ผลของ pH ต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. Cu2551

The Effect of pH on Hydrogen Production from Green Alga *Tetraspora* sp. CU2551

ชนิณตา ชื่นไชยสิทธิ์

พัณณ์ชิตา สงค์จันทร์พร

สุปริญญา จำปาศรี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของ pH ต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

The Effect of pH on Hydrogen Production from Green Alga *Tetraspora* sp. CU2551

T149338

ชนิณตา ชื่นไชยสิทธิ์
พัณณ์ชิตา สงค์จันทร์พร
สุปริญญา จำปาศรี

เลขหมู่.......
เลขทะเบียน 149338
วัน. เดือน. ปี 12 ก.พ. 2561
b. 12881892

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The Effect of pH on Hydrogen Production from Green Alga *Tetraspora* sp. CU2551

MISS CHANINTA CHUENCHAISIT
MISS PANCHITA SONGCHANPORN
MISS SUPRINYA JAMPASRI

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT
FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE ENVIRONMAETAL CHEMISTRY
DEPARTMENT OF CHEMISTRY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของ pH ต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 The Effect of pH on Hydrogen Production from Green Alga *Tetraspora* sp. CU2551
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชนิณตา ชื่นไชยสิทธิ์ รหัสนักศึกษา 56050678 นางสาวพัณณ์ชิตา สงค์จันทร์พร รหัสนักศึกษา 56050728 นางสาวสุปริญญา จำปาศรี รหัสนักศึกษา 56050780
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เคมีสิ่งแวดล้อม ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. สุวรรณี จรรยาพูน ประธานกรรมการ	
ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการ	
ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของ pH ต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชนิณตา ชื่นไชยสิทธิ์ รหัสนักศึกษา 56050678
	นางสาวพัณณ์ชิตา สงค์จันทร์พร รหัสนักศึกษา 56050728
	นางสาวสุปริญญา จำปาศรี รหัสนักศึกษา 56050780
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา	เคมี
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว Tetraspora sp. CU2551 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริกในการปรับพีเอช ผลการศึกษาพบว่าที่พีเอช 6.5 ถึง 9.0 สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ ดังนั้นในการศึกษาผลผลิตไฮโดรเจนจึงทำการศึกษา 2 ระบบ คือ ระบบแบบต่อเนื่อง (continuation) และระบบแบบเปลี่ยนอาหาร (adaptation) พบว่า การผลิตไฮโดรเจนในระบบแบบต่อเนื่อง ที่พีเอช 6.5 และ 7.5 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 29.12 μmol/mgDW และ 29.52 μmol/mgDW ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็น 140% และ 142% ตามลำดับเมื่อเทียบกับอาหาร TAP ที่ไม่ได้ปรับพีเอช ขณะเดียวกันการผลิตไฮโดรเจนในระบบแบบเปลี่ยนอาหาร พบว่า ที่พีเอช 6.5 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 35.15 μmol/mgDW และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 124% ดังนั้นการปรับพีเอชในอาหาร TAP จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่งที่จะศึกษาต่อไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

คำสำคัญ: *Tetraspora* sp. CU2551 การผลิตไฮโดรเจน พีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	The Effect of pH on Hydrogen Production from Green Alga *Tetraspora* sp. CU2551
Students	Miss Chaninta Chuenchaisit Student ID 56050678
	Miss Panchita Songchanporn Student ID 56050728
	Miss Suprinya Jampasri Student ID 56050780
Degree	Bachelor of Science (Environmaetal Chemistry)
Department	Chemistry
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj

Abstract

This project aims to study the effect of pH on hydrogen production from green alga *Tetraspora* sp. CU2551 by sodium hydroxide or hydrochloric acid addition to adjust the culture pH. The results revealed that at pH 6.5 to 9.0 the algae could normally grow. Thus, the experiment was further extended to produce the gas using continuation and adaptation techniques. The results showed that maximum hydrogen production on continuation technique was 29.12 μmol/mgDW and 29.52 μmol/mgDW obtained at pH 6.0 and 7.5, repectively which enhanced hydrogen production by 140% and 142%, repectively when compared to normal TAP medium without adjusting pH. Maximum hydrogen production on adaptation technique was 35.15 μmol/mgDW obtained at pH 6.5 which enhanced hydrogen production by 124% compared to normal TAP medium. Consequently, adjusting pH in TAP medium is particularly interesting to further study for biohydrogen production efficiency.

Keywords: *Tetraspora* sp. CU2551, Hydrogen production, pH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงจากดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของการจัดทำโครงงานพิเศษครั้งนี้ ขอขอบพระคุณกรรมการและประธานสอบโครงงานพิเศษ คือ ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน และดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ที่ให้ข้อเสนอแนะและข้อคิดเห็นเพื่อนำไปปรับปรุงโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณนางสาวธนาภรณ์ มาศวรรณา ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำทั้งในด้านข้อมูลและอุปกรณ์ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษ และขอขอบพระคุณผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ ตลอดจนเจ้าของเอกสารและงานวิจัยทุกท่านที่ผู้ศึกษาค้นคว้าได้นำมาอ้างอิงในโครงงานพิเศษนี้ จนกระทั่งโครงงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ท้ายที่สุดคณะผู้จัดทำโครงงานหวังว่าโครงงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์กับผู้สนใจไม่มากก็น้อย

ชนิณตา ชื่นไชยสิทธิ์
พัณณ์ชิตา สงค์จันทร์พร
สุปริญญา จำปาศรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
คำย่อ/สัญลักษณ์	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขต	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ไฮโดรเจน	3
2.2 การผลิตไฮโดรเจน	4
2.2.1 กระบวนการความร้อน (Thermo Process)	4
2.2.2 กระบวนการไฟฟ้า (Electrolytic Process)	4
2.2.3 กระบวนการชีวเคมี (Biophotolysis Process)	5
2.3 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวโดยการสังเคราะห์แสง	6
2.4 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว	7
2.5 สาหร่ายสีเขียว.	8
2.6 สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551	8
2.7 pH	9
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	11
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	11
3.2 สารเคมี	11
3.2.1 อาหารเลี้ยงสาหร่าย	11
3.2.1.1 อาหารเหลว TAP (Tris Acetate Phosphate medium)	11
3.2.1.2 อาหาร TAP-tris	12
3.2.2 การปรับ pH	13
3.2.2.1 Universal Buffer	13
3.2.2.2 วิธีการนับหยดด้วยกรดไฮโดรครอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์	13
3.2.3 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน	13
3.3 อุปกรณ์	13
3.4 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบริสุทธิ์ 14
3.4.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น (Starter culture) 14
3.5 การคัดช่วง (Screening) 14
3.6 การวัดการเจริญเติบโต (Growth Phase) 15
3.7 วิธีการวัดไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551. 16
3.7.1 การวัดแบบต่อเนื่อง (Continuation) 16
3.7.2 การวัดแบบเปลี่ยนอาหาร (Adaptation) 16
3.8 การวัดปริมาณไฮโดรเจน 17
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 18
4.1 ระบบควบคุม pH 18
4.2 ผลการคัดช่วง (Screening) ของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 20
4.3 การวัดการเจริญเติบโต (Growth Phase) 24
4.4 วิธีการวัดไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว Tetraspora sp. CU2551 25
4.4.1 การวัดแบบต่อเนื่อง (Continuation) (แบบที่ 1) 25
4.4.2 การวัดแบบเปลี่ยนอาหาร (Adaptation) (แบบที่ 2) 26
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 28
5.1 สรุปผลการวิจัย 28
5.2 ข้อเสนอแนะ 29
เอกสารอ้างอิง 30
ภาคผนวก 32
ภาคผนวก ก 33
ภาคผนวก ข 35
ภาคผนวก ค 36
ภาคผนวก ง 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ | หน้า

2.1 แสดงการเปรียบเทียบไฮโดรเจนกับเชื้อเพลิงชนิดอื่น 3
3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สด้วยเครื่อง Gas Chromatography 17
4.1 ผลการคัดช่วงที่ pH 3-12 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH โดย Universal Buffer (2 ซ้ำ) 19
4.2 ผลการคัดช่วงที่ pH 3.0-12.0 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH โดยการนับหยดด้วย กรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (2 ซ้ำ) 20
4.3 ผลการคัดช่วงที่ pH 6.0-8.0 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH โดยการนับหยดด้วย กรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 21
4.4 ผลการคัดช่วงที่ pH 6.0-9.0 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH โดยการนับหยดด้วย กรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 การผลิตไฮโดรเจนจากสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ 4
2.2 Standard Electrolysis 5
2.3 การเคลื่อนที่ของไอออน และการเกิดปฏิกิริยาในการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า 5
2.4 การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ 6
2.5 ผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวโดยการสังเคราะห์แสง 6
2.6 โครงสร้างของ NiFe-hydrogenase FeFe-hydrogenase และ Fe-hydrogenase 8
4.1 ผล pH 3.0-12.0 ในอาหาร TAP-tris ที่ปรับ pH โดย Universal Buffer และ pH 3.0-12.0 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH โดย Universal Buffer 18
4.2 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Tetraspora* sp.CU2551 24
4.3 กราฟแสดงปริมาณไฮโดรเจนที่ของเซลล์สาหร่ายในแต่ละช่วงอายุโดยการวัดแบบต่อเนื่อง (Continuation) (แบบที่ 1) 26
4.4 กราฟแสดงปริมาณไฮโดรเจนที่ของเซลล์สาหร่ายในแต่ละช่วงอายุโดยการวัดแบบเปลี่ยนอาหาร (Adaptation) (แบบที่ 2) 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
TAP	Tris Acetate Phosphate medium
UB	Universal Buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันประสบปัญหาภาวะโลกร้อนจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิลและการลดลงของเชื้อเพลิงฟอสซิลจึงแสวงหาพลังงานทดแทน พลังงานทางเลือก หรือพลังงานหมุนเวียนเพื่อให้ได้พลังงานที่มีประสิทธิภาพสูง สะอาด ใช้ได้ยั่งยืน ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นองค์ประกอบของน้ำ (H_2O) ที่มีมากที่สุดบนโลก นอกจากนี้ยังเป็นธาตุที่รวมอยู่ในโมเลกุลของสารประกอบอื่นๆ เช่น สารประกอบจำพวกไฮโดรคาร์บอน (HC) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปิโตรเลียมที่มีความสำคัญสำหรับการพัฒนาทางเศรษฐกิจของประเทศ คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน คือไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย มีความสะอาดสูง ไม่เป็นพิษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาใช้ประโยชน์คือเป็นเชื้อเพลิงในการเผาไหม้และให้ความร้อนออกมา หรือใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงโดยปฏิกิริยาทางเคมีแล้วเกิดกระแสไฟฟ้าซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ในอุปกรณ์อิเล็คทรอนิคส์ขนาดเล็ก การขับเคลื่อนรถ การผลิตกระแสไฟฟ้า และอื่นๆ ได้เลือกใช้เทคโนโลยีการผลิตไฮโดรเจนด้วนกระบวนการชีวเคมี (Biochemical Processes) เนื่องจากมีประสิทธิภาพและต้นทุนต่ำ ซึ่งกระบวนการนี้เป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก หรือจุลินทรีย์ และสาหร่าย ซึ่งสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเหล่านี้จะเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นไฮโดรเจน (กระทรวงพลังงาน,2559)

สาหร่ายสีเขียวสามารถนำแสงอาทิตย์มาใช้เป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงนี้มีระบบคล้ายพืช ซึ่งจะมีผลพลอยได้คือก๊าซไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 เป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพที่ใช้แสง เนื่องจากสาหร่ายสายพันธุ์นี้ใช้เวลาของการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าสั้นที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส สาหร่ายที่อายุ 24 ชั่วโมง แสดงความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เหมาะสมเมื่อบ่มเซลล์ที่ 35 องศาเซลเซียส (รัตนลักษณ์และคณะ, 2556)

$$2\,H^{+} + 2\,e^{-} \xrightarrow{\text{Hydrogenase}} H_2 \qquad \text{สมการที่ 1}$$

จากสมการจะเห็นว่าการเพิ่ม H^+ จะได้ก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นโดยการควบคุม pH ที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อให้เกิดการแตกตัวให้ H^+

โครงการนี้ จึงมีความสนใจในการผลิตพลังงานไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp.CU2551 โดยการเพิ่มจำนวน H^+ จากการควบคุม pH ที่แตกต่างกัน แล้วนำสาหร่าย *Tetraspora* sp.CU2551 ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วง pH ที่แตกต่างกันมาศึกษาว่า pH ในช่วงใดที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาระบบการควบคุม pH เพื่อใช้ในการทดลอง

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตไฮโดรเจนตามช่วงเวลาต่าง ๆ ในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 การคัดช่วง (Screening) สาหร่ายที่ pH 3-12 เมื่อสาหร่ายสามารถเติบโตได้แล้วจึงนำไปใช้ในขั้นติดตามการเจริญเติบโต (Growth Phase) ต่อไป

1.3.2 การติดตามการเจริญเติบโต (Growth Phase) จะทำกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา 24 ชั่วโมงกับความขุ่นที่ 730 นาโนเมตร

1.3.3 การวัด H_2 (Production Phase) 2 แบบเพื่อเปรียบเทียบกัน

1.3.3.1 วัดแบบต่อเนื่อง โดยนำสาหร่ายเลี้ยงในอาหาร TAP 24 ชั่วโมงแล้วเติมกรดไฮโดรครอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ด้วยวิธีนับหยด นำไปไล่ออกซิเจนด้วยแก๊สอาร์กอนแล้ววัด H_2 ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC)

1.3.3.2 วัดแบบ Adaptation โดยเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอาหาร TAP ใหม่+กรดไฮโดรครอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ด้วยวิธีนับหยด บ่ม 4 ชั่วโมงและนำไปไล่ออกซิเจนด้วยแก๊สอาร์กอนวัด H_2 ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบช่วงของ pH ที่สามารถทำให้สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด

1.4.2 ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 เพื่อให้ได้พลังงานไฮโดรเจนที่เป็นพลังงานสะอาดเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงในอนาคตได้

1.4.3 ต่อยอดความรู้เพื่อให้ในอนาคตสามารถผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ได้สูงมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุด เป็นแก๊สไม่มีสีไม่มีกลิ่น พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น ในบรรยากาศมีแก๊สไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ส่วนในล้านส่วน (ppm) พลังงานพันธะสูงเท่ากับ 436 กิโลจูลต่อโมล ต้องใช้พลังงานสลายพันธะระหว่างอะตอมเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา เช่น เพิ่มอุณหภูมิ หรือใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น อะตอมไฮโดรเจนประกอบด้วยนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง ภายในนิวเคลียสจะประกอบด้วยโปรตอนและนิวตรอน และมีอิเล็คตรอนวิ่งรอบนอกเหมือนธาตุอื่นๆ ไฮโดรเจนมี 3 ไอโซโทปขึ้นอยู่กับจำนวนของโปรตอนและนิวตรอน คือโปรเตียม (Protium) มี 1 โปรตอนน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 1.0078 ดิวเทอเรียม (deuterium) มี 1 โปรตอน และ 1 นิวตรอนน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 2.0141 และตริเทียม (tritium) มี 1 โปรตอนและ 2 นิวตรอนน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 3.0161 (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557 ; เกรียงไกร, 2551)

ตารางที่ 2.1 แสดงการเปรียบเทียบไฮโดรเจนกับเชื้อเพลิงชนิดอื่น

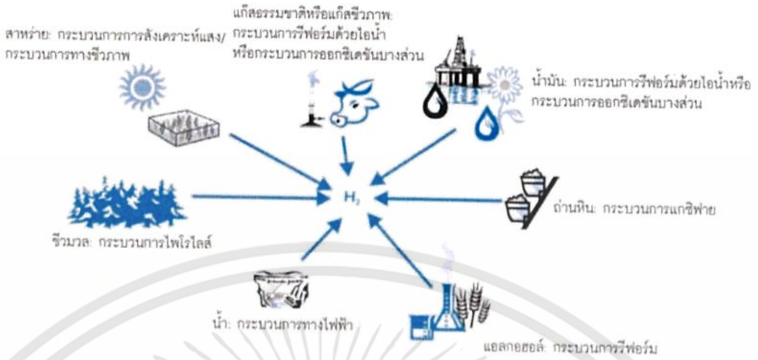
สมบัติทั่วไปของแก๊สไฮโดรเจน	
เลขอะตอม	1
พลังงานยึดเหนี่ยวอิเล็กตรอน (ionisation) ในสถานะพื้น	1312 kJ mol^{-1}
มวลโมเลกุล	2.016×10^{-3} kg mol^{-1}
ระยะทางเฉลี่ยระหว่างนิวเคลียส	0.074 nm
พลังงานการสลายพันธะ	436 kJ mol^{-1}
ความนำไอออนของไฮโดรเจนไอออนเจือจางในน้ำที่อุณหภูมิ 298 เคลวิน	0.035 $m^2 mol^{-1}\ \Omega^{-1}$
ความหนาแน่นที่ 101.33 กิโลปาสกาลและอุณหภูมิ 298 เคลวิน	0.084 kg m^{-3}
จุดหลอมเหลวที่ 101.33 กิโลปาสกาล	13.8 K
จุดเดือดที่ 101.33 กิโลปาสกาล	20.3 K
ความจุความร้อนที่ความดันบรรยากาศ และอุณหภูมิ 298 เคลวิน	14.3 kJ K^{-1} kg^{-1}
การละลายในน้ำที่ 101.33 กิโลปาสกาลและอุณหภูมิ 298 เคลวิน	0.019 $m^3 m^{-3}$

(ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การผลิตไฮโดรเจน (เกรียงไกร, 2551)

การผลิตไฮโดรเจน สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 เทคโนโลยีหลัก ได้แก่



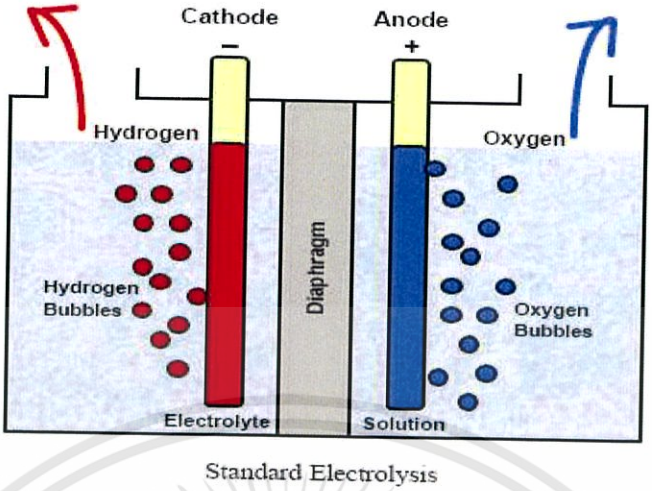
รูปที่ 2.1 การผลิตไฮโดรเจนจากสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ

(ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557)

2.2.1 **Thermo Process (กระบวนการความร้อน)** ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้โดยวิธีทางเคมีโดยใช้ความร้อน มีวัตถุดิบหลักที่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน ชีวมวล เป็นต้น ผลลัพธ์ที่ได้คือก๊าซสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย ไฮโดรเจน (H_2), คาร์บอนมอนนอกไซด์ (CO) คาร์บอนมอนนอกไซด์ (CO_2) น้ำ (H_2O) และมีเทน (CH_4) จากนั้นจะผ่านกระบวนการเพิ่มเติมเพื่อทำให้ได้ไฮโดรเจนที่บริสุทธิ์ขึ้น ซึ่งการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการความร้อนเคมี ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (Steam Reforming) กระบวนการแก๊สซิฟิเคชั่น (Gasification) ปัจจุบันการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำจากก๊าซธรรมชาติ เป็นกระบวนการที่ใช้กันแพร่หลายในเชิงพาณิชย์ ซึ่งในประเทศไทยใช้กระบวนการนี้ในการผลิตไฮโดรเจนเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่างๆ

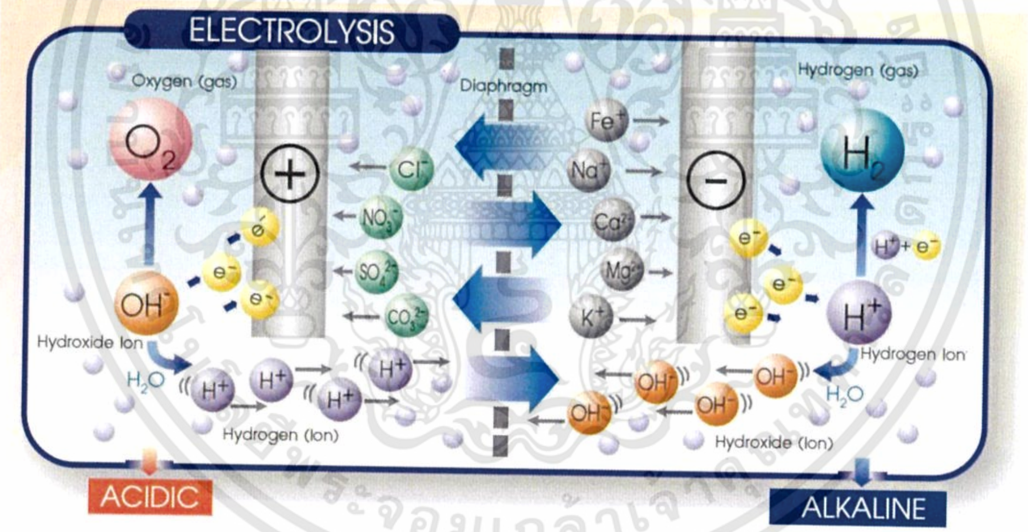
2.2.2 **Electrolytic Process (กระบวนการไฟฟ้า)** เป็นการใช้ไฟฟ้าเพื่อแยกน้ำเพื่อให้ได้ไฮโดรเจนและออกซิเจน โดยไฟฟ้าที่มาจากแหล่งกำเนิดไฟฟ้าทุกชนิดสามารถใช้ได้กับกระบวนการนี้ ไม่ว่าจะเป็นไฟฟ้าจากแหล่งพลังงานหมุนเวียน รวมทั้งจากพลังงานนิวเคลียร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 Standard Electrolysis

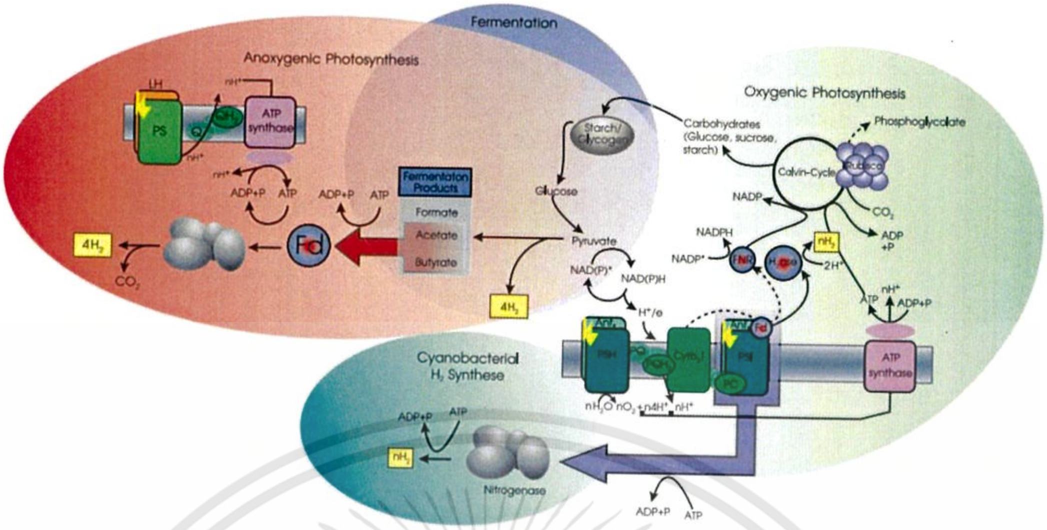
(ที่มา: http://www.greencarcongress.com/2004/11/milestone_for_h.html)



รูปที่ 2.3 การเคลื่อนที่ของไอออน และการเกิดปฏิกิริยาในการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า
(ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557)

2.2.3 **Biophotolysis Process (กระบวนการชีวเคมี)** กระบวนการนี้เป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยการใช้พลังงานแสงอาทิตย์เพื่อแยกน้ำเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน มีการใช้แสงแดดและกระบวนการทางชีวภาพของสาหร่ายเซลล์เดียวและแบคทีเรียในการแยกน้ำให้ เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน

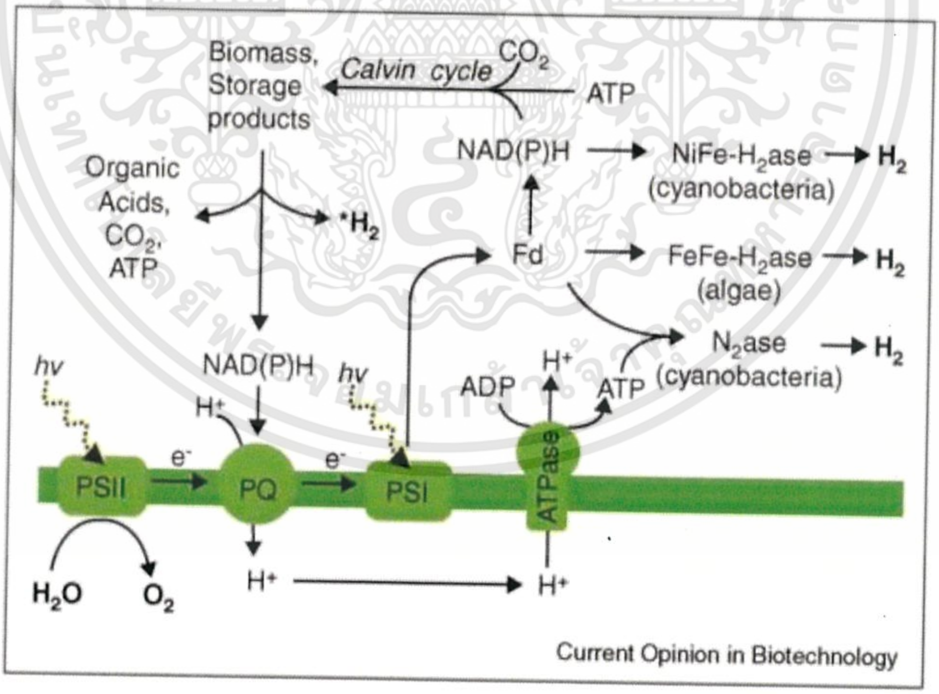
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

(ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557)

2.3 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวโดยการสังเคราะห์แสง



รูปที่ 2.5 ผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวโดยการสังเคราะห์แสง

(ที่มา: Current Opinion in Biotechnology 2010, 21:245)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

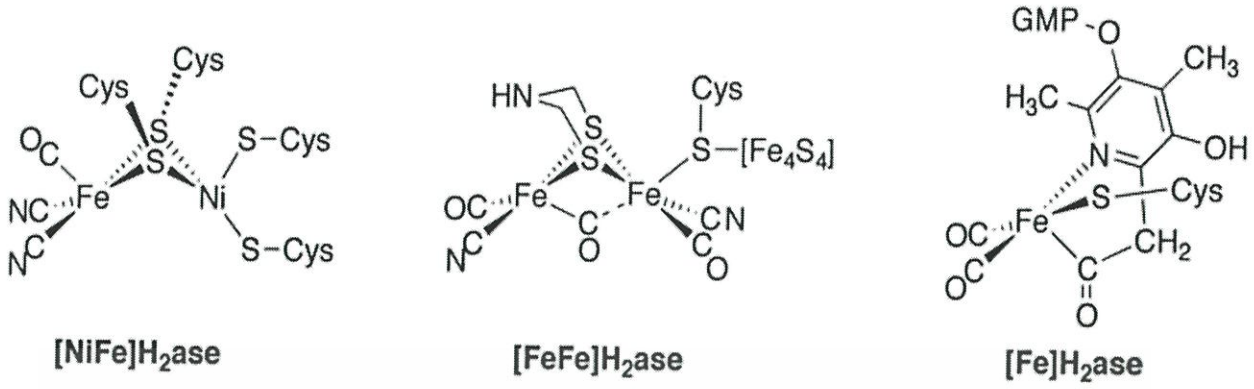
ในการสังเคราะห์แสงเพื่อผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวนั้นจะเกิดขึ้นที่ไทลาคอยด์ ที่ใช้รับพลังงานจากแสงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง สร้างขึ้นจากส่วนหนึ่งของเยื่อหุ้มชั้นในของคลอโรพลาสต์ (inner membrane) บนเยื่อหุ้มของไทลาคอยด์ นอกจากจะมีสารสีที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง คือ ระบบแสง II (photosystem II) มีองค์ประกอบสำหรับนำอิเล็กตรอน ระบบไซโตโครม (cytochrome system) ทำหน้าที่ช่วยปั๊มโปรตอนเข้ามาในไทลาคอยด์ มีระบบไซโตโครม และระบบแสง I (photosystem I) มีองค์ประกอบที่ช่วยในการสร้าง NADPH โดยเริ่มจากอิเล็กตรอนของระบบแสง II (photosystem II) ถูกกระตุ้นด้วยแสง ทำให้น้ำถูกออกซิไดซ์เป็นออกซิเจน จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกโอนไปยัง photosystem I (PSI) ผ่านพลาสโตคิวโนน (plastoquinone pool (PQ)) ระบบแสง I (photosystem I) จะถ่ายโอนอิเล็กตรอนไปยัง Ferredoxin (Fd) ซึ่งสามารถให้อิเล็กตรอนกับเอนไซม์ FeFe-hydrogenase (H_2ase) อิเล็กตรอน fd ยังสามารถถูกถ่ายโอนไป $NAD(P)^+$ โดยเอนไซม์ Fd oxidoreductase และสามารถนำมาใช้ตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ในกระบวนการชีวสังเคราะห์สังเคราะห์ (biosynthetic precursors) และสารชีวมวลผ่าน (Biomass) Calvin cycle *สารชีวมวลยังสามารถใช้กระบวนการหมักเพื่อให้อิเล็กตรอนในการผลิต H_2 (indirect photolysis) ในสาหร่าย NAD(P)H ให้อิเล็กตรอนไปยัง PSI เพื่อที่ใช้ในเอนไซม์ FeFe-hydrogenase และผลิตไฮโดรเจนต่อไป

2.4 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว

เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันย้อนกลับ (reversible oxidation) ของแก๊สไฮโดรเจน มีความสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมไฮโดรเจนในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียว (green algae) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) โครงสร้างทั่วไปประกอบด้วยคลัสเตอร์เหล็ก-ซัลเฟอร์ (Fe-S cluster) เชื่อมพันธะกับกรดอะมิโน เช่น ซีสเตอีน (cysteine) และลิแกนอื่นๆ แบ่งเป็นสามกลุ่มใหญ่ตามชนิดของโลหะแกน ได้แก่ [NiFe] [FeFe] และ [Fe] ไฮโดรจีเนสสามารถรีดิวซ์โปรตอน (proton, H^+) เป็นโมเลกุลไฮโดรเจน (H_2) ดังสมการข้างล่างนี้

$$2\,H^+ + 2\,e^- \xrightarrow{\text{Hydrogenase}} H_2 \qquad \text{สมการที่ 1}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ NiFe-hydrogenase FeFe-hydrogenase และ Fe-hydrogenase ตามลำดับ

(ที่มา: Current Opinion in Biotechnology, 2010)

2.5 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายในดิวิชั่นนี้มีสีเขียวเหมือนหญ้า ส่วนประกอบของรงควัตถุจะเป็นเช่นเดียวกับที่พบในพืชชั้นสูง คือ มีคลอโรฟิลล์ เอ มีคลอโรฟิลล์ บี แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ สาหร่ายสีเขียวเป็นพวกที่พบทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และทะเล หรือแม้แต่บนดินก็ขึ้นอยู่ได้ ขนาดมีตั้งแต่เล็กมากซึ่งประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียวไปจนถึงขนาดใหญ่มีลักษณะเป็นต้นหรือทัลลัส พวกที่มีขนาดเล็กมักอยู่ในลักษณะเป็นแพลงค์ตอนส่วนพวกที่มีขนาดใหญ่จะมีที่ยึดเกาะ (อักษร, 2549) วัฏจักรชีวิตของสาหร่ายสีเขียวมี 2 แบบ คือ แบบแฮพลินติก (haplontic type) เป็นการลดจำนวนโครโมโซมซึ่งเกิดในระยะไซโกตแบ่งตัวเพื่อสร้างสปอร์ วัฏจักรนี้พบใน Order Volcales และแบบดิบพลอนติก (diprontic type) เป็นการเพิ่มจำนวนโครโมโซมซึ่งเกิดในระยะสร้างแกมมีท วัฏจักรนี้พบในบางสกุลของ Order Chlorococcales การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวมีทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการรวมกันของแกมมีท ซึ่งมีทั้งแบบ isogamy, anisogamy และ oogamy ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยไม่เพศมีทั้งการแบ่งเซลล์ สร้างสปอร์และสร้างอะคินีต (akinete) (ยุวดี, 2546)

2.6 สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

เมื่อจำแนกสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ผลการยืนยันจากการหาลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน *18S* rDNA พบว่าสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 จัดอยู่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kingdom Plantae

Phylum Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Chlamydomonadales

Family Tetrasporaceae

Genus Tetraspora

Tetraspora sp. CU2551 มีความสัมพันธ์อย่างใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวสายพันธุ์อื่น เช่น *Tetraspora* sp TSU83121, *Nanoscyph Tetraspora* AF006314 และ *Tetraspora discoidea* AF306793 เป็นต้น (Maneeruttanarungroj, 2010)

2.7 pH

pH (Potential of Hydrogen ion) เป็นค่าที่แสดงความเป็นกรด-ด่าง จากปฏิกิริยาของไอออนของไฮโดรเจน (H^+) ซึ่งมีช่วงตั้งแต่ 0-14 โดยค่าพีเอชที่เท่ากับ 7 ถือว่ามีสภาวะเป็นกลาง ถ้าต่ำกว่า 7 มีสภาวะเป็นกรด และถ้ามากกว่า 7 มีสภาวะเป็นเบส สามารถทดสอบได้หลายวิธีทั้งการใช้กระดาษลิตมัสทดสอบด้วยการเปลี่ยนสี หรือเครื่องพีเอชมิเตอร์ (สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2559)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Dubini (2011) ได้สนใจสาหร่ายน้ำจืดเซลล์เดี่ยว *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งเป็นต้นแบบสำหรับการศึกษาการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพในสาหร่ายสีเขียว เพราะว่ามีลำดับสาย DNA มีข้อมูลทางชีวภาพเช่น EST และมีวัฏจักรการสืบพันธุ์ที่ไม่ซับซ้อนทำให้สามารถยีนส์ได้ง่ายที่หลากหลายจีโนไทป์ ดังนั้นสาหร่าย *Chlamydomonas* จึงเป็นต้นแบบที่ดีซึ่งมีข้อมูลเกี่ยวกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจน เอทานอล และไขมัน ไว้เป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยที่เมตาบอลิซึมของไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียวสามารถกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีทางชีวภาพที่ใช้แสง โดยใช้กลไกของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงระบบแสงที่ 2 (PSII) และระบบแสงที่ 1 (PSI) โดยการสลายน้ำและส่งอิเล็กตรอนไปให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (HYD) ซึ่งจะปล่อยก๊าซไฮโดรเจนออกมา โดยมีออกซิเจนเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดนจีเนส ซึ่งในสภาวะที่ขาดซัลเฟอร์จะเลี่ยงการเกิดออกซิเจนได้

Maneeruttanarungroj el al. (2010) กล่าวไว้ว่าสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่พบใหม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ถูกคัดแยกมาจากบ่อน้ำจืดในจังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงสาหร่ายนี้ถูกระบุว่าเป็นที่อยู่ในสกุล *Tetraspora* ผลการยืนยันจากการหาลำดับเบสดีเอ็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอของยีน 18S rDNA เผยว่าสาหร่ายสีเขียวระบุว่าเป็น *Tetraspora* sp. CU2551 มีความสัมพันธ์อย่างใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวสายพันธุ์อื่น ๆ *Tetraspora* sp. CU2551 มีเวลาของการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าสั้นที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ภายใต้ความเข้มแสง 48-92 μE/m^2/s และอุณหภูมิ 36 ^{0}C การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นด้วยค่า pH เพิ่มขึ้นจาก 5.75 ไป 9.30 การผลิตลดลงอย่างมากเมื่อลด pH ถึง 5.25 การเติม 0.5 mM ของ b-mercaptoethanol ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP จะกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนประมาณสองเท่า ในระหว่างขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจนถ้าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ขาดไนโตรเจนและซัลเฟอร์ทั้งสองอย่างมีผลในการเพิ่มขึ้นประมาณ 50% ในการผลิตไฮโดรเจน จากผลนี้จะได้ตรงกันข้ามถ้าขาดแหล่งไนโตรเจนหรือซัลเฟอร์เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งซึ่งจะส่งผลให้เซลล์ผลิตก๊าซในอัตราเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย การกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจน 0.5 mM b-mercaptoethanol ภายใต้เงื่อนไขการขาดทั้งแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์จะเกิดขึ้นเมื่อความเข้มแสงไม่เกิน 5 μE/m^2/s หากแสงเข้มขึ้นจะไม่ส่งผลให้ความข้นสูงขึ้นตาม จากการคำนวณได้ค่าอัตราการผลิตสูงสุดได้ประมาณ 17.3-61.7 μmol/mg Chl a/h เป็นอัตราการผลิตสูงมากเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวอื่น ๆ และทำให้ *Tetraspora* sp. CU2551 เป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจสำหรับการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีชีวภาพที่ใช้แสง

James B McKinlay และ Caroline S Harwood (2010) กล่าวไว้ว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ (PNSB) สามารถสังเคราะห์แสงแบบไม่ใช้ออกซิเจนเพื่อผลิตไฮโดรเจนได้ โดย PNSB สามารถรับอิเล็กตรอนจากกระบวนการหมัก ซึ่งได้จากผลผลิตทางการเกษตรและเศษอาหาร (เช่น acetate และ butyrate) และน้ำตาล อีกทั้ง PNSB สายพันธุ์ Rhodopseudomonas palustris ยังสามารถใช้สารประกอบอะโรมาติก (เช่น lignin monomer) ออกซิไดซ์สารตั้งต้นอินทรีย์อย่างสมบูรณ์ได้ชีวมวล H_2 และ CO_2 ออกมา และได้ผลผลิต H_2 สูงสุดใกล้เคียงกับทฤษฎี (โมล H_2 ต่อโมลสารตั้งต้น) ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจไม่มีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่จะเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาทางชีวภาพ เนื่องจากสารตั้งต้นอินทรีย์แต่เดิมได้มาจากการตรึง CO_2 โดยพืชสีเขียว แต่การผลิตไฮโดรเจนจากการสังเคราะห์แสงแบบไม่ใช้ออกซิเจนนั้นสามารถปล่อยคาร์บอนออกมาชดเชยในวัฏจักรได้ และ PNSB อีกหลายตัวยังสามารถออกซิไดซ์สารตั้งต้นอนินทรีย์เช่น $S_2O_3^{2-}$ H_2S หรือ Fe^{2+} เพื่อให้ได้อิเล็กตรอนในการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองนี้คือ สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551. ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ (เชิดศักดิ์, 2554) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงสาหร่าย

3.2.1.1 อาหารเหลว TAP (Tris Acetate Phosphate medium)(ภาคผนวก ก)

3.2.1.1.1 Tris (Analytical grade, Carlo Erba Reagent)

3.2.1.1.2 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.1.3 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.1.4 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)(Analytical grade, Ajax Finechem Pty Ltd)

3.2.1.1.5 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.1.6 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.1.7 เอทธิลีนไดอะมีนอะซิติคไดโซเดียม ($Na_2EDTA.2H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.1.8 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($ZnSO_47H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.1.9 กรดบอริก (H_3BO_3)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.1.10 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCL_2.4H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.1.11 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.1.12 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$)(Analytical grade, Carlo Erba Reagent)

3.2.1.1.13 คอปเปอร์(II)ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.1.14 แอมโมเนียมเฮปตะโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.1.15 กรดอะซิติกเข้มข้น (CH_3COOH conc.)(Analytical grade, Reagents Duksan)

3.2.1.1.16 น้ำกลั่น

3.2.1.2 อาหาร TAP-tris (ภาคผนวก ก)

3.2.1.2.1 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.2.2 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.2.3 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)(Analytical grade, Ajax Finechem Pty Ltd)

3.2.1.2.4 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.2.5 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.2.6 เอทธิลีนไดอะมีนอะซิติคไดโซเดียม ($Na_2EDTA.2H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.2.7 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($ZnSO_47H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.2.8 กรดบอริก (H_3BO_3) (Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.2.9 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCL_2.4H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.2.10 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.2.11 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$)(Analytical grade, Carlo Erba Reagent)

3.2.1.2.12 คอปเปอร์(II)ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.2.13 แอมโมเนียมเฮปตะโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.1.2.14 กรดอะซิติกเข้มข้น (CH_3COOH conc.)(Analytical grade, Reagents Duksan)

3.2.1.2.15 น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การปรับ pH

3.2.2.1 Universal Buffer (ภาคผนวก ข)

3.2.2.1.1 กรดอะซิติก (CH_3COOH)(Analytical grade, Reagents Duksan)

3.2.2.1.2 กรดบอริก (H_3BO_3)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.2.1.3 กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.2.1.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.2.1.5 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.2.2 วิธีการนับหยดด้วยกรดไฮโดรครอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์

3.2.2.2.1 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.2.2.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)(Analytical grade, Loba Chemie)

3.2.3 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน

3.2.3.1 ก๊าซอาร์กอน

3.2.3.2 4% ไฮโดรเจนในก๊าซอาร์กอน

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 ไมโครปิเปต (Micropipette) Rainin รุ่น Pipet-Lite XLS

3.3.2 ทิปขนาดต่างๆ

3.3.3 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop Inculate)

3.3.4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Balance) Mettler Toledo รุ่น ML204

3.3.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) Heraeus Megafuge 8R

3.3.6 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) JSCB-1200SB

3.3.7 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

3.3.8 เครื่องวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซ (Gas Chromatograph) Hewlett Packard รุ่น5890 Series II

3.3.9 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Thermo Scient รุ่น Evolution 201

3.3.10 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incibator shaker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.11 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Auto Crave) JSAC-60

3.3.12 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)

3.3.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.4 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

3.4.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบริสุทธิ์

นำสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งด้วยวิธี Streak plate technique โดยทำในตู้ถ่ายเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส และความเข้มแสงที่ 48-92 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 3-5 วัน เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

3.4.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น (Starter culture)

นำสาหร่ายโคโลนีเดี่ยว 3-5 โคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งมาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส และความเข้มแสงที่ 48-92 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นนำสาหร่ายที่ได้เทใส่หลอดเซนติฟิวขนาด 50 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนที่ใสทิ้งจะได้สาหร่ายหัวเชื้อเริ่มต้น (Starter culture) แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร โดยปิเปตสาหร่ายมา 10 ไมโครลิตรผสมกับน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร (เจือจาง 100 เท่า) ใส่ในไมโครเซนติฟิวขนาด 1 มิลลิลิตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวนหาค่าความขุ่นของสาหร่าย (OD_{730}) เพื่อเก็บไว้ใช้งาน

3.5 การคัดช่วง (Screening)

ทำการเลี้ยงสาหร่ายโดยกำหนดค่าความขุ่น (OD_{730}) เริ่มต้นของสาหร่ายอยู่ที่ 0.01 แล้วนำสาหร่ายมาเลี้ยงภายใต้การควบคุมค่า pH ที่ 3-12 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TAP โดยมีการควบคุม pH อยู่ 3 แบบ คือ

3.5.1 TAP-tris 25 มิลลิลิตรผสมกับ Universal Buffer 25 มิลลิลิตร

3.5.2 TAP 25 มิลลิลิตรผสมกับ Universal Buffer 25 มิลลิลิตร

3.5.3 TAP 50 มิลลิลิตรผสมกับกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์

แล้วนำไปบ่มที่เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส และความเข้มแสงที่ 48-92 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยทำการถ่ายภาพการเจริญเติบโตของสาหร่ายไว้ทุก ๆ 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียม 1) TAP-tris 25 mL + Universal Buffer 25 mL หรือ
2) TAP 25 mL + Universal Buffer 25 mL หรือ
3) TAP 50 mL + HCl/NaOH ที่ pH 3 ถึง 12 ลงในแต่ละฟลาสก์

↓

แต่ละฟลาสก์ใส่ Ampicillin 20 μg/mL และค่าความขุ่นสาหร่ายเริ่มต้น OD_{730} = 0.01

↓

นำไปเลี้ยงโดยการเขย่าที่ 36°c ความเข้มแสง 48-92 μE/m^2/s ความเร็ว 140 rpm โดยนำมาถ่ายภาพทุกๆ 24 ชม. เป็นเวลา 72ชม.

3.6 การวัดการเจริญเติบโต (Growth Phase)

ทำการเลี้ยงสาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตในช่วง pH ที่ผ่านการคัดช่วง (Screening) ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TAP 20 มิลลิลิตรจำนวน 3 ซ้ำ โดยทำการหยดกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ได้ค่า pH 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 และตัวควบคุม (Control) ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส และความเข้มแสงที่ 48-92 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตรทุก ๆ 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 54 ชั่วโมง

เตรียมอาหาร TAP 50 mL + Amplicillin 20 μg/ml ปรับ pH 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 และ Control ด้วย HCl/NaOH ลงในแต่ละฟ

↓

เติมสาหร่ายโดยให้มีค่าความขุ่นเริ่มต้น OD_{730} = 0.01 นำไปเลี้ยงโดยการเขย่าที่ 36°c ความเข้มแสง 48-92 μE/m^2/s ความเร็ว 140 rpm โดยนำมาวัดค่า UV ทุกๆ 6 ชม. เป็นเวลา 54 ชม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 วิธีการวัดไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

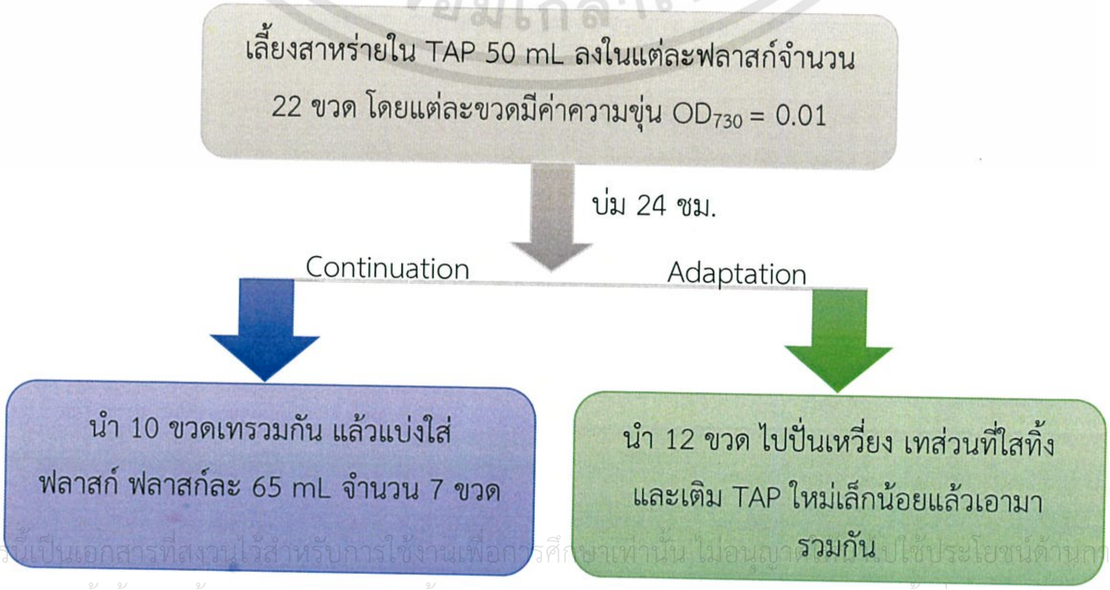
ทำการเลี้ยงสาหร่ายโดยกำหนดค่าความขุ่น (OD_{730}) เริ่มต้นของสาหร่ายอยู่ที่ 0.01 แล้วนำสาหร่ายมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TAP 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ 100 มิลลิลิตรจำนวน 22 ขวด แล้วนำไปบ่มที่เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส และความเข้มแสงที่ 48-92 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการวัดปริมาณไฮโดรเจน 2 แบบ คือ

3.7.1 การวัดแบบต่อเนื่อง (Continuation)

นำสาหร่ายที่บ่มมาแล้ว 24 ชั่วโมงจากข้างต้นจำนวน 10 ขวดมาเทรวมกันแล้วแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ 7 ขวด ขวดละ 65 มิลลิลิตร แต่ละขวดปรับค่า pH 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 และตัวควบคุม (Control) ซึ่งคือ TAP ตามลำดับด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นแบ่งใส่ขวดไวแอล (Vial) ขนาด 120 mL ขวดละ 20 มิลลิลิตรจำนวน 3 ซ้ำ ปิดด้วยจุกยางล็อคฝาด้วยอลูมิเนียม ไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซอาร์กอน 10-15 นาทีก่อนนำไปบ่มที่เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส และความเข้มแสงที่ 48-92 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 53 ชั่วโมง โดยนำเซลล์ในแต่ละช่วงเวลามาวัดปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) ที่มี Thermal conductivity detector (TCD)

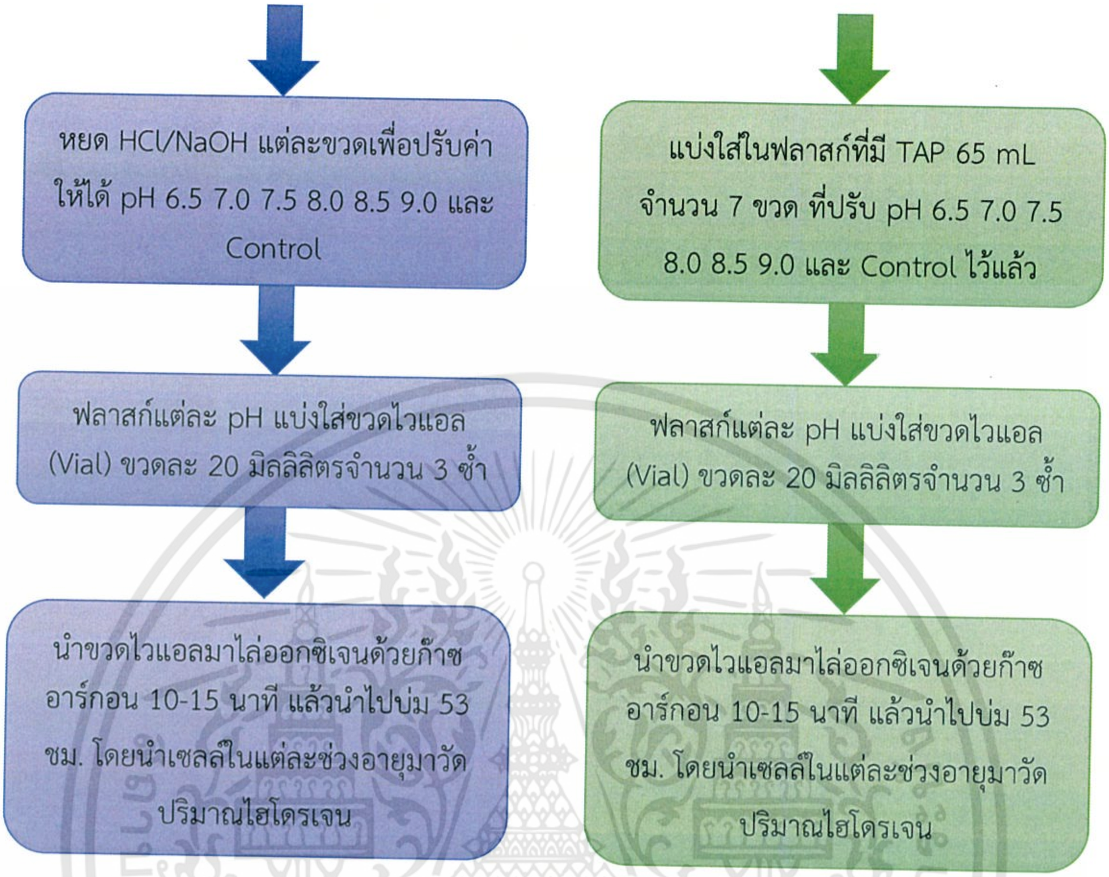
3.7.2 การวัดแบบเปลี่ยนอาหาร (Adaptation)

นำสาหร่ายที่บ่มมาแล้ว 24 ชั่วโมงจากข้างต้นจำนวน 12 ขวดมาเทใส่หลอดเซนติฟิวขนาด 50 มิลลิลิตรก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนที่ใสทิ้งและเติม TAP ใหม่เล็กน้อยแล้วเอามารวมกัน แบ่งสาหร่ายใส่ขวดรูปชมพู่ 7 ขวดอย่างละเท่า ๆ กันแล้วเติม TAP ปริมาตร 65 มิลลิลิตรที่มีการปรับค่า pH 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 และตัวควบคุม (Control) ซึ่งคือ TAP ตามลำดับด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้ว จากนั้นแบ่งใส่ขวดไวแอล (Vial) ขวดละ 20 มิลลิลิตรจำนวน 3 ซ้ำ ไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซอาร์กอน 10-15 นาทีก่อนนำไปบ่มที่เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส และความเข้มแสงที่ 48-92 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 53 ชั่วโมง โดยนำเซลล์ในแต่ละช่วงเวลามาวัดปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) ที่มี Thermal conductivity detector (TCD)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



3.8 การวัดปริมาณไฮโดรเจน

นำแก๊สบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) มาวัดปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) เทียบกับแก๊สอาร์กอน สภาวะที่ใช้ในการวัดปริมาณไฮโดรเจนแสดงในตารางที่ 3.8 แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวนหาปริมาณไฮโดรเจนด้วยวิธีตามภาคผนวก ค

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สด้วยเครื่อง Gas Chromatography

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Column	Pack column 2 m; Molecular sieve 13x
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Temperature Program	· Injector temperature : 100 °C · Column temperature : 50 °C · Detector temperature : 100 °C
Carrier gas	Argon 99.99% purity (flow rate 70-80 mL/min)
Standard	4% H_2 in Ar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

149338

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

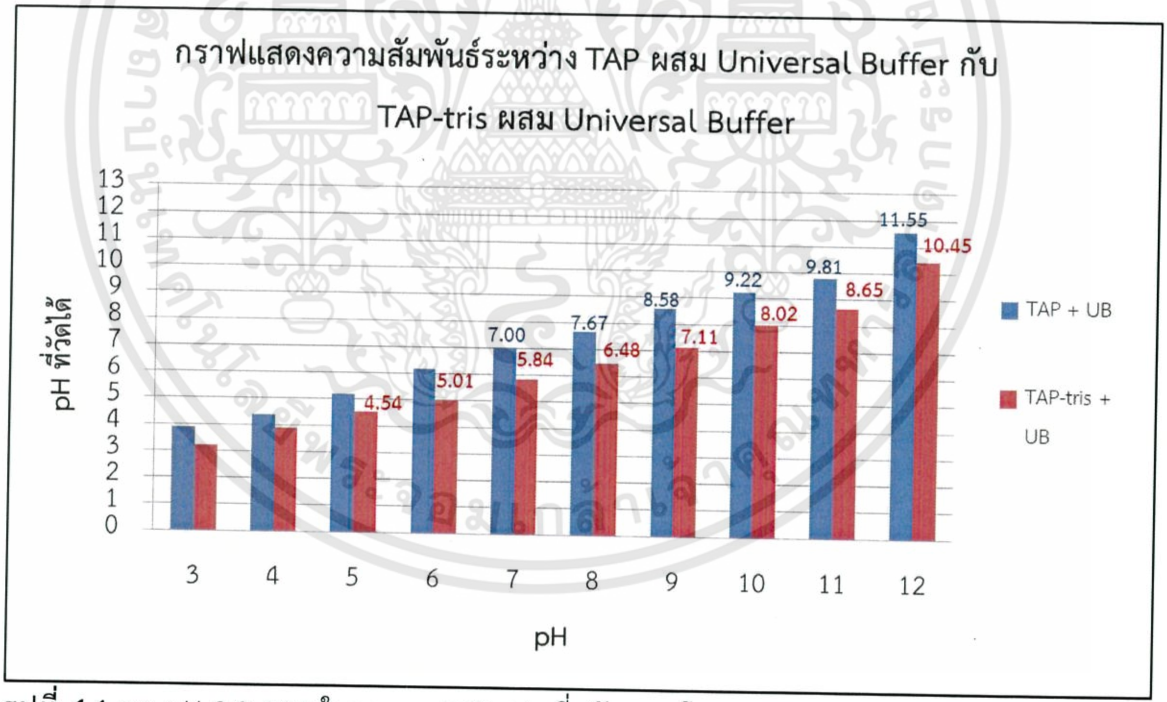
การศึกษาครั้งนี้ต้องการดูผลของ pH ต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยอยู่บนสมมุติฐานจาก

$$2\,H^{+} + 2\,e^{-} \xrightarrow{\text{Hydrogenase}} H_2$$ สมการที่ 1

คาดว่าการปรับปริมาณไฮโดรเจนผ่านการปรับ pH จะมีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนเช่นกัน

4.1 ระบบควบคุม pH

ในการทดลองได้ควบคุม pH ด้วยระบบ Universal Buffer (UB) เนื่องจากค่า pka สามารถครอบคลุมช่วง pH ที่ต้องการได้ โดยเลือกใช้อาหาร TAP จากงานวิจัยของ Maneeruttanarungroj et al., 2010 แต่ในอาหาร TAP มี Buffer อยู่คือ tris ซึ่งคาดว่าสารดังกล่าวจะไปรบกวนระบบ UB จึงเลือกใช้อาหาร TAP ปราศจาก tris (TAP-tris) ทำการทดลองควบคู่ไปด้วย ปรากฏว่าเมื่อนำ UB มาผสมกับอาหารทั้งสองแบบจะได้ pH ดังรูปที่ 4.1

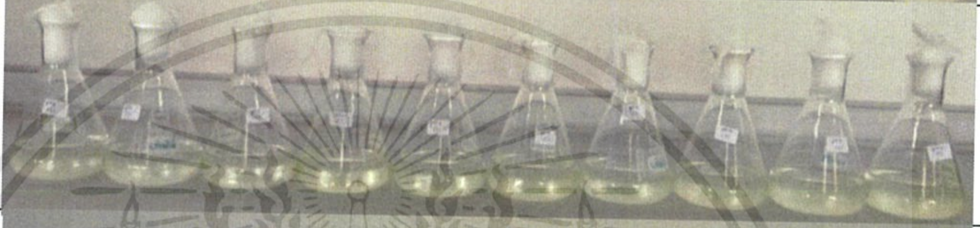
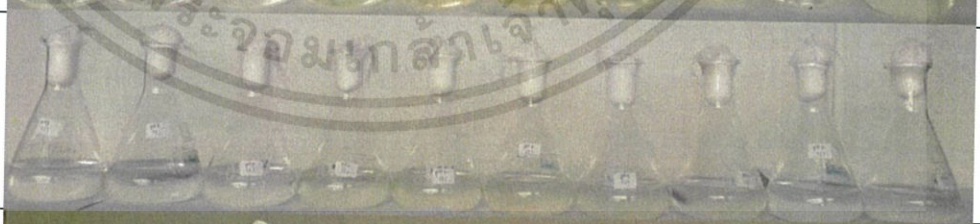


รูปที่ 4.1 ผล pH 3.0-12.0 ในอาหาร TAP-tris ที่ปรับ pH โดย Universal Buffer และ pH 3.0-12.0 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH โดย Universal Buffer

จากรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าการควบคุม pH ในอาหาร TAP-tris ที่ผสม UB ไม่สามารถควบคุม pH ที่ต้องการได้จึงเลือกศึกษาการควบคุม pH ในอาหาร TAP ที่ผสม UB ต่อมาเมื่อนำมาเลี้ยงสาหร่ายพบว่าสาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจาก UB เป็นสารที่มีอยู่ใน TAP การเติม UB จึงทำให้สารอาหารที่สาหร่ายได้รับมีมากเกินไปดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการคัดช่วงที่ pH 3-12 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH โดย Universal Buffer (2 ซ้ำ)

เวลา (ชั่วโมง)		ภาพสาหร่าย
0	1	
	2	
24	1	
	2	
48	1	
	2	
72	1	
	2	

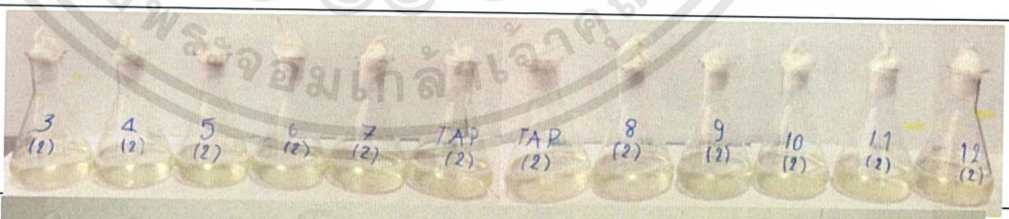
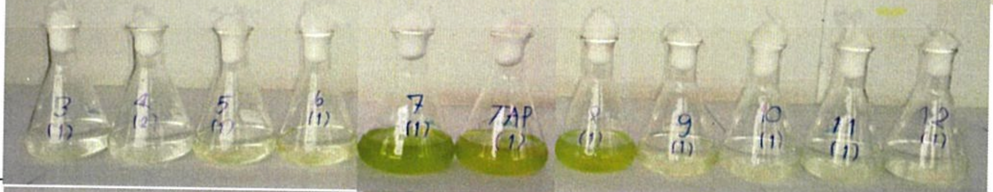
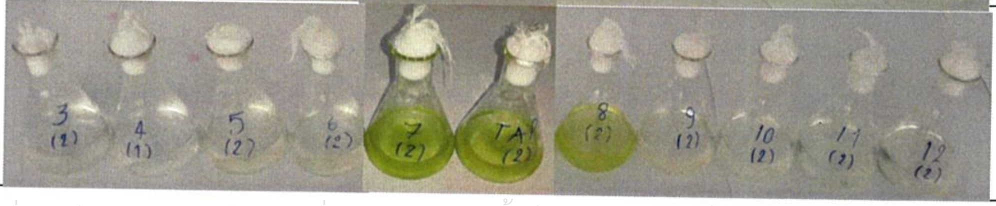
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ pH 3-12 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH โดย Universal Buffer สาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และมีแบคทีเรียขึ้นที่ pH 6.0-8.0 ดังนั้นจึงเลือกควบคุม pH ด้วยกรดไฮโดรครอลิก (HCl) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ผลปรากฏว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดังนั้นจึงใช้ระบบที่ควบคุม pH ด้วยกรดไฮโดรครอลิก (HCl) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ตลอดการศึกษาครั้งนี้

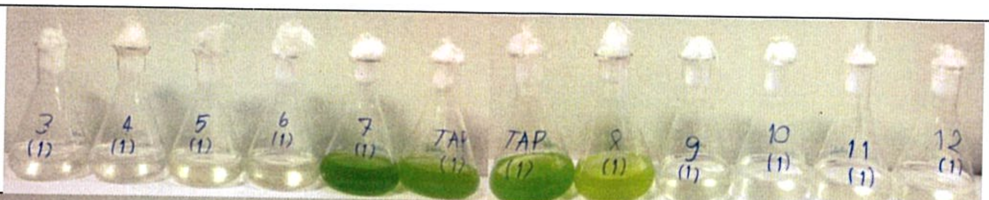
4.2 ผลการคัดช่วง (Screening) ของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

ช่วง pH น่าจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายจึงได้ทดสอบการเจริญเติบโตของสาหร่ายในช่วง pH 3.0-12.0 ด้วยระบบการควบคุม pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ความขุ่น OD_{730} = 0.01 ในอุณหภูมิ 36 °C เขย่าที่ 140 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 48-92 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการถ่ายรูปทุก 24 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญเติบโตอย่างคร่าว ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ผลการคัดช่วงที่ pH 3.0-12.0 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์

ตารางที่ 4.2 ผลการคัดช่วงที่ pH 3.0-12.0 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH โดยการนับหยดด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (2 ซ้ำ)

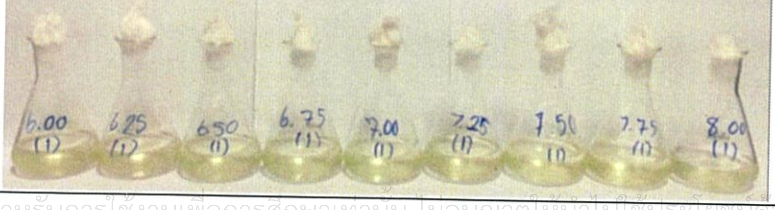
เวลา (ชั่วโมง)	ชุดที่	ภาพสาหร่าย
0	1	
	2	
24	1	
	2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

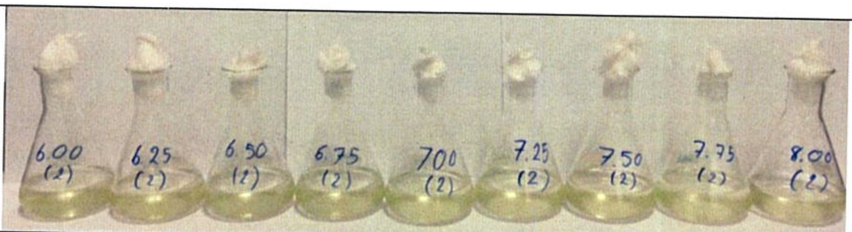
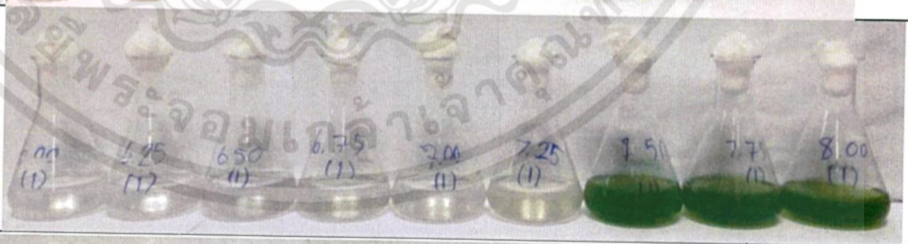
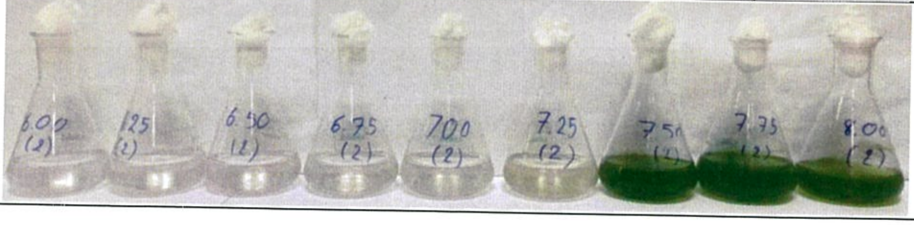
48	1	
	2	
72	1	
	2	

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ pH 3.0-12.0 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (2 ชุด) สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่ pH 7.0 และ 8.0 จึงได้แปรค่า pH ให้แคบโดยทำที่ pH 6.0-8.0 โดยเพิ่มขึ้นทีละ 0.25 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย ผลดังตารางที่ 4.3 ผลการคัดช่วงที่ pH 6.0-8.0 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ สาหร่ายสามารถโตได้ดีที่ pH 7.5-8.0 ซึ่งไม่ตรงกับผลในเบื้องต้นว่า pH 7.0 ควรจะเจริญเติบโตได้จึงทำการทกลองซ้ำอีกครั้ง เพื่อสร้างความคลออบคลุมจึงเลือกช่วง pH 6.0-9.0 โดยเพิ่มขึ้นทีละ 0.25 ผลดังตารางที่ 4.4 ผลการคัดช่วงที่ pH 6.0-9.0 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะเห็นว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งหมดใน 48 ชั่วโมง แต่จะเริ่มตายในช่วง pH 8.5 เป็นต้นไปในชั่วโมงที่ 72

ตารางที่ 4.3 ผลการคัดช่วงที่ pH 6.0-8.0 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH โดยการนับหยดด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (2 ซ้ำ)

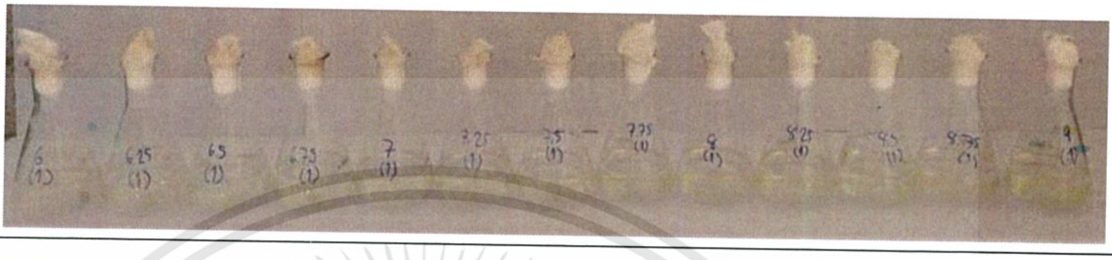
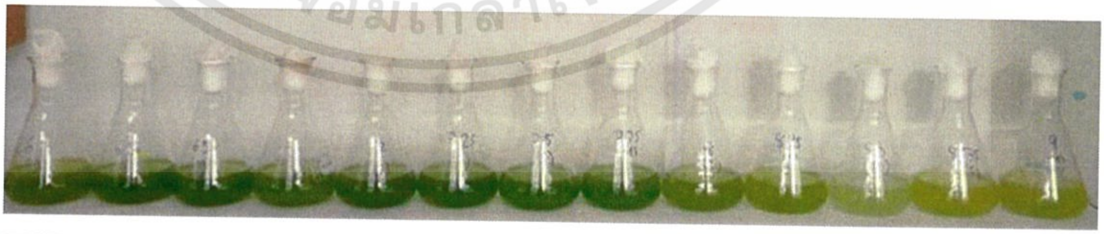
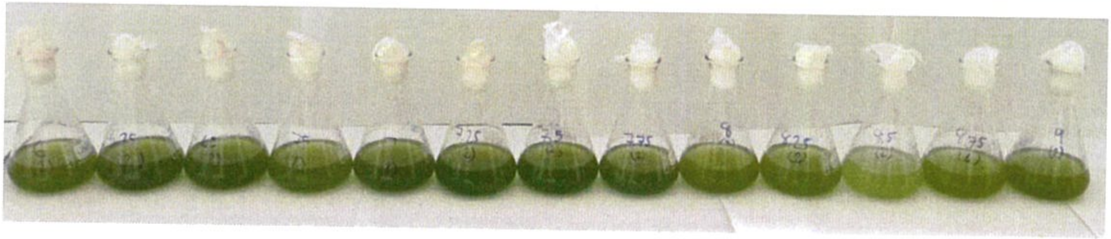
เวลา (ชั่วโมง)	ชุดที่	ภาพสาหร่าย
0	1	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

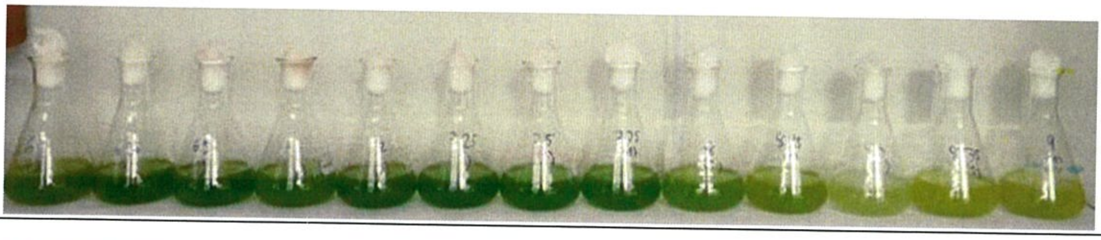
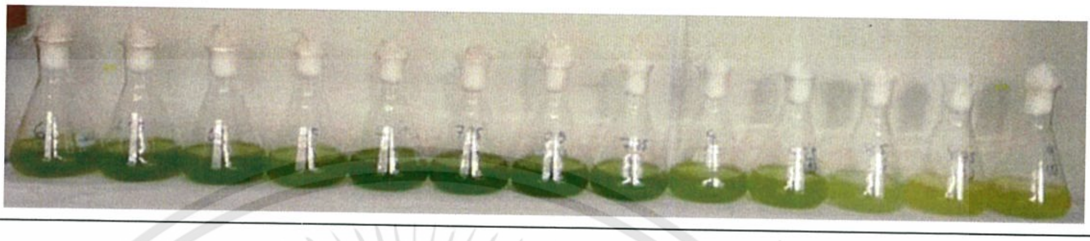
	2		
24	1		
	2		
48	1		
	2		
72	1		
	2		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการคัดช่วงที่ pH 6.0-9.0 ในอาหาร TAP ที่ปรับ pH โดยการนับหยดด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์

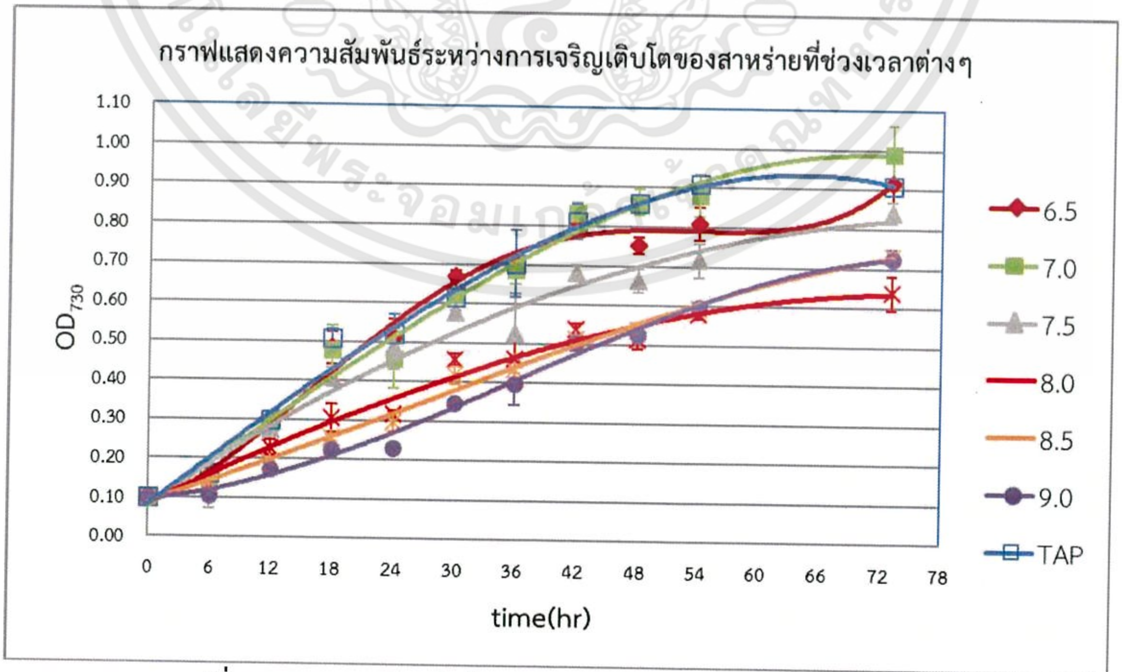
เวลา (ชั่วโมง)	ชุดที่	ภาพสาหร่าย
0	1	
	2	
24	1	
	2	
48	1	
	2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

72	1	
	2	

4.3 การวัดการเจริญเติบโต (Growth Phase)

จากหัวข้อ 4.2 ผลการคัดช่วง (Screening) ของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 จะเห็นว่าสาหร่ายเติบโตได้ที่ช่วง pH 6.0-8.25 แต่เนื่องจากมีแบคทีเรียขึ้นที่ pH 8.5-9.0 จึงเพิ่มวัดการเจริญเติบโตที่ pH 8.5 และ 9.0 ด้วย และปรับ pH โดยการนับหยดด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นติดตามผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 โดยทำการเลี้ยงแล้วนำสาหร่ายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตรทุก ๆ 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 54 ชั่วโมง โดยค่าความขุ่น (OD_{730}) เริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 อยู่ที่ 0.01 และทำการเลี้ยงต่อไปจนถึง 73 ชั่วโมงจะเห็นได้ว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตขึ้นดังรูป 4.2



รูปที่ 4.2 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองพบว่าอาหาร TAP (ไม่มีการปรับ pH) ซึ่งเป็นตัวควบคุม (Control) ซึ่งคือ TAP มี pH เท่ากับ 7.0 จะมีการเจริญเติบโตที่พบได้เป็นปกติในการติดตามการเจริญเติบโต ส่วนในระบบ pH 6.5 จะพบการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ TAP ดังนั้นในระบบ pH 6.5 จึงมีความน่าสนใจอย่างมากที่จะใช้ทดสอบการผลิตไฮโดรเจน ส่วนระบบ pH 7.0-9.0 จะพบการเจริญเติบโตที่น้อยกว่า TAP อย่างมีและไม่มีนัยสำคัญ(ภาคผนวก ง) อย่างไรก็ตามสาหร่ายยังสามารถเติบโตได้จึงได้ทำการทดสอบวัดปริมาณไฮโดรเจนต่อไปเช่นกัน

4.4 วิธีการวัดไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

วิธีการวัดไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551จะทดสอบด้วย 2 วิธี คือ การวัดแบบต่อเนื่อง (Continuation) โดยเลี้ยงสาหร่าย 24 ชั่วโมงแล้วนำมาปรับ pH เพื่อนำไปวัดไฮโดรเจนเลย และการวัดแบบเปลี่ยนอาหาร (Adaptation) โดยเลี้ยงสาหร่าย 24 ชั่วโมงแล้วมาเปลี่ยนอาหาร TAP แล้วปรับ pH เพื่อนำไปวัดไฮโดรเจน ซึ่งทั้ง 2 วิธีมีทั้งข้อดี-ข้อเสียต่างกันดังนี้

- การวัดแบบต่อเนื่อง (Continuation) (แบบที่ 1)

  ข้อดี ง่าย สะดวก และประหยัดในการทำ

  ข้อเสีย อาจจะมีของเสียที่เซลล์สร้างขึ้นมาในก่อนหน้า 24 ชั่วโมงนี้

- การวัดแบบเปลี่ยนอาหาร (Adaptation) (แบบที่ 2)

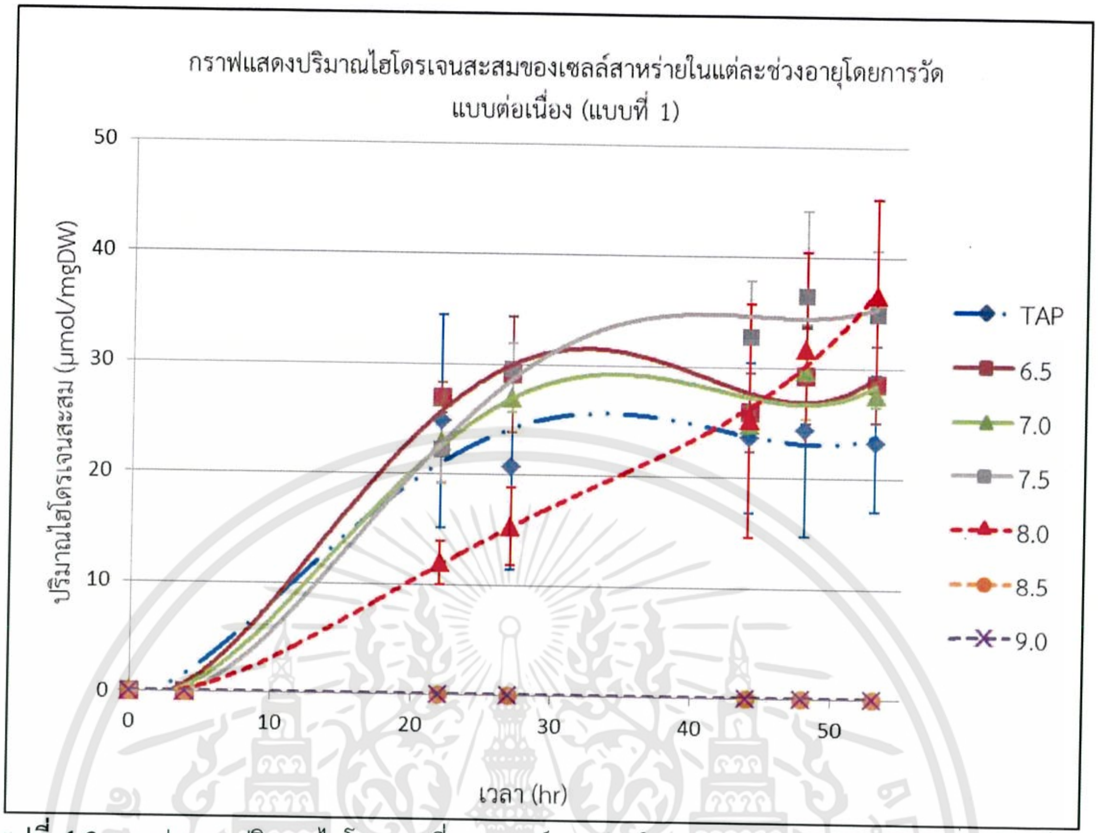
  ข้อดี เมื่อเปลี่ยนอาหารใหม่สาหร่ายจึงได้สารอาหารครบ

  ข้อเสีย เสียเวลา เสียค่าใช้จ่ายเปลี่ยนอาหาร และมีการลงทุนมากขึ้น

4.4.1 การวัดแบบต่อเนื่อง (Continuation) (แบบที่ 1)

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีค่า pH 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 และตัวควบคุม (Control) ซึ่งคือ TAP ตามลำดับด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหาร TAP ก่อนนำไปวัดปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) ได้ดังรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



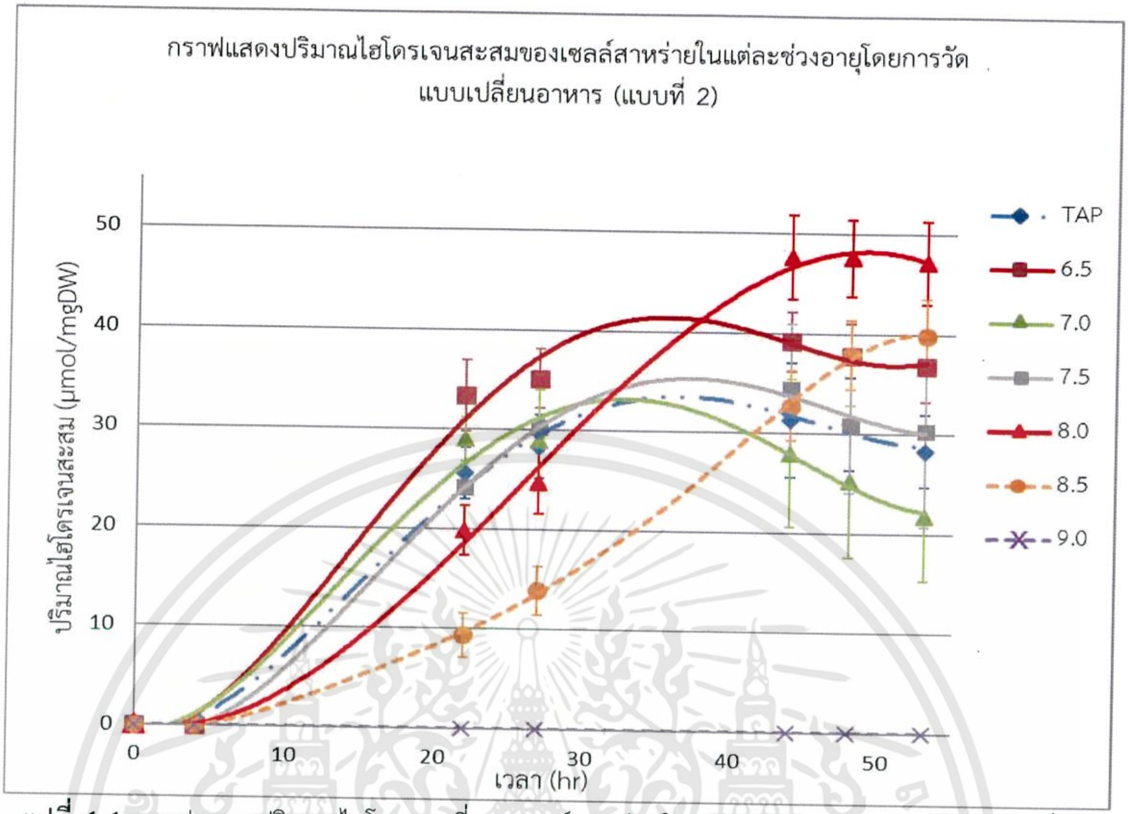
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณไฮโดรเจนที่ของเซลล์สาหร่ายในแต่ละช่วงอายุโดยการวัดแบบต่อเนื่อง (Continuation) (แบบที่ 1)

จากสมมุติฐานคาดว่าที่สภาวะเป็นกรดจะมีปริมาณไฮโดรเจนมากกว่าสภาวะเบสเนื่องจากมีปริมาณโปรตอนที่สามารถทำให้เกิดไฮโดรเจนได้มากกว่า (สมการที่ 1) ผลการทดลองพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 27 ชั่วโมง อาหาร TAP (ไม่มีการปรับ pH) ซึ่งเป็นตัวควบคุม (Control) มี pH เท่ากับ 7.0 เริ่มผลิตไฮโดรเจนคงที่ ส่วนในระบบ pH 6.5 และ 7.5 จะพบว่าปริมาณไฮโดรเจนวัดได้นั้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกัน(ภาคผนวก ง) และมีปริมาณไฮโดรเจนสูงกว่า TAP 40.6% และ 42.6% ตามลำดับ ที่ระบบ pH 7.0 มีปริมาณไฮโดรเจนสูงกว่า TAP 30.4% และที่ระบบ pH 8.0 มีปริมาณไฮโดรเจนน้อยกว่า TAP 20.1% คาดว่าที่สภาวะเบสทำให้ปริมาณสาหร่ายเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จึงทำให้แสงสามารถส่องผ่านเซลล์ได้ทั่วถึง ที่ระบบ pH 8.5 และ 9.0 ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจากสาหร่ายอาจตายในขณะปรับ pH หรืออาจมีโปรตอนไม่เพียงพอต่อการผลิตไฮโดรเจน

4.4.2 การวัดแบบเปลี่ยนอาหาร (Adaptation) (แบบที่ 2)

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีค่า pH 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 และตัวควบคุม (Control) ซึ่งคือ TAP ตามลำดับด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยเปลี่ยนอาหาร TAP ก่อนนำไปวัดปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) ได้ผลดังรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณไฮโดรเจนที่ของเซลล์สาหร่ายในแต่ละช่วงอายุโดยการวัดแบบเปลี่ยนอาหาร (Adaptation) (แบบที่ 2)

ผลการทดลองพบว่าปริมาณไฮโดรเจนสะสมมีการคงที่แล้วตั้งแต่เวลาประมาณ 27 ชั่วโมง อาหาร TAP (ไม่มีการปรับ pH) ซึ่งเป็นตัวควบคุม (Control) มี pH เท่ากับ 7.0 เริ่มผลิตไฮโดรเจนคงที่ ต่อมาทำการวัดในระบบ pH 6.5 พบว่าปริมาณไฮโดรเจนที่ได้นั้นมีมากกว่า TAP 24.19% ที่ระบบ pH 7.0 และ 7.5 พบว่าปริมาณไฮโดรเจนที่วัดได้นั้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ(ภาคผนวก ง) กับ TAP เนื่องจากมีปริมาณไฮโดรเจนมากกว่า TAP อยู่ 2.11% และ 6.67% ตามลำดับ ต่อมาที่ระบบ pH 8.0 และ pH 8.5 จะพบว่าปริมาณไฮโดรเจนมีการผลิตได้น้อยกว่า TAP อยู่ 12.57% และ 51.01% ตามลำดับ แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปจนถึงชั่วโมง 48 สาหร่ายมีการผลิตปริมาณไฮโดรเจนได้มากกว่า TAP อยู่ 53.71% และ 22.49% ตามลำดับ สุดท้ายที่ระบบ pH 9.0 ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจากสาหร่ายอาจมีโปรตอนไม่เพียงพอต่อการผลิตไฮโดรเจน และที่ pH 6.5 7.0 และ 7.5 มีปริมาณไฮโดรเจนสะสมลดลงในตอนท้าย อาจเนื่องมาจากเมื่อทำการเลี้ยงสาหร่ายไปเรื่อย ๆ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจมีการเปลี่ยนแปลงทำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้น้อยลง และเมื่อทำการดึงไฮโดรเจนมาวัดทุก 0.4 ml จึงทำให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมลดลงเรื่อย ๆ

จากผลดังกล่าวสรุปได้ว่าเมื่อทำการวัดปริมาณไฮโดรเจนที่ 27 ชั่วโมงพบว่าที่ pH 6.5 มีการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด เนื่องจากเมื่อทำการเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะกรด จากสมมุติฐานดังสมการที่ 1 ในสภาวะกรดจะมีปริมาณโปรตอนมากกว่าในสภาวะเบส จึงผลิตไฮโดรเจนได้สูง โดยผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่า TAP อยู่ 24.19%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองผลของ pH ต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อนำสาหร่ายมาคัดช่วง (Screening) ที่ช่วง pH 3-12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการปรับ pH ด้วยการหยดกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะเห็นได้ว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ pH ประมาณ 7-8 ต่อมาจึงทำการขยายช่วงโดยเลี้ยงสาหร่ายที่ pH 6.0 - 9.0 ผลที่ได้คือสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ทุก pH ถึงแม้ที่ pH 8.5 8.75 และ 9.0 จะมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่า

ต่อมาจึงได้นำมาวัดผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Growth Phase) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตรที่ pH 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 และตัวควบคุม (Control) ซึ่งคือ TAP ผลที่ได้คือเมื่อทำการวัดค่าความขุ่น (OD_{730}) ทุก ๆ 6 ชั่วโมงจนครบที่ 54 ชั่วโมงสาหร่ายยังคงมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง โดยที่ pH 6.5 และ 7.0 สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีเทียบเคียง TAP ส่วน 7.5 - 9.0 มีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่า TAP

ต่อมาจึงทำการวัดปริมาณไฮโดรเจนในระบบแบบต่อเนื่อง (Continuation) พบว่าเมื่อเวลาที่ 27 ชั่วโมงจะเห็นได้ว่าที่ pH 6.5 7.0 และ 7.5 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่าตัวควบคุม (TAP) และที่ pH 8.0 การผลิตไฮโดรเจนในช่วงแรกมีการผลิตไฮโดรเจนน้อย แต่ยังคงมีอัตราการผลิตที่เพิ่มขึ้นอย่างคงที่ โดยที่ pH 6.5 และ 7.5 นั้นสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดโดยผลิตได้ดีกว่าตัวควบคุม (TAP) อยู่ 40.6% และ 42.6% ตามลำดับ และผลิตปริมาณไฮโดรเจนสะสมได้ 29.12 µmol/mgDW และ 29.52 µmol/mgDW ตามลำดับ ส่วนการวัดปริมาณไฮโดรเจนในระบบแบบเปลี่ยนอาหาร (Adaptation) ที่เวลา 27 ชั่วโมง pH 6.5 7.0 และ 7.5 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่าตัวควบคุม (TAP) และที่ pH 8.0 และ 8.5 การผลิตไฮโดรเจนในช่วงแรกมีการผลิตไฮโดรเจนน้อย โดยที่ pH 6.5 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดโดยผลิตได้ดีกว่าตัวควบคุม (TAP) อยู่ 24.19% และผลิตปริมาณไฮโดรเจนสะสมได้ 35.15 µmol/mgDW ซึ่งสอดคล้องกันผลงานวิจัยของ Antal et al. (2016) ที่ศึกษาปัจจัย pH ต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยการตรึงสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ในสภาวะปราศจากซัลเฟอร์ พบว่าสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สามารถผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ pH 6.5 และ 7.0

จากผลที่กล่าวมาสามารถสรุปได้ว่าการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเก็บปริมาณไฮโดรเจนแบบระบบเปลี่ยนอาหารให้การผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่าระบบแบบต่อเนื่อง เนื่องจากการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทำให้สาหร่ายได้รับสารอาหารที่เพียงพอต่อการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

- จากการทดลองผลของ pH ต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว Tetraspora sp. CU2551 สารเคมีที่ใช้ควบคุม pH คือ HCl และ NaOH จะเห็นได้ว่าผลของการผลิตไฮโดรเจนมีค่าไม่ต่างมากนักจาก TAP ในการทดลองครั้งต่อไปอาจทำการขยายตัวควบคุมได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มแสง หรือสารเคมีอื่นในการควบคุม pH เช่นบัพเฟอร์ที่ช่วง pH ต่าง ๆ
- สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างต่อเนื่องได้ในระดับที่ใหญ่ขึ้น (Pilot scale) ที่ระบบการวัดไฮโดรเจนด้วยวิธีแบบเปลี่ยนอาหาร
- ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเวลาผ่านไป
- ทำการลดความเข้มข้นของ Universal Buffer เพื่อดูการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2557. **คู่มือความรู้ด้านพลังงานไฮโดรเจน.** [Online]. Available : http://www2.dede.go.th/kmmf/download/%E0%B8%99%E0%B8%A7%E0%B8%B1%E0%B8%95%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%A3%E0%B8%A1/%E0%B8%AA%E0%B8%A7%E0%B8%84/%E0%B8%84%E0%B8%B9%E0%B9%88%E0%B8%A1%E0%B8%B7%E0%B8%AD%E0%B8%9E%E0%B8%A5%E0%B8%B1%E0%B8%87%E0%B8%87%E0%B8%B2%E0%B8%99%E0%B9%84%E0%B8%AE%E0%B9%82%E0%B8%94%E0%B8%A3%E0%B9%80%E0%B8%88%E0%B8%99.pdf

เกรียงไกร แซมสีม่วง. 2551. **“พลังงานไฮโดรเจน พลังงานสะอาด เชื้อเพลิงแห่งอนาคต”.** *Mechanical Technology Magazine* 6(81) : 66-72

ช่อลัดดา ผิวเพชร, ธนพร เก็บไว้ และนราวดี รุจนพันธ์. 2552. **การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากนาข้าวในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย.** กรุงเทพฯ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

รัตนลักษณ์ หิรัญวิริยะ, อมรรัตน์ พ่วงพลับ และอัจจิตา ใจธรรม. 2556. **การผลิตไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำของนาข้าวในประเทศไทย.** กรุงเทพฯ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล. 2552. **“ไบโอไฮโดรเจน: หนึ่งทางเลือกสู่ความยั่งยืนทางพลังงานในอนาคต”.** *Biotechnology* 203 : 73-79

ศิริสุข นคร, ศุภาพิชญ์ ชอบสุข และสมพร บุญแก้ว. 2556. **สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*.** กรุงเทพฯ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศศิวิมล รักภิรมย์ และแสงรวี คงเจริญ. 2554. **ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *scenedesmus* sp. KMITL-01**. กรุงเทพฯ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ-ทหารลาดกระบัง.

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2559. **การตรวจวัดพีเอชน้ำ (PH).** [Online]. Available : http://globethailand.ipst.ac.th/?page_id=3994

Antal, T. Krendeleva, T. Kukarskikh, G. Rubin, A. Tyystjärvi, E. Volgusheva, A. : **Hydrogen photoproduction by immobilized S-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*: Effect of light intensity and spectrum, and initial medium pH.** *Algal Research* 2016; 17:38-45.

Dubini, A. : **Biofuel production from *Chlamydomonas reinhardtii* Green energy.** The Biochemical Society 2011:21-22.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khanal, S. Chen, W. Li, L. Sung, S. : **Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products.** *International journal of Hydrogen Energy* 2004; 29 :1123 – 1131

Kruse, O. Hankamer, B. : **Microalgal hydrogen production.** *Current Opinion in Biotechnology* 2010, 21:238–243

Green Car Congress. 2004. **Milestone for H_2 Production by High-Temperature Electrolysis.** [Online]. Available : http://www.greencarcongress.com/2004/11/milestone_for_h.html

Maneeruttanarungroj, C. Incharoensakdi, A. and Lindblad, P. : **A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production.** *International journal of Hydrogen Energy* 2010; 35:13193-13199.

McKinlay, J. Harwood, C. : **Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel.** *Current Opinion in Biotechnology* 2010; 21:244–251

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหาร TAP (Tris Acetate Phosphate medium)

1. Prepare the solution 1-5 as following

No.	Chemical	Amount (g)	Volume to (mL)	V/1L TAP	Final Conc (uM)
1	Tris	24.20	100	10	20,000
2	NH_4Cl	3.75	250	25	7,000
	$MgSO_4.7H_2O$	1.00			830
	$CaCl_2.2H_2O$	0.50			450
3	K_2HPO_4	2.88	10	1	1,650
	KH_2PO_4	1.44			1,050
4*	$Na_2EDTA.2H_2O$	0.5000	10	1	134
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.2200			136
	H_3BO_3	0.1140			184
	$MnCl_2.4H_2O$	0.0500			40
	$FeSO_4.7H_2O$	0.0500			33
	$CoCl_2.6H_2O$	0.0160			12
	$CuSO_4.5H_2O$	0.0160			10
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.0077			4
5	CH_3COOH (conc.)	-	-	1 mL	0.1% (V/V)

* Keep only in plastic container, and can be turned into red within 2 weeks. This stock can still be used.

*** Store solution 1-4 in 4 °C refrigerator ***

2. Pipatte solution 1-5 to 800 ml H_2O, and add H_2O up to 1000 ml.
3. (Optional) Prerare 1.5% TAP-agar medium using agar-agar powder.
4. Autoclave TAP medium (or TAP-agar medium) at 121 °C for 15 min.
5. Keep satirized solution at room temperature. Or, pour plate after temperature reach about 60 °C. (10 ug/mL Ampicillin can be added to inhibit bacterial contamination)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร TAP-tris

1. Prepare the solution 2-5 as following

No.	Chemical	Amount (g)	Volume to (mL)	V/1L TAP	Final Conc (uM)
1	Tris	24.20	100	10	20,000
2	NH_4Cl	3.75	250	25	7,000
	$MgSO_4.7H_2O$	1.00			830
	$CaCl_2.2H_2O$	0.50			450
3	K_2HPO_4	2.88	10	1	1,650
	KH_2PO_4	1.44			1,050
4*	$Na_2EDTA.2H_2O$	0.5000	10	1	134
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.2200			136
	H_3BO_3	0.1140			184
	$MnCl_2.4H_2O$	0.0500			40
	$FeSO_4.7H_2O$	0.0500			33
	$CoCl_2.6H_2O$	0.0160			12
	$CuSO_4.5H_2O$	0.0160			10
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.0077			4
5	CH_3COOH (conc.)	-	-	1 mL	0.1% (V/V)

* Keep only in plastic container, and can be turned into red within 2 weeks. This stock can still be used.

*** Store solution 1-4 in 4 °C refrigerator ***

2. Pipatte solution 2-5 to 300 ml H_2O, and add H_2O up to 500 ml.

3. Autoclave TAP-tris medium at 121 °C for 15 min.

4. Keep satirized solution at room temperature. Or, pour plate after temperature reach about 60 °C. (10 ug/mL Ampicillin can be added to inhibit bacterial contamination)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

Universal Buffer

1. เตรียมสารละลาย กรดอะซิติก (CH_3COOH) กรดบอริก (H_3BO_3) กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ความเข้มข้น 0.08 M ปริมาร 1500 ml
2. แบ่งใส่บีกเกอร์ 10 ขวด ปริมาตร 150 mL นำไปปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 M
3. เมื่อได้ pH ที่ต้องการ แล้วปรับปริมาตรแต่ละ pH เป็น 200 mL
4. เติมแอมพิซิลลิน (Ampicillin) 1 ml pH/µl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

1. นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละจากกราฟมาตรฐาน
2. นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละมาเปรียบเทียบเป็นค่าไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร
3. นำค่าไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาเปรียบเทียบเป็นค่าไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมลโดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาณไฮโดรเจน 1 โมล
4. หาน้ำหนักเซลล์แห้งจากสมการ y=1.7159x โดย y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร และ x คือ น้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยมิลลิกรัม
5. นำไฮโดรเจนที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมงจะได้ ปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมง
6. นำปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมงที่ได้มาคำนวณหาอัตราผลิตในหน่วย ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อชั่วโมง

ตัวอย่างเช่น

1. เมื่อฉีดไฮโดรเจน 0.4 ml ได้พื้นที่ใต้กราฟคือ 42.49318 mV.s โดย A คือค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของ 4%standard mV.s

   ถ้าพื้นที่ A mV.s จะเข้มข้น 4%

   ถ้าพื้นที่ 42.49318 mV.s จะเข้มข้น (4%*42.49318 mV.s)/A mV.s = B%
2. ค่าไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร โดย 8.4 ml คือ $V_{headspace} + V_{กระบอกฉีดยา}$

   ปริมาตร 100 ml มีปริมาณไฮโดรเจน B ml

   ปริมาตร 8.4 ml มีปริมาณไฮโดรเจน (B ml*8.4 ml)/100 ml = C ml
3. ค่าไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมล

   ปริมาตร 22.4 L มีปริมาณ 1 mol

   ปริมาตร C ml มีปริมาณ (1 mol*0.022428 L)/22.4 L = D μmol
4. หาน้ำหนักเซลล์แห้งในสาหร่าย 5 ml

   Y = 1.7915x

   X = (0.135/1.7915)*5 ml = E mg
5. ปริมาณไฮโดรเจนหน่วยไมโครโมลต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง

   ปริมาณไฮโดรเจน = (D μmol/E mgDW)/4 hr = F μmol/mgDW/hr

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การคำนวนผลทางสถิติ

1. ผลทางสถิติของระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย

Between-Subjects Factors

		N
trt2	0	33
	6.5	33
	7	33
	7.5	33
	8	33
	8.5	33
	9	33
trt1	0	21
	6	21
	12	21
	18	21
	24	21
	30	21
	36	21
	42	21
	48	21
	54	21
	73	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:yield

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15.029[a]	76	.198	163.109	.000
Intercept	52.395	1	52.395	4.322E4	.000
trt2	1.934	6	.322	265.849	.000
trt1	12.424	10	1.242	1.025E3	.000
trt2 * trt1	.671	60	.011	9.226	.000
Error	.187	154	.001		
Total	67.611	231			
Corrected Total	15.216	230			

a. R Squared = .988 (Adjusted R Squared = .982)

Multiple Comparisons

yield

Tukey HSD

(I) trt2	(J) trt2	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	6.5	.017879	.0085720	.366	-.007732	.043489
	7	.002061	.0085720	1.000	-.023550	.027671
	7.5	.087727*	.0085720	.000	.062117	.113338
	8	.190303*	.0085720	.000	.164693	.215914
	8.5	.196303*	.0085720	.000	.170693	.221914
	9	.221333*	.0085720	.000	.195723	.246944
6.5	0	-.017879	.0085720	.366	-.043489	.007732
	7	-.015818	.0085720	.520	-.041429	.009792
	7.5	.069848*	.0085720	.000	.044238	.095459
	8	.172424*	.0085720	.000	.146814	.198035
	8.5	.178424*	.0085720	.000	.152814	.204035
	9	.203455*	.0085720	.000	.177844	.229065
7	0	-.002061	.0085720	1.000	-.027671	.023550
	6.5	.015818	.0085720	.520	-.009792	.041429
	7.5	.085667*	.0085720	.000	.060056	.111277
	8	.188242*	.0085720	.000	.162632	.213853

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	8.5	.194242*	.0085720	.000	.168632	.219853
	9	.219273*	.0085720	.000	.193662	.244883
7.5	0	-.087727*	.0085720	.000	-.113338	-.062117
	6.5	-.069848*	.0085720	.000	-.095459	-.044238
	7	-.085667*	.0085720	.000	-.111277	-.060056
	8	.102576*	.0085720	.000	.076965	.128186
	8.5	.108576*	.0085720	.000	.082965	.134186
	9	.133606*	.0085720	.000	.107996	.159217
8	0	-.190303*	.0085720	.000	-.215914	-.164693
	6.5	-.172424*	.0085720	.000	-.198035	-.146814
	7	-.188242*	.0085720	.000	-.213853	-.162632
	7.5	-.102576*	.0085720	.000	-.128186	-.076965
	8.5	.006000	.0085720	.992	-.019610	.031610
	9	.031030*	.0085720	.007	.005420	.056641
8.5	0	-.196303*	.0085720	.000	-.221914	-.170693
	6.5	-.178424*	.0085720	.000	-.204035	-.152814
	7	-.194242*	.0085720	.000	-.219853	-.168632
	7.5	-.108576*	.0085720	.000	-.134186	-.082965
	8	-.006000	.0085720	.992	-.031610	.019610
	9	.025030	.0085720	.060	-.000580	.050641
9	0	-.221333*	.0085720	.000	-.246944	-.195723
	6.5	-.203455*	.0085720	.000	-.229065	-.177844
	7	-.219273*	.0085720	.000	-.244883	-.193662
	7.5	-.133606*	.0085720	.000	-.159217	-.107996
	8	-.031030*	.0085720	.007	-.056641	-.005420
	8.5	-.025030	.0085720	.060	-.050641	.000580

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .001.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Homogeneous Subsets

yield

Tukey HSD

trt2	N	Subset 1	2	3	4
9	33	.357152			
8.5	33	.382182	.382182		
8	33		.388182		
7.5	33			.490758	
6.5	33				.560606
7	33				.576424
0	33				.578485
Sig.		.060	.992	1.000	.366

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .001.

Multiple Comparisons

yield

Tukey HSD

(I) trt1	(J) trt1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
0	6	-.034238	.0107455	.063	-.069352	.000875
	12	-.147714*	.0107455	.000	-.182828	-.112601
	18	-.279714*	.0107455	.000	-.314828	-.244601
	24	-.302190*	.0107455	.000	-.337304	-.267077
	30	-.429238*	.0107455	.000	-.464352	-.394125
	36	-.458095*	.0107455	.000	-.493209	-.422982
	42	-.569571*	.0107455	.000	-.604685	-.534458
	48	-.571000*	.0107455	.000	-.606113	-.535887
	54	-.626048*	.0107455	.000	-.661161	-.590934
	73	-.721000*	.0107455	.000	-.756113	-.685887
6	0	.034238	.0107455	.063	-.000875	.069352
	12	-.113476*	.0107455	.000	-.148590	-.078363
	18	-.245476*	.0107455	.000	-.280590	-.210363

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	24	-.267952*	.0107455	.000	-.303066	-.232839
	30	-.395000*	.0107455	.000	-.430113	-.359887
	36	-.423857*	.0107455	.000	-.458971	-.388744
	42	-.535333*	.0107455	.000	-.570447	-.500220
	48	-.536762*	.0107455	.000	-.571875	-.501648
	54	-.591810*	.0107455	.000	-.626923	-.556696
	73	-.686762*	.0107455	.000	-.721875	-.651648
12	0	.147714*	.0107455	.000	.112601	.182828
	6	.113476*	.0107455	.000	.078363	.148590
	18	-.132000*	.0107455	.000	-.167113	-.096887
	24	-.154476*	.0107455	.000	-.189590	-.119363
	30	-.281524*	.0107455	.000	-.316637	-.246410
	36	-.310381*	.0107455	.000	-.345494	-.275267
	42	-.421857*	.0107455	.000	-.456971	-.386744
	48	-.423286*	.0107455	.000	-.458399	-.388172
	54	-.478333*	.0107455	.000	-.513447	-.443220
	73	-.573286*	.0107455	.000	-.608399	-.538172
18	0	.279714*	.0107455	.000	.244601	.314828
	6	.245476*	.0107455	.000	.210363	.280590
	12	.132000*	.0107455	.000	.096887	.167113
	24	-.022476	.0107455	.585	-.057590	.012637
	30	-.149524*	.0107455	.000	-.184637	-.114410
	36	-.178381*	.0107455	.000	-.213494	-.143267
	42	-.289857*	.0107455	.000	-.324971	-.254744
	48	-.291286*	.0107455	.000	-.326399	-.256172
	54	-.346333*	.0107455	.000	-.381447	-.311220
	73	-.441286*	.0107455	.000	-.476399	-.406172
24	0	.302190*	.0107455	.000	.267077	.337304
	6	.267952*	.0107455	.000	.232839	.303066
	12	.154476*	.0107455	.000	.119363	.189590
	18	.022476	.0107455	.585	-.012637	.057590
	30	-.127048*	.0107455	.000	-.162161	-.091934
	36	-.155905*	.0107455	.000	-.191018	-.120791
	42	-.267381*	.0107455	.000	-.302494	-.232267

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	48	-.268810*	.0107455	.000	-.303923	-.233696
	54	-.323857*	.0107455	.000	-.358971	-.288744
	73	-.418810*	.0107455	.000	-.453923	-.383696
30	0	.429238*	.0107455	.000	.394125	.464352
	6	.395000*	.0107455	.000	.359887	.430113
	12	.281524*	.0107455	.000	.246410	.316637
	18	.149524*	.0107455	.000	.114410	.184637
	24	.127048*	.0107455	.000	.091934	.162161
	36	-.028857	.0107455	.216	-.063971	.006256
	42	-.140333*	.0107455	.000	-.175447	-.105220
	48	-.141762*	.0107455	.000	-.176875	-.106648
	54	-.196810*	.0107455	.000	-.231923	-.161696
	73	-.291762*	.0107455	.000	-.326875	-.256648
36	0	.458095*	.0107455	.000	.422982	.493209
	6	.423857*	.0107455	.000	.388744	.458971
	12	.310381*	.0107455	.000	.275267	.345494
	18	.178381*	.0107455	.000	.143267	.213494
	24	.155905*	.0107455	.000	.120791	.191018
	30	.028857	.0107455	.216	-.006256	.063971
	42	-.111476*	.0107455	.000	-.146590	-.076363
	48	-.112905*	.0107455	.000	-.148018	-.077791
	54	-.167952*	.0107455	.000	-.203066	-.132839
	73	-.262905*	.0107455	.000	-.298018	-.227791
42	0	.569571*	.0107455	.000	.534458	.604685
	6	.535333*	.0107455	.000	.500220	.570447
	12	.421857*	.0107455	.000	.386744	.456971
	18	.289857*	.0107455	.000	.254744	.324971
	24	.267381*	.0107455	.000	.232267	.302494
	30	.140333*	.0107455	.000	.105220	.175447
	36	.111476*	.0107455	.000	.076363	.146590
	48	-.001429	.0107455	1.000	-.036542	.033685
	54	-.056476*	.0107455	.000	-.091590	-.021363
	73	-.151429*	.0107455	.000	-.186542	-.116315
48	0	.571000*	.0107455	.000	.535887	.606113

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	6	.536762*	.0107455	.000	.501648	.571875
	12	.423286*	.0107455	.000	.388172	.458399
	18	.291286*	.0107455	.000	.256172	.326399
	24	.268810*	.0107455	.000	.233696	.303923
	30	.141762*	.0107455	.000	.106648	.176875
	36	.112905*	.0107455	.000	.077791	.148018
	42	.001429	.0107455	1.000	-.033685	.036542
	54	-.055048*	.0107455	.000	-.090161	-.019934
	73	-.150000*	.0107455	.000	-.185113	-.114887
54	0	.626048*	.0107455	.000	.590934	.661161
	6	.591810*	.0107455	.000	.556696	.626923
	12	.478333*	.0107455	.000	.443220	.513447
	18	.346333*	.0107455	.000	.311220	.381447
	24	.323857*	.0107455	.000	.288744	.358971
	30	.196810*	.0107455	.000	.161696	.231923
	36	.167952*	.0107455	.000	.132839	.203066
	42	.056476*	.0107455	.000	.021363	.091590
	48	.055048*	.0107455	.000	.019934	.090161
	73	-.094952*	.0107455	.000	-.130066	-.059839
73	0	.721000*	.0107455	.000	.685887	.756113
	6	.686762*	.0107455	.000	.651648	.721875
	12	.573286*	.0107455	.000	.538172	.608399
	18	.441286*	.0107455	.000	.406172	.476399
	24	.418810*	.0107455	.000	.383696	.453923
	30	.291762*	.0107455	.000	.256648	.326875
	36	.262905*	.0107455	.000	.227791	.298018
	42	.151429*	.0107455	.000	.116315	.186542
	48	.150000*	.0107455	.000	.114887	.185113
	54	.094952*	.0107455	.000	.059839	.130066

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .001.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Homogeneous Subsets

yield

Tukey HSD

trt1	N	Subset						
		1	2	3	4	5	6	7
0	21	.100000						
6	21	.134238						
12	21		.247714					
18	21			.379714				
24	21			.402190				
30	21				.529238			
36	21				.558095			
42	21					.669571		
48	21					.671000		
54	21						.726048	
73	21							.821000
Sig.		.063	1.000	.585	.216	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .001.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลทางสถิติของการวัดปริมาณไฮโดรเจนด้วยวิธีต่อเนื่อง

Between-Subjects Factors

		N
trt1	0	21
	4	21
	22	21
	27	21
	44	21
	48	21
	53	21
trt2	.0	21
	6.5	21
	7.0	21
	7.5	21
	8.0	21
	8.5	21
	9.0	21

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: yield

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	28414.497[a]	48	591.969	38.889	.000
Intercept	27043.823	1	27043.823	1776.634	.000
trt1	11428.131	6	1904.689	125.128	.000
trt2	11250.829	6	1875.138	123.186	.000
trt1 * trt2	5735.536	36	159.320	10.466	.000
Error	1491.751	98	15.222		
Total	56950.071	147			
Corrected Total	29906.247	146			

a. R Squared = .950 (Adjusted R Squared = .926)

Estimated Marginal Means

1. Grand Mean

Dependent Variable: yield

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
13.564	.322	12.925	14.202

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. trt1

Dependent Variable: yield

trt1	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	-4.197E-015	.851	-1.690	1.690
4	2.508E-015	.851	-1.690	1.690
22	15.487	.851	13.798	17.177
27	17.379	.851	15.689	19.068
44	18.777	.851	17.088	20.467
48	21.702	.851	20.012	23.391
53	21.600	.851	19.911	23.290

3. trt2

Dependent Variable: yield

trt2	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.0	16.570	.851	14.881	18.260
6.5	19.982	.851	18.293	21.672
7.0	18.860	.851	17.171	20.550
7.5	22.273	.851	20.584	23.963
8.0	17.259	.851	15.569	18.948
8.5	-1.755E-015	.851	-1.690	1.690
9.0	1.961E-014	.851	-1.690	1.690

4. trt1 * trt2

Dependent Variable: yield

trt1	trt2	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
	.0	-1.004E-014	2.253	-4.470	4.470
	6.5	-6.490E-015	2.253	-4.470	4.470
	7.0	-2.937E-015	2.253	-4.470	4.470
0	7.5	4.167E-015	2.253	-4.470	4.470
	8.0	4.167E-015	2.253	-4.470	4.470
	8.5	-8.204E-015	2.253	-4.470	4.470
	9.0	-1.004E-014	2.253	-4.470	4.470
	.0	1.967E-015	2.253	-4.470	4.470
	6.5	1.967E-015	2.253	-4.470	4.470
	7.0	5.520E-015	2.253	-4.470	4.470
4	7.5	9.073E-015	2.253	-4.470	4.470
	8.0	2.328E-014	2.253	-4.470	4.470
	8.5	2.184E-015	2.253	-4.470	4.470
	9.0	-2.645E-014	2.253	-4.470	4.470

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	.0	24.380	2.253	19.910	28.850
	6.5	26.956	2.253	22.486	31.426
	7.0	22.944	2.253	18.474	27.414
22	7.5	22.185	2.253	17.714	26.655
	8.0	11.947	2.253	7.477	16.417
	8.5	-4.942E-015	2.253	-4.470	4.470
	9.0	-9.841E-015	2.253	-4.470	4.470
	.0	20.706	2.253	16.236	25.177
	6.5	29.122	2.253	24.652	33.592
	7.0	26.991	2.253	22.521	31.461
27	7.5	29.524	2.253	25.054	33.994
	8.0	15.307	2.253	10.837	19.777
	8.5	-5.731E-015	2.253	-4.470	4.470
	9.0	-7.167E-015	2.253	-4.470	4.470
	.0	22.584	2.253	18.114	27.054
	6.5	25.951	2.253	21.481	30.421
44	7.0	24.881	2.253	20.410	29.351
	7.5	32.820	2.253	28.350	37.291
	8.0	25.206	2.253	20.735	29.676

4. trt1 * trt2

Dependent Variable: yield

trt1	trt2	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
44	8.5	-4.916E-015	2.253	-4.470	4.470
	9.0	-1.594E-014	2.253	-4.470	4.470
	.0	24.756	2.253	20.286	29.227
	6.5	29.289	2.253	24.819	33.759
	7.0	29.656	2.253	25.186	34.126
48	7.5	36.490	2.253	32.020	40.960
	8.0	31.721	2.253	27.251	36.191
	8.5	-7.789E-015	2.253	-4.470	4.470
	9.0	-3.147E-015	2.253	-4.470	4.470
	.0	23.566	2.253	19.096	28.036
	6.5	28.558	2.253	24.088	33.028
	7.0	27.550	2.253	23.080	32.020
53	7.5	34.895	2.253	30.425	39.365
	8.0	36.632	2.253	32.162	41.102
	8.5	1.711E-014	2.253	-4.470	4.470
	9.0	2.099E-013	2.253	-4.470	4.470

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Multiple Comparisons

Dependent Variable: yield

Tukey HSD

(I) trt1	(J) trt1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	4	0E-9	1.2040387542	1.000	-3.624719689	3.624719689
	22	-15.487392050*	1.2040387542	.000	-19.112111739	-11.862672361
	27	-17.378652250*	1.2040387542	.000	-21.003371939	-13.753932561
	44	-18.777364627*	1.2040387542	.000	-22.402084316	-15.152644938
	48	-21.701773569*	1.2040387542	.000	-25.326493258	-18.077053880
	53	-21.600105711*	1.2040387542	.000	-25.224825400	-17.975386022
4	0	0E-9	1.2040387542	1.000	-3.624719689	3.624719689
	22	-15.487392050*	1.2040387542	.000	-19.112111739	-11.862672361
	27	-17.378652250*	1.2040387542	.000	-21.003371939	-13.753932561
	44	-18.777364627*	1.2040387542	.000	-22.402084316	-15.152644938
	48	-21.701773569*	1.2040387542	.000	-25.326493258	-18.077053880
	53	-21.600105711*	1.2040387542	.000	-25.224825400	-17.975386022
22	0	15.487392050*	1.2040387542	.000	11.862672361	19.112111739
	4	15.487392050*	1.2040387542	.000	11.862672361	19.112111739
	27	-1.891260201	1.2040387542	.701	-5.515979890	1.733459488
	44	-3.289972577	1.2040387542	.101	-6.914692266	.334747112
	48	-6.214381520*	1.2040387542	.000	-9.839101209	-2.589661831
	53	-6.112713662*	1.2040387542	.000	-9.737433351	-2.487993973
27	0	17.378652250*	1.2040387542	.000	13.753932561	21.003371939
	4	17.378652250*	1.2040387542	.000	13.753932561	21.003371939
	22	1.891260201	1.2040387542	.701	-1.733459488	5.515979890
	44	-1.398712376	1.2040387542	.907	-5.023432065	2.226007313
	48	-4.323121319*	1.2040387542	.009	-7.947841008	-.698401630
	53	-4.221453461*	1.2040387542	.012	-7.846173150	-.596733772
44	0	18.777364627*	1.2040387542	.000	15.152644938	22.402084316
	4	18.777364627*	1.2040387542	.000	15.152644938	22.402084316
	22	3.289972577	1.2040387542	.101	-.334747112	6.914692266
	27	1.398712376	1.2040387542	.907	-2.226007313	5.023432065
	48	-2.924408942	1.2040387542	.198	-6.549128631	.700310747
	53	-2.822741085	1.2040387542	.234	-6.447460774	.801978604
48	0	21.701773569*	1.2040387542	.000	18.077053880	25.326493258
	4	21.701773569*	1.2040387542	.000	18.077053880	25.326493258
	22	6.214381520*	1.2040387542	.000	2.589661831	9.839101209

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Multiple Comparisons

Dependent Variable: yield

Tukey HSD

(I) trt1	(J) trt1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
48	27	4.323121319	1.2040387542	.009	.698401630	7.947841008
	44	2.924408942*	1.2040387542	.198	-.700310747	6.549128631
	53	.101667858*	1.2040387542	1.000	-3.523051831	3.726387547
53	0	21.600105711*	1.2040387542	.000	17.975386022	25.224825400
	4	21.600105711*	1.2040387542	.000	17.975386022	25.224825400
	22	6.112713662*	1.2040387542	.000	2.487993973	9.737433351
	27	4.221453461	1.2040387542	.012	.596733772	7.846173150
	44	2.822741085*	1.2040387542	.234	-.801978604	6.447460774
	48	-.101667858*	1.2040387542	1.000	-3.726387547	3.523051831

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 15.222.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

yield

Tukey HSD

trt1	N	Subset		
		1	2	3
0	21	0E-9		
4	21	0E-9		
22	21		15.487392050	
27	21		17.378652250	
44	21		18.777364627	18.777364627
53	21			21.600105711
48	21			21.701773569
Sig.		1.000	.101	.198

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 15.222.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 21.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Multiple Comparisons

Dependent Variable: yield

Tukey HSD

(I) trt2	(J) trt2	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
.0	6.5	-3.411975827	1.2040387542	.079	-7.036695516	.212743862
	7.0	-2.289900723	1.2040387542	.484	-5.914620412	1.334818966
	7.5	-5.703001406*	1.2040387542	.000	-9.327721095	-2.078281717
	8.0	-.688558716	1.2040387542	.997	-4.313278405	2.936160973
	8.5	16.570370307*	1.2040387542	.000	12.945650618	20.195089996
	9.0	16.570370307*	1.2040387542	.000	12.945650618	20.195089996
6.5	.0	3.411975827	1.2040387542	.079	-.212743862	7.036695516
	7.0	1.122075104	1.2040387542	.966	-2.502644585	4.746794793
	7.5	-2.291025579	1.2040387542	.483	-5.915745268	1.333694110
	8.0	2.723417110	1.2040387542	.273	-.901302579	6.348136799
	8.5	19.982346134*	1.2040387542	.000	16.357626445	23.607065823
	9.0	19.982346134*	1.2040387542	.000	16.357626445	23.607065823
7.0	.0	2.289900723	1.2040387542	.484	-1.334818966	5.914620412
	6.5	-1.122075104	1.2040387542	.966	-4.746794793	2.502644585
	7.5	-3.413100683	1.2040387542	.079	-7.037820372	.211619006
	8.0	1.601342007	1.2040387542	.836	-2.023377682	5.226061696
	8.5	18.860271030*	1.2040387542	.000	15.235551341	22.484990719
	9.0	18.860271030*	1.2040387542	.000	15.235551341	22.484990719
7.5	.0	5.703001406*	1.2040387542	.000	2.078281717	9.327721095
	6.5	2.291025579	1.2040387542	.483	-1.333694110	5.915745268
	7.0	3.413100683	1.2040387542	.079	-.211619006	7.037820372
	8.0	5.014442690*	1.2040387542	.001	1.389723001	8.639162379
	8.5	22.273371713*	1.2040387542	.000	18.648652024	25.898091402
	9.0	22.273371713*	1.2040387542	.000	18.648652024	25.898091402
8.0	.0	.688558716	1.2040387542	.997	-2.936160973	4.313278405
	6.5	-2.723417110	1.2040387542	.273	-6.348136799	.901302579
	7.0	-1.601342007	1.2040387542	.836	-5.226061696	2.023377682
	7.5	-5.014442690*	1.2040387542	.001	-8.639162379	-1.389723001
	8.5	17.258929023*	1.2040387542	.000	13.634209334	20.883648712
	9.0	17.258929023*	1.2040387542	.000	13.634209334	20.883648712
8.5	.0	-16.570370307*	1.2040387542	.000	-20.195089996	-12.945650618
	6.5	-19.982346134*	1.2040387542	.000	-23.607065823	-16.357626445
	7.0	-18.860271030*	1.2040387542	.000	-22.484990719	-15.235551341

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(I) trt2	(J) trt2	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
8.5	7.5	-22.273371713	1.2040387542	.000	-25.898091402	-18.648652024
	8.0	-17.258929023	1.2040387542	.000	-20.883648712	-13.634209334
	9.0	0E-9*	1.2040387542	1.000	-3.624719689	3.624719689
9.0	.0	-16.570370307	1.2040387542	.000	-20.195089996	-12.945650618
	6.5	-19.982346134*	1.2040387542	.000	-23.607065823	-16.357626445
	7.0	-18.860271030*	1.2040387542	.000	-22.484990719	-15.235551341
	7.5	-22.273371713	1.2040387542	.000	-25.898091402	-18.648652024
	8.0	-17.258929023	1.2040387542	.000	-20.883648712	-13.634209334
	8.5	0E-9	1.2040387542	1.000	-3.624719689	3.624719689

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 15.222.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

yield

Tukey HSD

trt2	N	Subset		
		1	2	3
8.5	21	0E-9		
9.0	21	0E-9		
.0	21		16.570370307	
8.0	21		17.258929023	
7.0	21		18.860271030	18.860271030
6.5	21		19.982346134	19.982346134
7.5	21			22.273371713
Sig.		1.000	.079	.079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 15.222.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 21.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลทางสถิติของการวัดปริมาณไฮโดรเจนด้วยวิธีเปลี่ยนอาหาร

Between-Subjects Factors

		N
trt1	0	21
	4	21
	22	21
	27	21
	44	21
	48	21
	53	21
trt2	.0	21
	6.5	21
	7.0	21
	7.5	21
	8.0	21
	8.5	21
	9.0	21

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: yield

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	40394.986[a]	48	841.562	66.323	.000
Intercept	52997.189	1	52997.189	4176.661	.000
trt1	23040.071	6	3840.012	302.628	.000
trt2	10049.586	6	1674.931	132.000	.000
trt1 * trt2	7305.329	36	202.926	15.992	.000
Error	1243.511	98	12.689		
Total	94635.686	147			
Corrected Total	41638.497	146			

a. R Squared = .970 (Adjusted R Squared = .956)

Estimated Marginal Means

1. Grand Mean

Dependent Variable: yield

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
18.987	.294	18.404	19.571

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. trt1

Dependent Variable: yield

trt1	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	3.101E-016	.777	-1.543	1.543
4	-5.912E-015	.777	-1.543	1.543
22	20.177	.777	18.635	21.720
27	23.020	.777	21.477	24.562
44	30.463	.777	28.921	32.006
48	30.056	.777	28.514	31.599
53	29.196	.777	27.653	30.738

3. trt2

Dependent Variable: yield

trt2	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.0	20.647	.777	19.104	22.189
6.5	26.042	.777	24.499	27.584
7.0	18.995	.777	17.453	20.538
7.5	21.422	.777	19.879	22.964
8.0	26.706	.777	25.163	28.248
8.5	19.101	.777	17.558	20.643
9.0	-4.273E-014	.777	-1.543	1.543

4. trt1 * trt2

Dependent Variable: yield

trt1	trt2	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
	.0	7.416E-015	2.057	-4.081	4.081
	6.5	1.807E-014	2.057	-4.081	4.081
	7.0	3.105E-016	2.057	-4.081	4.081
0	7.5	3.105E-016	2.057	-4.081	4.081
	8.0	-3.244E-015	2.057	-4.081	4.081
	8.5	3.861E-015	2.057	-4.081	4.081
	9.0	-2.456E-014	2.057	-4.081	4.081
	.0	1.702E-015	2.057	-4.081	4.081
	6.5	5.256E-015	2.057	-4.081	4.081
4	7.0	-5.404E-015	2.057	-4.081	4.081
	7.5	-1.851E-015	2.057	-4.081	4.081
	8.0	-1.849E-015	2.057	-4.081	4.081

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	8.5	1.236E-014	2.057	-4.081	4.081
	9.0	-5.159E-014	2.057	-4.081	4.081
	.0	25.589	2.057	21.507	29.670
	6.5	33.347	2.057	29.265	37.428
	7.0	29.018	2.057	24.936	33.099
22	7.5	24.127	2.057	20.046	28.209
	8.0	19.810	2.057	15.729	23.892
	8.5	9.351	2.057	5.270	13.433
	9.0	-4.035E-014	2.057	-4.081	4.081
	.0	28.300	2.057	24.219	32.381
	6.5	35.146	2.057	31.064	39.227
	7.0	28.897	2.057	24.816	32.978
27	7.5	30.187	2.057	26.106	34.268
	8.0	24.742	2.057	20.661	28.824
	8.5	13.865	2.057	9.784	17.947
	9.0	-5.623E-014	2.057	-4.081	4.081
	.0	31.337	2.057	27.256	35.418
	6.5	39.153	2.057	35.072	43.235
44	7.0	27.996	2.057	23.915	32.077
	7.5	34.395	2.057	30.314	38.477
	8.0	47.634	2.057	43.553	51.716

4. trt1 * trt2

Dependent Variable: yield

trt1	trt2	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
44	8.5	32.728	2.057	28.646	36.809
	9.0	-4.470E-014	2.057	-4.081	4.081
	.0	30.970	2.057	26.889	35.051
	6.5	37.771	2.057	33.690	41.852
	7.0	25.212	2.057	21.130	29.293
48	7.5	30.901	2.057	26.819	34.982
	8.0	47.604	2.057	43.523	51.685
	8.5	37.936	2.057	33.855	42.017
	9.0	-3.774E-014	2.057	-4.081	4.081
	.0	28.333	2.057	24.251	32.414
	6.5	36.875	2.057	32.794	40.956
	7.0	21.845	2.057	17.764	25.927
53	7.5	30.343	2.057	26.261	34.424
	8.0	47.150	2.057	43.069	51.231
	8.5	39.825	2.057	35.744	43.907
	9.0	-4.394E-014	2.057	-4.081	4.081

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Multiple Comparisons

Dependent Variable: yield

Tukey HSD

(I) trt1	(J) trt1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	4	0E-9	1.0993023088	1.000	-3.309414011	3.309414011
	22	-20.177463884*	1.0993023088	.000	-23.486877895	-16.868049873
	27	-23.019609000*	1.0993023088	.000	-26.329023011	-19.710194989
	44	-30.463355353*	1.0993023088	.000	-33.772769364	-27.153941342
	48	-30.056203937*	1.0993023088	.000	-33.365617948	-26.746789926
	53	-29.195856830*	1.0993023088	.000	-32.505270841	-25.886442819
4	0	0E-9	1.0993023088	1.000	-3.309414011	3.309414011
	22	-20.177463884*	1.0993023088	.000	-23.486877895	-16.868049873
	27	-23.019609000*	1.0993023088	.000	-26.329023011	-19.710194989
	44	-30.463355353*	1.0993023088	.000	-33.772769364	-27.153941342
	48	-30.056203937*	1.0993023088	.000	-33.365617948	-26.746789926
	53	-29.195856830*	1.0993023088	.000	-32.505270841	-25.886442819
22	0	20.177463884*	1.0993023088	.000	16.868049873	23.486877895
	4	20.177463884*	1.0993023088	.000	16.868049873	23.486877895
	27	-2.842145115	1.0993023088	.142	-6.151559126	.467268896
	44	-10.285891469*	1.0993023088	.000	-13.595305480	-6.976477458
	48	-9.878740053*	1.0993023088	.000	-13.188154064	-6.569326042
	53	-9.018392945*	1.0993023088	.000	-12.327806956	-5.708978934
27	0	23.019609000*	1.0993023088	.000	19.710194989	26.329023011
	4	23.019609000*	1.0993023088	.000	19.710194989	26.329023011
	22	2.842145115	1.0993023088	.142	-.467268896	6.151559126
	44	-7.443746353*	1.0993023088	.000	-10.753160364	-4.134332342
	48	-7.036594938*	1.0993023088	.000	-10.346008949	-3.727180927
	53	-6.176247830*	1.0993023088	.000	-9.485661841	-2.866833819
44	0	30.463355353*	1.0993023088	.000	27.153941342	33.772769364
	4	30.463355353*	1.0993023088	.000	27.153941342	33.772769364
	22	10.285891469*	1.0993023088	.000	6.976477458	13.595305480
	27	7.443746353*	1.0993023088	.000	4.134332342	10.753160364
	48	.407151416	1.0993023088	1.000	-2.902262595	3.716565427
	53	1.267498523	1.0993023088	.910	-2.041915488	4.576912534
48	0	30.056203937*	1.0993023088	.000	26.746789926	33.365617948
	4	30.056203937*	1.0993023088	.000	26.746789926	33.365617948
	22	9.878740053*	1.0993023088	.000	6.569326042	13.188154064

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(I) trt1	(J) trt1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
48	27	7.036594938	1.0993023088	.000	3.727180927	10.346008949
	44	-.407151416*	1.0993023088	1.000	-3.716565427	2.902262595
	53	.860347108*	1.0993023088	.986	-2.449066903	4.169761119
53	0	29.195856830*	1.0993023088	.000	25.886442819	32.505270841
	4	29.195856830*	1.0993023088	.000	25.886442819	32.505270841
	22	9.018392945*	1.0993023088	.000	5.708978934	12.327806956
	27	6.176247830	1.0993023088	.000	2.866833819	9.485661841
	44	-1.267498523*	1.0993023088	.910	-4.576912534	2.041915488
	48	-.860347108*	1.0993023088	.986	-4.169761119	2.449066903

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 12.689.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

yield

Tukey HSD

trt1	N	Subset		
		1	2	3
0	21	0E-9		
4	21	0E-9		
22	21		20.177463884	
27	21		23.019609000	
53	21			29.195856830
48	21			30.056203937
44	21			30.463355353
Sig.		1.000	.142	.910

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 12.689.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 21.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Multiple Comparisons

Dependent Variable: yield

Tukey HSD

(I) trt2	(J) trt2	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
.0	6.5	-5.394819656*	1.0993023088	.000	-8.704233667	-2.085405645
	7.0	1.651425135	1.0993023088	.743	-1.657988876	4.960839146
	7.5	-.774993716	1.0993023088	.992	-4.084407727	2.534420295
	8.0	-6.059014310*	1.0993023088	.000	-9.368428321	-2.749600299
	8.5	1.545966975	1.0993023088	.797	-1.763447036	4.855380986
	9.0	20.646842239*	1.0993023088	.000	17.337428228	23.956256250
6.5	.0	5.394819656*	1.0993023088	.000	2.085405645	8.704233667
	7.0	7.046244790*	1.0993023088	.000	3.736830779	10.355658801
	7.5	4.619825940*	1.0993023088	.001	1.310411929	7.929239951
	8.0	-.664194654	1.0993023088	.997	-3.973608665	2.645219357
	8.5	6.940786630*	1.0993023088	.000	3.631372619	10.250200641
	9.0	26.041661894*	1.0993023088	.000	22.732247883	29.351075905
7.0	.0	-1.651425135	1.0993023088	.743	-4.960839146	1.657988876
	6.5	-7.046244790*	1.0993023088	.000	-10.355658801	-3.736830779
	7.5	-2.426418851	1.0993023088	.301	-5.735832862	.882995160
	8.0	-7.710439444*	1.0993023088	.000	-11.019853455	-4.401025433
	8.5	-.105458160	1.0993023088	1.000	-3.414872171	3.203955851
	9.0	18.995417104*	1.0993023088	.000	15.686003093	22.304831115
7.5	.0	.774993716	1.0993023088	.992	-2.534420295	4.084407727
	6.5	-4.619825940*	1.0993023088	.001	-7.929239951	-1.310411929
	7.0	2.426418851	1.0993023088	.301	-.882995160	5.735832862
	8.0	-5.284020593*	1.0993023088	.000	-8.593434604	-1.974606582
	8.5	2.320960691	1.0993023088	.354	-.988453320	5.630374702
	9.0	21.421835955*	1.0993023088	.000	18.112421944	24.731249966
8.0	.0	6.059014310*	1.0993023088	.000	2.749600299	9.368428321
	6.5	.664194654	1.0993023088	.997	-2.645219357	3.973608665
	7.0	7.710439444*	1.0993023088	.000	4.401025433	11.019853455
	7.5	5.284020593*	1.0993023088	.000	1.974606582	8.593434604
	8.5	7.604981284*	1.0993023088	.000	4.295567273	10.914395295
	9.0	26.705856548*	1.0993023088	.000	23.396442537	30.015270559
8.5	.0	-1.545966975	1.0993023088	.797	-4.855380986	1.763447036
	6.5	-6.940786630*	1.0993023088	.000	-10.250200641	-3.631372619
	7.0	.105458160	1.0993023088	1.000	-3.203955851	3.414872171

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(I) trt2	(J) trt2	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
8.5	7.5	-2.320960691*	1.0993023088	.354	-5.630374702	.988453320
	8.0	-7.604981284	1.0993023088	.000	-10.914395295	-4.295567273
	9.0	19.100875264	1.0993023088	.000	15.791461253	22.410289275
9.0	.0	-20.646842239*	1.0993023088	.000	-23.956256250	-17.337428228
	6.5	-26.041661894	1.0993023088	.000	-29.351075905	-22.732247883
	7.0	-18.995417104*	1.0993023088	.000	-22.304831115	-15.686003093
	7.5	-21.421835955*	1.0993023088	.000	-24.731249966	-18.112421944
	8.0	-26.705856548*	1.0993023088	.000	-30.015270559	-23.396442537
	8.5	-19.100875264*	1.0993023088	.000	-22.410289275	-15.791461253

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 12.689.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

yield

Tukey HSD

trt2	N	Subset		
		1	2	3
9.0	21	0E-9		
7.0	21		18.995417104	
8.5	21		19.100875264	
.0	21		20.646842239	
7.5	21		21.421835955	
6.5	21			26.041661894
8.0	21			26.705856548
Sig.		1.000	.301	.997

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 12.689.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 21.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้