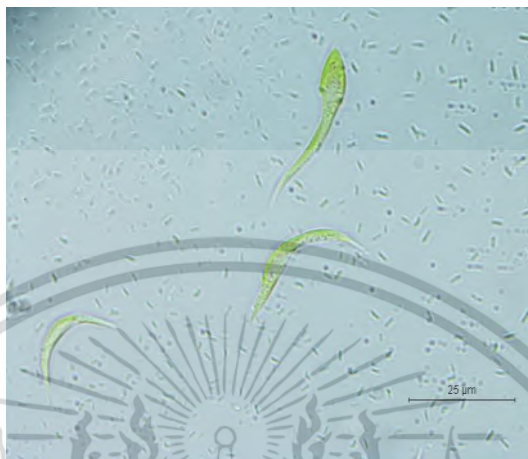
3) กลุ่มที่ 3 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว โคโลนีลักษณะวงรี ปลายเซลล์มีความโค้งงอและบิดเบี้ยว ความกว้างประมาณ 2.5 ไมโครเมตร และ ความยาวประมาณ 5.5 ไมโครเมตร จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ Undetected B35.1



รูปที่ ๓ สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ Undetected B35.1

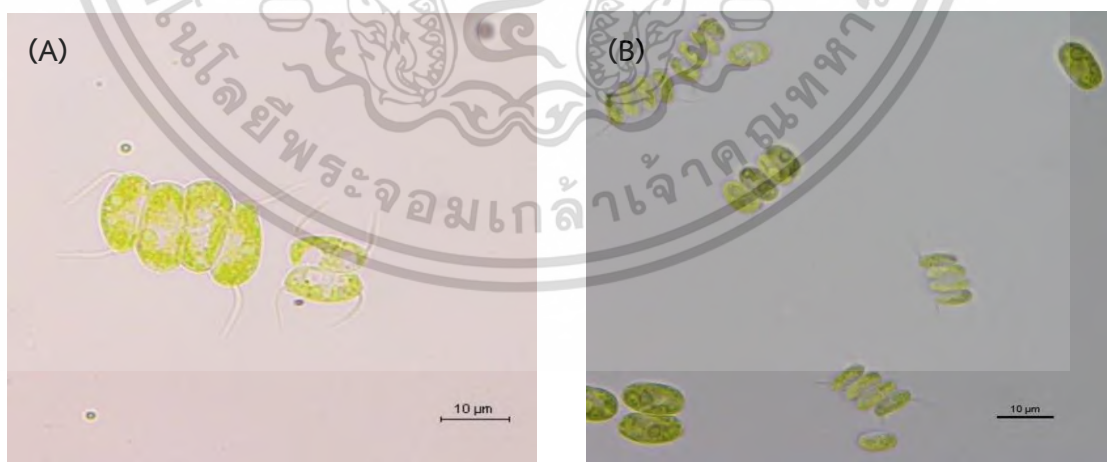
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) กลุ่มที่ 4 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว โคโลนีลักษณะคล้ายพระจันทร์เสี้ยว ปลายเซลล์มีความเรียวแหลม ความกว้างประมาณ 4.4 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 31.4 ไมโครเมตร จำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Monoraphidium branuii* TISTR 8553



รูปที่ ก 4 สาหร่ายสีเขียว *Monoraphidium branuii* TISTR 8553

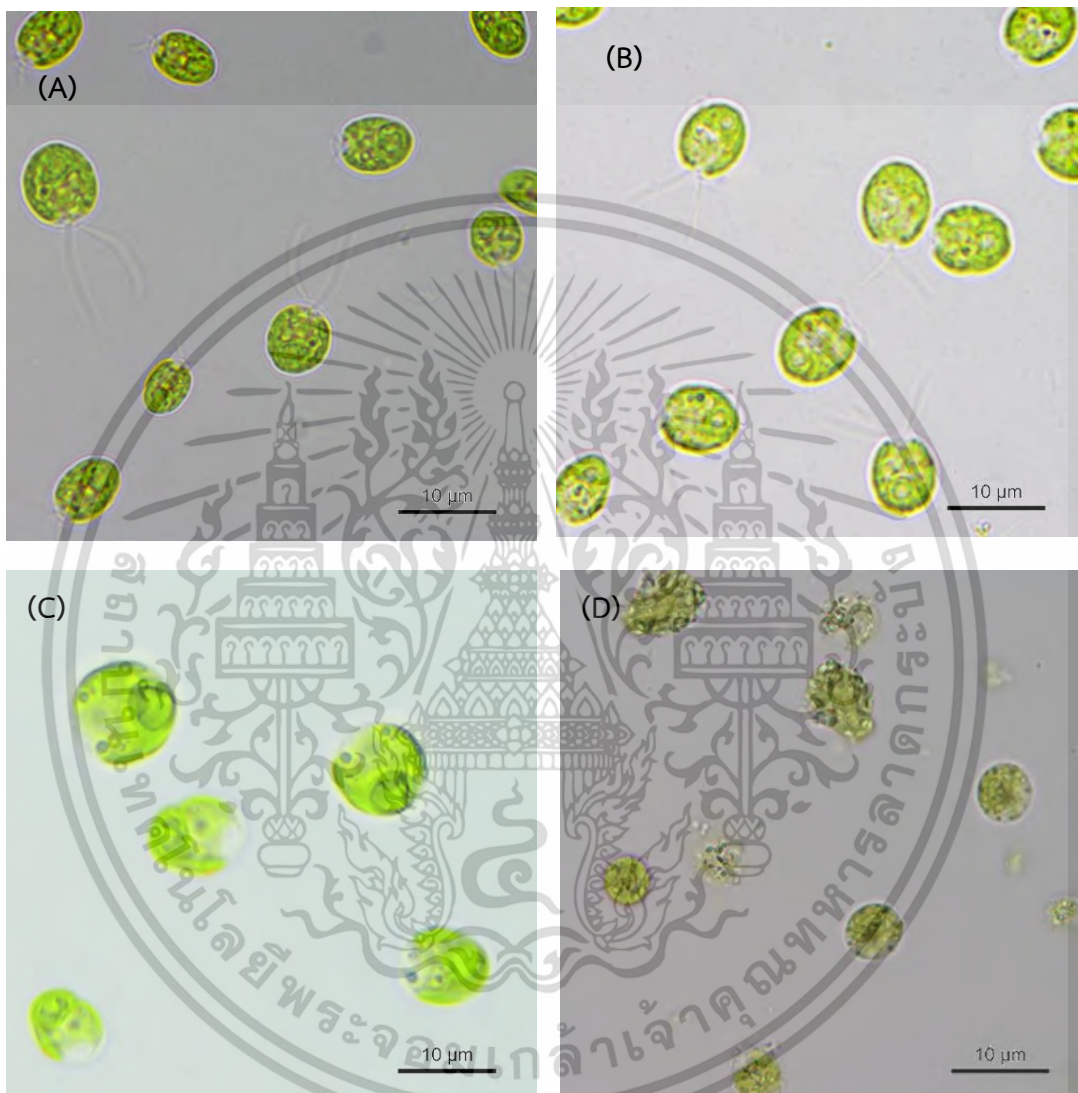
5) กลุ่มที่ 5 สาหร่ายสีเขียวรูปร่างรี เซลล์เรียงติดกัน 2, 4 หรือ 8 เซลล์คล้ายกระสวย มีแฟลกเจลลาทั้ง 4 มุมเซลล์ ความกว้างประมาณ 14 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 25 ไมโครเมตร จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Scenedesmus armatus* TISTR 8641 และ *Scenedesmus* sp. L



รูปที่ ก 5 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armatus* TISTR 8641 และ *Scenedesmus* sp. L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) กลุ่มที่ 6 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวที่มีโคลนนิ่งม มี eyespot ชัดเจน และด้านบนมีแฟล็กเจลลา 2 เส้น มีความกว้าง 14 ไมโครเมตรและความยาว 25 ไมโครเมตร ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-4147 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503



รูปที่ 6 สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 (A), *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 (B), *Chlamydomonas reinhardtii* CC-4147 (C) และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503 (D)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris acetate phosphate (TAP) (Harris, 1989)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

2X Filner's Beijernicks solution	25	มิลลิลิตร
1M Potassium phosphate	1	มิลลิลิตร
Trace mineral solution	5	มิลลิลิตร
Tris-Base	2.42	กรัม/ลิตร
Glacial acetic acid (Acetate 17.4 มิลลิโมลาร์)	1	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2 สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น 15 กรัมต่อ 1 ลิตรของอาหาร

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

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

สารละลาย Disodium EDTA 5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคน ปรับพีเอช 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 นอร์มอล เติมสารตามด้านล่างเพิ่มตามลำดับ

เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.2	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.51	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.016	กรัม
โซเดียมโมลิเบตเฮปตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.073	กรัม
โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.016	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนประกอบ 1M Potassium phosphate

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น (KH_2PO_4) 1 โมลาร์	20	มิลลิลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1 โมลาร์	30	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 7.2

ตารางที่ ข 1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ที่ขาดแหล่งอาหารต่างๆ

ส่วนประกอบ	ปกติ	ขาด โพแทสเซียม (TAP-K)	ขาด ไนโตรเจน (TAP-N)	ขาด ฟอสฟอรัส (TAP-P)	ขาดซัลเฟอร์ (TAP-S)
KH_2PO_4	+	NaH_2PO_4	+	KCl	+
K_2HPO_4	+	Na_2HPO_4	+	KCl	+
NH_4Cl	+	+	-	+	+
$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	+	+	+	+	MgCl_2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	+	+	+	+	FeCl_2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	+	+	+	+	ZnCl_2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	+	+	+	+	CuCl_2

หมายเหตุ : + หมายถึง มีการเติมสารชนิดนั้น - หมายถึง ขาดสารชนิดนั้น

ตารางที่ ข 2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ขาดซัลเฟอร์ (TAP-S) ร่วมกับขาดแหล่งอาหารอื่น

ส่วนประกอบ	TAP-S	TAP-KS	TAP-NS	TAP-PS
KH_2PO_4	+	NaH_2PO_4	+	KCl
K_2HPO_4	+	Na_2HPO_4	+	KCl
NH_4Cl	+	+	-	+
$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	MgCl_2	MgCl_2	MgCl_2	MgCl_2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	FeCl_2	FeCl_2	FeCl_2	FeCl_2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	ZnCl_2	ZnCl_2	ZnCl_2	ZnCl_2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	CuCl_2	CuCl_2	CuCl_2	CuCl_2

หมายเหตุ : + หมายถึง มีการเติมสารชนิดนั้น - หมายถึง ขาดสารชนิดนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข 3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ขาดโพแทสเซียม (TAP-K) ร่วมกับขาดแหล่งอาหารอื่น

ส่วนประกอบ	TAP-K	TAP-KN	TAP-KP	TAP-KS	TAP-KNP	TAP-KNS	TAP-KPS
KH_2PO_4	NaH_2PO_4	NaH_2PO_4	-	NaH_2PO_4	-	NaH_2PO_4	-
K_2HPO_4	Na_2HPO_4	Na_2HPO_4	-	Na_2HPO_4	-	Na_2HPO_4	-
NH_4Cl	+	-	+	+	-	-	+
$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	+	+	+	MgCl_2	+	MgCl_2	MgCl_2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	+	+	+	FeCl_2	+	FeCl_2	FeCl_2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	+	+	+	ZnCl_2	+	ZnCl_2	ZnCl_2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	+	+	+	CuCl_2	+	CuCl_2	CuCl_2

หมายเหตุ : + หมายถึง มีการเติมสารชนิดนั้น - หมายถึง ขาดสารชนิดนั้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจนและปริมาณของออกซิเจน

วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

- 1) นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ (%) จากกราฟมาตรฐานไฮโดรเจน
- 2) นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละมาคำนวณเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร
- 3) นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาเปรียบเป็น ปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิโมล โดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาณไฮโดรเจน 1 มิลลิโมล
- 4) นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมงจะได้ ปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมง
- 5) นำปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมงที่ได้มาหารปริมาณคลอโรฟิลล์จะได้หน่วยเป็นปริมาณไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง
- 6) นำปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมงที่ได้มาหารปริมาตรของอาหารในการเพาะเลี้ยงจะได้หน่วยเป็น ปริมาณไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง

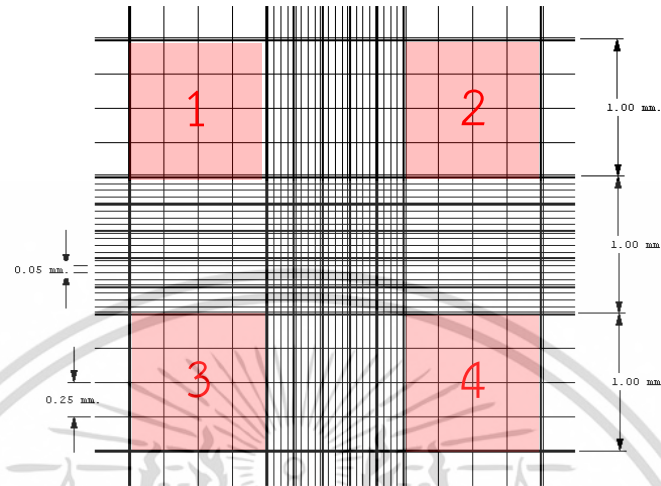
วิธีการคำนวณปริมาณของออกซิเจน

- 1) นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของออกซิเจนในหน่วยร้อยละ (%) จากกราฟความเข้มข้นออกซิเจนในบรรยากาศปกติ
- 2) นำค่าความเข้มข้นของออกซิเจนในหน่วยร้อยละมาคำนวณเป็นปริมาณออกซิเจนในหน่วยมิลลิลิตร
- 3) นำปริมาณออกซิเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาเปรียบเป็น ปริมาณออกซิเจนในหน่วยมิลลิโมล โดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซออกซิเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาณออกซิเจน 1 มิลลิโมล
- 4) นำปริมาณออกซิเจนที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมงจะได้ ปริมาณออกซิเจนต่อชั่วโมง
- 5) นำปริมาณออกซิเจนต่อชั่วโมงที่ได้มาหารปริมาณคลอโรฟิลล์จะได้หน่วยเป็นปริมาณออกซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

วิธีการนับเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์



รูปที่ ง 1 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

- 1) ทำการปิเปตสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายลงในฮีโมไซโตมิเตอร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
- 2) นำฮีโมไซโตมิเตอร์ที่มีสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายสองภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายภาพ 100 เท่า
- 3) นับจำนวนเซลล์สาหร่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ในช่องสีแดงที่ 1, 2, 3 และ 4
- 4) หาค่าเฉลี่ยระหว่างจำนวนเซลล์ที่นับได้ในช่อง 1, 2, 3 และ 4
- 5) ปริมาตรสารแขวนลอยในช่องสีแดงแต่ละช่องมีค่าเท่ากับ กว้าง x ยาว x สูง (ความกว้างเท่ากับ 1 มิลลิเมตร, ความยาวเท่ากับ 1 มิลลิเมตร และ ความลึกเท่ากับ 1 มิลลิเมตร)

ดังนั้น ปริมาตรสารแขวนลอยในช่องสีแดงมีค่า

เท่ากับ	$1 \times 1 \times 1$	มิลลิเมตร
เท่ากับ	$0.1 \times 0.1 \times 0.1$	เซนติเมตร
เท่ากับ	0.0001	ลูกบาศก์เซนติเมตร
เท่ากับ	10^4	ลูกบาศก์เซนติเมตร

ดังนั้น ปริมาณเซลล์เท่ากับจำนวนเซลล์จากการนับ $\times 10^4$ ลูกบาศก์เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ตารางที่ จ 1 ปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 5 สายพันธุ์ที่บ่มในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีที่ความเข้มข้นของออกซิเจนเริ่มต้น 0, 1, 2.5, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว	ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตรต่อลิตร)					
	0	1	2.5	5	10	20
<i>C.reinhardtii</i> CC-124	35.782 ± 0.328 ^a	29.723 ± 1.118 ^b	20.695 ± 0.939 ^b	12.981 ± 3.192 ^A	9.222 ± 0.416 ^B	6.170 ± 0.701 ^B
<i>C.reinhardtii</i> CC-125	35.636 ± 0.575 ^a	30.015 ± 0.396 ^a	23.467 ± 0.944 ^a	15.023 ± 0.642 ^A	11.410 ± 0.828 ^A	8.896 ± 1.017 ^A
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	25.606 ± 0.305 ^d	22.115 ± 0.633 ^d	14.364 ± 0.482 ^c	8.383 ± 1.670 ^B	6.615 ± 0.873 ^C	3.924 ± 0.092 ^C
<i>Soblignus</i> TISTR 8546	31.119 ± 0.347 ^b	26.535 ± 0.738 ^c	21.553 ± 0.852 ^b	14.887 ± 1.483 ^A	10.660 ± 1.082 ^A	8.722 ± 1.331 ^A
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	29.545 ± 0.885 ^c	19.043 ± 0.882 ^d	9.801 ± 0.388 ^d	5.475 ± 0.656 ^B	3.683 ± 0.215 ^D	2.275 ± 0.067 ^D

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในแนวสดมภ์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ภาคผนวก ฉ

ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA

ชุดข้อมูลที่อยู่ในกลุ่มอักษรเหมือนกัน คือชุดข้อมูลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p -value > 0.05) และชุดข้อมูลที่อยู่ในกลุ่มอักษรแตกต่างกัน คือชุดข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p -value < 0.05)

ตารางที่ ฉ 1 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีดของสาหร่ายจำนวน 21 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
<i>Chlorella</i> sp. ChiS4	3	.887													
<i>Chlorella</i> sp. 2TKS2.2	3	1.243													
<i>M. branuii</i> TISTR 8553	3	1.706	1.706												
<i>Coelastrum</i> sp. SD	3	3.280	3.280	3.280											
<i>C. microporum</i> TISTR 8568	3		3.985	3.985											
<i>Coelastella</i> sp. CH	3		4.178	4.178											
<i>C. reinhardtii</i> CC-4147	3		4.288	4.288											
<i>Chlorella</i> sp. LSD-W1	3			5.066											
<i>Chlorella</i> sp. KMITL CirG	3				7.931										
<i>Chlorella</i> sp. 1SinS1.1	3				8.947										
<i>Micractinium</i> sp. A25.1	3				9.358	9.358									
<i>C. reinhardtii</i> CC-503	3					11.775	11.775								
Undetected B35.1	3						12.197	12.197							
<i>Scenedesmus</i> sp. KMITL OVG-1	3							14.693							
<i>Chlorella</i> sp. ChiW1	3								17.679						
Undetected WTK-W3.1	3								18.445						
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3									23.953					
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3									24.771					
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3									25.549					
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3										29.125				
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3											34.546			
Sig.		.086	.070	.210	.288	.059	.737	.052	.542	.235	1.000	1.000			

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๒ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีดของสาหร่ายจำนวน 21 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>M. branuii</i> TISTR 8553	3	.231									
<i>Chlorella</i> sp. ChiS4	3	.490	.490								
<i>Chlorella</i> sp. 2TKS2.2	3	.612	.612	.612							
<i>Chlorella</i> sp. 1SinS1.1	3	.699	.699	.699							
<i>C. microporum</i> TISTR 8568	3		1.552	1.552							
<i>Coelastrum</i> sp. SD	3		1.764	1.764							
<i>Coelastella</i> sp. CH	3			1.836							
<i>Chlorella</i> sp. LSD-W1	3			1.874							
<i>C. reinhardtii</i> CC-4147	3			1.922							
<i>C. reinhardtii</i> CC-503	3				3.945						
<i>Chlorella</i> sp. KMITL CirG	3				3.946						
<i>Micractinium</i> sp. A25.1	3				4.499	4.499					
Undetected WTK-W3.1	3				4.575	4.575					
Undetected B35.1	3				4.718	4.718					
<i>Scenedesmus</i> sp. KMITL OVG-1	3					5.736	5.736				
<i>Chlorella</i> sp. ChiW1	3						6.488				
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3							15.204			
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3								16.435		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3									17.835	
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3									17.862	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3										22.738
Sig.		.475	.058	.058	.249	.059	.207	1.000	1.000	.964	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีดของสาหร่ายจำนวน 21 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Chlorella</i> sp. ChiS4	3	.137							
<i>Chlorella</i> sp. 2TKS2.2	3	.205							
<i>M. branuii</i> TISTR 8553	3	.208							
Undetected WTK-W3.1	3	.230							
<i>Chlorella</i> sp. 1SinS1.1	3	.258							
<i>Coelastrum</i> sp. SD	3	.504							
<i>C. reinhardtii</i> CC-4147	3	.658							
<i>Coelastella</i> sp. CH	3	.665							
<i>C. microporum</i> TISTR 8568	3	.703							
<i>Chlorella</i> sp. LSD-W1	3	.902	.902						
<i>Chlorella</i> sp. KMITL CirG	3		1.510	1.510					
<i>Micractinium</i> sp. A25.1	3			1.783					
<i>C. reinhardtii</i> CC-503	3			2.037	2.037				
Undetected B35.1	3			2.227	2.227				
<i>Chlorella</i> sp. ChiW1	3				2.746				
<i>Scenedesmus</i> sp.	3				2.768				
KMITL OVG-1	3								
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3					5.433			
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3					6.066	6.066		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3						6.272	6.272	
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3							6.843	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3								12.118
Sig.		.073	.093	.069	.064	.081	.563	.114	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๔ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีดของสาหร่ายจำนวน 21 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Chlorella</i> sp. ChiS4	3	.070								
<i>Chlorella</i> sp. 2TKS2.2	3	.110								
<i>M. branuii</i> TISTR 8553	3	.112								
<i>Coelastella</i> sp. CH	3	.120								
Undetected WTK-W3.1	3	.139								
<i>Chlorella</i> sp. 1SinS1.1	3	.153	.153							
<i>C. reinhardtii</i> CC-4147	3	.156	.156							
<i>Micractinium</i> sp. A25.1	3	.192	.192							
<i>Coelastrum</i> sp. SD	3	.263	.263	.263						
<i>Chlorella</i> sp. LSD-W1	3	.264	.264	.264						
<i>C. microporum</i> TISTR 8568	3	.307	.307	.307						
<i>C. reinhardtii</i> CC-503	3		.510	.510						
<i>Chlorella</i> sp. KMITL CirG	3			.599	.599					
Undetected B35.1	3				.846					
<i>Scenedesmus</i> sp.	3					1.234				
KMITL OVG-1	3						1.569			
<i>Chlorella</i> sp. ChiW1	3							1.569		
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3								2.457	
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3									2.899
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3									3.086
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3									3.207
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3									7.727
Sig.		.208	.052	.059	.121	1.000	1.000	1.000	.067	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๕ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีแสงของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3	89.306				
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3		94.213			
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3			99.839		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3				106.061	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3					119.761
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๖ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีแสงของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	60.724				
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		77.130			
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3			82.933		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3				89.330	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3					102.122
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๗ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีแสงของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	31.253				
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		50.098			
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3			57.744		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3				69.841	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3					82.948
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๘ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีแสงของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	16.295			
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		27.516		
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3		34.910	34.910	
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3			41.916	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3				55.383
Sig.		1.000	.119	.137	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๑ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาคความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีแสงของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	10.961			
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		21.714		
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3		24.801		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3			31.835	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3				39.658
Sig.		1.000	.162	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๑๒ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาคความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อปริมาณไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในที่มีแสงของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.3)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	6.771			
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		12.881		
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3		16.593		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3			24.820	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3				32.448
Sig.		1.000	.122	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๑ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาค่า O_2 จากกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ที่มีความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 0-20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (ตารางที่ 4.4)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	7.614			
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		9.839		
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3			12.907	
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3				15.090
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3				15.934
Sig.		1.000	1.000	1.000	.206

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๑๒ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาค่าความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.4)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	5.089			
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		5.604		
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3		5.831		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3			6.979	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3				8.624
Sig.		1.000	.201	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๓ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.4)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	3.517			
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		4.887		
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3		5.315		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3			5.967	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3				7.495
Sig.		1.000	.057	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๑๔ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.4)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	3.153			
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		4.189		
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3		4.389		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3			5.149	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3				6.498
Sig.		1.000	.203	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๕ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาคความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.4)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	2.122				
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		2.676			
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3			3.577		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3				4.532	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3					5.473
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๑๖ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาคความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.4)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	1.443				
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		1.977			
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3			2.960		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3				4.003	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3					4.876
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๗ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาคความเข้มข้นออกซิเจนเริ่มต้นเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.4)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	1.102				
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		1.463			
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3			2.079		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3				3.053	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3					4.103
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๑๘ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาคความเข้มข้นออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.5)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	.142				
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		.339			
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3			.456		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3				.642	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3					.979
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๙ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ เวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.5)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	3.397				
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		8.145			
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3			10.945		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3				15.406	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3					23.506
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๒๐ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ เวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.5)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	4.008				
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		11.412			
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3			13.192		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3				17.760	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3					34.601
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๒๑ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาคความเข้มข้นออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ เวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.5)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	1.899				
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		6.502			
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3			8.873		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3				12.200	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3					33.159
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๒๒ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาคความเข้มข้นออกซิเจนในบรรยากาศปกติ (ไม่พ่นอาร์กอน) ต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายจำนวน 5 สายพันธุ์ เวลา 96 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.5)

Duncan^a

Green algae	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	3	.920				
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	3		3.373			
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	3			5.286		
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	3				8.684	
<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	3					31.448
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๒๓ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาอายุเซลล์ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 (รูปที่ 4.2)

Duncan^a

Cultivation Time (h)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
12	3	.429			
60	3		.560		
48	3		.586	.586	
24	3			.630	
36	3				.716
Sig.		1.000	.251	.074	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๒๔ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาอายุเซลล์ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (รูปที่ 4.2)

Duncan^a

Cultivation Time (h)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
12	3	.579			
60	3		.762		
48	3		.801		
24	3			.904	
36	3				.978
Sig.		1.000	.173	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑ 25 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 (รูปที่ 4.3)

Duncan^a

Optical density at 750 nm	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
2.0	3	.197				
1.5	3		.338			
1.0	3			.522		
0.2	3			.544		
0.4	3				.614	
0.6	3				.643	
0.8	3					.700
Sig.		1.000	1.000	.216	.112	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๑ 26 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (รูปที่ 4.3)

Duncan^a

Optical density at 750 nm	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
2.0	3	.445				
1.5	3		.580			
1.0	3			.792		
0.2	3			.819		
0.4	3				.904	
0.6	3				.922	
0.8	3					.988
Sig.		1.000	1.000	.240	.418	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๒๗ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาราดแหล่งอาหารต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 (คำนวณหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง) (ตารางที่ 4.8)

Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
TAP	3	.710			
TAP-P	3		1.559		
TAP-K	3		1.593		
TAP-N	3			1.981	
TAP-S	3				2.431
Sig.		1.000	.687	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๒๘ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาราดแหล่งอาหารต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (คำนวณในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง) (ตารางที่ 4.8)

Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
TAP-P	3	.007		
TAP-N	3	.008		
TAP-S	3	.083		
TAP	3		.972	
TAP-K	3			3.974
Sig.		.620	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๒๙ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษากาการขาดแหล่งอาหารต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 (คำนวณในหน่วยมิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง) (ตารางที่ 4.8)

Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
TAP	3	.262			
TAP-P	3		.577		
TAP-K	3			.660	
TAP-N	3			.708	
TAP-S	3				.825
Sig.		1.000	1.000	.153	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๑๓๐ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษากาการขาดแหล่งอาหารต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (คำนวณในหน่วยมิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง) (ตารางที่ 4.8)

Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
TAP-P	3	.001		
TAP-N	3	.002		
TAP-S	3	.009		
TAP	3		.305	
TAP-K	3			1.157
Sig.		.857	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓ 31 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 (คำนวณในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที) (ตารางที่ 4.8)

Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
TAP	3	.996			
TAP-P	3		1.978		
TAP-K	3		2.234		
TAP-N	3			3.359	
TAP-S	3				3.837
Sig.		1.000	.198	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๓ 32 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (คำนวณในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที) (ตารางที่ 4.8)

Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
TAP-P	3	.252			
TAP-N	3	.326			
TAP-S	3		.480		
TAP	3			1.368	
TAP-K	3				5.169
Sig.		.278	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓๓ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 (คำนวณในหน่วยมิลลิลิตรต่อลิตรต่อนาทีก) (ตารางที่ 4.8)

Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
TAP	3	.188			
TAP-P	3		.341		
TAP-K	3		.350		
TAP-N	3			.414	
TAP-S	3				.490
Sig.		1.000	.737	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๓๔ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (คำนวณในหน่วยมิลลิลิตรต่อลิตรต่อนาทีก) (ตารางที่ 4.8)

Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
TAP-P	3	.018			
TAP-N	3	.029	.029		
TAP-S	3		.043		
TAP	3			.214	
TAP-K	3				.579
Sig.		.128	.073	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓5 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษารวมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (คำนวณในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง) (ตารางที่ 4.9)

Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
TAP-KNP	3	3.254			
TAP-KP	3	3.893			
TAP-KS	3		5.307		
TAP-KN	3			6.790	
TAP-KPS	3				7.824
TAP-K	3				8.330
TAP-KNS	3				8.498
Sig.		.103	1.000	1.000	.102

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๓6 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษารวมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (คำนวณในหน่วยมิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง) (ตารางที่ 4.9)

Duncan^a

Medium	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
TAP-KNP	3	.300				
TAP-KN	3		.531			
TAP-KS	3		.672			
TAP-KP	3			1.007		
TAP-KPS	3				1.189	
TAP-KNS	3				1.300	
TAP-K	3					1.567
Sig.		1.000	.091	1.000	.175	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓๗ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาสารรายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่ป้อนในอาหาร TAP ต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง (รูปที่ 4.7)

Duncan^a

Time (h)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	4	43.406			
96	4	44.589	44.589		
24	4		49.234	49.234	
72	4			52.014	52.014
48	4				55.472
Sig.		.614	.061	.245	.153

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๓๘ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาสารรายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่ป้อนในอาหาร TAP-K ต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง (รูปที่ 4.7)

Duncan^a

Time (h)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
96	4	24.357				
72	4		34.123			
48	4			39.057		
0	4				44.444	
24	4					48.164
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓๙ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาสารรายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่ป่มในอาหาร TAP ต่อกระบวนการหายใจ (รูปที่ 4.7)

Duncan^a

Time (h)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0	4	10.643	
96	4	12.827	12.827
24	4	12.828	12.828
48	4		14.490
72	4		15.547
Sig.		.108	.056

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๔๐ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาสารรายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่ป่มในอาหาร TAP-K ต่อกระบวนการหายใจ (รูปที่ 4.7)

Duncan^a

Time (h)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	4	12.096			
24	4		25.423		
96	4		27.847	27.847	
48	4			31.786	31.786
72	4				35.699
Sig.		1.000	.212	.051	.053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๔๑ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษานิตของแหล่งคาร์บอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 เมื่อบ่มเซลล์ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.11)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Carbon deprivation	3	.000			
Fructose	3	.000			
Lactose	3	.000			
Maltose	3	.000			
Sucrose	3	.000			
Glucose	3		.886		
Sodium acetate	3			1.848	
Acetic acid	3				3.887
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๔๒ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษานิตของแหล่งคาร์บอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 เมื่อบ่มเซลล์ 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.11)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Maltose	3	.000			
Carbon deprivation	3	.049			
Fructose	3	.051			
Lactose	3	.113			
Sucrose	3	.184			
Glucose	3		4.379		
Sodium acetate	3			5.440	
Acetic acid	3				8.582
Sig.		.251	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000. ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๔๓ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษานิตของแหล่งคาร์บอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 เมื่อบ่มเซลล์ 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.11)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Carbon deprivation	3	.081				
Fructose	3	.109				
Lactose	3	.196	.196			
Maltose	3	.282	.282			
Sucrose	3		.582			
Glucose	3			3.960		
Sodium acetate	3				4.509	
Acetic acid	3					7.952
Sig.		.361	.079	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๔๔ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษานิตของแหล่งคาร์บอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 เมื่อบ่มเซลล์ 96 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.11)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Carbon deprivation	3	.109					
Fructose	3	.139					
Lactose	3	.224	.224				
Maltose	3		.413				
Sucrose	3			.934			
Glucose	3				3.263		
Sodium acetate	3					3.734	
Acetic acid	3						7.529
Sig.		.317	.112	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000. ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๔๕ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษานิตของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 เมื่อป่มเซลล์ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.11)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Carbon deprivation	3	.000			
Fructose	3	.000			
Lactose	3	.000			
Maltose	3	.000			
Sucrose	3	.000			
Glucose	3		21.269		
Sodium acetate	3			44.361	
Acetic acid	3				93.294
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๔๖ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษานิตของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 เมื่อป่มเซลล์ 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.11)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Maltose	3	.000			
Fructose	3	2.438			
Carbon deprivation	3	3.334			
Lactose	3	5.402			
Sucrose	3	8.823			
Glucose	3		210.172		
Sodium acetate	3			261.135	
Acetic acid	3				411.944
Sig.		.251	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000. ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๔๗ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษานิตของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 เมื่อปัมเซลล์ 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.11)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Carbon deprivation	3	5.861				
Fructose	3	7.866				
Lactose	3	14.113	14.113			
Maltose	3	20.270	20.270			
Sucrose	3		41.915			
Glucose	3			285.087		
Sodium acetate	3				324.619	
Acetic acid	3					572.550
Sig.		.361	.079	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๔๘ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษานิตของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 เมื่อปัมเซลล์ 96 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.11)

Duncan^a

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Carbon deprivation	3	9.686					
Fructose	3	13.303					
Lactose	3	21.471	21.471				
Maltose	3		39.674				
Sucrose	3			89.712			
Glucose	3				313.248		
Sodium acetate	3					358.442	
Acetic acid	3						722.823
Sig.		.317	.112	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๔๙ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซีติกต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (รูปที่ 4.8)

Duncan^a

Acetic acid concentration (mM)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.049				
1.74	3		3.761			
174	3			6.173		
8.7	3			6.412		
87	3				7.273	
34.8	3					8.274
17.4	3					8.441
Sig.		1.000	1.000	.493	1.000	.632

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๕๐ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความเข้มแสงต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (รูปที่ 4.9)

Duncan^a

Light intensity ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.797				
480	3		3.599			
240	3		4.246	4.246		
120	3			4.936		
60	3				6.388	
30	3					8.385
Sig.		1.000	.068	.054	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๕1 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาอุณหภูมิต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (รูปที่ 4.11)

Duncan^a

Temperature (°C)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
50	3	2.594			
45	3	3.208			
25	3		5.532		
40	3		5.893		
35	3			7.689	
30	3				8.353
Sig.		.058	.242	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๕2 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (ตารางที่ 4.12)

Duncan^a

Initial pH	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
5.0	3	.180						
5.5	3		1.226					
9.0	3			3.777				
8.5	3				5.234			
8.0	3				5.514			
6.0	3				5.797			
6.5	3					6.639		
7.0	3						7.314	
7.5	3						7.552	
7.2	3							8.316
Sig.		1.000	1.000	1.000	.053	1.000	.371	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๕3 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาชนิดของสารให้อิเล็กตรอนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (รูปที่ 4.13)

Duncan^a

Reducing agents	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Methyl viologen	3	.000						
Potassium exacyanoferrate(II) trihydrate	3	1.183						
Dithiothreitol	3		3.503					
Formic acid	3			5.080				
β-mercaptoethanol	3			5.506				
Sodium sulfide nanohydrate	3				6.875			
Sodium borohydride	3				7.899			
Oxalic acid	3					13.681		
TAP-K	3					14.048	14.048	
Sodium dithionite	3						15.164	15.164
Ascorbic acid	3						15.435	15.435
Cysteine	3							16.179
Sig.		.084	1.000	.522	.131	.581	.055	.155

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๕4 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาสภาวะการบ่มเซลล์ที่เหมาะสมของสาหร่ายต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 4.16)

Duncan^a

Conditions	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
TAP (Air)	3	.972			
TAP	3		7.342		
TAP-K	3			16.998	
Optimized TAP-K (Air)	3				20.044
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่โดยกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ โดยไม่คิดค่า
 เอกสารนี้ใช้ภายใต้เงื่อนไขการใช้งานที่ระบุไว้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวกชพร เสรีตระกูล
วัน เดือน ปีเกิด	20 กันยายน 2536
ที่อยู่ปัจจุบัน	99/53 ถนนเทศบาล4 ตำบลท่าเสา อำเภอกระทุ่มแบน จังหวัดสมุทรสาคร
ประวัติการศึกษา	(2559) วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรตเฉลี่ย 3.61 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมแบบเหมาจ่ายและมีค่าครองชีพ ระดับบัณฑิตศึกษา
ผลงานทางวิชาการ	Sereetrakul, K. and Phunpruch, S. 2021 “Factors Affecting Hydrogen Production by Unicellular Green Alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-125” <i>Chiang Mai Journal of science</i> . 48(4) : 979-995.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้