การหาภาวะที่เหมาะสมและการผลิตไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

ปริญญานิพนธ์

ของ

กนกกานต์ นาคทอง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

สิงหาคม 2556

การหาภาวะที่เหมาะสมและการผลิตไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

ปริญญานิพนธ์

ของ

กนกกานต์ นาคทอง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

สิงหาคม 2556

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การหาภาวะที่เหมาะสมและการผลิตไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

บทคัดย่อ

ของ

กนกกานต์ นาคทอง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

สิงหาคม 2556

กนกกานต์ นาคทอง. (2556). *การหาภาวะที่เหมาะสมและการผลิตไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย Oscillatoria* sp. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ดร.อนิษฐาน ศรีนวล, ดร.สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมและการผลิตไฟโคไซยานินในไซยาโน-แบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. โดยศึกษาผลของพีเอช อุณหภูมิ ความเครียดจากเกลือ แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน และการใช้สารสกัดจากธูปฤาษีและผักตบชวามาเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พบว่าภาวะการเจริญที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง คือ พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ จากนั้นทำการศึกษาโดยการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BG_{11} พบว่าความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า มีผลทำให้การเจริญของ *Oscillatoria* sp.สูงสุด นอกจากนี้ทำการทดลองโดยนำสารสกัดจากธูปฤาษีและผักตบชวามาเป็นส่วนผสมในอาหารชนิด BG_{11} พบว่าสารสกัดจากธูปฤาษีและผักตบชวามีผลทำให้ *Oscillatoria* sp. มีการเจริญได้มากกว่าในอาหารปกติ หลังจากนั้นศึกษาหาปริมาณรงควัตถุในอาหารที่มีภาวะเป็นเบส อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณรงควัตถุมากขึ้นและเซลล์เมื่ออยู่ในอาหารที่มีภาวะเป็นกรด อุณหภูมิไม่เหมาะสม มีความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ และขาดปริมาณไนโตรเจน จะมีผลทำให้ปริมาณรงควัตถุลดลง เมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนเป็น 2 เท่าจะมีผลทำให้ปริมาณไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้น จากการทดลองนี้พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฟโคไซ-ยานินและการเจริญของ *Oscillatoria* sp. คือ อาหาร BG_{11} ที่เติม $NaNO_3$ 3 g/l อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอช 8 แล้วทำการทดลองต่อโดยนำมาเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. พบว่าจะให้น้ำหนักแห้งและปริมาณไฟโคไซยานินสูงสุด

คำสำคัญ: ออสซิลลาทอเรีย ภาวะที่เหมาะสม ไฟโคไซยานิน

OPTIMIZATION AND PRODUCTION OF PHYCOCYANIN FROM CYANOBACTERIUM *Oscillatoria* sp.

AN ABSTRACT

BY

KANOKGARN NAKTHONG

Presented in Partial Fulfillment of Requirements for the

Master of Science Degree in Biology

at Srinakharinwirot University

August 2013

Kanokgarn nakthong. (2013). *Optimization and production of phycocyanin from cyanobacterium Oscillatoria sp.* Master thesis, M.Sc. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Anitthan Srinual, Ph.D.; Surasak Laloknam, Ph.D.

The purpose of this research was to determine the optimal conditions for growth and produce the phycocyanin pigment in cyanobacterium *Oscillatoria* sp. In this study, the effect of pH, temperature, salt stress, carbon and nitrogen sources and the crude extract of cattail and water hyacinth in BG_{11} medium were measured. The optimum condition for growth was found in the BG_{11} medium, pH 8, 35 ^{o}C without NaCl. Then, carbon and nitrogen sources were added in the BG_{11} medium and found the highest growth of *Oscillatoria* sp. in BG_{11} medium with 3 g/l as well as the crude cattail and water hyacinth extract in BG_{11} medium, Showed higher growth than normal medium. The content of phycocyanin pigment were increased in alkaline pH and decreased in acidic pH. The optimal condition for growth and phycocyanin contents of *Oscillatoria* sp. were cultured in BG_{11} medium with 3 g/l NaNO3, pH 8 and 35 ^{o}C

Keywords: *Oscillatoria* sp., Optimaization, Phycocyanin

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การหาภาวะที่เหมาะสมและการผลิตไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

ของ
กนกกานต์ นาคทอง
ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ 17 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2556

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ที่ปรึกษาหลัก ..... ประธาน
(อาจารย์ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล) (รองศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมชัย วงศ์วัฒนะ)

..... ที่ปรึกษาร่วม ..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ) (อาจารย์ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สมบัติ คงวิทยา)

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิต
ในระดับบัณฑิตศึกษา จากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ 2556

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่สละเวลาเพื่อให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางในการดำเนินการทำวิจัยจนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมชัย วงศ์วัฒนะ และ ดร.สมบัติ คงวิทยา ที่กรุณาแนะนำให้ข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เป็นประโยชน์แก่งานวิจัยนี้ และเสียสละเวลาในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสำนักการศึกษา (กองพัฒนาข้าราชการครูกรุงเทพมหานคร) ที่มอบทุนสนับสนุนการศึกษาสำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่มอบทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษาจากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2556 เพื่อสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เป็นอย่างยิ่งที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการและสารเคมีและเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทภูมิรู้และภูมิธรรมทุกท่าน และขอขอบคุณเพื่อนนิสิตปริญญาโทที่คอยช่วยเหลืออำนวยความสะดวก และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้สามารถผ่านอุปสรรคต่างๆ จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

กนกกานต์ นาคทอง

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
	ความสำคัญของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	2
	ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย	3
	สถานที่ทำการทดลอง	3
	นิยามศัพท์เฉพาะ	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	4
	ไซยาโนแบคทีเรีย	4
	ออสซิลลาทอเรีย	5
	ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ	6
	รงควัตถุในไซยาโนแบคทีเรีย	9
	คลอโรฟิลล์	9
	คาโรทีนอยด์	10
	ไฟโคไซยานิน	11
	พืชที่ใช้ในการศึกษา	13
	ธูปฤาษี	13
	ผักตบชวา	15
	องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์พืช	17
	วิธีปรับส่วนผสมของวัตถุดิบ	19
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	21
	วัสดุอุปกรณ์	21
	สารเคมี	21
	ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา	22
	วิธีการทดลอง	22

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

3 (ต่อ)

ตอนที่ 1 ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. 22

ตอนที่ 2 ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อปริมาณรงควัตถุของไซยาโน-แบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. 23

ตอนที่ 3 ศึกษาผลของความเครียดจากเกลือต่อการเจริญและปริมาณรงควัตถุในไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. 24

ตอนที่ 4 ศึกษาการเตรียมผักตบชวาและธูปฤาษี เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน..... 24

ตอนที่ 5 ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่อการเจริญและปริมาณไฟโคไซยานินในไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. 25

การทำโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง..... 26

4 ผลการทดลอง..... 27

ตอนที่ 1 ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Oscillatoria* sp. 27

ตอนที่ 2 ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อปริมาณรงควัตถุของ *Oscillatoria* sp. 30

ตอนที่ 3 ผลของความเครียดจากเกลือต่อการเจริญและปริมาณรงควัตถุใน *Oscillatoria* sp. 33

ตอนที่ 4 ศึกษาการเตรียมผักตบชวาและธูปฤาษี เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน..... 36

ตอนที่ 5 ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่อการเจริญและปริมาณไฟ-โคไซยานินใน *Oscillatoria* sp. 39

5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง 49

สรุปผลการทดลอง 49

อภิปรายผลการทดลอง 49

บรรณานุกรม 57

ภาคผนวก 65

ประวัติย่อผู้วิจัย 73

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. 5

2 โครงสร้างของคลอโรฟิลล์ เอ และบี..... 9

3 โครงสร้างของแคโรทีนอยด์..... 10

4 โครงสร้างของไฟโคบิลิโซม..... 11

5 ต้นธูปฤาษี..... 13

6 ผักตบชวา..... 16

7 โครงสร้างของเซลลูโลส..... 18

8 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส..... 18

9 โครงสร้างของลิกนิน..... 18

10 Schematic representation on biomass pre-treatment..... 19

11 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่มีค่าพีเอช 5-10

(ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer

(ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง..... 28

12 การเจริญของ Oscillatoria sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 25, 35, และ 45 องศาเซลเซียส

(ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer

(ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง..... 29

13 ผลของพีเอชต่อปริมาณรงควัตถุใน *Oscillatoria* sp. รงควัตถุที่ทำการศึกษาได้แก่

(ก) คลอโรฟิลล์ (ข) คาโรทีนอยด์ (ค) ไฟโคไซยานิน (ง) ไฟโคอิริทริน

(จ) อัลโลไฟโคไซยานิน..... 31

14. ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณรงควัตถุใน *Oscillatoria* sp. รงควัตถุที่ทำการศึกษา ได้แก่

(ก) คลอโรฟิลล์ (ข) คาโรทีนอยด์ (ค) ไฟโคไซยานิน (ง) ไฟโคอิริทริน

(จ) อัลโลไฟโคไซยานิน..... 32

15 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ

(ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer

(ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง..... 33

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

16 ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณรงควัตถุที่พบใน *Oscillatoria* sp. รงควัตถุที่ทำการศึกษา ได้แก่ (ก) คลอโรฟิลล์ (ข) คาโรทีนอยด์ (ค) ไฟโคไซยานิน (ง) ไฟโคอิริทริน (จ) อัลโลไฟโคไซยานิน..... 35

17 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยการแปรผันปริมาณไนโตรเจนจากน้ำสกัดธูปฤาษี (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง..... 37

18 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยการแปรผันปริมาณไนโตรเจนจากน้ำสกัดผักตบชวา (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง..... 38

19 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11}, BG_{11}-N และBG_{11}-C ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง..... 39

20 เซลล์ของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร (ก) BG_{11}, (ข) BG_{11}-N และ (ค) BG_{11}-C 40

21 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีความแตกต่างของแหล่งคาร์บอน (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง..... 41

22. การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีความแตกต่างของแหล่งไนโตรเจน (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง..... 42

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

23. ผลของอาหาร BG_{11}, BG_{11}-C และ BG_{11}–N ต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp. 43

24. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.
(1). โซเดียมไนเตรด 0.75 กรัมต่อลิตร (2). โซเดียมไนเตรด 1.5 กรัมต่อลิตร
(3). โซเดียมไนเตรด 3 กรัมต่อลิตร..... 44

25. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.
(1). แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.475 กรัมต่อลิตร
(2). แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.95 กรัมต่อลิตร
(3). แอมโมเนียมคลอไรด์ 1.9 กรัมต่อลิตร..... 45

26. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.
(1). แป้ง 0.01 กรัมต่อลิตร (2). แป้ง 0.02 กรัมต่อลิตร
(3). แป้ง 0.04 กรัมต่อลิตร..... 46

27. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.
(1). กลูโคส 0.025 กรัมต่อลิตร (2). กลูโคส 0.05 กรัมต่อลิตร
(3). กลูโคส 0.1 กรัมต่อลิตร..... 46

28. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.
(1). โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.01 กรัมต่อลิตร
(2). โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.02 กรัมต่อลิตร
(3). โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.04 กรัมต่อลิตร..... 47

29. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.
(1). โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.0075 กรัมต่อลิตร
(2). โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.015 กรัมต่อลิตร
(3). โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.03 กรัมต่อลิตร..... 47

30. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.
(1). กลูตามิก 0.025 กรัมต่อลิตร (2). กลูตามิก 0.05 กรัมต่อลิตร
(3). กลูตามิก 0.1 กรัมต่อลิตร..... 48

31. รงควัตถุที่พบใน *Oscillatoria* sp. โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ TLC 49

32. สารสกัดสีน้ำเงินใน *Oscillatoria* sp. 49

33. รงควัตถุสีน้ำเงินที่พบใน *Oscillatoria* sp. โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ TLC 50

บัญชีตาราง

ภาพประกอบ **หน้า**

1 รงควัตถุที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ 8

2 องค์ประกอบของธูปฤาษี..... 14

3 องค์ประกอบของผักตบชวา..... 17

4 ปริมาณไนโตรเจนในน้ำสกัดจากผักตบชาวและธูปฤาษี..... 36

5 ปริมาณไฟโคไซยานินในอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 43

บทที่ 1
บทนำ

1. ภูมิหลัง

ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue green algae) เป็นสิ่งมีชีวิตอยู่ในดิวิชันไซยาโนไฟตา (Division Cyanophyta) มีกลไกการสังเคราะห์ด้วยแสงได้คล้ายพืช มีผนังเซลล์ และมีรูปร่างหลายแบบ ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียว (unicellular cyanobacteria) เช่น *Microcystis* sp., *Gloeocapsa* sp. และ *Synechococcus* sp. ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสาย (filamentous cyanobacteria) เช่น *Tolypothrix* sp., *Spirulina* sp. และ*Oscillatoria* sp. นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถตรึงแก๊สไนโตรเจนในบรรยากาศได้ (Nitrogen-fixing cyanobacteria) เช่น *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช ปริมาณธาตุอาหาร รวมทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเพื่อใช้สร้างพลังงานและโครงสร้างของเซลล์ (ยุวดี พีระพรพิศาล. 2551)

การสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรียใช้น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารตั้งต้นเพื่อสร้างน้ำตาลในภาวะที่มีแสง (Wim; et al. 2001) โดยมีรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง ได้แก่ คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) อัลโลไฟโค-ไซยานิน (allophycocyanin) และไฟโคอิริทริน (phycoerythrin) ไฟโคไซยานินเป็นรงควัตถุที่มีความสามารถดูดกลืนแสงในช่วงที่คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) ซึ่งดูดกลืนแสงได้น้อยและช่วยถ่ายทอดพลังงานที่ดูดกลืนไปยังคลอโรฟิลล์ เอ กลไกนี้เหมือนกับสาหร่ายสีแดง (Johnson; 2006) ประโยชน์ของไฟโคไซยานินมีหลายด้าน ได้แก่ เป็นสีผสมอาหาร เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารของสัตว์น้ำ ไฟโคไซยานินมีสมบัติเรืองแสงได้จึงมีการสกัดไฟโคไซยานิน จาก *Spirulina* sp. ใช้แทนเอทธิเดียมโบร-ไมด์ (EtBr) ในการย้อมเจลเพื่อดูดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ (Singh; et al. 2010) นอกจากนี้ไฟโคไซยานินยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น กำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล และเปอร์ออกซิล (Romay; et al. 2003)

การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียต้องการแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และมีงานวิจัยนำวัชพืชที่มีองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลที่ประกอบด้วยธาตุคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นส่วนผสมของวัตถุดิบในการเจริญเติบโต (Valeria; et al. 2003) พืชที่นำมาใช้ ได้แก่ ต้นผักตบชวา (Water Hyacinth) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms และต้นธูปฤาษี (Cat - tail) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Typha angustifolia* L. โดยเตรียมวัตถุดิบจากกระบวนการต่างๆ เช่น ใช้กรด ความร้อนและเอนไซม์เพื่อย่อยให้ได้โครงสร้างที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอน (ฆาสิณี พูลพิพัฒน์. 2548) และไนโตรเจน (Soletto; et al. 2004)

ดังนั้น การศึกษานี้เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของ *Oscillatoria* sp. ที่แตกต่างกัน และการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากสารสกัดผักตบชวาและธูปฤาษี เพื่อทำให้การเจริญของ *Oscillatoria* sp. เหมาะสมในการผลิตไฟโคไซยานิน

2. ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.
2. ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อปริมาณรงควัตถุของไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.
3. ศึกษาผลของความเครียดจากเกลือต่อการเจริญและปริมาณรงควัตถุในไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.
4. ศึกษาการเตรียมผักตบชวาและธูปฤาษี เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน
5. ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่อการเจริญและปริมาณไฟโคไซยานินในไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

3. ความสำคัญของการวิจัย

การหาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตไฟโคไซยานินของไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. โดยการนำพืชซึ่งเป็นวัชพืชน้ำ ได้แก่ ผักตบชวา และธูปฤาษีมาใช้เป็นส่วนผสมของอาหารในการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. เพื่อผลิตไฟโคไซยานินเพื่อเป็นแนวทางวิจัยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารของสัตว์น้ำ นอกจากนี้ยังเป็นการลดวัชพืชน้ำซึ่งจะช่วยแก้ไขปัญหามลพิษทางน้ำได้อีกด้วย

4. ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาการเจริญและปริมาณรงควัตถุที่พบในไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. โดยศึกษาจากภาวะที่แตกต่างกัน ได้แก่ ภาวะปกติ ภาวะความเครียดจากเกลือ ภาวะความแตกต่างของพีเอชและอุณหภูมิ และการนำวัชพืชมาเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโต เพื่อให้ปริมาณของไฟโคไซยานินสูงสุด โดยศึกษาไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. จากห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

4.1 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เริ่มตั้งแต่ พฤษภาคม 2554 – เมษายน 2556

4.2 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ ห้อง 623 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ ชั้น 6 อาคาร 15 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

5. นิยามศัพท์เฉพาะ

5.1 ภาวะที่เหมาะสม หมายถึง ภาวะที่ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. เจริญเติบโตได้ดีที่สุด ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต

5.2 แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน หมายถึง แหล่งที่มีธาตุคาร์บอน และไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ สารสกัดจากผักตบชวา สารสกัดจากธูปฤาษี โซเดียมไนเตรต แอมโมเนียม-คลอไรด์ โซเดียมไบคาร์บอเนต โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต กลูโคส กลูตามิก และแป้ง

6. สมมติฐานในการวิจัย

แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากพืช มีผลต่อการเจริญและปริมาณไฟโคไซยานินของไซยาโน-แบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. ไซยาโนแบคทีเรีย
2. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย
3. รงควัตถุในไซยาโนแบคทีเรีย
4. พืชที่นำมาศึกษา
5. โครงสร้างที่พบในพืช
6. การปรับสภาพวัตถุดิบ

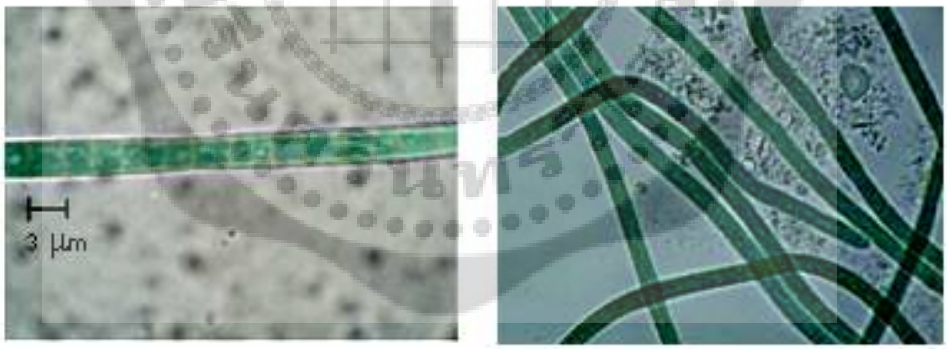
1. ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีความหลากหลาย เช่น ทะเล ทะเลสาป ดิน และบ่อน้ำพุร้อน (Koppenaal; 2011) รูปร่างของไซยาโนแบคทีเรียแบ่งออกได้หลายลักษณะ ได้แก่ พวกที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดียว (unicellular) เช่น *Chroococcus* sp. และ*Synechocystis* sp. พวกที่มีลักษณะเป็นโคโลนี (colony) เช่น *Gloecapsa* sp. และ *Aphanothece* sp. พวกที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filaments) เช่น *Oscillatoria* sp. และ *Spirulina* sp. บางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ (nitrogen-fixing bacteria) เนื่องจากมีเฮเทอโรซิสต์ เช่น *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. (มาลินี ฉัตรมงคลกุล; และชิดชัย จันทร์ตั้งสี. 2548) สิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์เอ แคโรทีนอยด์ และยังมีรงควัตถุกลุ่มอื่นคือ ไฟโคไซยานิน ไฟโคอิริทริน และอัลโลไฟโคไซยานิน ซึ่งพบอยู่ที่เยื่อไทลาคอยด์ เรียกว่า ไฟโคบิลิ-โซม (phycobilisome) อีกด้วย (ยุวดี พีระพรพิศาล; และคณะ. 2551) การเคลื่อนที่เป็นแบบเลื่อนไหล (gliding movement) ซึ่งเกิดจากแรงผลักดันของสารคล้ายเมือกขับออกมาทางรูเล็กๆ ที่ผนัง-เซลล์การแลกเปลี่ยนน้ำและสารละลายภายในเซลล์ที่ไม่เท่ากัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแรงตึงผิวจึงเกิดการเคลื่อนที่ได้ (Hoiczyk; 2000) การสืบพันธุ์เป็นแบบไม่อาศัยเพศโดยแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ การแบ่งตัว (fission) และการสร้างสปอร์ (spore formation) พวกที่เป็นเซลล์เดียวจะแบ่งเซลล์ทำให้เกิดกลุ่มเซลล์รวมกันอยู่ภายในผนังเซลล์เดียวกัน หลังจากนั้นเซลล์จะหลุดออกจากผนังเซลล์และเจริญเติบโตเป็นเซลล์กลุ่มใหม่ พวกที่เป็นโคโลนีจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและหลุดออก เป็นกลุ่มย่อยๆ แล้วกลายเป็นเซลล์ใหม่ การสร้างฮอร์โมโกเนีย (hormogonia) หรือฮอร์โมโกน (homogon) จะพบในพวกที่เป็นตรัยโคม (trichome) จะแยกเป็นท่อนสั้นๆ ประมาณ 2 – 3 เซลล์หรือมากกว่า บริเวณที่ขาดออกจากกันเรียกว่า เซพาเรชั่นดิสค์ (separation disks) หรือ เนครีเดีย (necridia)

หากอยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสมยังมีการสร้างเซลล์ที่มีขนาดใหญ่คล้ายสปอร์ เรียกว่า อะคีนีต (akinete) ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ภาวะแห้งแล้ง อุณหภูมิสูง ส่วนการสร้างสปอร์แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ เอนโดสปอร์ (endospore) เป็นสปอร์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จากการแบ่งของโพรโทพลาสต์ (protoplast) และเอกโซสปอร์ (exospore) เกิดจากกระบวนการแบ่งส่วนปลายเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียออกมา (จารุ สังขนุกิจ. 2547) มีการนำไซยาโนแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น นำมาใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพสำหรับคนและสัตว์ เครื่องสำอาง สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม ปุ๋ยชีวภาพ และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็นต้น (อุดมลักษณ์ มณีโชติ. 2552)

ออสซิลลาทอเรีย (*Oscillatoria* sp.)

ออสซิลลาทอเรียอยู่ในดิวิชันไซยาโนไฟตา จัดอยู่ในวงศ์ (family) Oscillatoriaceae มีลักษณะเป็นเส้นสายไม่มีการแตกแขนง ตรัยโคมเป็นทรงกระบอกเหยียดตรงหรือเป็นเกลียวเล็กน้อย ตรัยโคมไม่มีชีทหุ้ม และที่ปลายสายมีเซลล์ปลายสุดเรียกว่า apical cap cell บริเวณปลายจะมน หรือในบางชนิดพบว่าเซลล์ปลายสุดอาจมีลักษณะยาว เรียวแหลม หรืออาจเป็นลูกตุ้ม มีการเคลื่อนที่แบบแกว่งไปมา (oscillating movement) มีการสร้างโฮโมโกเนียที่ใช้ในการสืบพันธุ์โดยแบ่งสายออกเป็นท่อนๆ แต่ละท่อนสามารถแบ่งเซลล์ยาวต่อไป ไม่มีเฮเทอโรซิสจึงไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ (ภาพประกอบ 1) (ยุวดี พีรพรพิศาล; และคณะ. 2551)



ภาพประกอบ 1 ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

มีการศึกษาเกี่ยวกับไซยาโนแบคทีเรีย *Chroococcus turidus* และ *Oscillatoria* sp. ในบ่อเลี้ยงสาหร่ายขนาดใหญ่ เพื่อตรวจสอบปริมาณรงควัตถุ วิตามิน ยาปฏิชีวนะ พอลิแซคคาไรด์ กรดไขมันจำเป็น และเอนไซม์ เพื่อทำเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตใช้เชิงพานิชย์ เช่น สีผสมอาหาร ไอศครีม ยา และแหล่งเชื้อเพลิง (Mohan; et al. 2010) และนอกจากนี้ Hemlata (2011) ได้สกัดไฟโคไซยา-

นินจาก *Anabaena* sp. NCCU-9 เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น อาหารเสริม เครื่องสำอาง ยารักษาโรค ทางการแพทย์ และเภสัชกรรมเช่นกัน

สารที่สกัดได้จาก *Oscillatoria willei* มีฤทธิ์ระงับอาการปวดและฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูถีบจักรได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับมาตรฐานความปลอดภัยทางยา (Rajavel; et al. 2007) และมีรายงานว่าไฟโคบิลิโปรตีนสามารถต้านออกซิเดชันที่อุณหภูมิสูงพบใน *Oscillatoria* sp. KC 45 มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันสูงที่สุด รองลงมาคือ *Phormidium* sp. PD 40, *Scytonema* sp. TP 40 และ *Cyanosarcina* sp. SK 40 ตามลำดับ และพบว่าการต้านออกซิเดชันจาก *Cyanosarcina* sp. SK 40 เพิ่มขึ้น เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 30 นาที (ชยากร ภูมาศ; และคณะ. 2007)

2. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย (พิมพ์ภาพ มณีธร. 2553)

2.1 ความเข้มแสง มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโน-แบคทีเรียเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะความเข้มแสงที่แตกต่างกันมีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย จากรายงานพบว่าการได้รับแสงมีผลต่อคุณค่าทางโภชนาการและการสร้างรงควัตถุ โดยการใช้มูลสุกรผสมในปุ๋ยสำหรับเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis* (สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์; ศักดิ์ชัย ชูโชติ; และปวีณา ทวีกิจการ. 2553) นอกจากนี้ความเข้มแสงที่เหมาะสมสำหรับ *Aphanothece halophytica* สำหรับการผลิตไฟโคไซยานินคือ 1,500 ลักซ์ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในแสงสีแดง สีเขียว และสีขาว พบว่าไซยาโนแบคทีเรียผลิตไฟโคไซยานินในปริมาณสูงภายใต้แสงสีแดง สีขาว และสีเขียว ตามลำดับ (ศศิพร เทียนแป้น และคณะ. 2551)

2.2 อุณหภูมิ มีผลต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย การสืบพันธุ์ และทำให้ปริมาณของออกซิเจนในน้ำลดลง ไซยาโนแบคทีเรียมีความต้องการอุณหภูมิในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน จากการศึกษา *Nostoc commune* ซึ่งกำลังได้รับความนิยมในประเทศไทยนำมาเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุดคือ 8.1 $\pm$ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำหนักแห้งมากที่สุดคือ 1.36 $\pm$ 0.01 กรัมต่อลิตร (สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์. 2549) และจากการศึกษา *Arthrospira platensis* อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ และปริมาณไฟโคไซยานินคือ 28 องศาเซลเซียส (Mohite; & Wakte: 2011)

2.3 ความขุ่นของน้ำ เกิดจากสารแขวนลอย ทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ รวมทั้งสิ่งมีชีวิตในน้ำ อนุภาคสารแขวนลอย เช่น ฟอสเฟตทำให้พืชน้ำเจริญเติบโตได้ดี มีผลต่อปริมาณแสงในน้ำ (Kjellstrom; 2006) ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรียทำให้เจริญเติบโตไม่เต็มที่

2.4 ค่าพีเอช ในการเจริญของสิ่งมีชีวิตจะอยู่ในช่วง 6.8-8.0 ทั้งนี้ไซยาโนแบคทีเรียมีความต้องการพีเอชที่แตกต่างกัน จากการศึกษาไซยาโนแบคทีเรีย *Phormidium tenue*, *Synechococcus cedrorum* และ *Synechococcus pevalekii* เจริญเติบโตได้ดีที่สุดใน BGA

medium ที่พีเอชเท่ากับ 7.5 (Nagle; Mhalsekar: & Jagtap; 2009) นอกจากนี้เคลบเบอร์และคณะ (2011) ได้ศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญของ *Anabaenopsis elenkinii* ที่พบใน ทะเลสาปของประเทศบราซิล อัตราการเจริญมากที่สุดที่พีเอช 10.5 (Kleber; et al. 2011)

2.5 ปริมาณสารอาหาร ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญเติบโตได้เหมือนสิ่งมีชีวิตทั่วไป ต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโต เพื่อนำมาสร้างพลังงานและสารประกอบที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ โดยแบ่งความต้องการปริมาณสารอาหารของไซยาโนแบคทีเรีย ดังนี้

2.5.1 แร่ธาตุที่ต้องการเป็นปริมาณมาก (macro nutrient) เป็นแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลซึ่งเป็นโครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน ไฮโดรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และโพแทสเซียม

2.5.2 แร่ธาตุที่ต้องการเป็นปริมาณน้อย (micro nutrient) แร่ธาตุเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของโมเลกุลของ Growth factors หรือเอนไซม์ ได้แก่ คลอรีน เหล็ก แมงกานิส โบรอน สังกะสี ทองแดง โครเมียม ซิลิเนียม และโมลิบดินัม มีรายงานการศึกษาลักษณะของการเจริญเติบโตและปริมาณไฟโคไซยานินใน Antarctic cyanobacteria และ Tropical cyanobacteria โดยคัดกรองไซยาโนแบคทีเรีย 3 สกุล คือ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Phormidium* sp. ภายใต้การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่มีอุณหภูมิ แสง และสารอาหารต่างกัน พบว่าไซยาโนแบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโต และปริมาณไฟโคไซยานินในอาหาร modifiled BG_{11} มากกว่าในอาหารแบบปกติ (Shukia; et al. 2008) และยังมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณแคโรทีนอยด์อีกด้วย (Shukia; & Kashyap. 2003) นอกจากนี้ในการเจริญเติบโตของ *Azotobacter chroococcum* โดยใช้กลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) แมนนิทอล (manitol) และโซเดียม-เบนโซเอต (sodium benzoate) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดยีสต์ (yeast extract) สารสกัดเนื้อ (meat extract) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งไนโตรเจนใช้ในการเจริญเติบโต พบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสและสารสกัดจากยีสต์ 13.06 และ 3.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ จะให้ผลผลิตมากที่สุดคือ 0.1117 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Ivonne; Ana; & Nubia. 2011)

ตาราง 1 รงควัตถุที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

ชนิดของรงควัตถุ	ช่วงความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสง (nm)	ชนิดของสิ่งมีชีวิต
คลอโรฟิลล์		
คลอโรฟิลล์ เอ	420, 660	พืชชั้นสูงทุกชนิดและสาหร่าย
คลอโรฟิลล์ บี	435, 643	พืชชั้นสูงทุกชนิดและสาหร่ายสีเขียว
คลอโรฟิลล์ ซี	445, 625	ไดอะตอมและสาหร่ายสีน้ำตาล
คลอโรฟิลล์ ดี	450, 690	สาหร่ายสีแดง
แคโรทีนอยด์		
เบต้า คาโรทีน	425, 450, 480	พืชชั้นสูงและสาหร่ายส่วนใหญ่
แอลฟา คาโรทีน	420, 440, 470	พืชส่วนใหญ่และสาหร่ายบางชนิด
ลูตีออล	425, 445, 475	สาหร่ายสีเขียว สีแดงและพืชชั้นสูง
ไวโอลาแซนธอล	425, 450, 475	พืชชั้นสูง
ฟูโคแซนธอล	425, 450, 475	ไดอะตอมและสาหร่ายสีน้ำตาล
ไฟโคบิลิน		
ไฟโคอิริทริน	490, 546, 576	สาหร่ายสีแดงและไซยาโนแบคทีเรีย
ไฟโคไซยานิน	618	สาหร่ายสีแดงบางชนิดและไซยาโนแบคทีเรีย

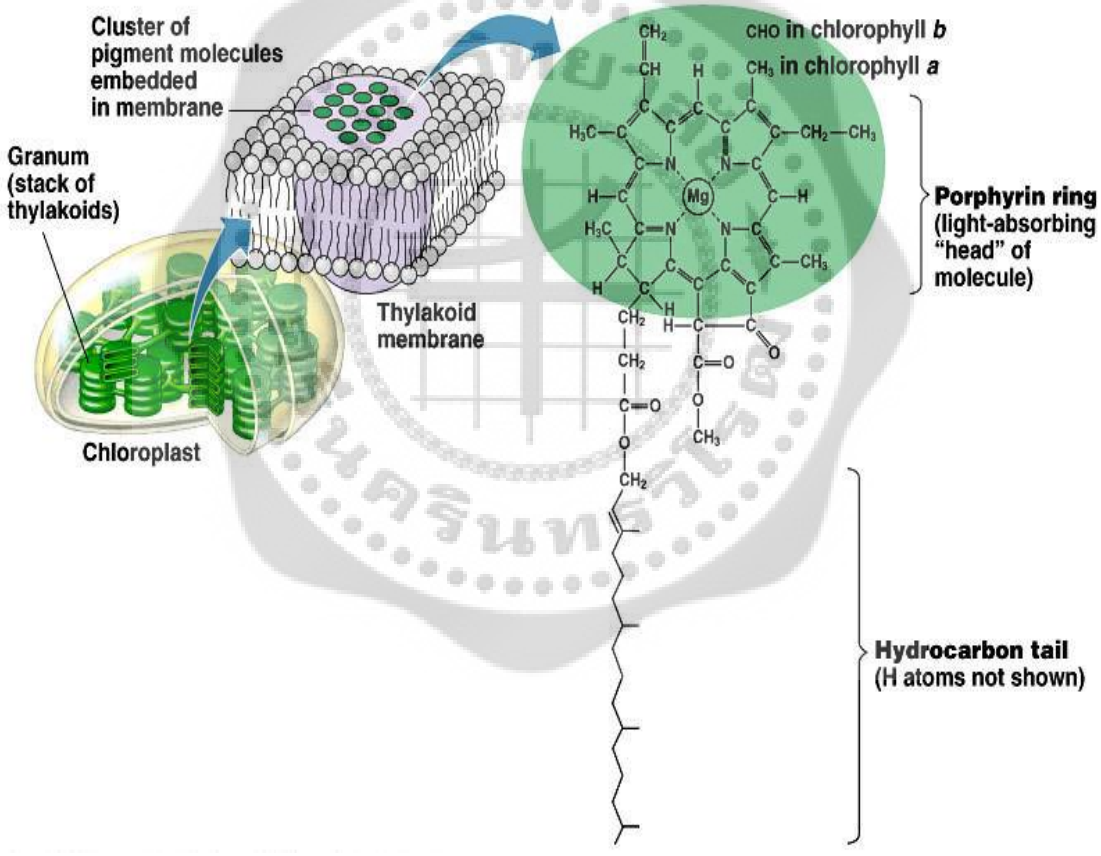
ที่มา: ดนัย บุณยเกียรติ. (2004)

3. รงควัตถุในไซยาโนแบคทีเรีย

รงควัตถุที่พบในสิ่งมีชีวิตสามารถจำแนกได้ตามตาราง 1 โดยมีรายละเอียดต่างๆ ดังนี้

3.1 คลอโรฟิลล์

คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุที่มีสีเขียวพบในสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ โดยพืชจะใช้พลังงานแสงเปลี่ยนไปเป็นพลังงานเคมี คลอโรฟิลล์แบ่งเป็น คลอโรฟิลล์ เอ บี ซี และดี โดยคลอโรฟิลล์เอจะพบในแพลงก์ตอนพืชและสาหร่ายทุกชนิด (พิมพ์ภาพ มณีธร. 2554) พืชได้รับพลังงานแสงและมีรงควัตถุในการดูดกลืนคลื่นแสง ซึ่งรงควัตถุมีหลายชนิดและดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นต่างกันดังตาราง 1 คลอโรฟิลล์มีหลายชนิดซึ่งแต่ละชนิดมีโครงสร้างหลักที่เหมือนกันคือ วงแหวนไพรอล (pyrol) 4 วง โซ่ข้างของคลอโรฟิลล์แต่ละชนิดจะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป (ภาพประกอบ 2) (ภาคภูมิ พระประเสริฐ. 2550)

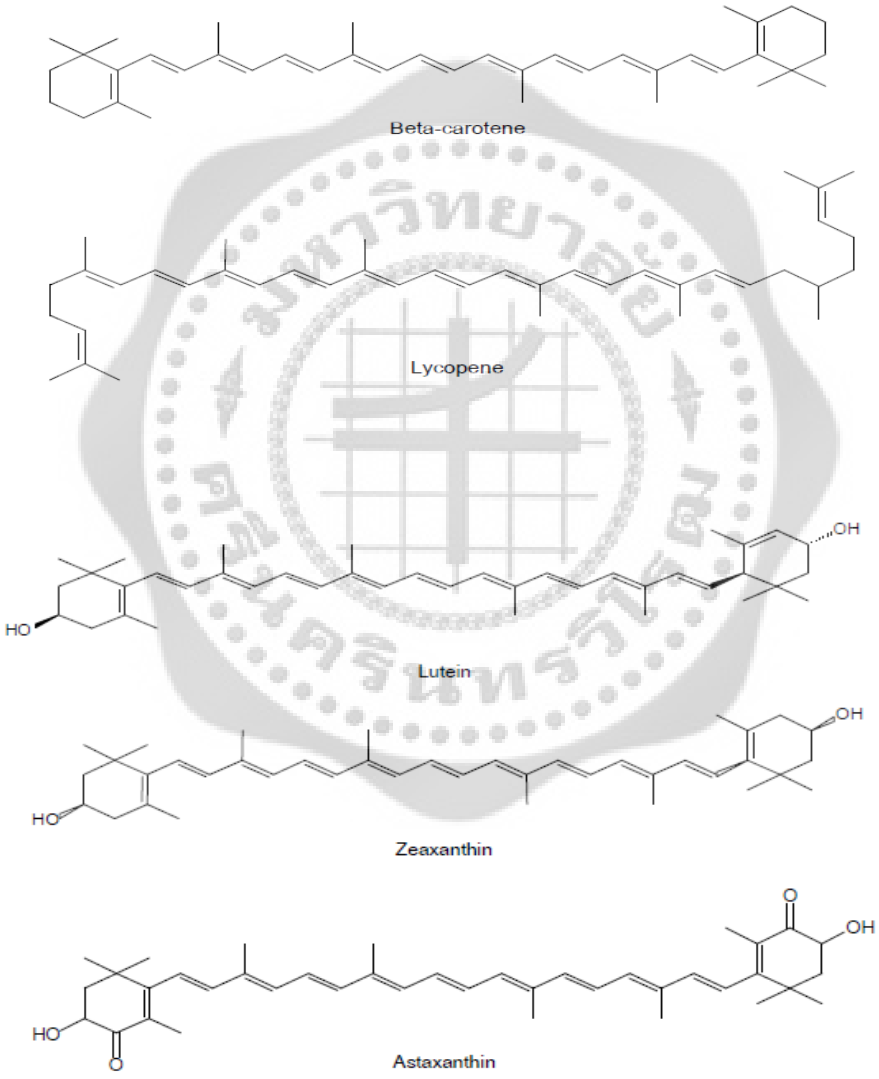


ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของคลอโรฟิลล์ เอ และบี

ที่มา: Campbell's *Biology, 5th Edition.* page 175

3.2 แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบทั่วไปในสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ มีหน้าที่ในการช่วยรับพลังงานแสง เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และยังมีความสามารถในการป้องกันอันตรายจากแสง แคโรทีนอยด์มีโครงสร้างหลักเป็นสายไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยคาร์บอน 40 อะตอม จำแนกได้เป็น 2 กลุ่มคือ แคโรทีน (carotenes) และแซนโท-ฟิลล์ (xanthophylls) แสดงโครงสร้างของแคโรทีนอยด์บางชนิดดังภาพประกอบ 3 (Hendry; & Houghton. 1996)

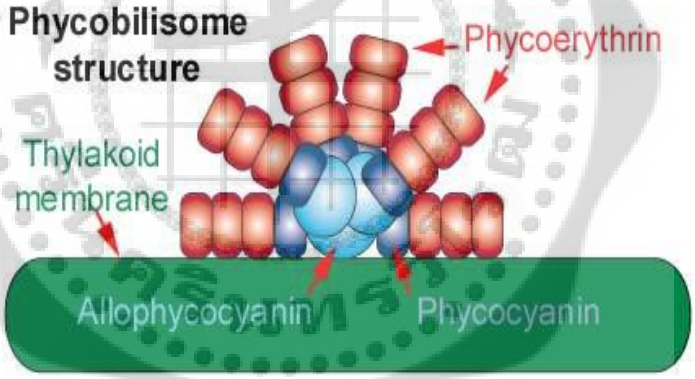


ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของแคโรทีนอยด์

ที่มา: วีระศักดิ์ สามี. 2005.หน้า 59.

3.3 ไฟโคไซยานิน

ไฟโคไซยานินเป็นรงควัตถุที่ทำหน้าที่ดูดกลืนแสง และถ่ายทอดพลังงานในระบบแสง II (photosystem II) ทำหน้าที่ดูดกลืนแสงในช่วงที่สามารถมองเห็นได้ (visible light) ทำงานในช่วงที่คลอโรฟิลล์เอ ดูดกลืนได้น้อย โดยโครงสร้างนี้พบในไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีแดง (ภาพประกอบ 4) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดพลังงานให้กับระบบแสง II (ยุวดี พีระพรพิศาล; และคณะ. 2551) และไฟโคไซยานินซึ่งเป็นส่วนประกอบที่พบในไฟโคบิลิโซม (phycobilisome) ที่อยู่บนเยื่อของไทลาคอยด์มีโครงสร้าง 2 ส่วนคือส่วนของ core จำนวน 3 แท่ง ประกอบด้วยไฟโคบิลิโปรตีน ชนิดอัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin APC) และส่วน rod จำนวน 6 แท่ง ประกอบด้วย ไฟโคบิลิโปรตีน 2 ชนิดคือไฟโคไซยานิน (phycocyanin, PC) และไฟโคอิริทริน (phycoerythrin, PE) ไฟโคบิลิโปรตีนแบ่งเป็นกลุ่ม prosthetic group ตามส่วนที่มีสี (chromobilin) ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย ซึ่งไฟโคบิลิโปรตีนแบ่งออกเป็น 3 ชนิด แต่ละชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่แตกต่างกัน ได้แก่ PE มี λ_{max} ~565 nm PC มี λ_{max} ~620 nm และ APC มี λ_{max} ~650 nm



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของไฟโคบิลิโซม

ที่มา: Botany Hawii. 2011.

รงควัตถุเหล่านี้สามารถสกัดได้ง่ายเพียงทำให้เซลล์แตกในน้ำหรือสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นต่ำ (ยุวดี พีรพรพิศาล; และคณะ. 2551) มีการสกัดไฟโคไซยานินที่มีสีน้ำเงินเพื่อเป็นสีผสมอาหาร และอุตสาหกรรมยา ด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน เช่น วิธีทางเคมี ฟิสิกส์ และเอนไซม์ (Moraes; 2010) การสกัดไฟโคไซยานินที่เหมาะสมจาก *Aphanothece halophytica* พบว่าวิธีการย่อยด้วยไลโซไซม์เป็นวิธีที่ดีที่สุด และภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* จาก

สูตรอาหาร Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ โดยมีโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร มีปริมาณไฟโคไซยานินมากที่สุด (จันทรพร ทองเอกแก้ว. 2537) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการสกัดไฟโคไซยานินจาก *Synechococcus* sp. โดยบ่มกับไลโซไซม์ที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 16 ชั่วโมง ผลที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์เท่ากับ 2.18 หลังจากนั้นบ่มโดยใช้ถ่านกับไคโตซานมีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.72 ผลผลิตของไฟโคไซยานินที่ได้เท่ากับ 80-100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง (Alka; Jayashree; & Sainis; 2009)

การศึกษาผลของการทำแห้งต่อปริมาณของ C-Phycocyanin (C-PC) และสมบัติการต้านออกซิเดชันจาก *Spirulina platensis* พบว่าการทำแห้งมีผลต่อปริมาณ C-PC รวมทั้งสมบัติการต้านออกซิเดชัน เมื่อเปรียบเทียบการสกัดที่ผ่านการทำแห้งโดยวิธีต่าง ๆ พบว่า *S. platensis* ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็งและแบบพ่นฝอยมีปริมาณ C-PC ที่มีความบริสุทธิ์ นอกจากนี้การทำให้ C-PC บริสุทธิ์ที่ผ่านการทำแห้งวิธีต่าง ๆ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 50% (w/v) พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้น 2-5 เท่าจากเริ่มต้น (สินีนาฏ อักโขสุวรรณ และศศิธร จันทนวรางกูร. 2010) นอกจากนี้ Bhasker และคณะ (2005) ศึกษาเกี่ยวกับการทำให้ C-PC บริสุทธิ์สกัดจาก *S. platensis* และทำการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 50% พบว่ามีค่าเท่ากับ 4.98 เท่า

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการสกัด PC จาก *Spirulina platensis* โดยวิธี sonication, repeated freezing and thawing (RFT) และ enzymolysis โดยศึกษาจากสายพันธุ์ Sp 1183 และ Sp1213 โดยวิธีการ sonication ใช้เวลา 5, 12.5 และ 20 วินาที ที่ความถี่ 70, 85 และ 100 พบว่าทำให้เซลล์แตก วิธีการที่ RFT บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง และการทำให้ละลาย 1-3 รอบ พบว่าเวลาที่แช่แข็งและทำให้ละลายมีผลทำให้เซลล์แตก ส่วนวิธีการ sonication และ RFT ของสายพันธุ์ Sp1183 ให้ผลสูงกว่าสายพันธุ์ Sp1213 วิธีการ sonication มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มากกว่า RFT วิธีการที่ใช้ enzymolysis lysozyme ภายใต้ความเข้มข้นของเอนไซม์ เวลาการสกัด และอุณหภูมิ พบว่าได้ค่าสูงสุดที่ได้รับที่ 44 °C ที่ pH 5.0 มีค่าเท่ากับ 0.123 กรัมต่อมิลลิลิตร (Duangsee; et al. 2009)

ไฟโคไซยานินใช้เป็นสีผสมอาหาร และเป็นอาหารสัตว์เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูง (สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์; และคณะ. 2553) เนื่องจากมีคุณสมบัติเรืองแสง จึงมีการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. ในการย้อมเจลเพื่อดูดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอแทนเอทธิเดียมโบรไมด์ (EtBr) และยังใช้ตรวจสอบทางชีวเคมี (Herrera; et al. 1989) นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina platensis* จากสูตรอาหาร Zarrouk และสูตรอาหารอย่างง่าย ที่ pH เท่ากับ 8, 9, 10 และ 11 พบว่า ที่ pH 9 ในสูตรอาหารอย่างง่ายให้ปริมาณไฟโคไซยานินสูงที่สุด การเติมโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัม/ลิตร พบว่าผลผลิตที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (กรวิทย์ ไชยสุ. ม.ป.ป.) และนอกจากนี้การศึกษาความคงตัวของไฟโคบิลิโปรตีนพบว่าในสภาพที่มีแสงไฟโคบิลินจะมีความคงตัวมาก และไฟโคบิลินโปรตีนจาก *S. platensis* มีความคงตัวได้ดีกว่า

Oscillatoria sp. KC45 (ศศิพร เทียนแป้น; และปานมุก วัชระปิยะโสภณ. 2551) และไฟโคไซยานินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Singh; et al. 2010) มีการศึกษาใน *S. platensis* พบว่า Se-PC สามารถยับยั้งมะเร็งเต้านมและเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ A375 และ MCE-7 (Chen; et al. 2008) และการศึกษาในยีน *apc* ของ *Anacystis nidulans* ซึ่งผลิต APC ถูกโคลนและแสดงออกใน *Escherichia coli* และ Recombinant APC ที่ได้เมื่อวัดกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Deoxyribose assay พบว่าสามารถกำจัด hydroxyl radical ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ge; et al. 2006) ดังนั้นไฟโคไซยานินสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์และเภสัชกร ด้านอาหาร และด้านอื่นๆ และได้มีการศึกษาและพัฒนาเพื่อนำไปใช้ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

4. พืชที่ใช้ในการศึกษา

4.1 ธูปฤาษี (Cat-tail)

ต้นธูปฤาษีจัดเป็นวัชพืชที่ขึ้นบริเวณริมน้ำ มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามแต่ละพื้นที่ เช่น กกช้าง กกธูป เฟื้อ ปรือ และหญ้าสลาบหลวง (นพพล เกตุประสาท. 2554) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จัดอยู่ในอันดับ (order) Poales วงศ์ Typhaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Typha angustifolia* L. (ภาพประกอบ 5)

ภาพประกอบ 5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นธูปฤาษี *Typha angustifolia* L.

1 ลักษณะวิสัย

2 ดอกธูปฤาษีเพศผู้

3 ดอกธูปฤาษีเพศเมีย

ธูปฤาษีมีการกระจายพันธุ์ในเขตร้อนและเขตอบอุ่น มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกา และยุโรป มีอายุประมาณ 2 ปี ลำต้นแข็งตรงสูงประมาณ 1.5 – 3 เมตร มีเหง้าแตกแขนง ลำต้นแข็ง ใบเรียงสลับในระนาบเดียวกันออกจากโคนต้นยาวประมาณ 50 – 120 เซนติเมตร มีกาบใบ ช่อดอกแบบช่อทรงกระบอก ไม่มีกลีบดอกและกลีบเลี้ยง ออกดอกตลอดทั้งปี ดอกมีขนาดเล็กจำนวนมากโดยด้านบนเป็นดอกเพศผู้มีสีน้ำตาลอมเขียวช่อดอกเพศผู้ยาว 8 – 40 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของช่อดอก 0.2 – 0.7 เซนติเมตร มีใบประดับ 1 - 3 ใบ มีเกสรเพศผู้ 2 – 5 อันซึ่งมีขนล้อมรอบ ก้านเกสรเพศผู้สั้น อับเรณูยาว 1.5 – 2 มิลลิเมตร และด้านล่างเป็นดอกเพศเมียซึ่งมีสีน้ำตาลเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 – 2 เซนติเมตร ช่อดอกเพศเมียยาวประมาณยาว 5 – 30 เซนติเมตร รังไข่รูปกระสวยติดบนก้านรังไข่ซึ่งเป็นหลอดยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร มีขนยาวจำนวนมาก หรือมีใบประดับย่อยที่โคน ก้านเกสรเพศเมียเป็นหลอด ยอดเกสรกว้างรูปแถบ หรือรูปใบพายยาว 1 – 1.5 มิลลิเมตร มีขนแต่สั้นกว่าบนก้านเกสร มีออวุล 1 เม็ด ผลมีขนาดเล็ก หลุดร่วงพร้อมก้านผล เมล็ดห้อยลงเป็นริ้ว ระหว่างดอกเพศผู้และดอกเพศเมียจะมีส่วนของก้านช่อดอกที่เป็นหมันยาว 2.5 – 7 เซนติเมตร คั่นอยู่ ดอกที่เป็นหมันมีรังไข่บวมพองแต่ไม่มียอดเกสรเพศเมีย (carpodium)

ธูปฤาษีเป็นวัชพืชที่ขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและเจริญเติบโตได้ดีในแหล่งน้ำ เช่น แหล่งน้ำในชุมชน แหล่งน้ำเสียหน้าโรงงานต่างๆ จึงมีการศึกษาและนำต้นธูปฤาษีมาใช้ประโยชน์เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ เช่น วัว ควาย และแพะ (ดวงพร สุวรรณกุล; และรังสิต สุวรรณาเขตนิคม. 2544) และมีการศึกษาองค์ประกอบของธูปฤาษี ดังตาราง 2 เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์

ตาราง 2 องค์ประกอบของธูปฤาษี

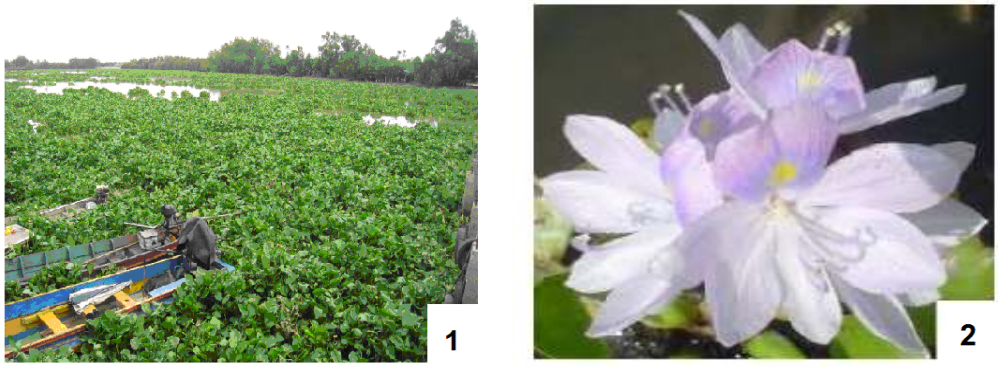
ส่วนประกอบ	% น้ำหนักแห้ง
Ash	6.75
C	45.91
N	1.37
P	0.21
Ca	0.89
Mg	0.16
K	2.38
Na	0.38
S	0.13

ที่มา: ดัดแปลงจาก Boyd; & Hess, 1970

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีการนำธูปฤาษีมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำไบโอ-เอทานอล (Bio-ethanol) (Suda; et al. 2007) นำธูปฤาษีไปปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล เพื่อลดต้นทุนในการผลิตพลังงาน (Zhang; et al. 2010) และใช้เป็นตัวดูดซับฟอร์มัลดี-ไฮด์ที่เหลือจากถ่านแกลบ ถ่านธูปฤาษี และถ่านกกกลม (วัชรพงษ์ วาระรัมย์; และคณะ. ม.ป.ป.)

4.2 ผักตบชวา (Water Hyacinth)

ผักตบชวา มีชื่อเรียกที่แตกต่างกัน เช่น ผักตบชวา ผักป่อง สวะ อยู่ในอันดับ Commelinales วงศ์ Pontederiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms (ประวิทย์ สุรนีรนาถ. 2554) เป็นพืชที่เจริญอยู่บนผิวน้ำ รากไม่ยึดติดกับพื้นดิน จึงถูกน้ำพัดพาได้เมื่ออยู่ในน้ำ ตื้นรากจะหยั่งยึดติดกับพื้นดิน ลักษณะของต้นประกอบด้วยกลุ่มของใบเรียงกันเป็นกระจุก โคนก้านใบจะมีกาบใบ (sheath) เป็นเยื่อสีขาวแกมเขียวอ่อน เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลำต้นทอดไปตามผิวน้ำเชื่อมติดต่อกันโดยการไหล (stolon) เพื่อช่วยในการขยายพันธุ์ของผักตบชวาให้เพิ่มขึ้น ราก ของผักตบชวาเป็นแบบรากฝอย (fibrous root) ใบเป็นแบบใบเดี่ยว (simple leaf) ประกอบด้วย แผ่นใบ (blade) และก้านใบ (petiole) แผ่นใบมีลักษณะคล้ายรูปไต (reniform) หรือคล้ายรูปหัวใจ (cordate) มักมีความกว้างมากกว่ายาว ใบอ่อนมีลักษณะปลายใบมักมน เมื่อมีอายุมากขึ้น ปลายใบจะแหลม มีสีเข้ม ขอบใบเรียบ เส้นใบขนาน ก้านใบมีลักษณะกลม เรียบ อวบน้ำ ถ้าต้นผักตบชวาเจริญอยู่ห่างกันลำต้นจะเล็กและก้านใบมักจะพองออกเป็นทุ่นลอยน้ำเรียกว่า buoyancy leaf แต่ถ้าผักตบชวาเจริญอยู่ในที่เบียดชิดกันก้านใบจะไม่พอง ลักษณะของดอกเป็นดอกช่อ ไม่มีก้านดอก ถ้าช่อดอกเล็กจะมีดอกประมาณ 4-5 ดอก ถ้าช่อดอกใหญ่มีจำนวนดอกเพิ่มขึ้นจนถึง 60 ดอก ช่อดอกจะเกิดบริเวณกลางของต้น ช่อดอกจะเจริญมาจากโคน เมื่อเจริญเต็มที่แล้วดอกมักจะบานพร้อมกันหมดทั้งช่อ ดอกประกอบด้วยกลีบดอก 6 กลีบ ส่วนโคนกลีบจะติดกันเป็นหลอด (tube) มีสีเขียว หลอดนี้จะติดไปถึงก้านช่อดอก ส่วนกลีบรวมจะเป็นสีม่วงอ่อน มีกลีบอยู่ตรงกลางขนาดใหญ่จะมีสีเหลืองแต้ม นอกจากนี้ ดอกยังประกอบด้วย เกสรเพศผู้ (stamen) 6 อัน ติดอยู่ที่ตอนล่างของกลีบดอก ส่วนเกสรเพศเมีย (pistil) ส่วนปลายเรียกว่า stigma มีสีม่วงอ่อน อยู่บนก้าน (style) ต่อมาจากรังไข่ (ovary) ซึ่งอยู่เหนือกลีบดอก (superior ovary) รังไข่นี้เมื่อได้รับการผสมแล้ว จะเจริญขึ้นเป็นผล แต่ตามปกติแล้วในสภาพแวดล้อมในประเทศไทยมักจะไม่ค่อยพบว่า มีการผสมของดอกผักตบชวา จึงไม่ค่อยพบเมล็ด (seed) (ดวงพร สุวรรณกุล; และรังสิต สุวรรณาเขตนิคม. 2544) ผักตบชวานำเข้ามาในประเทศไทยปี พ.ศ. 2444 สมัยรัชกาลที่ 5 จากอินโดนีเซียซึ่งเป็นไม้ประดับที่สวยงาม เมื่อถูกปล่อยลงแม่น้ำลำคลองสามารถแพร่พันธุ์อย่างรวดเร็ว ทำให้ผักตบชวากลายเป็นวัชพืชน้ำที่เจริญเติบโตอย่างหนาแน่นตามแหล่งน้ำต่างๆ ก่อให้เกิดปัญหากับแหล่งน้ำ เช่น เจริญเติบโตในพื้นที่เพาะปลูก เป็นอุปสรรคทางการชลประทาน แหล่งน้ำนั้นตื้นเขิน อุปสรรคต่อการทำประมง เป็นอุปสรรคทางด้านการสาธารณสุข เนื่องจากเป็นแหล่งของพาหะนำโรค (ภาพประกอบ 6) (ศุภฤกษ์ ดวงขวัญ; จันทร์หอม แก่นพินิจ; และปัททินี อุ่มทอง. 2554)



ภาพประกอบ 6 ลักษณะสัณฐานของผักตบชวา *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms

1 ลักษณะวิสัย

2 ดอกของผักตบชวา

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับผักตบชวามาใช้ประโยชน์เพื่อลดปัญหาที่เกิดขึ้น ได้แก่นำมาใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์ และเชื้อเพลิงเป็นพลังงานที่สำคัญในการคมนาคมขนส่ง เนื่องจากปริมาณของผักตบชวามีเพิ่มขึ้น จึงมีการนำผักตบชวามาผลิตเอทานอลโดยการปรับสภาพ (pretreatment) ร่วมกับเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) เพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลที่มีประสิทธิภาพ (Mako; Babayemi; & Akinsoyinu. 2011) และมีการศึกษาองค์ประกอบของผักตบชวาแสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 องค์ประกอบของผักตบชวา

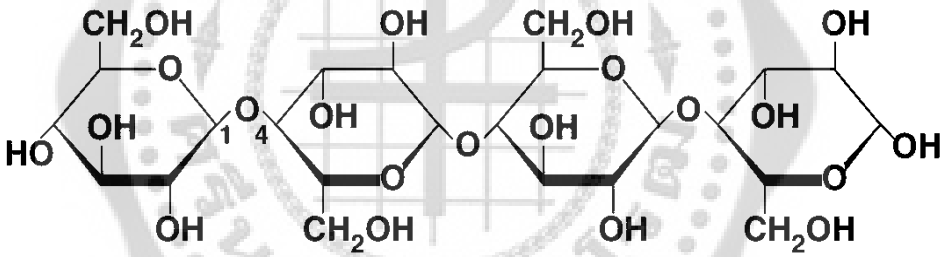
ส่วนประกอบ	% น้ำหนักแห้ง
Ash	25
C	35
N	1.6
P	0.3
Ca	1.7
Mg	0.6
K	3.8
Na	0.6
C/N	23

ที่มา: Lindsey; & Hirt; 1999

นอกจากนี้มีการศึกษาการทำปุ๋ยจากผักตบชวาโดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ หรือการเติมอากาศต่อการทำปุ๋ยหมักจากผักตบชวา จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ *Aspergillus* sp. SK5 ทั้งนี้พบว่าการเติมหัวเชื้อรามีอิทธิพลต่อการลดปริมาณคาร์บอนและค่า C/N Ratio ของวัสดุหมักได้ดี และการเติมอากาศในระหว่างการหมักปุ๋ยจากผักตบชวามีผลต่อการลดค่าความชื้นและค่า C/N Ratio ได้อย่างมีนัยสำคัญ (นิสากร วิเวกวินย์. 2546) นอกจากนี้ยังมีการนำผักตบชวามาใช้ประโยชน์ได้อีกหลายด้าน เช่น บำบัดน้ำเสีย เพาะเห็ด และแก๊สหุงต้ม เป็นต้

5. องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์พืช

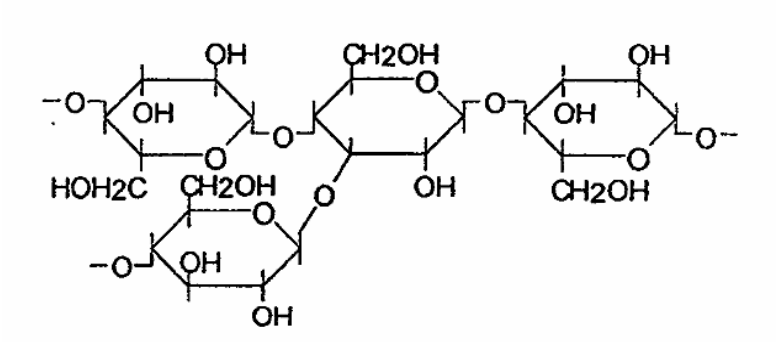
พืชโดยทั่วไปมีส่วนประกอบหลัก คือ เซลลูโลส (cellulose) และส่วนประกอบอื่นๆ เช่น เฮมิเซลลูโลส (hemi cellulose) และลิกนิน (lignin) เป็นต้น โครงสร้างของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส และเป็นสายตรงไม่มีกิ่งก้านสาขา ต่อกันด้วยพันธะ β- (1-4) ไกลโคซิดิก เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของพืช มีสูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{12}O_6)_n$ (ภาพประกอบ 7)



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา: Sketch the cellulose structure. Alghazzawi. 2012

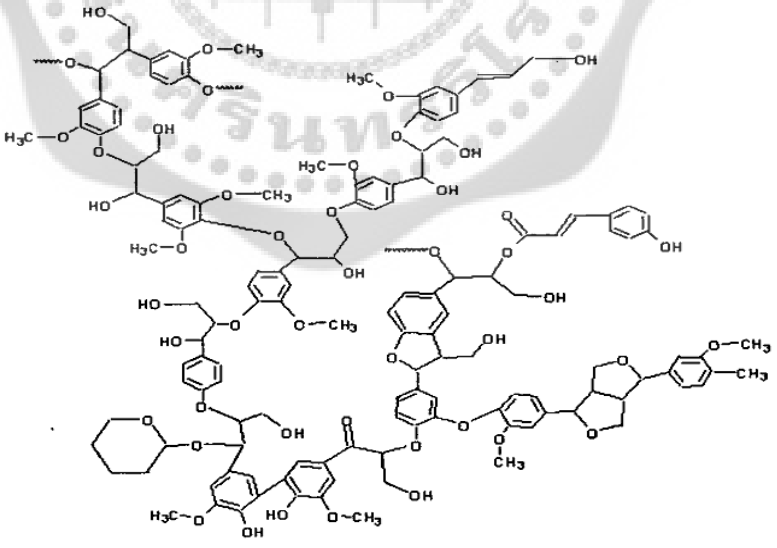
เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นพอลิแซกคาไรด์ชนิดหนึ่งซึ่งคล้ายเซลลูโลส ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด เช่น กลูโคส กาแลกโตส แมนโนส ไซโลส อะราบิโนส รวมทั้งกรดกลูคูโรนิก และกาแลกทูโรนิก ต่อกันด้วยพันธะ β- (1-6) ไกลโคซิดิก เฮมิเซลลูโลสพบในเนื้อเยื่อของพืชโดยรวมอยู่กับสารอื่นๆ เช่น ลิกนิน เซลลูโลส เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ สูตรทางเคมีคือ $(C_6H_{12}O_5)_n$ (ภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: ฆาสิณี พูลพิพัฒน์. 2548

ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนมีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่รวมกับเซลลูโลส ลิกนินเป็นสารที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิดซึ่งเป็นสารอะโรมาติกที่ไม่ละลายน้ำ ไม่ยืดหยุ่น เพราะฉะนั้นจึงทำให้พืชที่มีลิกนินมากมีความแข็งแรงทนทาน (ภาพประกอบ 9)



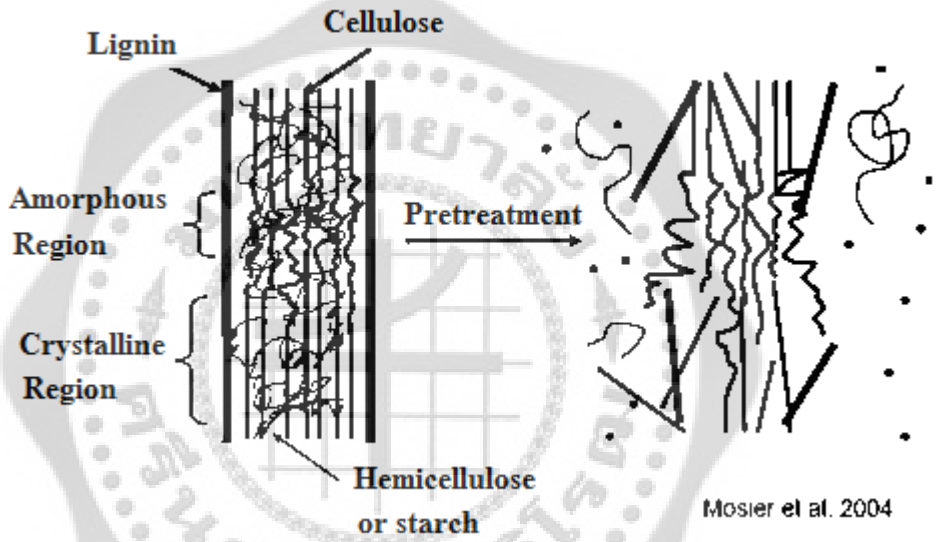
ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของลิกนิน

ที่มา: ฆาสิณี พูลพิพัฒน์. 2548

6. วิธีปรับส่วนผสมของวัตถุดิบ

6.1 ขั้นตอนการปรับส่วนผสมของวัตถุดิบ

การปรับส่วนผสมของวัตถุดิบจากพืชซึ่งเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) โดยมีองค์ประกอบพวกเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส เป็นส่วนประกอบที่พบจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับพืช (Harmsen; et al. 2010) เนื่องจากเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นอยู่ในรูปที่เป็นสารผลึกของสารประกอบเชิงซ้อน (complex) กับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ขั้นตอนแรกจึงต้องแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อน (ภาพประกอบ 10) (Kumar; et al. 2009)



ภาพประกอบ 10 Schematic representation on biomass pre-treatment

ที่มา: Kumar; et al. 2009

6.1.1 วิธีการปรับส่วนผสมของสภาพแบ่งได้เป็น 4 วิธีคือ

6.1.1.1 การปรับส่วนผสมของวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical Pretreatment) เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบ และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออก เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น เช่น การบด การใช้ความร้อน เป็นต้น

6.1.1.2 การปรับส่วนผสมของวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมี (Chemical Pretreatment) เป็นการใช้สารละลายกรดเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส และนอกจากนี้ยังมีการใช้สารละลายด่างเพื่อ

เพิ่มปริมาณการละลายของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน โดยมีการศึกษาการปรับสภาพฟางข้าว ที่ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2.0 M และไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 10 % อุณหภูมิ 111 $^{\circ}$C เป็นเวลา 30 นาที จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ดีที่สุด (Deejing; & Ketkorn. 2009) จากการศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบจากธูปฤาษีพบว่าที่อุณหภูมิ 190 $^{\circ}$C เวลา 15 นาทีจะมีปริมาณกลูโคสและเซลลูโลสมากขึ้น แต่หลังจากนำเอนไซม์เซลลูเลสมาเติมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าจะให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด 77.6% (Zhang; et al. 2010)

6.1.1.3 การปรับส่วนผสมของวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์ (Physic-chemical Pretreatment) เป็นวิธีที่ใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมีจาก ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อน ในสภาวะความดันสูงของการปรับสภาพฟางข้าวในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่าประสิทธิภาพการย่อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อนที่เพิ่มขึ้น เมื่อใช้ความร้อนภายใต้สภาวะความดันสูงเพียงอย่างเดียว จะทำให้การย่อยสลายลดลง เนื่องจากการแตกตัวของน้ำตาลที่เกิดขึ้นเปลี่ยนเป็นสารประเภทเฟอฟูรัล (furfural) สารฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) หรือกรดฟอร์มิก (formic acid) ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์

6.1.1.4 การปรับส่วนผสมของวัตถุดิบด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological Pretreatment) เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก

6.2 การย่อยหรือไฮโดรไลซิส

เซลลูโลสตามธรรมชาติส่วนใหญ่เกิดการสลายตัวโดยการย่อยของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เอนไซม์เป็นโปรตีนที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น เพื่อทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์ เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพ เมื่ออยู่ในสภาวะการทำงานที่เหมาะสม จะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็วเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความจำเพาะ (specificity) ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง แม้ว่าเอนไซม์จะถูกสร้างอยู่ภายในเซลล์แต่สามารถสกัดออกมาใช้งานได้ มีรายงานว่าการสกัดน้ำมันจากเหง้าไพล *Zingiber cassumunar* Roxb. ด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส และเพคติเนส โดยการใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียว และใช้เอนไซม์มากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกัน ตลอดจนศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อปริมาณสารอัลฟา-เทอพิเนน-4-ออล (α - terpinen – 4 - ol) ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในน้ำมันไพลที่สกัดได้ พบว่าการสกัดน้ำมันไพลโดยการใช้เซลลูเลสเพียงอย่างเดียว การใช้เซลลูเลสร่วมกับเฮมิเซลลูเลสและการใช้เอนไซม์ทั้งสามชนิดร่วมกัน ทำให้ได้ปริมาณสารอัลฟา-เทอพิเนน-4-ออล สูงกว่าการสกัดโดยใช้เอทานอลและไม่ใช้เอนไซม์ช่วยร้อยละ 24.30, 8.41 และ 7.41 ตามลาดับ ผลที่ได้ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ช่วยส่งเสริมการไฮโดรไลซิสของผนังเซลล์ทำให้ได้น้ามันไพลออกมาเพิ่มขึ้น (ทัดดาว ชูโชติ. 2009)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น STURDY SA-300VL USA.

1.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น JENWAY 6405 ENGLAND

1.3 เครื่องชั่งรุ่น DENVER INSTRUMENT TB-203 THAILAND

1.4 เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)

1.5 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

1.6 เครื่องปั่นยี่ห้อ MISUSHITA มิซูชิต้า MXT-2001PW

1.7 เครื่องอบรุ่น MEMMERT MAEL 500 GERMANY

1.8 ออโตปิเปต (Autopipette)

1.9 อาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียสูตร BG 11 medium

1.10 กระดาษกรองยี่ห้อ WHATMAN NO. 2

1.11 เครื่อง sonicate

1.12 หม้อดูดความชื้น VAKUUMFEST DUCAN GERMANY

1.13 เครื่องมินิเซนตริฟิวส์ HSIANGTAI CM-630 TAIWAN

1.14 พีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น PCSTEST DUCAN GERMANY

1.15 บีกเกอร์

1.16 TLC plastic sheets 20 X 20 Cm : Merck, Germany

สารเคมี

2.1 Ethanol (C_2H_5OH): RANCHEM, India

2.2 Sodium hydrogencarbonate ($NaHCO_3$) : Ajax Finechem, New Zealand

2.3 Sodiumbicarbonate (Na_2CO_3) : Fisher Scientific, UK

2.4 Glucose ($C_6H_{12}O_6$): Ajax Finechem, New Zealand

2.5 Glutamic acid ($C_5H_9NO_4$): Ajax Finechem, New Zealand

2.6 Starch: Ajax Finechem, New Zealand

2.7 Sulfuric acid (H_2SO_4): Analar, UK

2.8 Sodiumnitrate ($NaNO_3$): RANCHEM, India

2.9 Ammoniumchloride (NH_4Cl): Merck,Germany

2.10 Sodium hydroxide (NaOH): Fisher Scientific, UK

2.11 phosphate buffer pH 7

2.12 Sodium chloride: Ajax Finechem, New Zealand

2.13 Ethylenediaminetetraacetic acid: Ajax Finechem, New Zealand

2.14 Magnesium sulfate Heptahydrate: Fisher Scientific, UK

2.15 Dipotassium phosphate: Fisher Scientific, UK

2.16 Calcium chloride Dihydrate: RANCHEM, India

2.17 Sodium carbonate: Fisher Scientific, UK

2.18 Citric acid: RANCHEM, India

2.19 Ferric ammonium citrate: Ajax Finechem, New Zealand

2.20 Boric acid: Ajax Finechem, New Zealand

2.21 Manganese Chloride Tetrahydrate

2.22 Zinc sulphate Heptahydrate: Ajax Finechem, New Zealand

2.23 Sodium molybdate: Ajax Finechem, New Zealand

2.24 Copper (II) sulfate Pentahydrate: Fisher Scientific, UK

2.25 Cobalt (III) Nitrate: Labachemie, India

2.26 Potassium chloride: Fisher Scientific, UK

2.27 Magnesium chloride Hexahydrate: RANCHEM, India

2.28 Calcium chloride Dihydrate: RANCHEM, India

2.29 Sodium chloride: Ajax Finechem, New Zealand

ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง คือ *Oscilltoria* sp. จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

ผลของพีเอช

นำไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิด BG_{11} ปรับให้อาหารมีความแตกต่างของพีเอชโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้มีความแตกต่างของพีเอช 5 – 9 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) นำไซยาโนแบคทีเรียไปไว้ภายใต้ภาวะแสงขาว 24 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง วัดการเจริญทุก 3 วัน ด้วยการชั่งน้ำหนักแห้งตามวิธีของพิมพ์ภาพ มณีธร (2553) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

นำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยก่อนชั่งน้ำหนักนำกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปใส่ในหม้อดูดความชื้น ชั่งหาน้ำหนัก กระดาษกรอง (A) จากนั้นนำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียกรองผ่านกระดาษกรองนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่มีค่า pH 4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C เวลา 2 ชั่วโมง นำไปใส่ในหม้อดูดความชื้น ชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองที่มีไซยาโนแบคทีเรีย (B) คำนวณหาน้ำหนักแห้งตามสูตร

$$\text{น้ำหนักแห้งของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย} = \frac{(B - A)}{\text{ปริมาตรเซลล์ที่กรอง}} \text{.....mg/ml}$$

A = น้ำหนักกระดาษกรอง

B = น้ำหนักกระดาษกรองที่มีสาหร่าย

ผลของอุณหภูมิ

นำ *Oscillatoria* sp. 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิด BG_{11} ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีการปรับค่าพีเอชเท่ากับ 8 นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส วัดการเจริญทุก 3 วัน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และการชั่งน้ำหนักแห้งตามวิธีของพิมพ์ภาพ มณีธร (2553)

ตอนที่ 2 ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อปริมาณรงควัตถุของไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

นำ *Oscillatoria* sp. จากข้อ 1 ตรวจสอบปริมาณรงควัตถุแปลงจากพิมพ์ภาพ มณีธร (2553) โดยนำเซลล์ 0.1 กรัม ผสมกับเอทานอล 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 5 นาที ปล่อยให้เย็นในที่มืด จากนั้นนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยง 6,000 rpm 15 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470, 650 และ 665 นาโนเมตร ตามสมการ

$$\text{คลอโรฟิลล์ เอ} = (16.5 \times A_{665}) - (8.5 \times A_{650}) \quad \text{.....mg/ml}$$

$$\text{คาโรทีนอยด์} = (A_{461} - (0.046 \times A_{664})) \times 4 \quad \text{.....mg/ml}$$

ตรวจสอบปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินตามสมการของ Bennett and bogorad (1973) โดยนำเซลล์สด 0.1 กรัมผสมกับ phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็ง 2 ชั่วโมง ทำให้ละลายในน้ำอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 30 นาที ทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นความถี่สูง

30 นาที จากนั้นนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยง 6,000 rpm 15 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562, 615 และ 652 นาโนเมตร ตามสมการ

$$PC = \frac{A_{615} - 0.474(A_{652})}{5.34} \text{.....mg/ml}$$

$$APC = \frac{A_{652} - 0.208(A_{615})}{5.09} \text{.....mg/ml}$$

$$PE = \frac{A_{562} - 0.849(APC)}{9.62} \text{.....mg/ml}$$

ตอนที่ 3 ศึกษาผลของความเครียดจากเกลือต่อการเจริญและปริมาณรงควัตถุในไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

นำ *Oscillatoria* sp. 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิด BG $_{11}$ พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0 - 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ นำเซลล์เลี้ยงภายใต้ภาวะแสงขาว 24 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง แล้วติดตามการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และการชั่งน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นนำเซลล์มาตรวจสอบปริมาณรงควัตถุโดยวิธีของพิมพ์ภาพ มณีธร (2553)

ตอนที่ 4 ศึกษาการเตรียมผักตบชวาและธูปฤาษี เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน

วิธีการเตรียมสารสกัดจากผักตบชวาและธูปฤาษีมีรายละเอียดดังนี้ นำผักตบชวาและธูปฤาษีมาหั่นและตากแห้งอบที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$C 24 ชั่วโมง บดด้วยเครื่องปั่น นำไปต้มกับน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ กรองสารสกัดที่ได้ แล้วนำไปหาปริมาณไนโตรเจนโดยใช้ชุดตรวจสอบของ Hanna instruments (HI3895N-O) ตามวิธีของอัฐวุฒิ คำแสน (2010) นำตัวอย่างน้ำสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายทดสอบไนโตรเจนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer นำค่าไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโซเดียมไนเตรต โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจน 0, 0.5, 1, 3, 5, 10 มิลลิกรัมต่อ 50 มิลลิลิตร นำ *Oscillatoria* sp. 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิด BG $_{11}$ ที่มีการผสมสารสกัดจากธูปฤาษีและผักตบชวาแบบแห้งในอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิด BG_{11} ติดตามการเจริญโดยวิธีของพิมพ์ภาพ มณีธร (2553)

ตอนที่ 5 ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่อการเจริญและปริมาณไฟโค-ไซยานินในไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

นำ *Oscillatoria* sp. 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิด BG_{11} ที่มีความแตกต่างของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน ด้วยการใช้สารเคมีที่เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแทนในอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิด BG_{11} ในอาหารปกติมีแหล่งคาร์บอน ได้แก่ โซเดียมไบคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 0.02 กรัมต่อลิตร โดยแทนที่ด้วยโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) กลูตามิก ($C_5H_9NO_4$) และแป้ง $(C_6H_{12}O_6)_n$ แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ โซเดียมไนเตรด ($NaNO_3$) 1.5 กรัมต่อลิตร แทนที่ด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)

นำอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียสูตร BG_{11} ที่มี Na_2CO_3 เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับความเข้มข้นเป็น 0.01, 0.02, 0.04 กรัมต่อลิตร แทนที่โซเดียมไบคาร์บอเนตด้วยสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนได้แก่

-โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตปรับความเข้มข้นเป็น
0.0075, 0.015, 0.03 กรัมต่อลิตร
-กลูโคสปรับความเข้มข้นเป็น
0.025, 0.05, 0.1 กรัมต่อลิตร
-แป้งปรับความเข้มข้นเป็น
0.01, 0.02, 0.04 กรัมต่อลิตร

นำอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียสูตร BG_{11} ที่มีโซเดียมไนเตรดเป็นแหล่งไนโตรเจนปรับความเข้มข้นเป็น 0.75, 1.5, 3 กรัมต่อลิตร แทนที่โซเดียมไนเตรดด้วยสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนได้แก่

-แอมโมเนียมคลอไรด์ปรับความเข้มข้นเป็น
0.49, 0.98, 1.92 กรัมต่อลิตร

ตามวิธีของ Sylvian Liotenberg (1996) นำเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ติดตามการเจริญจากการทดลองตอนที่ 1 และตรวจสอบปริมาณรงควัตถุจากการทดลองตอนที่ 2

การทำโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin layer Chromatography: TLC)

เตรียมหลอดทดลองขนาดเล็กเติมสารที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตร (เอทานอล) เตรียมแผ่น TLC โดยหยดสารตัวอย่าง 1 หยด (10 μl) บนแผ่น TLC แต่ละแผ่นให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC ประมาณ 1 cm หย่อนแผ่น TLC ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้โดยให้มีหยดสารที่จะทดสอบอยู่ด้านล่าง รอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงระดับที่ต้องการ คือประมาณ 0.5 ซม. จากขอบด้านบนเคลือบตัวอยู่กับที่ไว้ ตำแหน่งนี้เรียกว่า solvent front ยกแผ่น TLC ออกปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง 2 – 3 นาที บันทึกระยะทางที่สารเคลื่อนที่ คำนวณค่า Rf ของสารแต่ละชนิด จาก

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางสารเคลื่อนที่จากตำแหน่งเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่จากตำแหน่งเริ่มต้นถึงตำแหน่งสูงสุด}}$$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้แบ่งผลการทดลองเป็นดังนี้

ตอนที่ 1 ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Oscillatoria* sp.

ตอนที่ 2 ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อปริมาณรงควัตถุของ *Oscillatoria* sp.

ตอนที่ 3 ผลของความเครียดจากเกลือต่อการเจริญและปริมาณรงควัตถุใน *Oscillatoria* sp.

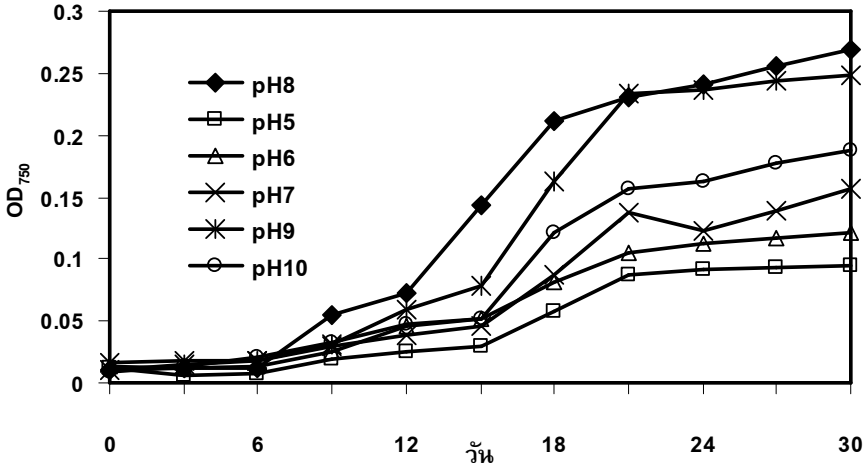
ตอนที่ 4 ศึกษาการเตรียมผักตบชวาและธูปฤาษี เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน

ตอนที่ 5 ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่อการเจริญและปริมาณไฟโคไซยานิน ใน *Oscillatoria* sp.

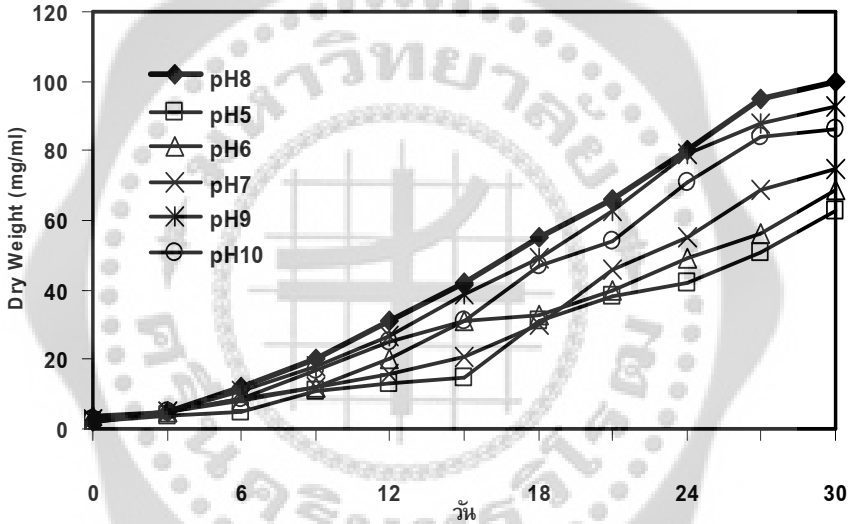
ตอนที่ 1 ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Oscillatoria* sp.

1) ผลของพีเอช

ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่มีการแปรผันค่าพีเอชในอาหารเท่ากับ 5 – 10 แล้วทำการติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย เป็นระยะเวลา 30 วัน นำเซลล์มาวัดการเจริญ พบว่าการเจริญเข้าสู่ระยะกลางของการเจริญแบบทวีคูณ (mid log phase) ได้ดีในช่วง 12 - 18 วัน เซลล์จะเจริญได้ดีที่สุดที่พีเอช 8 (ภาพประกอบ 11) เซลล์สามารถเจริญได้ที่พีเอช 9 และ 10 เมื่อค่าพีเอชต่ำกว่า 8 การเจริญของเซลล์ลดลง ดังนั้นจึงเลือกค่าพีเอช 8 ในการศึกษาต่อไป



(ก)

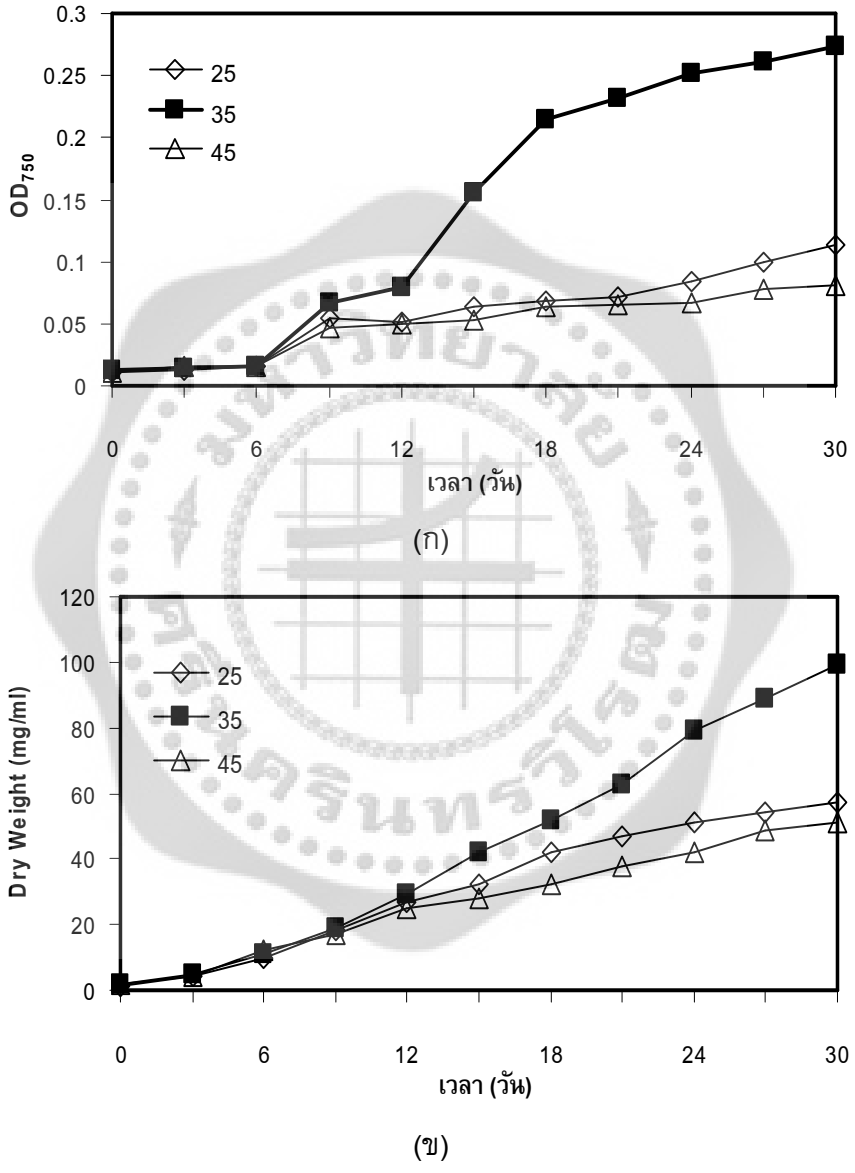


(ข)

ภาพประกอบ 11 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่มีค่าพีเอช 5-10 โดยใช้วิธี (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer และ (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง

2) ผลของอุณหภูมิ

ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 25, 35, และ 45 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เซลล์มีการเจริญสูงสุด (ภาพประกอบ 12) เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส การเจริญลดลง ดังนั้นการศึกษาขั้นต่อไปศึกษาที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

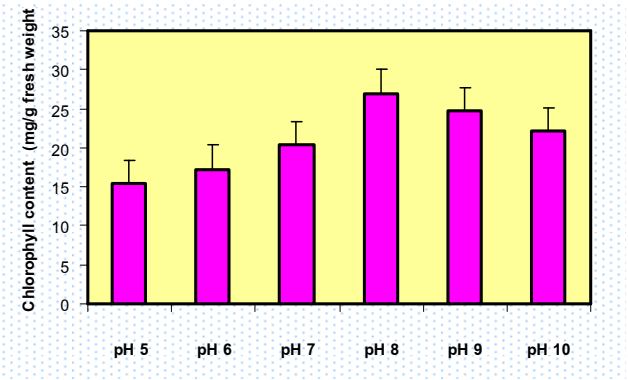


ภาพประกอบ 12 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 25, 35, และ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธี (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectrophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง

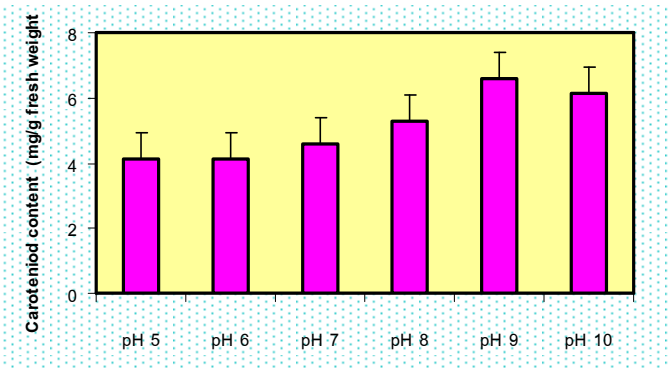
ตอนที่ 2 ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อปริมาณรงควัตถุของ *Oscillatoria* sp.

ผลของพีเอช

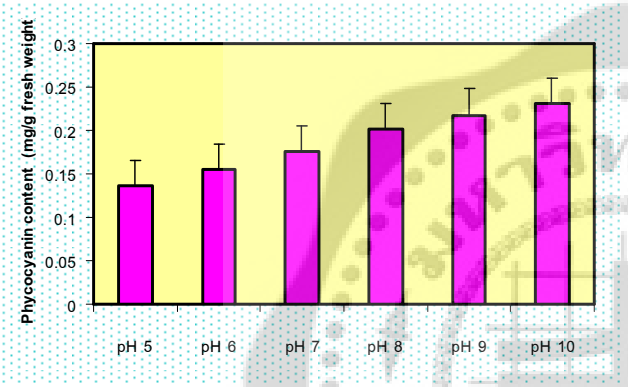
ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่มีการแปรผันค่าพีเอชในอาหารในช่วง 5 – 10 เป็นระยะเวลา 14 วัน ทำการติดตามปริมาณรงควัตถุได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ ไฟโคไซยานิน ไฟโคอิริทริน และอัลโลไฟโคไซยานิน พบว่าคลอโรฟิลล์จะมีปริมาณสูงสุดที่พีเอช 8 (ภาพประกอบ 13 ก) ปริมาณแคโรทีนอยด์จะมีปริมาณสูงสุดที่พีเอช 9 (ภาพประกอบ 13 ข) ไฟโคไซยานินจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชสูงขึ้นและให้ค่าสูงสุดที่พีเอช 10 (ภาพประกอบ 13 ค) ไฟโคอิริทรินจะมีปริมาณสูงสุดที่พีเอช 8 (ภาพประกอบ 13 ง) และอัลโลไฟโค-ไซยานินจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชสูงขึ้นและให้ค่าสูงสุดทีค่าพีเอช 10 (ภาพประกอบ 13 จ) จากภาพประกอบ 13 พบว่าปริมาณรงควัตถุจะมีปริมาณสูงในการเจริญภายใต้ภาวะที่มีพีเอชเป็นเบส



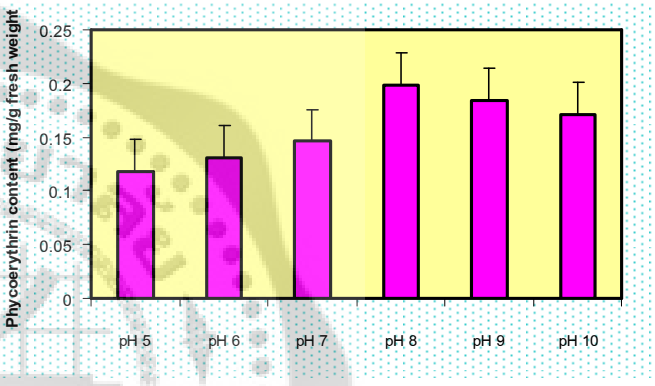
(ก)



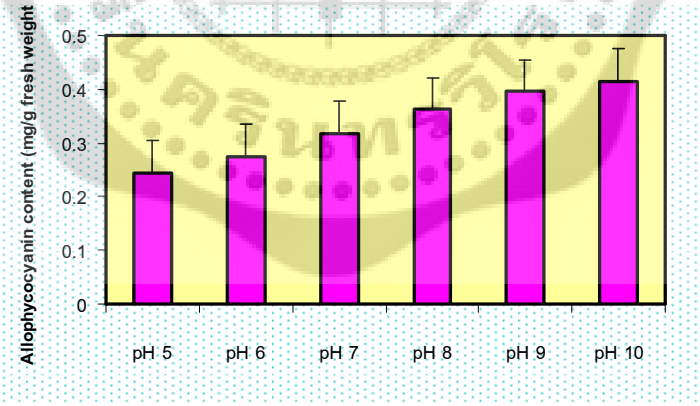
(ข)



(ค)



(ง)

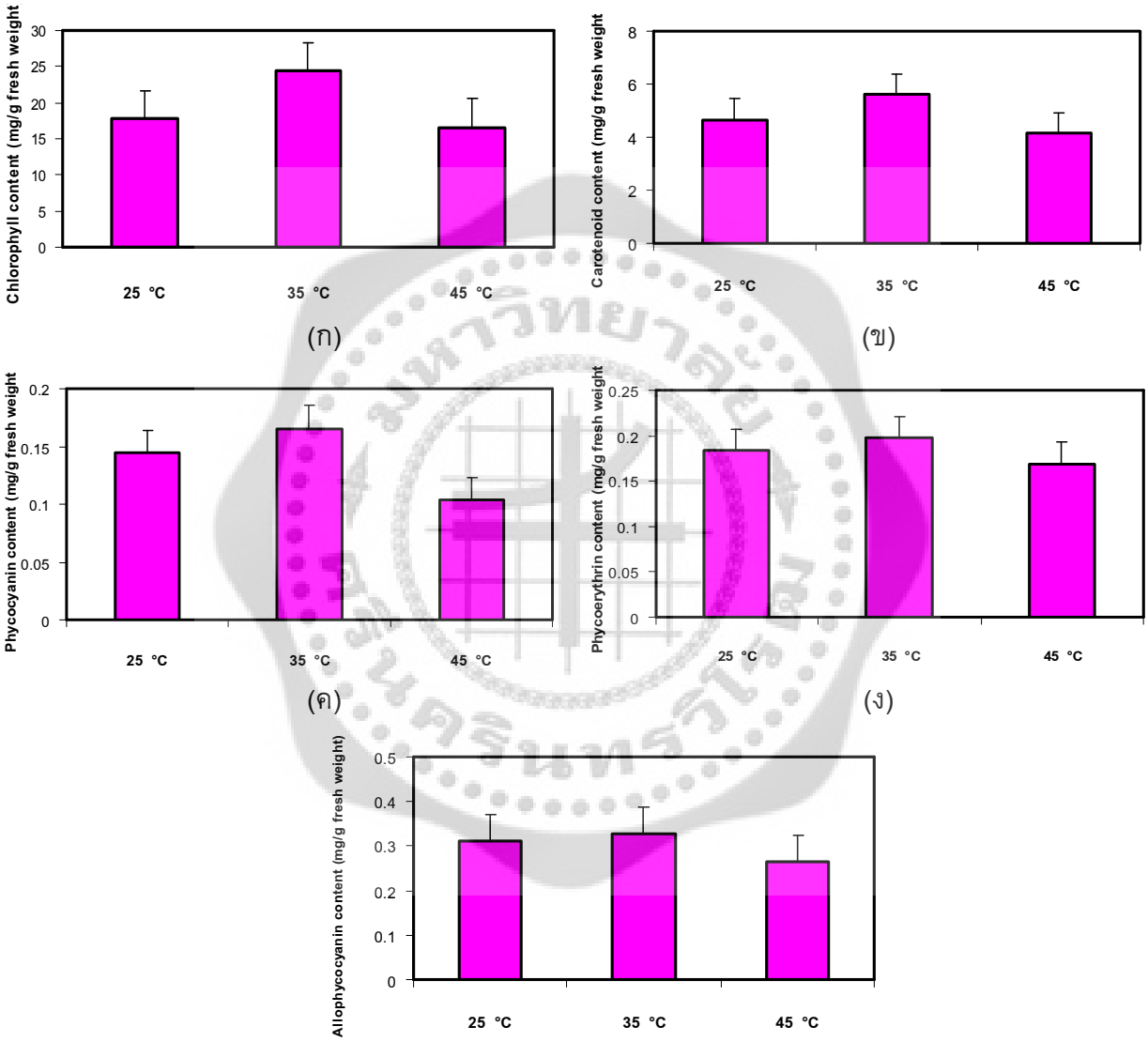


(จ)

ภาพประกอบ 13 ผลของพีเอชต่อปริมาณรงควัตถุใน *Oscillatoria* sp. รงควัตถุที่ทำการศึกษาได้แก่ (ก) คลอโรฟิลล์ (ข) แคโรทีนอยด์ (ค) ไฟโคไซยานิน (ง) ไฟโคอิริทริน (จ) อัลโลไฟโคไซยานิน

ผลของอุณหภูมิ

ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 25, 35, และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 วัน แล้วทำการติดตามปริมาณของรงควัตถุ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ ไฟโคไซยานิน ไฟโคอิริทริน และอัลโลไฟโคไซยานิน พบว่าอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีปริมาณรงควัตถุทุกชนิดสูงสุด (ภาพประกอบ 14)

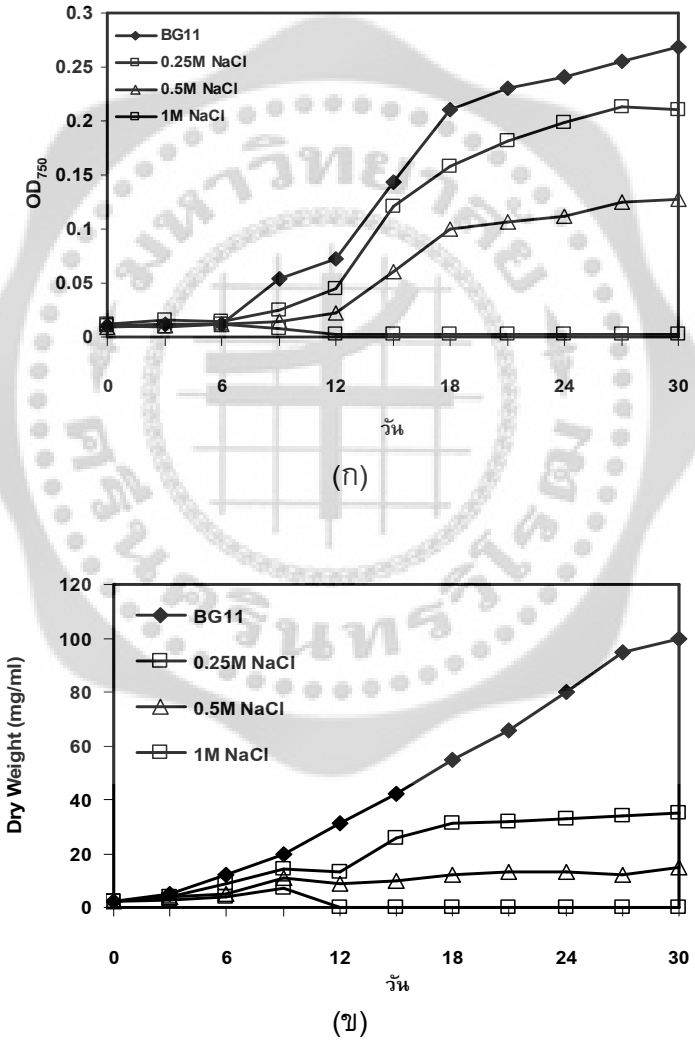


ภาพประกอบ 14 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณรงควัตถุใน *Oscillatoria* sp. รงควัตถุที่ทำการศึกษา ได้แก่ (ก) คลอโรฟิลล์ (ข) แคโรทีนอยด์ (ค) ไฟโคไซยานิน (ง) ไฟโคอิริทริน (จ) อัลโลไฟโคไซยานิน

ตอนที่ 3 ผลของความเครียดจากเกลือต่อการเจริญและปริมาณรงควัตถุใน *Oscillatoria* sp.

ผลของความเครียดจากเกลือต่อการเจริญ

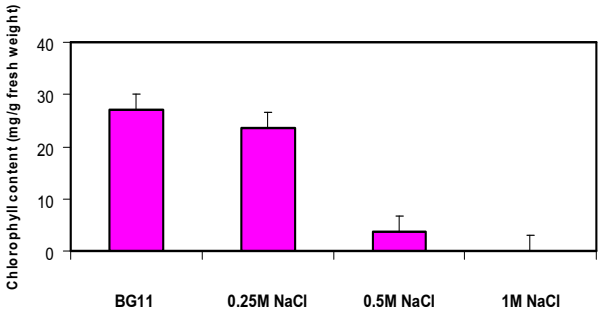
ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยแปรผันเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5 และ 1 โมลาร์ ทำการติดตามการเจริญ พบว่า *Oscillatoria* sp. เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่ไม่มีเกลือ เมื่อความเครียดจากเกลือมากขึ้นมีผลทำให้การเจริญลดลง ความเครียดจากเกลือเพิ่มขึ้น การเจริญจะลดลงเมื่อเทียบกับอาหารปกติ ที่ความเครียดจากเกลือ 1 โมลาร์ไม่สามารถเจริญได้ (ภาพประกอบ 15)



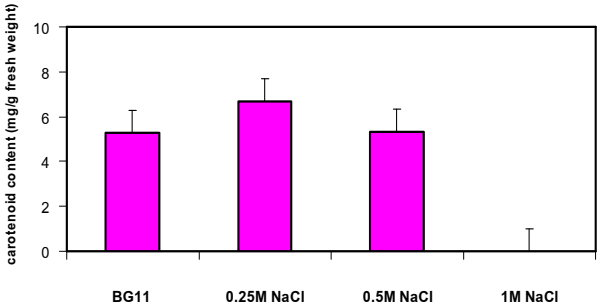
ภาพประกอบ 15 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะปกติและภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยใช้วิธี (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectrophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง

ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณรงควัตถุ

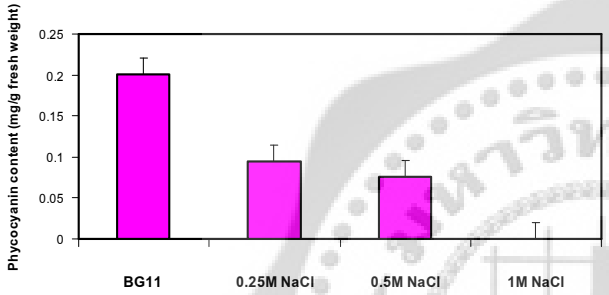
ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยแปรผันเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5 และ 1 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 14 วัน ติดตามปริมาณของรงควัตถุคลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ ไฟโคไซยานิน ไฟโคอิริทริน และอัลโลไฟโคไซยานิน พบว่าปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์ ไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริทรินลดลงเมื่อมีความเครียดจากเกลือเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณของแคโรทีนอยด์จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อมีความเครียดมากขึ้นจาก 0 โมลาร์ เป็น 0.25 โมลาร์ และลดลงเมื่อความเข้มข้นมากกว่า 0.25 โมลาร์ (ภาพประกอบ 16) และไม่มีรงควัตถุที่สามารถตรวจสอบได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 1 โมลาร์ เนื่องจากเซลล์ตาย ดังนั้นภาวะที่ใช้ในการเตรียมรงควัตถุคือไม่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์



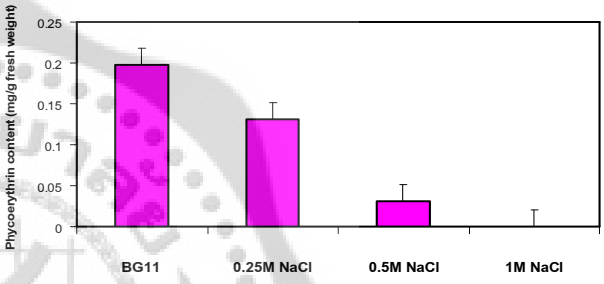
(ก)



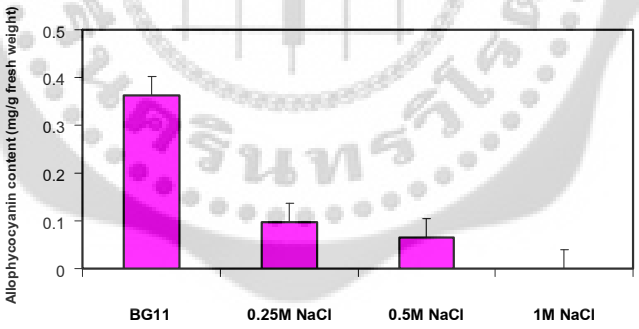
(ข)



(ค)



(ง)



(จ)

ภาพประกอบ 16 ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณรงควัตถุที่พบใน *Oscillatoria* sp. รงควัตถุที่ทำการศึกษา ได้แก่ (ก) คลอโรฟิลล์ (ข) แคโรทีนอยด์ (ค) ไฟโคไซยานิน (ง) ไฟโคอิริทริน (จ) อัลโลไฟโคไซยานิน

ตอนที่ 4 ศึกษาการเตรียมผักตบชวาและธูปฤาษี เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน

การเตรียมตัวอย่างน้ำสกัดจากผักตบชวาและธูปฤาษี

ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่มีการผสมน้ำสกัดจากธูปฤาษีและผักตบชวาแบบแห้ง ทำการหาปริมาณไนโตรเจนโดยใช้ชุดตรวจสอบของ Hanna instruments (HI3895N-O) นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไนโตรเจนโดยใช้โซเดียมไนเตรตเป็นสารมาตรฐาน ได้ผลดังตาราง

ตาราง 4 ปริมาณไนโตรเจนในน้ำสกัดจากผักตบชวาและธูปฤาษี

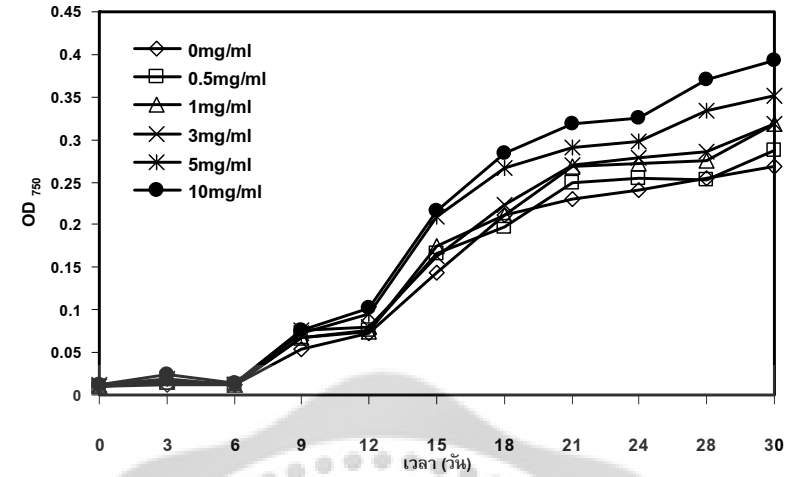
ชนิดน้ำสกัด	ความเข้มข้นของไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ผักตบชวา	7.49
ธูปฤาษี	8.30

การหาปริมาณไนโตรเจนจากตารางที่ 4 พบว่าในน้ำสกัดจากธูปฤาษีมีปริมาณของไนโตรเจนมากกว่าน้ำสกัดจากผักตบชวา เมื่อได้ปริมาณไนโตรเจนของน้ำสกัดแต่ละชนิดแล้วจึงนำไปเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} โดยการแปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจน 0, 0.5, 1, 3, 5 และ 10 mg/ml เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

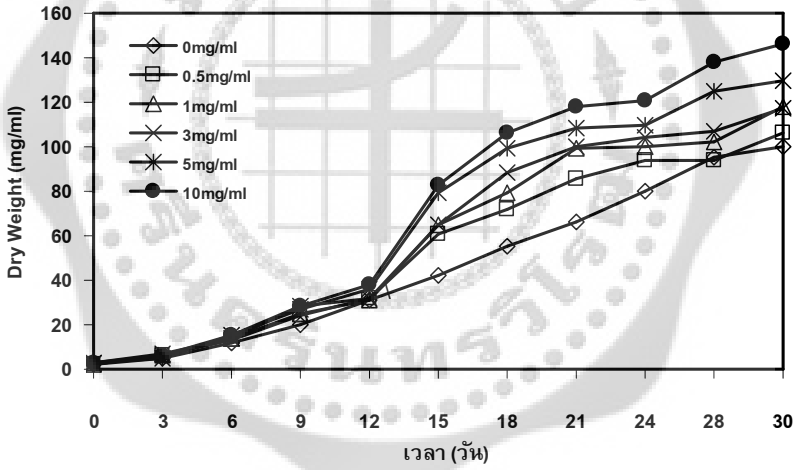
ผลของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนจากผักตบชวาและธูปฤาษีต่อการเจริญของ *Oscillatoria* sp.

ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่มีการผสมน้ำสกัดจากธูปฤาษีและผักตบชวาแบบแห้ง แปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจน 0, 0.5, 1, 3, 5 และ 10 mg/ml ติดตามการเจริญเปรียบเทียบกับอาหารปกติ พบว่า *Oscillatoria* sp. สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG_{11} ที่มีส่วนผสมของน้ำสกัดผักตบชวาและธูปฤาษีทุกความเข้มข้นของไนโตรเจน โดยปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นการเจริญเติบโตดีขึ้น โดยที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 5 mg/ml ในอาหารที่มีส่วนผสมน้ำสกัดจากผักตบชวา และในอาหารที่มีส่วนผสมน้ำสกัดจากธูปฤาษีที่ความเข้มข้นของไนโตรเจน 10 mg/ml ให้การเจริญเติบโตดีที่สุดตามลำดับ (ภาพประกอบ 18) ดังนั้นในอาหารความเข้มข้นของน้ำสกัดผักตบชวาที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 5 mg/ml และในอาหารที่มี

ส่วนผสมน้ำสกัดจากธูปฤาษีที่ความเข้มข้นของไนโตรเจน 10 mg/ml *Oscillatoria* sp. เจริญได้สูงสุด ซึ่งความเข้มข้นไนโตรเจนที่มากกว่านี้ให้ผลของการเจริญไม่แตกต่างกัน

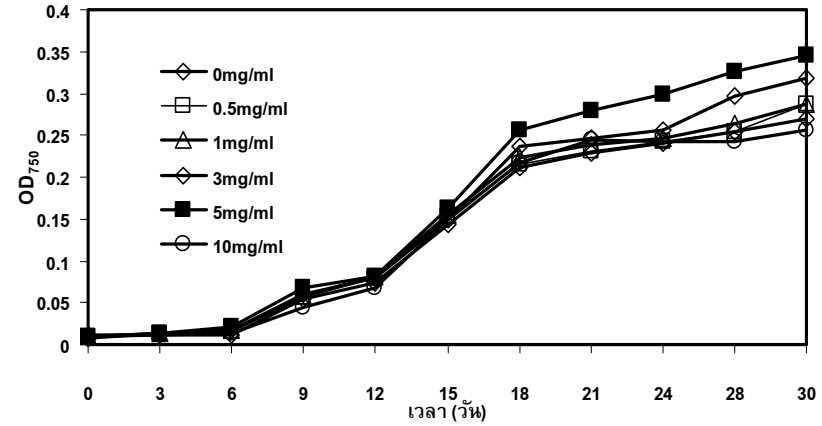


(ก)

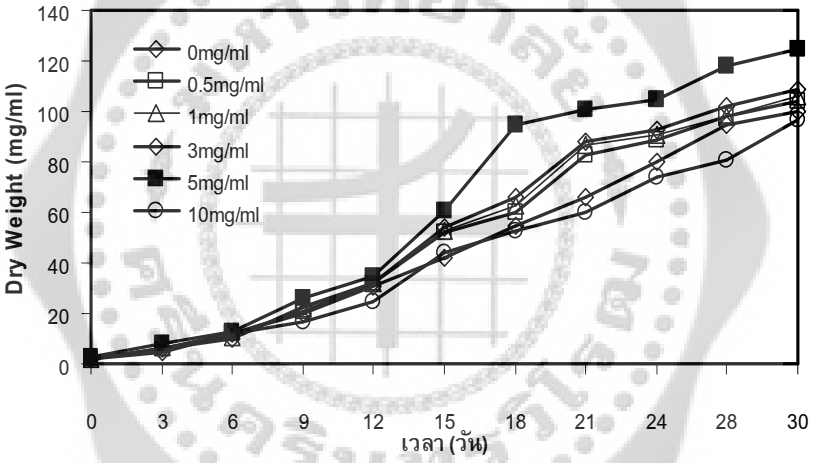


(ข)

ภาพประกอบ 17 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยการแปรผันปริมาณไนโตรเจนจากน้ำสกัดธูปฤาษี โดยใช้วิธี (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectrophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง



(ก)



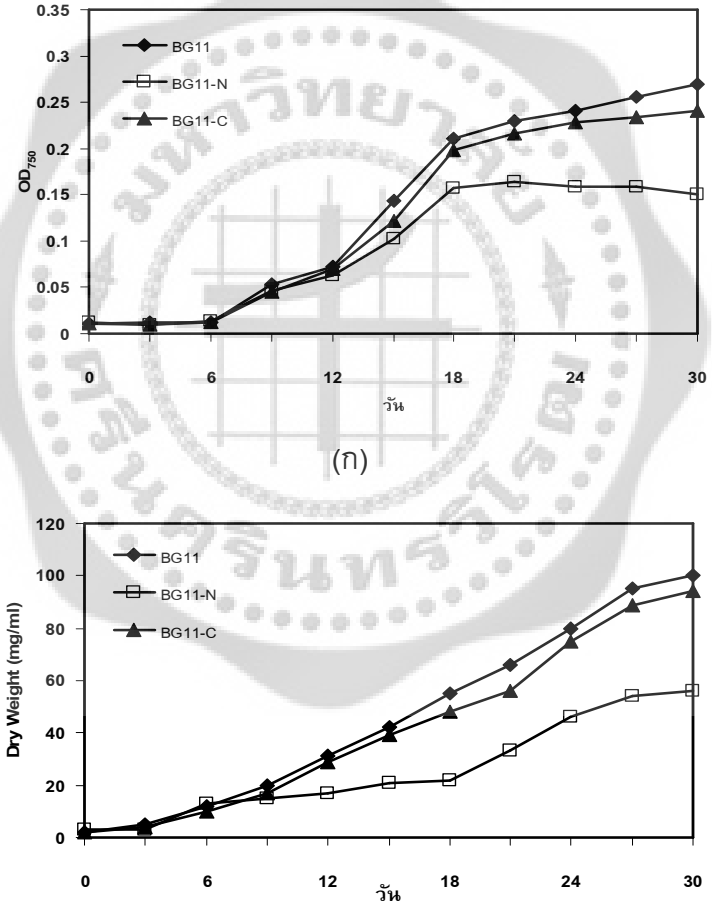
(ข)

ภาพประกอบ 18 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยการแปรผันปริมาณไนโตรเจนจากน้ำสกัดผักตบชวา โดยใช้วิธี (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectrophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง

ตอนที่ 5 ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่อการเจริญและปริมาณไฟโคไซยานิน ใน *Oscillatoria* sp.

ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BG_{11} ที่ไม่มีไนโตรเจน (BG_{11}-N) และในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดชนิด BG_{11} ที่ไม่มีคาร์บอน (BG_{11}-C) ต่อการเจริญของ *Oscillatoria* sp.

ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11}, BG_{11}-C และ BG_{11}–N ทำการติดตามการเจริญ พบว่าการเจริญของ *Oscillatoria* sp. เจริญได้มากที่สุดในอาหารปกติ BG_{11}-C และ BG_{11}-N ตามลำดับ (ภาพประกอบ 19) หลังจาก 18 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11}–N มีการเจริญลดลง เมื่อสังเกตดูสีของเซลล์ในอาหารชนิด BG_{11}-N มีสีเขียวจางลงหลังจากวันที่ 21 เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติ และชนิด BG_{11}-C (ภาพประกอบ 20)



ภาพประกอบ 19 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11}, BG_{11}-N และBG_{11}-C ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธี (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectrophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง

(ก) (ข) (ค)

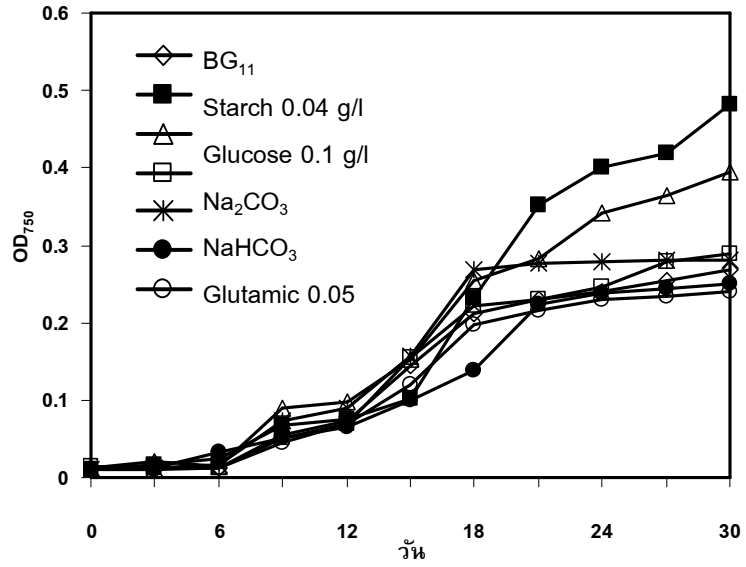
ภาพประกอบ 20 เซลล์ของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร (ก) BG_{11}, (ข) BG_{11}-C และ (ค) BG_{11}-N

ผลของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่อการเจริญของ *Oscillatoria* sp.

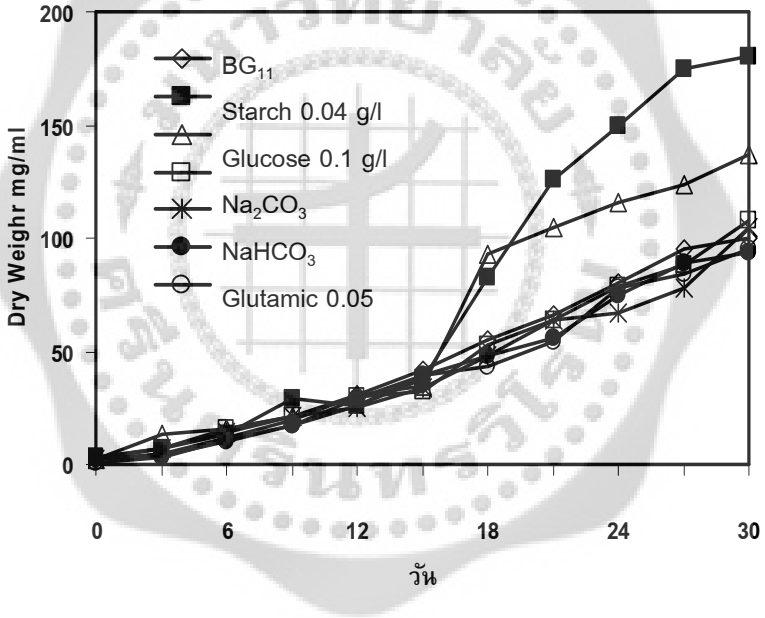
จากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่อการเจริญของ *Oscillatoria* sp. ด้วยการใช้สารเคมีที่เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแทนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ในอาหารปกติจะใช้สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ โซเดียมไบคาร์บอเนต แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ โซเดียมไนเตรต แทนที่แหล่งของคาร์บอนด้วยโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต กลูโคส กลูตามิก แป้ง และแหล่งไนโตรเจนด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ แล้วติดตามการเจริญของเซลล์

ผลของแหล่งคาร์บอน

นำ *Oscillatoria* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่มีความแตกต่างของแหล่งคาร์บอนแล้วติดตามการเจริญ พบว่าการเจริญของ *Oscillatoria* sp. เจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีการเติมแป้ง 0.04 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 0.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อาหารที่มีแป้ง 0.04 กรัมต่อลิตร จะเจริญได้ดีในช่วงหลังวันที่ 18 (ภาพประกอบ 21) และนอกจากนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แทนที่ด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต และกลูตามิกจะมีการเจริญน้อยกว่าในอาหารที่มีการเติมแป้งและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



(ก)

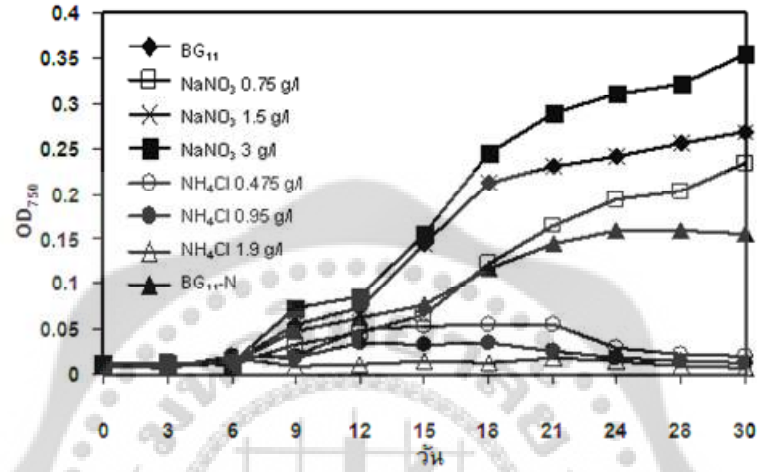


(ข)

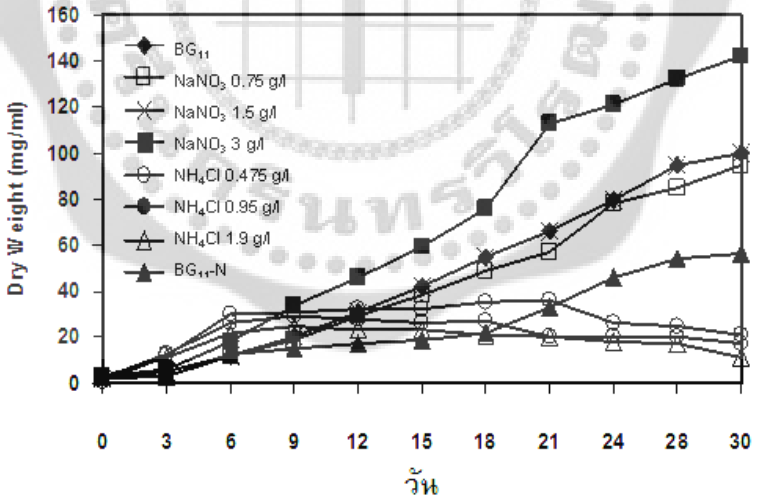
ภาพประกอบ 21 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีความแตกต่างของแหล่งคาร์บอน โดยวิธี (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectrophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง

ผลของแหล่งไนโตรเจน

ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่มีความแตกต่างของแหล่งไนโตรเจนแล้วติดตามผลการเจริญ พบว่าการเจริญของ *Oscillatoria* sp.เจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีการเติมโซเดียมไนเตรด 3 กรัมต่อลิตร อาหารที่มีการเติม โซเดียมไนเตรด 0.75 กรัมต่อลิตร มีการเจริญลดลงมากกว่าในอาหาร BG_{11} และการเจริญเติบโตมีแนวโน้มลดลงในอาหารที่มีการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น (ภาพประกอบ 22)



(ก)



(ข)

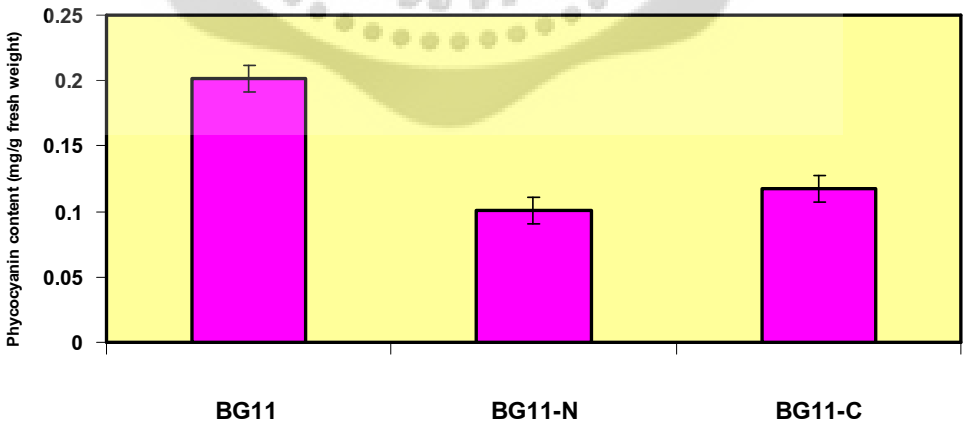
ภาพประกอบ 22 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีความแตกต่างของแหล่งไนโตรเจน โดยใช้วิธี (ก) การวัดความขุ่นของ เซลล์โดยเครื่อง Spectrophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง

ตาราง 5 ปริมาณไฟโคไซยานินในอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร	ปริมาณไฟโคไซยานิน (mg/gfreshweight)
BG_{11} – N	0.101
BG_{11} – N + ผักตบชวา	0.147
BG_{11} – N + ธูปฤาษี	0.155
BG_{11} – C	0.117
BG_{11} – C + ผักตบชวา	0.169
BG_{11} – C + ธูปฤาษี	0.182
BG_{11}	0.201
BG_{11} + ผักตบชวา	0.296
BG_{11} + ธูปฤาษี	0.373

ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BG_{11} ที่ไม่มีไนโตรเจน (BG_{11}-N) และในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BG_{11} ที่ไม่มีคาร์บอน (BG_{11}-C) ต่อปริมาณไฟโคไซยานิน

ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BG_{11}-C และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11}–N พีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ติดตามปริมาณของรงควัตถุไฟโคไซยานิน พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11}–N ให้ปริมาณไฟโคไซยานินน้อยกว่า BG_{11}-C และ BG_{11} ตามลำดับ (ภาพประกอบ 23)



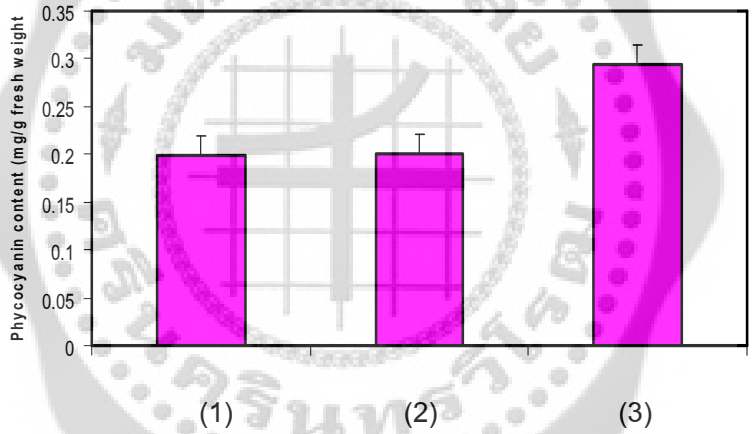
ภาพประกอบ 23 ผลของอาหาร BG_{11}, BG_{11}-C และ BG_{11}–N ต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.

ผลของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานิน

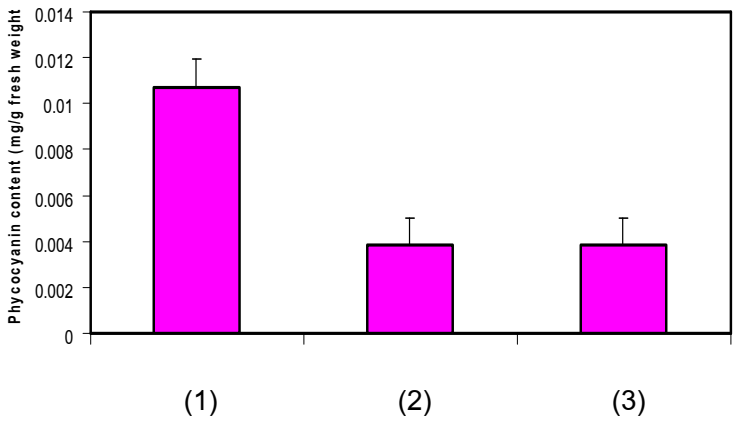
จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่อการเจริญของ *Oscillatoria* sp. ด้วยการใช้สารเคมีที่เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแทนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ในอาหารปกติจะใช้สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.02 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ โซเดียมไนเตรต 1.5 กรัมต่อลิตร ทำการแทนที่แหล่งของคาร์บอนด้วย โซเดียมไฮโดรเจน-คาร์บอเนต กลูโคส กลูตามิก แป้ง และแหล่งไนโตรเจนด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ ติดตามปริมาณของรงควัตถุไฟโคไซยานิน

ผลของแหล่งไนโตรเจน

ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่มีความแตกต่างของแหล่งไนโตรเจน ติดตามปริมาณของรงควัตถุไฟโคไซยานิน พบว่าอาหารที่มี โซเดียมไนเตรต จะทำให้ปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้น เมื่อมีความเข้มข้นมากขึ้น ในอาหารที่มีแอมโมเนียม-คลอไรด์ จะมีปริมาณไฟโคไซยานินลดลงเมื่อมีความเข้มข้นมากขึ้น (ภาพประกอบ 24 และ 25)



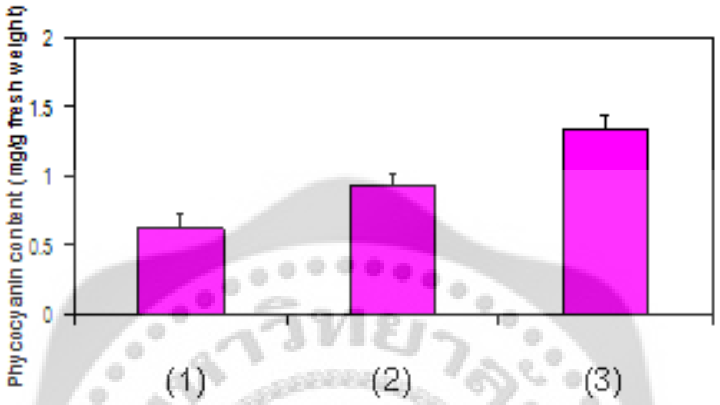
ภาพประกอบ 24 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.
(1). โซเดียมไนเตรต 0.75 กรัมต่อลิตร (2). โซเดียมไนเตรต 1.5 กรัมต่อลิตร
(3). โซเดียมไนเตรต 3 กรัมต่อลิตร



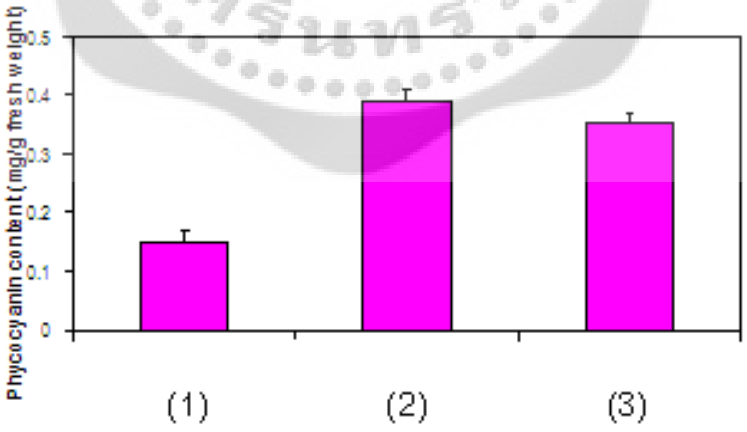
ภาพประกอบ 25 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.
(1). แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.475 กรัมต่อลิตร (2). แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.95 กรัมต่อลิตร
(3). แอมโมเนียมคลอไรด์ 1.9 กรัมต่อลิตร

ผลของแหล่งคาร์บอน

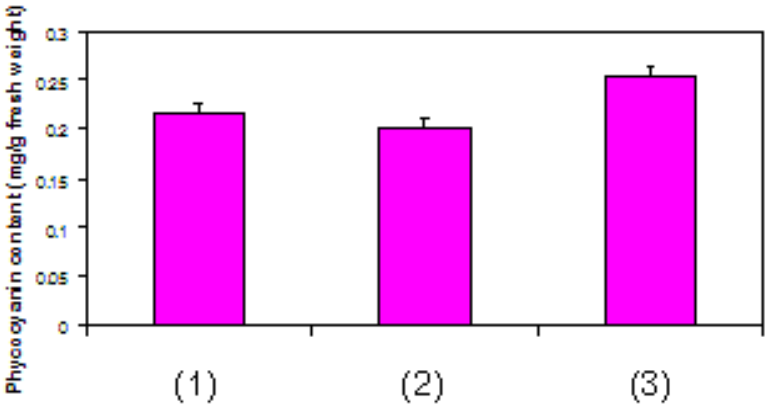
ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่มีความแตกต่างของแหล่งคาร์บอน ติดตามปริมาณของรงควัตถุไฟโคไซยานิน ในอาหารที่มีการแทนที่แหล่งคาร์บอนด้วยแป้งและโซเดียมไบคาร์บอเนต เมื่อมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของไฟโค-ไซยานิน และนอกจากนี้อาหารที่แทนที่ด้วยกลูโคส โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต และกลูตามิก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจะทำให้ปริมาณของไฟโคไซยานินลดลง (ภาพประกอบ 26-30)



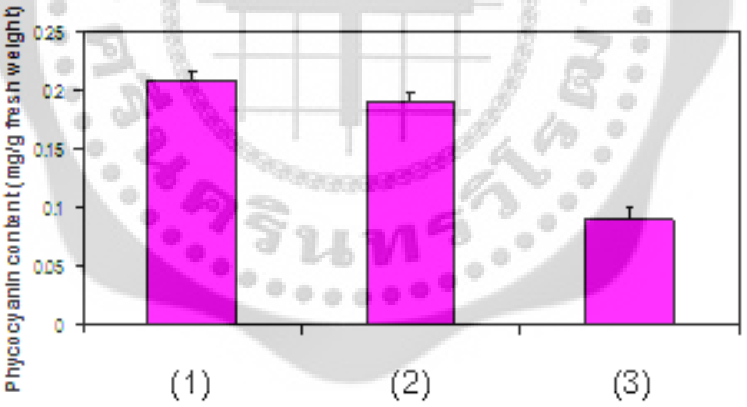
ภาพประกอบ 26 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.
(1). แป้ง 0.01 กรัมต่อลิตร (2). แป้ง 0.02 กรัมต่อลิตร (3). แป้ง 0.04 กรัมต่อลิตร



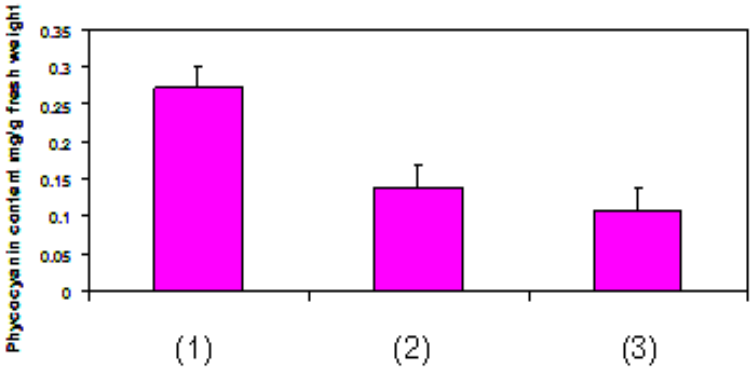
ภาพประกอบ 27 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.
(1). กลูโคส 0.025 กรัมต่อลิตร (2). กลูโคส 0.05 กรัมต่อลิตร (3). กลูโคส 0.1 กรัมต่อลิตร



ภาพประกอบ 28 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.
(1). โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.01 กรัมต่อลิตร (2). โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.02 กรัมต่อลิตร
(3). โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.04 กรัมต่อลิตร



ภาพประกอบ 29 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.
(1). โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.0075 กรัมต่อลิตร
(2). โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.015 กรัมต่อลิตร
(3). โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.03 กรัมต่อลิตร



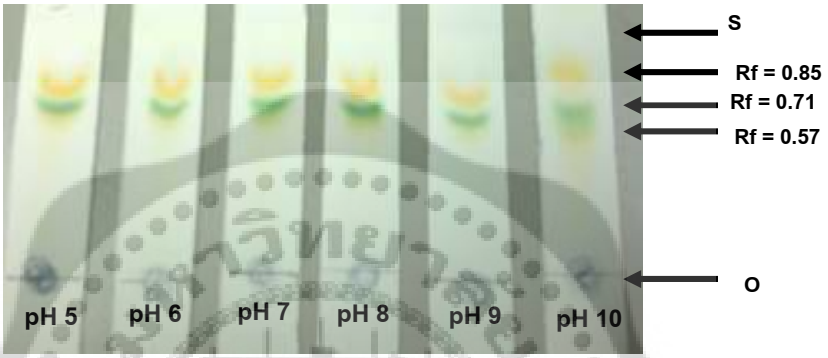
ภาพประกอบ 30 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณรงควัตถุไฟโคไซยานินที่พบใน *Oscillatoria* sp.

(1). กลูตามิก 0.025 กรัมต่อลิตร (2). กลูตามิก 0.05 กรัมต่อลิตร

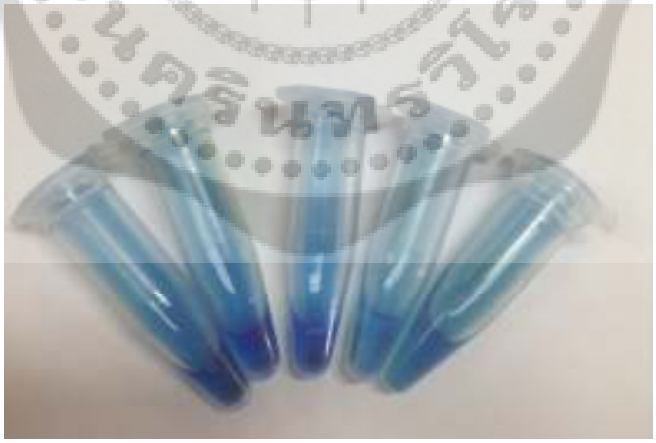
(3). กลูตามิก 0.1 กรัมต่อลิตร

การสกัดไฟโคไซยานินแบบหยาบ

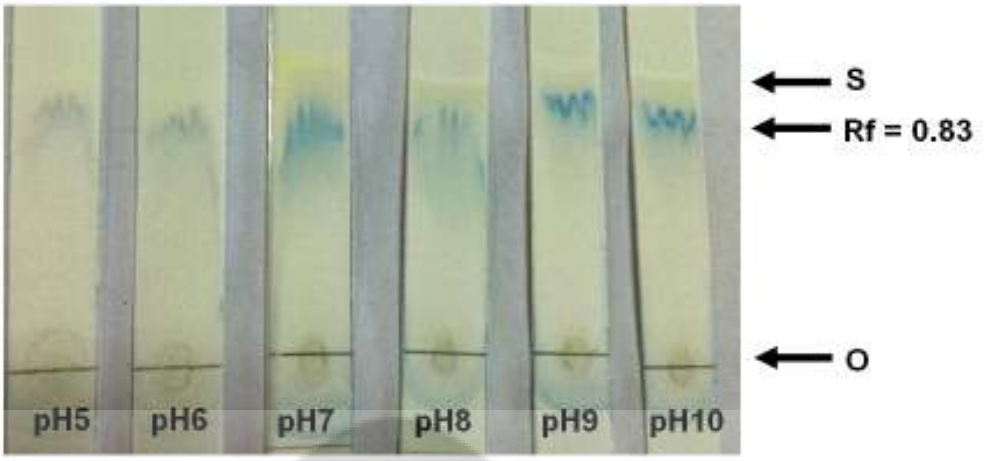
ทำการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ตรวจสอบปริมาณรงควัตถุโดยใช้ TLC ที่มีซิลิกาเป็นตัวดูดซับ และใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบสารสีเขียว สีเหลือง และสีน้ำเงิน (ภาพประกอบ 31) พบแถบสีจำนวน 3 แถบ คือ Rf = 0.57, Rf = 0. 71 และ Rf = 0.85 หลังจากนั้นสกัดรงควัตถุไฟโคไซยานินใน *Oscillatoria* sp. จะได้สารสกัดที่มีสีน้ำเงิน (ภาพประกอบ 32) แล้วนำสารที่ได้มาตรวจสอบโดยใช้ TLC จะพบว่ามีแถบสีน้ำเงิน 1 แถบ คือ Rf = 0.83 เกิดขึ้น (ภาพประกอบ 33)



ภาพประกอบ 31 รงควัตถุที่พบใน *Oscillatoria* sp. โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ TLC



ภาพประกอบ 32 สารสกัดสีน้ำเงินใน *Oscillatoria* sp.



ภาพประกอบ 33 รงควัตถุสีน้ำเงินที่พบใน *Oscillatoria* sp. โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ TLC

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฟโคไซยานินจากไซยาโน-แบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} มีภาวะที่แตกต่างกัน ได้แก่ ภาวะปกติ ภาวะความแตกต่างของพีเอชและอุณหภูมิ ภาวะความเครียดจากเกลือ และการนำวัชพืชมาเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโต แล้วทำการติดตามการเจริญและปริมาณรงควัตถุของ *Oscillatoria* sp. เป็นระยะเวลา 30 วัน ได้ผลสรุป ดังนี้

1. การเจริญของ *Oscillatoria* sp. เจริญได้ถึงระยะกลางแบบทวีคูณ (mid log phase) ในช่วง 12 – 18 วัน โดยเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ และการนำธูปฤาษีและผักตบชวามาเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า *Oscillatoria* sp. จะเจริญได้ดีกว่าในอาหารปกติ โดยมีการเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีส่วนผสมจากธูปฤาษี 10 mg/ml และในอาหารที่มีส่วนผสมจากผักตบชวา 5 mg/ml ตามลำดับ และนอกจากนี้ *Oscillatoria* sp. เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี starch 0.04 gl^{-1} เป็นแหล่งคาร์บอน และ $NaNO_3$ 3 gl^{-1} เป็นแหล่งไนโตรเจน

2. ปริมาณรงควัตถุของ *Oscillatoria* sp. จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในอาหารที่มีภาวะเป็นเบส อุณหภูมิ 35 องศาเซียสเซียส ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรต์ และอาหารที่มีการเพิ่มแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนมีผลทำให้รงควัตถุเพิ่มขึ้นเช่นกัน ยกเว้นในอาหารที่มี NH_4Cl เมื่อความเข้มข้นมากขึ้นปริมาณรงควัตถุจะลดลง

3. ปริมาณไฟโคไซยานินใน *Oscillatoria* sp. มีค่าสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่เติม $NaNO_3$ 3 gl^{-1} และ starch 0.04 gl^{-1}

อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฟโคไซยานินจากไซยาโน-แบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่มีภาวะแตกต่างกัน ได้แก่ ภาวะปกติ ภาวะความเครียดจากเกลือ ภาวะความแตกต่างของพีเอชและอุณหภูมิ และการนำวัชพืชมาเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโต และนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปใช้ประโยชน์ในด้านการลดปริมาณวัชพืชที่แพร่กระจายอย่างรวดเร็วซึ่งก่อให้เกิดปัญหากับแหล่งน้ำ (ประวิทย์ สุรนีรนาถ. 2554)

จากการทดลองเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญพบว่า *Oscillatoria* sp. เจริญได้ถึงระยะกลางแบบทวีคูณ (mid

log phase) ระหว่างวันที่ 12 – 18 โดยเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 8 นอกจากนี้อาหารที่มีภาวะเป็นกรด *Oscillatoria* sp. จะมีการเจริญลดลงซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของนาเกิล ฮาลสิกาล และแจกแทบ (Nagle; Mhalsekal; & Jagtap. 2009) ได้ทำการทดลองศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece pallid, Lyngbya* sp., *Synechocystis pevalekii, spirulina* sp., *Phormedium tenue, Synechococcus cedrorum* และ *Oscillatoria* sp. พบว่ามีการเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่าพีเอชช่วง 6.5 – 8.5 และเจริญสูงสุดในอาหารที่มีค่าพีเอช 7.5 สอดคล้องการศึกษาของสมชาย หวังวิบูลย์กิจ, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, และนิติ ชูเชิด (Wangwibulkit; Limsuwan; & Chuchird. 2008) ได้ทำการศึกษาพีเอชต่อการเจริญของ *Oscillatoria sp.* และ *Microcystis sp.* ที่แยกจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่า พีเอชระหว่าง 7.5 – 9 เช่นเดียวกับการทดลองของเฟอร์รารี (Ferrari; Italiano; & silva. 2002) *Oscillatoria sp.* เจริญได้ดีในอาหารสูตร BW_3 ที่มีภาวะเป็นเบส และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเจริญในอาหาร Algal พีเอช 7.5 โดย *Oscillatoria* sp. MOF-06 เจริญได้ดีในอาหารที่มีภาวะเป็นเบสและเจริญลดลงในอาหารที่มีพีเอชต่ำกว่า 8 (Fuenmayer; Jonte; Rosale; & Morales. 2009) การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียนอกจากความเหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ยังพบว่าอุณหภูมิมีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสมชาย หวังวิบูลย์กิจ, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, และนิติ ชูเชิด (Wangwibulkit; Limsuwan; & Chuchird. 2008) กล่าวว่าสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ที่เลี้ยงในสูตร BG_{11} Modifiled อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเท่ากับ 28.5+1.3 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับชำนิ ด้วงเทพ และคณะ (ชำนิ ด้วงเทพและคณะ; 2010) ทำการศึกษาสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร BG_{11} modifiled อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้โมไฮต์และเวค(Mohite ; & Wakte. 2011) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ *Arthrospira platensis* คือ 28 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียนอกจากจะมีผลต่อการเจริญของเซลล์แล้วยังมีผลต่อปริมาณของรงควัตถุในเซลล์อีกด้วย อาหารที่มีพีเอชเป็นเบส อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณของรงควัตถุมากกว่าในอาหารที่เป็นกรดซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของนาเกิลและแจกแทบ (Nagle; Mhalsekal; & Jagtap. 2009) พบว่าเมื่อเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหารที่มีพีเอช 7.5 ไซยาโนแบคทีเรียมีจะการเจริญและมีปริมาณรงควัตถุสูงสุด สอดคล้องกับการทดลองกรวิทย์ ไชยสุ (กรวิทย์ ไชยสุ. ม.ป.ป.) ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina platensis* จากสูตรอาหาร Zarrouk และสูตรอาหารอย่างง่าย ที่ pH เท่ากับ 8, 9, 10 และ 11 พบว่าที่ pH 9 ในสูตรอาหารอย่างง่ายให้ปริมาณไฟโคไซยานินสูงที่สุด และนอกจากนี้พันดีและคณะ (Pandee; Pathak; & Tiwari. 2010) ทำการศึกษาไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis* ที่พีเอช 9 จะมีการเจริญสูงสุด และยังมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณคลอโรฟิลล์และโปรตีนอีกด้วย

เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ เซลล์จะรักษาสมดุลเพื่อให้อยู่รอด โดยมีผลต่อการเจริญของเซลล์และปริมาณรงควัตถุ จากการทดลองเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ในภาวะที่มีความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่า *Oscillatoria* sp. เจริญ

ได้ดีในอาหารที่ไม่มีเกลือ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของโพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์ (โพธิธรณ์ ครรชิ-ตานุรักษ์; และคณะ. 2556) ซึ่งได้ทำการศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. พบว่าไซยาโนแบคทีเรียเจริญได้ดีในภาวะที่ไม่มีเกลือยกเว้น *Arthrospira* sp. PCC 8005 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.25 โมลาร์ และนอกจากนี้สมชาย หวังวิบูลย์กิจ, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, และนิติ ชู-เชิด (Wangwibulkit; Limsuwan; & Chuchird. 2008) ทำการศึกษาการเจริญของ *Oscillatoria* sp. พบว่าจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11}modifiled ที่มีความเครียดจากเกลืออยู่ระหว่าง 0 – 10 ppt ปรียาดาชานีและคณะ (Priyadashane; Thajuddin; & Rath. 2012) ศึกษาผลของความเค็มต่อพา มิเตอร์ทางชีวเคมีจากไซยาโนแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ*Oscillatoria subbrevis, Phormidium tenue*, *Phormidium* sp., *Lyngbya* sp. เลี้ยงในอาหาร ASN-III medium ที่มีความเครียดจากเกลือ 2.5% (Control), 3.0%, 3.5%,4.0%, 4.5%, 5.0%, 5.5% เมื่อมีความเครียดจากเกลือมากขึ้นเกิน 2.5% ในวันที่ 7 การเจริญลดลง ยกเว้น *Phormidium tenue* ที่เจริญได้ดีในอาหารที่มีความเครียดจากเกลือ 3.0% และจากการศึกษาปริมาณรงควัตถุของ *Oscillatoria* sp. พบว่าเมื่อมีความเครียดจากเกลือเพิ่มขึ้น ปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์ ไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริทรินลดลง ในทางตรงกันข้ามในอาหารที่มีความเครียดจากเกลือ 0 – 0.5 โมลาร์ จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการศึกษาของศรีวาสทาวา และคูมา (Srivastava; Kumar. 2010) ทำการศึกษาการเจริญของ *Nostoc muscorum* ในอาหารที่มีความเครียดจากเกลือ เมื่อมีความเครียดมากขึ้น ปริมาณของคลอโรฟิลล์และไฟโคไซยานินจะลดลง แต่ปริมาณของแคโรทีนอยด์จะเพิ่มขึ้น

การนำสารสกัดจากธูปฤาษีและผักตบชวามาเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} เนื่องจากพืชเหล่านี้เป็นวัชพืชที่ก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ เช่น เจริญเติบโตในพื้นที่เพาะปลูก เป็นอุปสรรคทางการชลประทาน ทำให้แหล่งน้ำตื้นเขิน อุปสรรคต่อการทำประมง เป็นอุปสรรคทางด้านการสาธารณสุข เนื่องจากเป็นที่พักอาศัยของพาหะนำโรค เป็นต้น (ศุภฤกษ์ ดวงขวัญ; จันทร์หอม แก่นพินิจ และปัททินี อุ่มทอง. 2554) จากการทดลองพบว่า *Oscillatoria* sp. เจริญได้ดีในอาหารที่มีส่วนผสมจากธูปฤาษี 10 mg/ml และในอาหารที่มีส่วนผสมจากผักตบชวา 5 mg/ml ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของอุษา บุญญเลศนิรันดร์ (อุษา บุญญเลศนิรันดร์. 2544) นำสารสกัดจากผักตบชวามาเป็นส่วนผสมในอาหารสูตร Zarrouk เมื่อนำสารสกัดจากผักตบชวาเข้มข้น 10% จะมีผลทำให้ *spirulina* sp. เจริญได้ใกล้เคียงกับสูตรอาหาร Zarrouk มาตรฐาน และนอกจากนี้จากการทดลองพบว่าเมื่อมีความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้นจะทำให้การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของอำพร คล้ายแก้วและนิศานาถ ละอองพันธุ์ (อำพร คล้ายแก้ว; และนิศานาถ ละอองพันธุ์. 2547) เมื่อนำสารสกัดจากธูปฤาษีและแหนเป็ดเล็กเป็นส่วนผสมในอาหารและศึกษาการเจริญของสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และไดอะตอม พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้นการเจริญจะลดลง ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการนำวัชพืชมาทำให้เกิดประโยชน์มากขึ้นโดยรัชพล พะวงศ์รัตน์ (รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2011) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไฮโดรไลเลสจากผักตบชวาโดยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงเพื่อผลิตเอทานอล ด้วยวิธีการที่

แตกต่างกันพบว่าสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 % ร่วมกับหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงจะช่วยให้เพิ่มการผลิตเอทานอลได้มากขึ้น

การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียต้องการแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมเพื่อนำมาสร้างพลังงานและสารประกอบที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน (BG_{11}-N) พบว่าการเจริญจะลดลงซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของแคนโต้และคณะ (Canto; Dubaco; & Thomas. 1986) พบว่าเมื่อเซลล์ของ *Pseudanabaena sp.* M2 and *Oscillatoria splendida*. L3 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด modified Z medium ที่ขาดไนโตรเจนจะส่งผลต่อองค์ประกอบภายในเซลล์ และเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เซลล์เจริญมากขึ้น โดย *Oscillatoria* sp. มีการเจริญได้ดีที่สุดในอาหารสูตร $NaNO_3$ 3 gl^{-1} เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของสุพจน์ บุญแรง และสุริยา สาสนรักกิจ (สุพจน์ บุญแรง; และสุริยา สาสนรักกิจ. 2542) เพาะเลี้ยง *Anabaena simensis* ในอาหารสูตร BG_{11} ที่เติม $NaNO_3$ 0.25 gl^{-1}, glucose 4.0 gl^{-1} จะมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด เช่นเดียวกับกัญญาลักษณ์ และคณะ (กัญญาลักษณ์ สังข์ประไพ; แพรพรรณ เกตุเรืองรอง; และสุเปญญา จิตตพันธ์. 2554) ทำการคัดเลือก *Oscillatoria* spp. โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 2 เท่า *Oscillatoria* sp. BG 00205 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด การใช้ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจนแทน $NaNO_3$ พบว่าการเจริญจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ NH_4Cl มากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของไดและคณะ (Dai; Deblois; Liu;Juneau; & Qui. 2008) ทำการศึกษาปุ๋ย NH_4Cl ต่อการเจริญของ *Nostoc* sp. ในนาข้าวพบว่าการใช้ปุ๋ย NH_4Cl ทำให้การเจริญของ *Nostoc* sp. ในนาข้าวลดลง นอกจากนี้เมื่อเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ในอาหารที่ไม่คาร์บอน (BG_{11}-C) พบว่า *Oscillatoria* sp. เจริญได้ใกล้เคียงกับในอาหารปกติ (BG_{11}) โดยสามารถใช้ CO_2 เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Janssen; 2002)

กับดานและคาร์กิ (Kapdan; & Kargi. 2006) ศึกษารวบรวมแหล่งคาร์บอนในน้ำเสียที่มีส่วนประกอบของ starch และ cellulose พบว่าน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ จุลินทรีย์สามารถนำไปเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้ ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียการโดยพามานิกส์และคณะ (Pramanik; Sundararaman; Das; Ghosh; & Mukherjee. 2011) ทำการคัดกรองไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp., *Phormidium* sp., *Plectonema* sp., *Oscillatoria* sp., และ*Synechocystis* sp. โดยพบว่าไซยาโนแบคทีเรียสามารถใช้ glycerol และ starch ในการเจริญได้ดีกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ และจากการศึกษาพบว่าปริมาณไฟโคไซยานินลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ขาดไนโตรเจนสอดคล้องกับการศึกษาของแคนโต้และคณะ (Canto; Dubaco; & Thomas. 1986) ถ้าปริมาณไนโตรเจนในอาหารไม่เพียงพอ รงควัตถุกลุ่มไฟโคไซยานินจะถูกสลายไปเป็นโครงสร้างภายในเซลล์ และการเพิ่มปริมาณ $NaNO_3$ เป็นสองเท่าจะทำให้ปริมาณของไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการศึกษาของสุพจน์ บุญแรง และสุริยา สาสนรัก (สุพจน์ บุญแรง; และสุริยา สาสนรักกิจ. 2542) เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนจะทำให้มีปริมาณของรงควัตถุไฟโคไซยานินมากที่สุด และการเติม $NaNO_3$ เพิ่มขึ้น 2 เท่าจะทำให้ผลิตซี – ไฟโคไซยานินได้สูงสุด (กัญญาลักษณ์ สังข์ประไพ; แพรพรรณ

เกตุเรืองรอง; และสุเปญญา จิตตพันธ์. 2554) และจากการศึกษาของบอซาริและคณะ (Borsari; et al. 2007) ทำการศึกษาการเจริญและปริมาณไฟโคไซยานินของ *Nostoc* sp. โดยเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และกากน้ำตาล อาหารที่มีกากน้ำตาลจะมีการเจริญและปริมาณ ไฟโคบิลิโปรตีนสูงที่สุด

จากงานวิจัยสรุปได้ว่าการเจริญของ *Oscillatoria* sp. ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและใช้สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารนำมาสร้างส่วนประกอบของเซลล์ กระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น การสร้างพลังงาน เอนไซม์ รงควัตถุ เป็นต้น นอกจากนี้ค่าพีเอชในอาหารมีผลต่อการเจริญของเซลล์โดยจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีภาวะเบส เนื่องจากอาหารที่เป็นเบสจะมีผลต่อปริมาณการละลายของคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนในอาหารที่เป็นกรดเซลล์จะพยายามขับ H^+ เพื่อรักษาสมดุลของเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงต้องใช้พลังงานจำนวนมากซึ่งมีผลต่อกระบวนการต่างๆ เช่น การเจริญของเซลล์ การนำสารเข้า-ออกของเซลล์ เป็นต้น กระบวนการต่างๆ ของเซลล์รวมถึงการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์และอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมจะมีผลต่อการทำงานของเซลล์ เช่นเดียวกับเซลล์เมื่ออยู่ในภาวะที่มีความเครียดจากเกลือโดยเซลล์จะพยายามรักษาดุลยภาพ ในภาวะที่แตกต่างกันของพีเอช อุณหภูมิและความเครียดจากเกลือจะส่งผลต่อการเจริญและลดปริมาณรงควัตถุหลักที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้เซลล์จะมีการสร้างรงควัตถุแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นเพื่อช่วยในการสังเคราะห์ด้วยแสงอีกด้วย โดยปกติ *Oscillatoria* sp. สามารถนำคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้ การเพิ่มสารอินทรีย์ในอาหารจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญได้มากขึ้น และนอกจากนี้เซลล์ยังต้องการไนโตรเจนเพื่อเพิ่มการเจริญและการสร้างรงควัตถุ เมื่อเซลล์อยู่ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนไม่เพียงพอจะทำให้มีปริมาณของรงควัตถุไฟโคไซยานินลดลง และการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากพืชที่เป็นวัชพืช พบว่าสารสกัดจากธูปฤาษีและผักตบชวาเมื่อนำมาเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มการเจริญของ *Oscillatoria* sp. ได้มากขึ้น จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากธูปฤาษีและผักตบชวามีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของ *Oscillatoria* sp. ช่วยลดต้นทุนในการเลี้ยง และยังช่วยลดปริมาณของวัชพืชที่เป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กรวิทย์ ไชยสุ. (ม.ป.ป.). *ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฟโคไซยานินของสาหร่าย spirulina platensis.* ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์.

กัญญาลักษณ์ สังข์ประไพ; แพรพรรณ เกตุเรืองรอง; และสุเปญญา จิตตพันธ์. (2554). *การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียมแกมน้ำเงิน Oscillatoria spp. สำหรับนำมาใช้ในการผลิต ซี-ไฟโคไซยานิน* วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 19(3)

ฆาสิณี พูลพิพัฒน์. (2548). *การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัตถุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อรา Aspergillus niger Yang no. 2.* ปริญญานิพนธ์ กศ.ม (เคมี) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

จันทรพร ทองเอกแก้ว (2537). การผลิตไฟโคไซยานินจาก อะฟาโนทีค ฮาโลพีทิกา และการทำให้บริสุทธิ์ Production and Purification of Phycocyanin from Aphanothece Halophytica วิทยานิพนธ์วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีทางชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

จารุ สังขนุกิจ. (2547). *การเพาะเลี้ยงสาหร่าย spirulina sp. ในอาหารจากเศษเหลือการเกษตร.* วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

ชนิกาญจน์ จันทร์มาทอง. (2552). กิจกรรมต้านออกซิเคชันและปริมาณสารต้านออกซิเดชันบางชนิดในผลมะเขือ (Antioxidant activity and some antioxidant contents in eggplant - fruits). ปริญญานิพนธ์ กศ.ม (ชีววิทยา). เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ชยากร ภูมาศ; และคณะ. (2007). *การคัดกรองไฟโคบิลิโปรตีนและกิจกรรมต้านออกซิเดชันที่ทนอุณหภูมิสูงจากไซยาโนแบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิสูงบางชนิด.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม (ชีววิทยา). เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ถ่ายเอกสาร.

ชำนิ ด้วงเทพและคณะ; (2010). *คุณค่าโภชนาการ และแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Oscillatoria sp.) ที่เลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ.* วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 5:(1) 76-88

ดนัย บุณยเกียรติ. (2004). *สรีระวิทยาของพืช.* สืบค้นเมื่อวันที่ 26 กันยายน 2554 จาก http://web.agri.cmu.ac.th/hort/course/359311/PPHY4_photosyn.htm

ดวงพร สุวรรณกุล; และ รังสิต สุวรรณาเขตนิคม. (2544). *วัชพืชในประเทศไทย.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทัดดาว ชูโชติ. (2009). การสกัดไพลโดยใช้เอ็นไซม์ช่วย (Enzyme-Assisted Extraction of PLai) *Zingiber cassumunar Roxb* คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาศาสตร์ศิลปากร.

นพพล เกตุประสาท. (2554). *ธูปฤาษี*. นครปฐม: *หน่วยอนุรักษ์และใช้ประโยชน์พืชพันธุ์ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง* มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สืบค้นเมื่อ 1 มีนาคม 2554 จาก http://clgc.rdi.ku.ac.th/index.php/rs/weed/373-typha.

นิสากร วิเวกวินย์. (2546*). อิทธิพลของการเติมหัวเชื้อ และ/หรือ การเติมอากาศต่อการทำปุ๋ยหมักจากผักตบชวา.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ) ชลบุรี: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา. ถ่ายเอกสาร.

ประวิทย์ สุรนีรนาถ. (2554*). พรรณไม้น้ำในประเทศไทย.* สืบค้นเมื่อ 5 สิงหาคม 2554 จาก http://www.ku.ac.th/AgrInfo/thaifish/aqplant/aqpindex.html.

พิมพ์ภาพ มณีธร. (2554) *ผลของแสงสีต่างๆและการเพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกที่มีต่อการเจริญเติบโต และปริมาณไฟโคบิลิโปรตีนของไซยาโนแบคทีเรีย Oscillatoria sp. KC 45.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม (ชีววิทยา) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ถ่ายเอกสาร.

โพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์; และคณะ. (2556). *ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณอิออนและสารออสโมโพรเทคแทนต์ในไซยาโนแบคทีเรีย.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม (ชีววิทยา) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

ภาคภูมิ พระประเสริฐ. (2550). *สรีระวิทยาของพืช.* กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์

มาลินี ฉัตรมงคลกุล; และชิดชัย จันทร์ตั้งสี. (2548*). แพลงก์ตอน.* ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ยุวดี พีรพรพิศาล; และคณะ. (2551). *กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระทนร้อนของรงควัตถุกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีนจากไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนเพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ทนร้อนด้านอื่น.* ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รัชพล พะวงศ์รัตน์. (2011). การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไฮโดรไลเสทผักตบชวาโดยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงเพื่อผลิตเอทานอล. Veridian E-Journal SU. 4(1): 891-901

วัชรพงษ์ วาระรัมย์; และคณะ. (ม.ป.ป.*). การดูดซับฟอร์มัลดีไฮด์ในน้ำเสียด้วยถ่านแกลบ ถ่านธูปฤาษี และถ่านกกกลม(Adsorption of Formaldehyde in Wastewater by Rice Husk Carbon, Typha angustifolia Linn. Carbon and Cuperus corybosus Rottb. Carbon.)* วิทยาลัยสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วีระศักดิ์ สามี. (2005). แคโรทีนอยด์: โครงสร้างทางเคมีและกลไกที่มีผลต่อการทำหน้าที่ของร่างกาย (Carotenoids: Structures and Potential Mechanisms in Biological Functions). สาขาวิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 10(1):58-66

ศศิพร เทียนแป้น; และคนอื่นๆ. (2551). *คุณสมบัติของสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียเพื่อ ผลิตภัณฑ์เสริมความงาม.* ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ศุภฤกษ์ ดวงขวัญ; จันทร์หอม แก่นพินิจ และ ปัททินี อุ่มทอง. (2554). *การจัดการผักตบชวา. สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 6*. มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

สินีนาฏ อักโขสุวรรณ. และศศิธร จันทนวรางกูร. (2010). *ผลของการทำแห้งต่อ C-Phycocyanin และสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากสาหร่ายเกลียวทอง (Spirulina platensis).* ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สินีรัตน์ เรืองสมบูรณ์; และคณะ. (2553). *คุณค่าทางโภชนาการและปริมาณรงควัตถุของ Spirulina platensis. ที่เลี้ยงในปุ๋ยผสมมูลสุกร.* วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 4(2): 34-43.

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์ (2549). ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโต ปริมาณโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc commune* Vaucher. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง 2549. 14(2): 40-49

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์; ศักดิ์ชัย ชูโชติ; และปวีณา ทวีกิจการ. (2553) *คุณค่าทางโภชนาการและปริมาณรงควัตถุของ Spirulina platensis ที่เลี้ยงในปุ๋ยผสมมูลสุกร.* วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 4(2): 34-43.

สุพจน์ บุญแรง; และสุริยา สาสนรักกิจ. (2542). *ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฟโคไซยานินของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว*. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37.

อุดมลักษณ์ มณีโชติ. (2552). *รายงานการประชุมเรื่อง การทบทวนทะเบียนรายการสาหร่ายและแพลงก์ตอนพืชในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: สำนักงานนโยบายและทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมกระทรวงทรัพยากรและธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

โอภา วัชระคุปต์; และคณะ. (2549). *สารต้านอนุมูลอิสระ*. กรุงเทพฯ: พี เอส พรินส์.

อัญชนา เจนวิถีสุข. (2546). *แอนติออกซิเดนท์ : สารต้านมะเร็งในผัก – สมุนไพรไทย.* เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์

อุษา บุญญเลศนิรันดร์. (2544). *การเพาะเลี้ยงสาหร่าย Spirulina sp. ในน้ำสกัดชีวภาพจากผักตบชวา*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม(วิทยาศาสตร์เทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยมหาวิทยาลัยมหิดล. ถ่ายเอกสาร.

อำพร คล้ายแก้ว; และนิศานาถ ละอองพันธ์. (2547). *ผลของสารสกัดจากธูปฤาษี (Typha sp.)และแหนเป็ดเล็ก (Lemna sp.) ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายชั้นต่ำในพื้นที่ชลประทาน*. กลุ่มวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์ สำนักวิจัยและพัฒนา กรมชลประทาน

Alghazzawi. (2012). *Sketch the cellulose structure*. สืบค้นเมื่อ 3 มกราคม 2555 จาก http://biochemcs.com/cellulose_structure.htm

Alka Gupta; Jayashree K; & Sainis. (2010*). Isolation of C-phycocyanin from Synechococcus sp.,(Anacystis nidulans BD1) .* Jounal of apply physical. 22: 231–233

Bennett A; and Bogorad L. (1973). *Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue-Green Alga.* Cell Biology. 58: 419-435

Bhaskar SU, Gopalaswamy G, Raghu R.A. (2005) *simple method for efficient extraction and purification of C-phycocyanin from Spirulina platensis Geitler*. สืบค้นเมื่อ 3 กุมภาพันธ์ 2554 จาก http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15816417

Bold; and Wynne; (1978). *Introduction to the algae : structure and reproduction*. Englewood Cliffs, N.J. : Prentice-Hall.

Botany. Hawii. (2011). *Phycobilisome*. สืบค้นเมื่อ 3 กุมภาพันธ์ 2554 จาก http://www.botany.hawaii.edu/faculty/webb/bot311/cyanobacteria/cyanophyta-14.htm.

Borsari; e al. (2007). *Mixotrophic growth of Nostoc sp. on glucose, sucrose and sugarcane molasses for phycobiliprotein production*. Journal of Acta Scientiarum. Biological Sciences. 29(1): 9-13

Boyd; & Hess. (1970*). Factors influencing shoot production and mineral nutrient levels in Typha latifolia*. Ecology. 51(2): 296–300

Cambell et.al. (1999). *Biology. 5thed*. California :Addison Wesley Longman Inc

Chen; et al. (2008). *In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities ofSelenium-Containing Phycocyanin fromSelenium-Enriched Spirulina platensis*. journal of Agric.Food Chem. 56: 4352–4358

Chemical Book. (2011*). Structure of 1,3,5-Triazine*. สืบค้นเมื่อ 2 มิถุนายน 2554.จาก http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB9390153_EN.htm.

Deejing S; & Ketkorn W. (2009). *Comparison of Hydrolysis Conditions to Recover Reducing Sugar from Various Lignocellulose Materials*. Journal Of Science. 36(3): 384-394.

Dai; Deblois; Liu;Juneau; & Qui. (2008). *Differential sensitivity of five cyanobacterial strains to ammonium toxicity and its inhibitory mechanism on the photosynthesis of rice-field cyanobacterium Ge-Xian-Mi (Nostoc).* Journal of Aquat Toxicol. 2008. 89(2):113-21

Duangsee Rachen; Phoopat Natapas; & Ningsanond Suwayd; (2009). *Phycocyanin extraction from Spirulina platensis and extract stability under various pH and temperature.* Journal of food Agriculture-Industry. 2(04): 819-826

Ferrari; Italiano; & silva. (2002). *Effect of a cyanobacterial community on calcium carbonate precipitation in Puente del Inca.* Journal of Acta Bot. Croat. 61;(1), 1–9

Fuenmayer; Jonte; Rosale; & Morales. (2009). *Growth of the marine cyanobacteria Oscillatoria sp. MOF-06 in relation to pH in discontinuous cultures.* Journal of Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia 2009. 29(1).21-25

Ge; et al. (2006). *Antioxidant properties of recombinant allophycocyanin expressed in Escherichia coli.* ournal of Photochemistry and Photobiology. 84: 175–180

Harmsen; et al. (2010). *Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for ignocellulose Biomass*. Food & Biobased Research.

Hemlata; et al. (2011). *Studies on Anabaena sp. NCCU-9 with special reference to phycocyanin.* Jounal of Algal Biomass Utln. 2(1): 30 – 51

Hendry G.A.F; & Houghton J.D. (1996). *Natural Food Colorants. Second edition.* Great Britain: Champman & Hall

Hoiczyk K; (2000). *Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations*. Journal of Microbiology. 174: 11-17

Herrera; et al. (1989). *Recovery of c-phycococyanin from cyanobacterium Spirulina maxima.* Journal of Appl. Phycol. 1:325-331.

Lindsey; & Hirt; (1999). *A Practical Handbook of Uses for the Water Hyacinth from Across the World*. สืบค้นเมื่อ 2 มิถุนายน 2554.จาก http://www.anamed.net/English_Home/Who_we_are____/water_hyacinth/Use_Water_Hyacinth_Download/Chapter_5.pdf.

Ivonne; Ana; & Nubia. (2011). *Optimising carbon and nitrogen sources for Azotobacter chroococcum growth.* African Journal of Biotechnology. 10(15): 2951-2958

Johnson James D. (2011). *Phycobilisome*. สืบค้นเมื่อ 3 กุมภาพันธ์ 2554 จาก http://www.chm.bris.ac.uk/motm/oec/motmc.htm.

Johnson. James D. (2006). *The Manganese-calcium oxide cluster of Photosystem II and its assimilation by the Cyanobacteria.* Department of Chemistry Florida. State University. Tallahassee. USA สืบค้นเมื่อวันที่ 10 ตุลาคม 2554 จาก http://www.chm.bris.ac.uk/motm/oec/ motm.htm.

Kapdan; & Kargi. (2006). *Bio-hydrogen production from waste materials.* Journal of Enzyme and Microbial Technology 38 (2006) 569–582

Kjellstrom Tord; et al. (2006). *Air and Water Pollution: Burden and Strategies for Control.* สืบค้นเมื่อวันที่10 ตุลาคม 2554. จาก http://files.dcp2.org/pdf/DCP/DCP43.pdf.

Kleber; et al. (2011). *Effects of the pH on growth and morphology of Anabaenopsis elenkinii Miller (Cyanobacteria) isolated from the alkaline shallow lake of the Brazilian Pantanal.* Journal of Fottea. 11(1): 119–126, 2011

KMUTT; (2001). *Laboratory Instruction : A Workshop on Mass cultivation of Spirulina*, January 8-11, 2001. King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand

Koppenaal. David. W. (2011). *EMSL Scientific Grand Challenge: Membrane Biology.* สืบค้น เมื่อวันที่ 8 ตุลาคม 2554. จาก http://www.emsl.pnl.gov/science/membrane/cyanobacteria.jsp.

Kumar; Kulshreshtha; & Singh. (2011). *Growth and Biopigment Accumulation of Cyanobacterium Spirulina platensis at Different Light Intensity and Temperature.* Brazilian Journal of Microbiology. 42: 1128-1135

Luciane C; et al. (2006). *Production of Biomass and Nutraceutical Compounds by spirulina platensis Under Different temperature and Nitrogen regimes.* Journal of Bioresource Technology. 98: 1489-1493

Merck KGaA. (2554). *1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, Free Radical, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Free Radical* สืบค้นเมื่อ 26 สิงหาคม 2554 จาก http://www.merck-chemicals.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-TH-Site/th_TH/-/THB/ViewPDFPrint.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=7_ab.s1LILUAAAEWlWEfVhTm&ProductUUID=ZXib.s1O8lgAAAEYlUtrwKK0&PortalCatalogUUID=ywGb.s1LAyMAAAEWzdUfVhTl.

Mako; Babyyemi; & Akinsoyinu. (2011). *An evaluation of nutritive value of water hyacinth (Eichhornia crassipes Mart. Solms-Laubach) harvested from different water sources as animal feed*. สืบค้นเมื่อ 27 ธันวาคม 2554 จาก http://www.lrrd.org/lrrd23/5/mako23106.htm.

Mohan N.; et al. (2010). *Mass Cultivation of Chroococcus turgidus and Oscillatoria sp. and Effective Harvesting of Biomass by Low-cost methods*. Journal of nature.

Mohite; & Wakte: (2011). *Assessment of Factors Influencing Growth and C-Phycocyanin Production of Arthrospira platensis from Meteoritic Crater Lake.* Journal of Algal Biomass Utln. 2(2): 53– 68

Moraes. C.C; (2010). *C-Phycocyanin Extraction from Spirulina platensis. Wet Biomass.Brazilian.* Journal of Chemical Engineering. 28: 45–49

Nagle ; Mhalsekar: &Jagtap; (2009). *Isolation, optimization and characterization of selected Cyanophycean members.* Journal of Marine Science. 39(2): 212-218

Pandee; Pathak; & Tiwari. (2010). *Standerdization of pH and Light Intensity for the Biomass Production of Spirulina platensis*. Journal of Algal Biomass Utin. 1(2): 93-102

Pramanik; Sundararaman; Das; Ghosh; & Mukherjee. (2011). *Isolation and Characterization of Cyanobacteria {ossessing antimicrobial Activity from the Sundarbans, The World 's Laegest Tidal Mangrove Forest .* Journal of Phycological Society of America. 47: 731–743

Priyadashane; Thajuddin; & Rath. (2012). *Salinity induced changes in biochemical parameters of four species of Cyanobacteria collected from Odisha coastline, India.*Journal of Advanced Life Sciences (IJALS). 4: 28-35

Rajavel; et al. (2007). *Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of Oscillatoria willei in experimental animal models*. Journal of Medicinal Plants Research. 3(7): 533-537

Romay; et al. (2003). *C-Phycocyanin: A Biliprotien with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects*. Journal of Current Protein and Peptide Science. 4: 207-216

Shukia S. P; and Kashyap S. (2003). *An assessment of Biopotential of three Cyanobacterial Isolates from Antarctic for Carotenoid Production*. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics. 40: 362-366

Shukia S. P.; et al. (2008*). Antarctic Cyanobacteria as Source of Phycocyanin: An assessment*. Indian Journal of Marine Sciences. 37(4): 446-449

Singh P; Kuddus M., & Thomas G. (2010*). An efficient method for extraction of C-phycocyaninfrom Spirulina sp. and its binding affinity to blood cells,nuclei and genomic DNA.* Journal of Biotechnology. 1(5): 080-085

Soletto D; (2004*). Batch and fed-batch Cultivations of Spirulina platensis using Amonium sulphate and Urea as Nitrogen source.* Journal of Aquaculture. 243: 217-224

Srivastava; & Kumar Ashish. (2011*). Assessment of Salinity-Induced Antioxidant Defense System of Diazotrophic Cyanobacterium Nostoc muscorum*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 20(11): 1506-1512

Suda K; et al. (2007). *The Feasibility of Using Cattail from Construced Wetland to Product Bioethanol*. Environmemtal Science and Technology.

Paveen; et al. (2009). *Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production*. Journal of Industrial & Engineering Chemistry Research. 43(8): 3713–3729

Valeria; et al. (2003). *Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Lipase Production by Penicillium aurantiogriseum*. Journal of Food Technol. Biotechnol. 41(2); 105–110

Wim V; (2001). *Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria.* ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. Arizona State University.

Wangwibulkit; Limsuwan; & Chuchird. (2008). *Effects of Salinity and pH on the Growth of Blue-Green Algae, Oscillatoria sp. And Microcystis sp., Isolated from Pacific White Shrimp (Litopenaeus vannamei) Ponds*. Kasetsart University Fisheries Research Bulletin . 32: 1-9

Zhang Bo; et al. (2010). *Hot - Water Pretreatment of Cattail for Extraction of Cellulose*. Journal of Microbial Biotechnology

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย BG_{11}

อาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย BG_{11}

การเตรียม Stock Solution

Stock Solution I (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

K_2HPO_4	6.27 g

Stock Solution II (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

$MgSO_4 * 7 H_2O$	1.50 g

Stock Solution III (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

$CaCl_2 * 2 H_2O$	7.20 g

Stock Solution IV (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

$NaCl_2CO_3$	4.00 g

Stock Solution V (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

EDTA	0.20 g
Citric acid	1.20 g
Ferric ammonium citrate	1.20 g

Stock Solution VI (Trace element A5 + Co ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

H_3BO_3	2.86 g
$MnCl_2 * 4 H_2O$	1.81 g
$ZnSO_4 * 7 H_2O$	0.22 g
$Na_2MoO_4 * 2 H_2O$	0.39 g
$CuSO_4 * 5 H_2O$	0.079 g
$Co(NO_3)_2 * 6 H_2O$	0.049 g

อาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย BG_{11} (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารเคมี

$NaNO_3$	1.50 g
KCl	0.67 g
$MnSo_4 * 7 H_2O$	6.92 g
$MgCl_2 * 6 H_2O$	5.50 g
$CaCl_2 * 2 H_2O$	1.47 g
Solution I	1.00 ml
Solution II	1.00 ml
Solution III	1.00 ml

Solution IV	1.00 ml
Solution V	1.00 ml
Solution VI	1.00 ml

ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 7.6 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

สารละลาย 50 mM Phosphate buffer (pH 7)

เตรียม Stock 50 mM Na_2HPO_4 โดยชั่ง Na_2HPO_4 7.10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

เตรียม Stock 50 mM KH_2PO_4 โดยชั่ง KH_2PO_4 6.81 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

นำ 50 mM Na_2HPO_4 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร มาปรับค่า pH ด้วย 50 mM KH_2PO_4 จนได้ pH ที่ต้องการ

ภาคผนวก ข

การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer และการหาน้ำหนักแห้ง

การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer และการหาน้ำหนักแห้ง

นำเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปใส่ในหม้อดูดความชื้น ชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรอง (A) นำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียกรองผ่านกระดาษกรองนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่มีค่า pH 4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C เวลา 2 ชั่วโมง นำไปใส่ในหม้อดูดความชื้น ชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองที่มีสาหร่าย (B) คำนวณหาน้ำหนักแห้งตามสูตร

$$\text{น้ำหนักแห้งของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย} = \frac{(B - A)}{\text{ปริมาตรเซลล์ที่กรอง}} \text{ .....mg/ml}$$

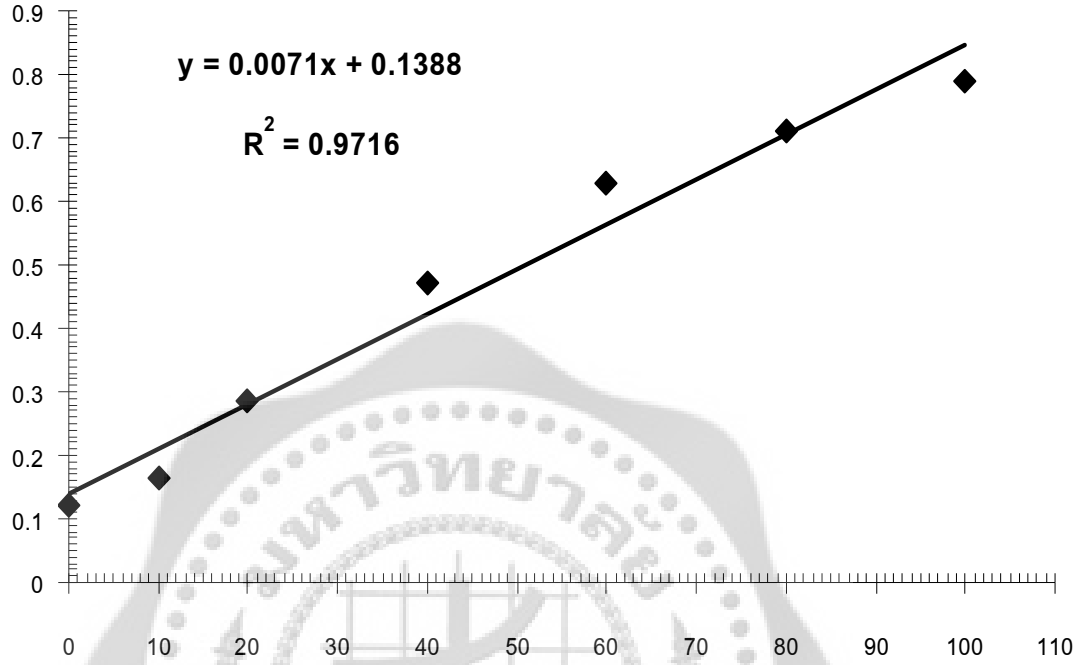
A = น้ำหนักกระดาษกรอง

B = น้ำหนักกระดาษกรองที่มีสาหร่าย

นำไปคำนวณหาน้ำหนักเซลล์ที่เจริญเติบโตสูงสุดจากอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่แตกต่างกัน

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐานไนโตรเจน

กราฟมาตรฐานไนโตรเจน



ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวกนกกานต์ นาคทอง
วันเดือนปีเกิด	วันที่ 9 มีนาคม 2526
สถานที่เกิด	อำเภอหนองฉาง จังหวัดอุทัยธานี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	141 หมู่ 1 เขตทุ่งครุ จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2540	มัธยมศึกษาตอนต้นปีที่ 3 จาก โรงเรียนหนองฉางวิทยา จังหวัดอุทัยธานี
พ.ศ. 2543	มัธยมศึกษาตอนปลายปีที่ 6 จาก โรงเรียนหนองฉางวิทยา จังหวัดอุทัยธานี
พ.ศ. 2547	ปริญญาตรี การศึกษาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์-ชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2556	ปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ