สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตแอมโมเนียโดยกระบวนการตรึงไนโตรเจนของสาหร่าย *Anabaena azollae* ในรูปเซลล์ตรึง

T062084

นางสาวกุลธิดา แก้วประพาพ
นายเกษม ธีรกฤตยากร
นางสาวจินตนา คำมณี

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 62084
วัน,เดือน,ปี 27 ก.ค. 2549
b 21160205

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ammonia production via nitrogen fixation of immobilized *Anabeana azollae*

Ms. Kulthida Kaewprapan

Mr. Kasem Theerakittayakorn

Ms. Jintana Kommanee

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for

the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic year 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง การผลิตแอมโมเนียโดยกระบวนการตรึงไนโตรเจนของสาหร่าย *Anabaena azollae* ในรูปเซลล์ตรึง

นักศึกษา นางสาวกุลธิดา แก้วประพาฬ
นายเกษม ธีรกฤตยากร
นางสาวจินตนา คำมณี

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.วีนา ชูโชติ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ	ผศ.วีนา ชูโชติ	
กรรมการ	อาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง การผลิตแอมโมเนียโดยกระบวนการตรึงไนโตรเจนของสาหร่าย *Anabaena azollae* ในรูปเซลล์ตรึง

นักศึกษา นางสาวกุลธิดา แก้วประพาพ
นายเกษม ธีรกฤตยากร
นางสาวจินตนา คำมณี

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2547

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.วีนา ชูโชติ

บทคัดย่อ

การแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaena azollae* จากแหนแดง, *Azolla pinnata* โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน โคโลนีของ *A. azollae* ที่แยกได้ จะมีสีน้ำตาลซีดจางและมีเซลล์เฮทเทอโรซิสต์เป็นจำนวนมาก เมื่อเปรียบเทียบการผลิตแอมโมเนียของเซลล์อิสระเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตและเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซาน ในสภาวะที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน พบว่า ปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้จากเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตในสภาวะอาหารที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนมีปริมาณแอมโมเนียมากที่สุด โดยมีปริมาณแอมโมเนียเท่ากับ 3.66 มิลลิโมลาร์ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนความเข้มข้น 5.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตรทุกๆ 20 ชั่วโมง พบว่า *A. azollae* สามารถรอดชีวิตอยู่ในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนได้เป็นเวลานาน 60 ชั่วโมง ซึ่งผลิตแอมโมเนียในชั่วโมงที่ 60 ได้ 7.59 มิลลิโมลาร์ การผลิตแอมโมเนียโดย *A. azollae* ที่เลี้ยง 2 สภาวะสลับกัน (สภาวะที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน) ปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้เพิ่มสูงขึ้นโดยในชั่วโมงที่ 186 มีปริมาณแอมโมเนียสูงถึง 12.99 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Topic Title Ammonia Production via Nitrogen Fixation of Immobilized *Anabaena azollae*

Name Ms. Kulthida Kaewprapan
Mr. Kasem Theerakittayakorn
Ms. Jintana Kommanee

Department Applied Biology

Program Biotechnology

Academic Year 2004

Special Project advisor Asst. Prof. Weena Choochote

ABSTRACT

The purification of blue green algae *Anabaena azollae* from *Azolla pinnata* was cultivated in BG-11 free-nitrogen medium. Colonies of *A. azollae* were pale brown, and several heterocysts were formed. The differences of ammonia production by free cell, immobilized in calcium alginate beads and immobilized in chitosan beads of *A. azollae* were determined in methionine sulfoximine-treated and no methionine sulfoximine-treated conditions. The highest concentration of ammonia, 3.66 mM, was produced by *A. azollae* immobilized in calcium alginate beads with methionine sulfoximine-treated at the hour 24. When the culture was added by 2 ml of 5.25 mM methionine sulfoximine every 20 hours, *A. azollae* can survive for 60 hours in the methionine sulfoximine-treated condition which the concentration of ammonia at the hour 60 was 7.59 mM. The two stage of cultivation, with and without methionine sulfoximine-treated conditions, the concentration of ammonia reached to 12.99 mM at the hour 186 of cultivation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก ผศ.วีนา ชูโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง และอาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ที่ได้ตรวจและแก้ไขโครงงานพิเศษและให้ความอนุเคราะห์ยืมอุปกรณ์ รวมทั้งอาจารย์ทุกท่านที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา คำแนะนำและชี้ทางที่เป็นประโยชน์ต่อโครงงานพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ที่ได้ให้ความสะดวกในเรื่องเครื่องมือและอุปกรณ์การทดลองต่างๆ เพื่อนนักศึกษาที่คอยเป็นกำลังใจ กำลังความคิด ตลอดจนให้ความร่วมมือในเรื่องต่างๆ อย่างดียิ่ง

นางสาวกุลธิดา แก้วประพาศ
นายเกษม ธีรกฤตยากร
นางสาวจินตนา คำมณี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญ (ต่อ)	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญตาราง (ต่อ)	ช
สารบัญรูป	ซ
สารบัญรูป (ต่อ)	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	3
1.4 ขั้นตอนในการทำโครงงานพิเศษ	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน	4
2.2 กลไกการตรึงไนโตรเจน	6
2.3 เมตาบอลิซึมของแอมโมเนียที่ได้จากการตรึงไนโตรเจน	7
2.4 แหนแดง	10
2.5 *Anabaena azollae*	11
2.6 ซิมไบโอติกไซยาโนแบคทีเรีย	13
2.7 การผลิตแอมโมเนียโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในรูปเซลล์ตรึง	14
2.8 วัสดุตรึงที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย	16
2.9 การใช้เมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนในการผลิตแอมโมเนีย	17
2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกระบวนการแอมโมเนียโดยการตรึงไนโตรเจน	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.11 การใช้ประโยชน์จากแอมโมเนีย	25
2.12 การวัดปริมาณแอมโมเนียโดยวิธี Nesslerization	26
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการทดลอง	28
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	28
3.2 สารเคมี	28
3.3 อุปกรณ์	28
3.4 วิธีการทดลอง	30
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ	33
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	34
4.1 การแยก *A. azollae* จากแหนแดง	34
4.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตแอมโมเนียโดยเซลล์อิสระกับเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานและเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต	36
4.3 การหาระยะเวลาที่ *A. azollae* สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	42
4.4 การผลิตแอมโมเนียโดย *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงจากการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะสลับกัน (สภาวะที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน)	44
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	48
5.1 การแยก *A. azollae* จากแหนแดง	48
5.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตแอมโมเนียโดยเซลล์อิสระกับเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานและเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต	48
5.3 การหาระยะเวลาที่ *A. azollae* สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	49
5.4 การผลิตแอมโมเนียโดย *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงจากการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะสลับกัน (สภาวะที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน)	49
5.5 ข้อเสนอแนะ	49
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ปริมาณแอมโมเนียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตโดยเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุก 20 ชั่วโมง	43
4.2	ปริมาณแอมโมเนียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตแบบ 2 สภาวะสลับกัน	45
ก1	อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน	55
ข1	ค่าการดูดกลืนแสงของการวัดปริมาณแอมโมเนียในสารละลายมาตรฐาน	59
ข2	ค่าการดูดกลืนแสงของการวัดปริมาณแอมโมเนียในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	61
ข3	ค่าการดูดกลืนแสงของการวัดปริมาณแอมโมเนียในเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	61
ข4	ค่าการดูดกลืนแสงของการวัดปริมาณแอมโมเนียของเซลล์อิสระที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	61
ข5	ค่าการดูดกลืนแสงของการวัดปริมาณแอมโมเนียในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	62
ข6	ค่าการดูดกลืนแสงของการวัดปริมาณแอมโมเนียในเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	62
ข7	ค่าการดูดกลืนแสงของการวัดปริมาณแอมโมเนียเซลล์อิสระที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	62
ข8	ปริมาณแอมโมเนียจากเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	64
ข9	ปริมาณแอมโมเนียจากเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	64
ข10	ปริมาณแอมโมเนียจากเซลล์อิสระที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	64
ข11	ปริมาณแอมโมเนียจากเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	65
ข12	ปริมาณแอมโมเนียจากเซลล์ตรึงในไคโตซานที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	65
ข13	ปริมาณแอมโมเนียจากเซลล์อิสระที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ข14	ค่าการดูดกลืนแสงจากการวัดปริมาณแอมโมเนียในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุก 20 ชั่วโมง	66
ข15	ปริมาณแอมโมเนียในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุก 20 ชั่วโมง	67
ข16	ค่าการดูดกลืนแสงจากการวัดปริมาณแอมโมเนียในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตแบบ 2 สภาวะสลับกัน	68
ข17	ปริมาณแอมโมเนียในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตแบบ 2 สภาวะสลับกัน	69
ข18	ค่าการดูดกลืนแสงจากการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	70
ข19	ค่าการดูดกลืนแสงจากการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในเซลล์อิสระที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	71
ข20	ค่าการดูดกลืนแสงจากการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	71
ข21	ค่าการดูดกลืนแสงจากการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในเซลล์อิสระที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	72
ข22	ปริมาณแอมโมเนียในการวัดการเจริญเติบโตในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	74
ข23	ปริมาณแอมโมเนียในการวัดการเจริญเติบโตในเซลล์อิสระที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	74
ข24	ปริมาณแอมโมเนียในการวัดการเจริญเติบโตในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	74
ข25	ปริมาณแอมโมเนียในการวัดการเจริญเติบโตในเซลล์ตรึงในเมไคโตซานที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	75
ค1	การเปรียบเทียบปริมาณแอมโมเนียในทุกลักษณะการเจริญ	77
ค2	การเปรียบเทียบปริมาณแอมโมเนียในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต	78
ค3	การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตโดยวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในทุกลักษณะการเจริญ	79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะเฮทเทอโรซิสต์และ อะคีนีตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน	4
2.2	ความสัมพันธ์ของเฮทเทอโรซิสต์กับเซลล์ปกติ	5
2.3	การตรึงก๊าซไนโตรเจนโดยการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส	7
2.4	เมตาบอลิซึมของแอมโมเนีย	9
2.5	ภาพแสดงลักษณะของแหนแดง	10
2.6	แสดงโครงสร้างภายในของ *A. azollae*	11
2.7	โครงสร้างของแหนแดงและโพรงใบของแหนแดง	12
2.8	สาหร่าย *A. azollae* ที่เจริญภายในโพรงใบของแหนแดง	12
2.9	เซลล์ตรึงเม็ดโฟมโพลียูรีเทนของ *A. azollae*	15
2.10	เซลล์ตรึงในฟางข้าวของ *A. azollae*	15
2.11	โครงสร้างของเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	17
2.12	กระบวนการผลิตแอมโมเนียจากไนเตรตโดย *Anacystis nidulans*	20
2.13	การผลิตแอมโมเนียแบบต่อเนื่องโดย *A. azollae* ในถังหมักชนิดเส้นใยกลวง	21
2.14	แผนภูมิแสดงการใช้ประโยชน์จากแอมโมเนียในด้านต่างๆ	26
4.1	*A. azollae* ที่แยกได้จากแหนแดง	34
4.2	การเพิ่มจำนวน *A. azollae* ในอาหารแข็ง	35
4.3	การเพิ่มจำนวน *A. azollae* ในอาหารเหลว	35
4.4	*A. azollae* ในเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซาน	36
4.5	*A. azollae* ในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต	36
4.6	ปริมาณแอมโมเนียในอาหารที่เติมและไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	38
4.7	ปริมาณแอมโมนียในเซลล์อิสระ เซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตและเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซาน	39
4.8	การเจริญเติบโตของเซลล์อิสระในอาหารที่เติมและไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	41
4.9	การเจริญเติบโตของเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตในอาหารที่เติมและไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.10	ปริมาณแอมโมเนียในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุก 20 ชั่วโมง	44
4.11	ปริมาณแอมโมเนียในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตแบบ 2 สภาวะสลับกัน	46
ข1	สีของสารประกอบเชิงซ้อนของเนสเลอร์ รีเอเจนท์ในการทำกราฟมาตรฐาน	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาโครงงานพิเศษ

ในบรรยากาศของโลกประกอบด้วยก๊าซไนโตรเจน (N_2) มากถึงร้อยละ 79 โดยปริมาตร แม้ว่าในบรรยากาศจะประกอบด้วยก๊าซไนโตรเจนมากมาย แต่สิ่งมีชีวิตที่สามารถนำก๊าซไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ได้โดยตรงมีเพียงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น พืชและสัตว์ไม่สามารถนำก๊าซไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ได้โดยตรง พืชจะรับไนโตรเจนในรูปของสารประกอบ เช่น แอมโมเนีย (NH_3) หรือ ไนเตรต (NO_3^-) นอกจากนี้ในธรรมชาติยังมีการเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้เป็นไนเตรตได้ขณะเกิดฟ้าแลบฟ้าผ่า

แต่ถึงอย่างไรก็ตามการนำก๊าซไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ประโยชน์ได้น้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณไนโตรเจนที่มีอยู่มากมายในบรรยากาศ ตัวอย่างการนำไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ประโยชน์ในปัจจุบัน ได้แก่ การผลิตเป็นไนโตรเจนเหลว ใช้ในรูปก๊าซเฉื่อยในหลอดไฟหรือในบรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุอาหาร หรือนำมาผลิตเป็นแอมโมเนีย (NH_3) โดยกระบวนการทางเคมีที่มีชื่อว่า Haber-Bosch ซึ่งเป็นกระบวนการผลิตแอมโมเนียระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบัน สำหรับกระบวนการ Haber-Bosch มีข้อด้อยหลายประการ เช่น ปฏิกิริยาดำเนินในสภาวะที่รุนแรง คือ อุณหภูมิ 400-500 องศาเซลเซียสและความดัน 200 บรรยากาศ (Dixon และ Wheeler,1986) ก๊าซไนโตรเจนที่ใช้ในปฏิกิริยาได้มาจากปิโตรเลียมซึ่งเป็นเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ใช้แล้วหมดไป และต้องใช้พลังงานสูงในการเพิ่มอุณหภูมิและความดันและต้องลงทุนค่าก่อสร้างเครื่องจักรอุปกรณ์ในราคาสูง ทำให้ปัจจุบันมีการศึกษาและพัฒนาการผลิตแอมโมเนียโดยอาศัยการตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่ากระบวนการ Haber-Bosch

สำหรับการผลิตแอมโมเนียโดยอาศัยการตรึงไนโตรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีข้อได้เปรียบกว่าแบคทีเรียหลายประการ คือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโฟโตออโตโทรฟ (photoautotroph) ได้พลังงานจากการสังเคราะห์ด้วยแสงและสามารถใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนทำให้มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า ปัจจุบันมีการศึกษาการผลิตแอมโมเนียโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นจำนวนมาก สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้มีประมาณ 32 สกุล 152 ชนิด (สรวิศ, 2543) โดยที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินกลุ่มที่มีเฮทเทอโรซิสต์ (heterocyst) เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนมากที่สุด สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิ่งมีชีวิตอื่น(symbiosis) สามารถตรึงไนโตรเจนแล้วปลดปล่อยไนโตรเจนที่ตรึงได้บางส่วนในรูปของแอมโมเนียให้แก่ผู้ให้อาศัย (host) ได้อย่างต่อเนื่องทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นสามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้ผลิตแอมโมเนียแบบต่อเนื่องได้

Anabaena azollae เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับแหนแดง *(Azolla* sp.) *A. azollae* จัดเป็นไซยาโนไบออนท์(cyanobiont) ที่มีการศึกษาและใช้ประโยชน์จากการตรึงไนโตรเจนมากที่สุดชนิดหนึ่ง ในประเทศจีนโดยเฉพาะทางตะวันออกเฉียงใต้ของจีนและทางตอนเหนือของเวียดนามนิยมปลูกแหนแดงร่วมกับการปลูกข้าวเพื่อใช้แหนแดงเป็นเป็นปุ๋ยพืชสดที่มีธาตุไนโตรเจน

Brouers และคณะ (1989) ได้ศึกษาการผลิตแอมโมเนียใน *A. azollae* ที่เพาะเลี้ยงในสภาพเซลล์อิสระ และในสภาพเซลล์ตรึง พบว่า *A. azollae* ที่เพาะเลี้ยงในสภาพเซลล์อิสระมีการตรึงไนโตรเจน การผลิตแอมโมเนีย และสัดส่วนของเฮทเทอโรซิสต์ต่ำกว่าในสภาพการดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับแหนแดงอย่างมาก ในขณะที่ *A. azollae* ที่เพาะเลี้ยงในสภาพเซลล์ตรึงยังคงมีการตรึงไนโตรเจน การผลิตแอมโมเนียและจำนวนของเฮทเทอโรซิสต์คล้ายกับการดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับแหนแดง *A. azollae* ที่เพาะเลี้ยงในสภาพเซลล์ตรึงมีการปลดปล่อยแอมโมเนียในสารละลายที่เพาะเลี้ยงมากถึงร้อยละ 40 ของปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้

ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้ *A. azollae* มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพเซลล์ตรึงเพื่อใช้ในการผลิตแอมโมเนีย ซึ่งอาจสามารถพัฒนาสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมแทนการผลิตโดยกระบวนการ Haber-Bosch ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 คัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมต่อการผลิตแอมโมเนียของ *A. azollae*

1.2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอมโมเนียของ *A. azollae*

1.2.3 ศึกษาความสัมพันธ์ของการตรึงไนโตรเจน การเจริญเติบโตและการผลิตแอมโมเนียของ *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึง

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

แยกเชื้อ *A. azollae* จากแหนแดงซึ่งมีภาวะการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยแล้วนำ *A. azollae* ที่ได้มาตรึงกับวัสดุตรึง 2 ชนิด คือ ไคโตซาน (chitosan) และอัลจิเนต (alginate) เพื่อหาวัสดุที่เหมาะสมต่อการตรึง *A. azollae* ที่สามารถผลิตแอมโมเนียได้ในปริมาณมากที่สุด

นอกจากนี้ยังศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต การตรึงไนโตรเจนกับการผลิตแอมโมเนีย รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอมโมเนีย

1.4 ขั้นตอนในการทำโครงงานพิเศษ

1.4.1 แยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *A. azollae* จากแหนแดงและเพิ่มจำนวน *A. azollae* ในอาหารเหลว

1.4.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตแอมโมเนียโดยเซลล์อิสระกับเซลล์ตรึงในวัสดุตรึง 2 ชนิด คือ ไคโตซานและอัลจิเนต จากนั้นหาระยะเวลาการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสของเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน (L-methionine-DL-sulfoximine ,MSX)

1.4.3 หาระยะเวลาที่ *A. azollae* สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาพที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

1.4.4 การผลิตแอมโมเนียโดย *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงจากการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะสลับกัน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงวัสดุตรึงที่เหมาะสมต่อการผลิตแอมโมเนียของ *A. azollae*

1.5.2 ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแอมโมเนีย

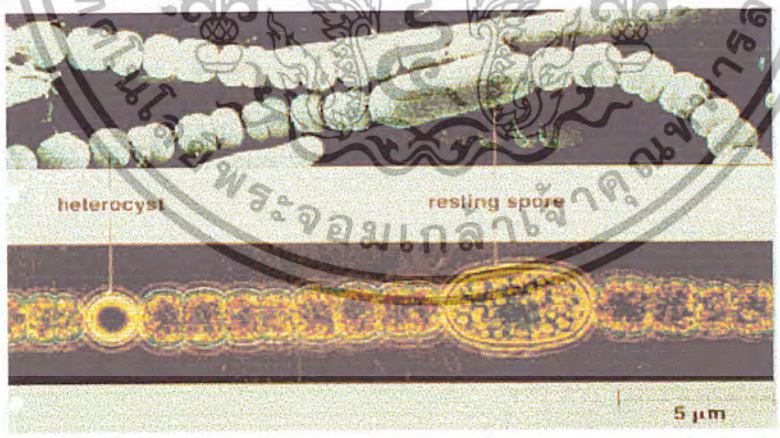
1.5.3 เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตแอมโมเนียจาก *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสิ่งมีชีวิตโปรคาริโอตพวกโฟโตออโตโทรฟ มีรงควัตถุทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสงแต่ไม่มีคลอโรพลาสต์เหมือนพืชชั้นสูง บางสกุลสามารถสร้างอะคีนีต (akinete) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่และมีผนังหนาทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้มากกว่าเซลล์ปกติ บางชนิดสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศได้ สำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้มีประมาณ 32 จีนัส 152 สปีชีส์ (สรวิศ,2543) แบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้ สาหร่ายกลุ่มที่มีเฮทเทอโรซิสต์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน สาหร่ายกลุ่มที่เจริญเป็นเซลล์เดียวหรือเป็นกลุ่มสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน สาหร่ายกลุ่มที่เป็นเส้นสายที่ไม่มีเฮทเทอโรซิสต์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน และกลุ่มสุดท้ายสาหร่ายกลุ่มที่เป็นเส้นสายที่ไม่มีเฮทเทอโรซิสต์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาวะที่มีไม่มีออกซิเจน

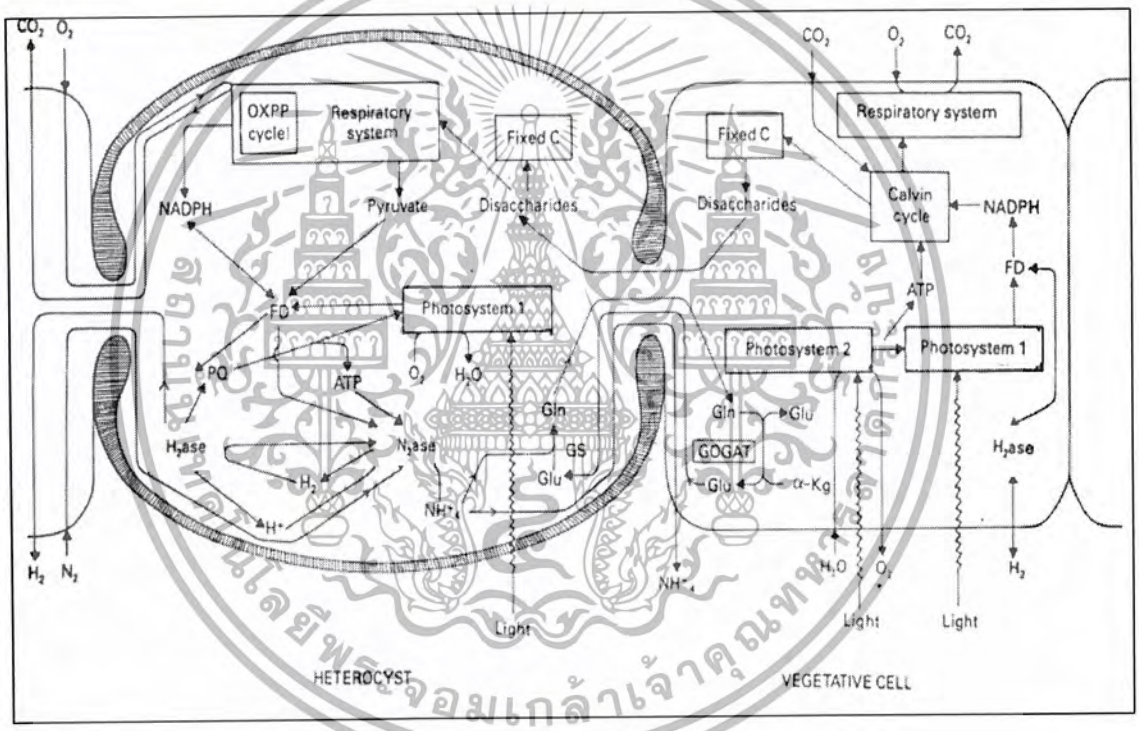


รูปที่ 2.1 ลักษณะเฮทเทอโรซิสต์ (heterocyst) และ อะคีนีต (akinete หรือ resting spore) ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ที่มา: www.nbsp.sonoma.edu/resources/presentations/derekpres/05 Microbe%20lecture/sld005.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฮทเทอโรซิสต์เป็นเซลล์พิเศษที่มีเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ เนื่องจากเอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่ว่องไวต่อออกซิเจน โครงสร้างของเฮทเทอโรซิสต์จึงมีการเปลี่ยนแปลงเป็นพิเศษคือ มีผนังหนาช่วยป้องกันออกซิเจนจากภายนอกแพร่เข้าสู่เซลล์และไม่มีระบบแสง II (photosystem II) จึงไม่มีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์และไม่สร้างออกซิเจน ด้วยโครงสร้างและลักษณะทางชีวเคมีของเฮทเทอโรซิสต์นี้เองทำให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสสามารถทำงานได้แม้ในสภาวะที่มีออกซิเจน ด้วยเหตุนี้ทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินกลุ่มที่มีเฮทเทอโรซิสต์มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนมากที่สุด



รูปที่ 2.2 ความสัมพันธ์ของเฮทเทอโรซิสต์กับเซลล์ปกติ (vegetative cell)

ที่มา : www.biotech.szbk/u-szeged.hu/KK_Jegyzet/pic/heterocyst.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กลไกการตรึงไนโตรเจน

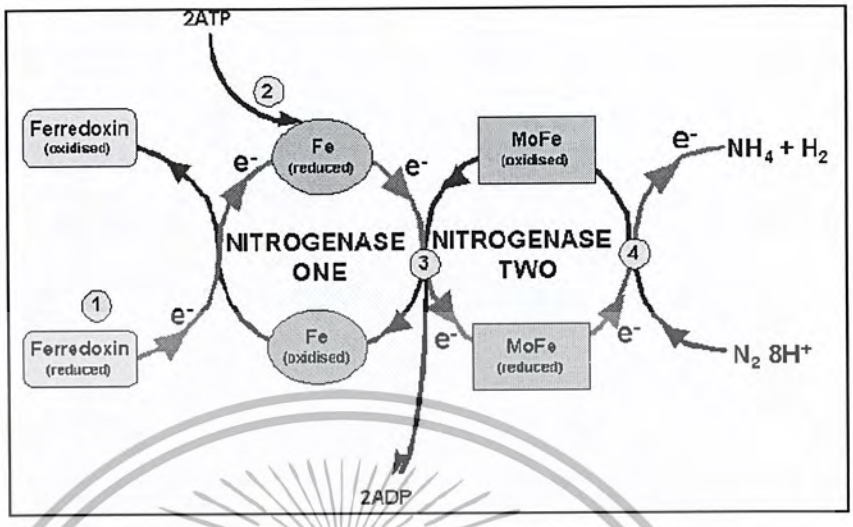
การตรึงก๊าซไนโตรเจน 1 โมล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนีย 2 โมล โดยใช้พลังงานในรูปเอทีพี (ATP) จำนวน 16 โมล และใช้อิเล็กตรอนและโปรตอนดังแสดงในสมการ

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

ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นโดยโปรคาริโอตที่มีเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์คอมเพลกซ์ (enzyme complex) เอนไซม์นี้ประกอบไปด้วยโปรตีน 2 ส่วน ส่วนแรกคือเอนไซม์รีดักเทส (reductase) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ (iron protein) ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ส่วนที่ 2 เป็นเอนไซม์ไดไนโตรจีเนส (dinitrogenase) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีทั้งธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมเป็นองค์ประกอบ (molybdenum-iron protein, Mo-Fe-protein) จึงสามารถเรียกเอนไซม์นี้อีกชื่อหนึ่งว่าโมลิบดินัมไนโตรจีเนส ซึ่งประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย เอนไซม์ไนโตรจีเนสส่วนแรกที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนและสลายเอทีพี เพื่อผลักดันอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์ไนโตรจีเนสส่วนที่สองที่ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ซึ่งจะทำหน้าที่รีดิวซ์ไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย แอมโมเนียที่สังเคราะห์ได้จะเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโนและ กรดนิวคลีอิกเป็นส่วนใหญ่ แอมโมเนียที่ได้จากการตรึงไนโตรเจนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เช่น กรดแอสพาติก (aspartic acid) และ กรดกลูตามิก (glutamic acid) เป็นต้น (มนตรี, 2542)

แหล่งของอิเล็กตรอนที่ใช้อาจได้มาจากเฟอร์รีดอกซิน (ferridoxin) ในรูปรีดิวซ์หรือเฟลโวโปรตีน (flavoprotein) รูปรีดิวซ์ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ตรึงไนโตรเจนเอนไซม์ไนโตร-จีเนสสามารถทำงานได้เฉพาะในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เนื่องจากออกซิเจนเป็น ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเมื่อปริมาณแอมโมเนียสูงขึ้นการเกิดเฮทเทอโรซิสต์จะลดลง (ลัดดา, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การตรึงก๊าซไนโตรเจนโดยการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส
ที่มา : www.com.univ-mrs.fr/images/nitfix.

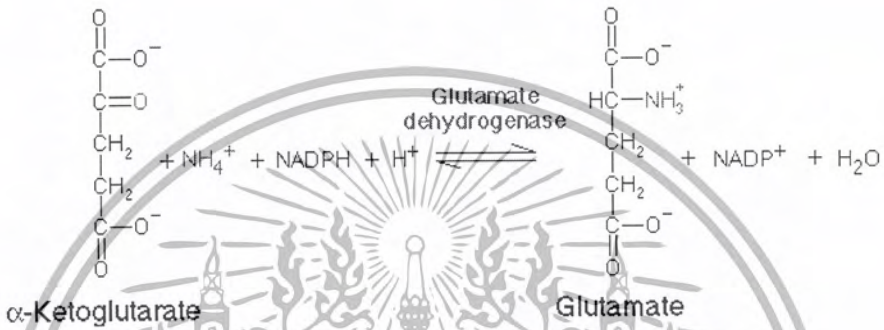
2.3 เมตาบอลิซึมของแอมโมเนียที่ได้จากการตรึงไนโตรเจน (สิริภัค, 2543)

แอมโมเนียที่ได้จากการตรึงไนโตรเจนจะถูกใช้ในการสร้างกรดอะมิโนและสารประกอบไนโตรเจนต่างๆ กระบวนการสร้างกรดอะมิโนจากแอมโมเนียมีความสำคัญต่อเซลล์มาก เนื่องจากถ้ามีการนำแอมโมเนียไปใช้ได้เร็วก็จะทำให้การตรึงไนโตรเจนเกิดได้สูงขึ้น แต่ถ้ามีการนำแอมโมเนียไปใช้ได้ช้าการตรึงไนโตรเจนก็จะช้าลงด้วยเพราะแอมโมเนียเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งเซลล์จะต้องรีบเปลี่ยนแอมโมเนียให้อยู่ในของสารประกอบไนโตรเจนอื่นและรักษาระดับแอมโมเนียให้ต่ำอยู่เสมอ การตรึงไนโตรเจนถูกควบคุมโดยปริมาณแอมโมเนียโดยที่ถ้ามีปริมาณแอมโมเนียในเซลล์สูงจะมีผลยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน (ยีน *nif*) รวมทั้งโปรตีนอื่นที่เกี่ยวข้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

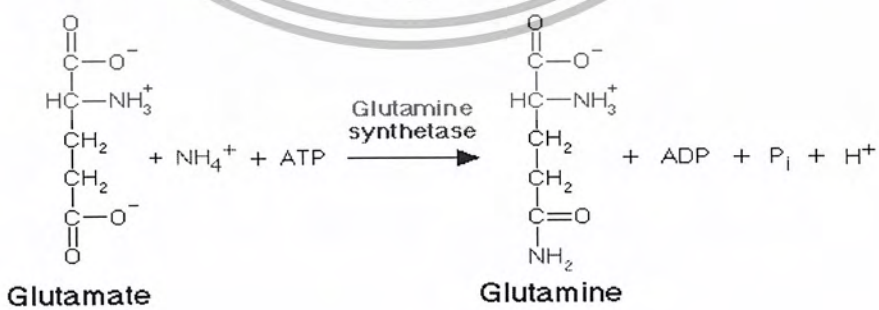
เมื่อมีแอมโมเนียภายในเซลล์มาก แอมโมเนียจะทำปฏิกิริยากับแอลฟาคีโตกลูตาเรต (α– ketoglutarate) ซึ่งเร่งโดยเอนไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส (glutamate dehydrogenase)

$$\alpha\text{– ketoglutarate} + NH_3 + ATP + NADPH + H^+ \longrightarrow \text{glutamate} + ADP + Pi + NADP^+$$



กรณีที่มีแอมโมเนียในเซลล์น้อย แอมโมเนียจะถูกใช้ในการสร้างกลูตามีน (glutamine) ซึ่งเร่งโดยเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส (glutamine synthetase)

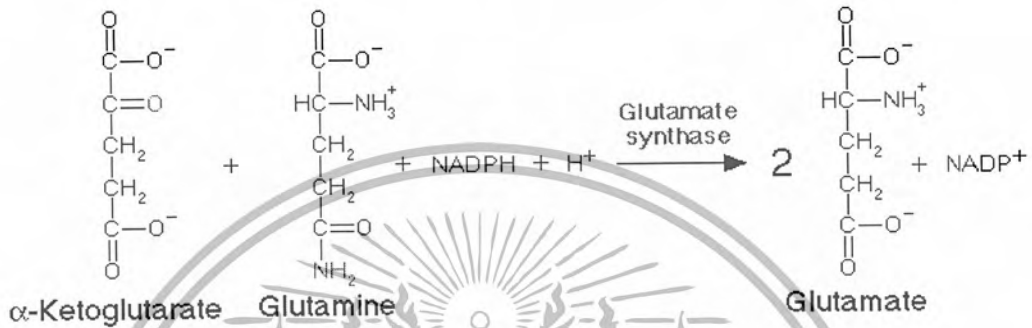
$$\text{glutamate} + NH_3 + ATP \longrightarrow \text{glutamine} + ADP + Pi$$



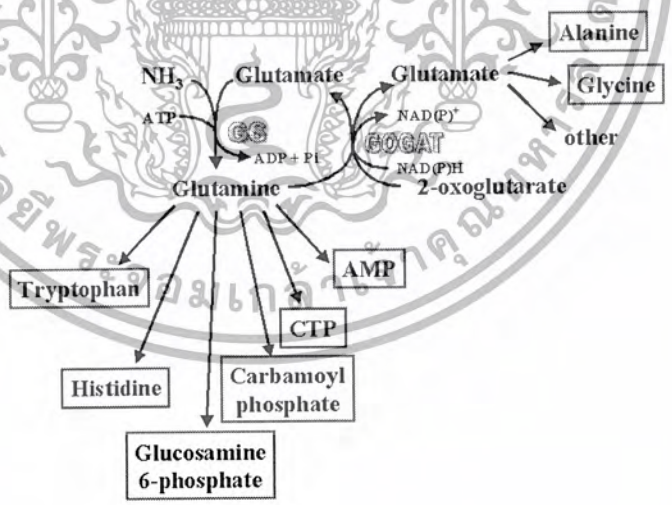
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้นกลูตามีนที่ได้จะทำปฏิกิริยากับแอลฟาคีโตกลูตาเรตเพื่อให้ได้กลูตาเมต (glutamate) ซึ่งปฏิกิริยานี้เร่งโดยเอนไซม์กลูตาเมตซินเทส

$$\text{glutamine} + \alpha\text{– ketoglutarate} + NADPH + H^+ \longrightarrow 2\ \text{glutamate} + NADP^+$$



โดยทั่วไปแล้วภายในเซลล์จะมีปริมาณแอมโมเนียต่ำ ดังนั้นแอมโมเนียที่ได้จากการตรึงไนโตรเจนจึงถูกใช้ในการสร้างกลูตามีน โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส



รูปที่ 2.4 เมตาบอลิซึมของแอมโมเนีย

ที่มา : www.com.univ-mrs.fr/images/nitfix.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 แหนแดง (Azolla) (www.ku.ac.th/AgrInfo/thaifish/aqplant/aqpt013.)

แหนแดงเป็นพืชน้ำขนาดเล็กพวกเฟิร์นชนิดหนึ่งมีชื่อสามัญคือ Azolla, Water ferm และ Water velvet ชื่อวงศ์คือ AZOLLACEAE เจริญเติบโตลอยอยู่ผิวน้ำในที่มีน้ำขังในเขตร้อนและอบอุ่น ต้นแหนแดงประกอบด้วยส่วนต่างๆ คือ ลำต้น (rhizome) ราก (root) และใบ (leaf) ใบมีขนาดเล็กเรียงแบบสลับอยู่ตามกิ่งก้าน มีลักษณะคล้ายเกล็ด ยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ใบอ่อนมีสีเขียว ใบแก่เปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีน้ำตาลเข้ม ใบแหนแดงเกิดตามกิ่งเรียงสลับกันไปแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ใบบน (dorsal leaf) ที่สัมผัสกับอากาศ และใบล่าง (ventral leaf) ที่สัมผัสกับผิวน้ำ ซึ่งทั้งสองส่วนมีขนาดใกล้เคียงกัน ใบล่างค่อนข้างโปร่งมีคลอโรฟิลล์น้อยมาก ใบบนเป็นสีเขียวมีคลอโรฟิลล์เป็นองค์ประกอบ ใบบนมีโพรงใบซึ่งภายในมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอาศัยอยู่ในลักษณะพึ่งพาอาศัย ซึ่งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนี้สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศแล้วเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบในรูปของแอมโมเนียมให้แหนแดงเอาไปใช้ได้ ทำให้แหนแดงมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสูงร้อยละ 3 ถึง 5 แหนแดงขยายพันธุ์ได้ 2 แบบ โดยการแตกหักของใบแยกเป็นต้นใหม่และแบบใช้ สปอร์

รูปที่ 2.5 ภาพแสดงลักษณะของแหนแดง

ที่มา : www.home.aone.net/au/byzantium/ferns/descriptions/azolla/azpinnata.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 *Anabaena azollae*

A. azollae เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดหนึ่งมีลักษณะเป็นเส้นสายและมีเฮทเทอโรซิสต์ ดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับแหนแดงโดยอาศัยอยู่ภายในโพรงใบของใบบน (dorsal leaf) ของแหนแดง *A. azollae* จัดเป็นไซยาโนไบออนท์ที่มีการศึกษาและใช้ประโยชน์จากการตรึงไนโตรเจนมากที่สุดชนิดหนึ่ง ในประเทศจีนโดยเฉพาะทางตะวันออก เฉียงใต้ของจีนและทางตอนเหนือของเวียดนามนิยมปลูกแหนแดงร่วมกับการปลูกข้าวเพื่อใช้แหนแดงเป็นปุ๋ยพืชสดโดย *A. azollae* ในแหนแดงจะตรึงไนโตรเจนทำให้ปุ๋ยที่ได้มีปริมาณของธาตุไนโตรเจนมาก

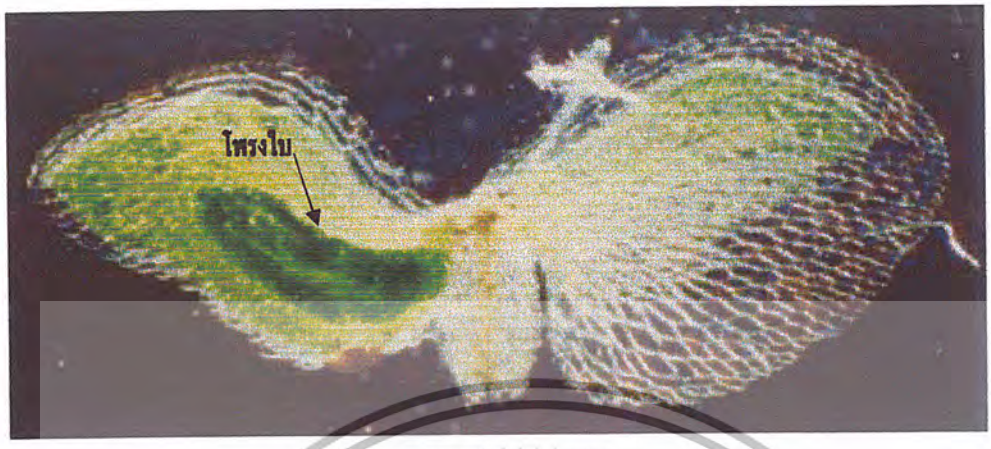
2.5.1 การจัดหมวดหมู่ของสาหร่าย *Anabaena azollae*

Division	Cyanophyta
Class	Cyanophyceae
Order	Nostocalos
Family	Nostocaceae
Genus	*Anabaena*

รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างของ *Anabaena azollae* (400X)

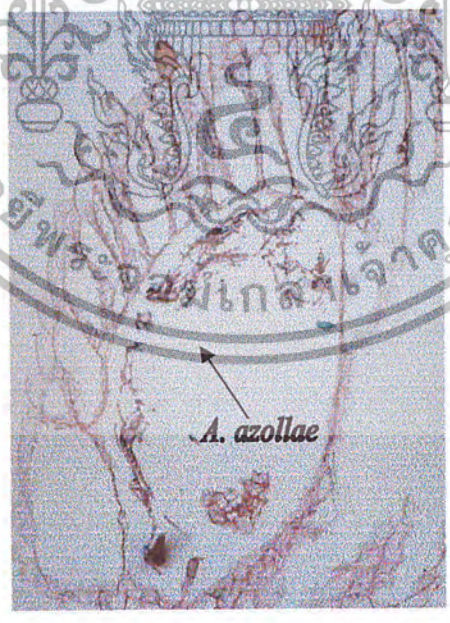
ที่มา : www.botany.wisc.edu/courses/botany_330/AnabaenaAzolla2.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของแหนแดงและโพรงใบของแหนแดง

ที่มา : www.soils.umn.edu/academics/classes/soil3612/Symbiotic_Nitrogen_Fixation/Other.



รูปที่ 2.8 สาหร่าย *A. azollae* ที่เจริญภายในโพรงใบของแหนแดง

ที่มา : www.dipbot.unict.it/sistematica_es/Azolla.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ซิมไบโอติกไซยาโนแบคทีเรีย (Symbiotic cyanobacteria)

ซิมไบโอติกไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีการเจริญร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกับสิ่งมีชีวิตอื่น โดยทั่วไปแล้วมักมีคุณสมบัติบางอย่างที่แตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เจริญแบบอิสระ เช่น มีอัตราการตรึงไนโตรเจนและมีจำนวนเฮทเทอโรซิสต์สูงกว่าพวกที่เจริญอย่างอิสระ (ยกเว้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เจริญในไลเคนจะมีอัตราการตรึงไนโตรเจนและมีจำนวนเฮทเทอโรซิสต์ใกล้เคียงกับพวกที่เจริญอย่างอิสระ) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีความสามารถพิเศษเกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจนคือ ผลิตภัณฑ์จากการตรึงไนโตรเจนซึ่งก็คือ แอมโมเนียจะถูกปลดปล่อยเป็นปริมาณมากให้แก่โฮสต์โดยอยู่ในช่วงร้อยละ 40 (ในไลเคน, *Peltigera canina* ซึ่งมี *Nostoc* ซึ่งเป็นซิมไบออนท์ (symbiont) จะปลดปล่อยกลูโคสด้วย) ถึงร้อยละ 90 (ในลิเวอร์เวิร์ต(liverwort), *Blasia pusilla* *Anthoceros punctatus* และไลเคน *Peltigera aphthosa*) (Rees, 1989)

เหตุผลสำคัญที่ทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีการปลดปล่อยแอมโมเนียเนื่องจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่สูงแต่มีกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสที่ต่ำ ในกรณีของ *Nostoc* ที่เป็นซิมไบโอติกของ *Peltigera aphthosa* และ *Peltigera canina* มีกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสเพียงร้อยละ 3 และ 6 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกรณีที่เจริญอย่างอิสระ ส่วน *A. azollae* ในแหนแดงมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสอยู่ในช่วงร้อยละ 5 ถึง 20 ของพวกที่เจริญอย่างอิสระ (Rees, 1989)

จากการศึกษาของ Freshwater Algal Culture Collection ประเทศจีนซึ่งมีการเก็บรวบรวมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินประมาณ 1000 สายพันธุ์ พบว่าในจำนวนนั้นมี 232 สายพันธุ์ที่เป็นพวกที่มีเฮเทอโรซิสต์โดยที่บางส่วนได้ถูกนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน จากการศึกษาพบว่า *A. azollae* ที่แยกได้จากแหนแดงเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานในอาหารสังเคราะห์ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนมีกิจกรรมของอะเซทิลีนรีดักชันสูงที่สุด (มีการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด) (Dixon และ Wheeler 1986)

การอยู่ร่วมกันของ *A. azollae* กับแหนแดงสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในอัตราที่สูงกว่าการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียไรโซเบียม (*Rhizobium* sp.) กับพืชตระกูลถั่ว (Kerby และคณะ 1989)

A. azollae ที่อาศัยร่วมกับแหนแดงจะมีระดับกลูตามีนซินเทเทสแอนติเจน (glutamine synthetase antigen) เพียงร้อยละ 5 เมื่อเทียบกับ *A. azollae* ที่เจริญอย่างอิสระทั้งนี้เพราะแหนแดงสามารถยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสของ *A. azollae* ได้ (Orr และ Haselkorn 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 การผลิตแอมโมเนียโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในรูปเซลล์ตรึง

ในธรรมชาติจุลินทรีย์หลายชนิดเจริญเติบโตในสภาวะที่ถูกตรึงโดยธรรมชาติ เช่น เจริญในลักษณะเป็นฟิล์มบางๆบนพื้นผิววัสดุ หรือ เจริญภายในเจลหรือเมือกที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมาเอง สำหรับ *A. azollae* ในธรรมชาติเจริญอยู่ภายในโพรงใบบนของแหนแดงในรูปของเซลล์ที่ถูกตรึงภายในพื้นที่ที่จำกัดนอกจากนี้ *A. azollae* ยังสร้างเมือกมาห่อหุ้มกลุ่มเซลล์เข้าไว้ด้วยกันด้วย

เมื่อเปรียบเทียบการใช้เซลล์แขวนลอยอิสระกับการใช้เซลล์ตรึงในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch culture) และแบบต่อเนื่อง (continuous culture) จากการศึกษาของ Kumar และ Kannaiyan (2002) พบว่าการใช้เซลล์ตรึงมีข้อดีกว่า ดังนี้

1. เร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาเนื่องจากมีความหนาแน่นของเซลล์สูง
2. เพิ่มเมตาบอลิซึมของเซลล์และเพิ่มความสามารถในการเลือกผ่าน (permeability) ของผนังเซลล์
3. ไม่ทำให้เกิดการชะเซลล์ออกไปในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง
4. มีความคงตัวในการใช้งาน และสามารถควบคุมกระบวนการได้ง่าย
5. ลดค่าใช้จ่ายในการแยกเซลล์ออกจากผลผลิตในสารละลาย

เม็ดโฟมโพลียูรีเทน (polyurethane) (รูปที่ 2.9) และ โพลีไวนิล (polyvinyl) เป็นวัสดุตรึงที่ใช้ตรึงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้ดี มีการนำมาใช้ตรึงสาหร่ายที่ตรึงไนโตรเจนได้โดยเริ่มต้นเซลล์จะเจริญเป็นโคโลนีที่ผิวของเม็ดโฟมหลังจากนั้นจึงแทงเส้นใยลงไปในรูพรุนของเม็ดโฟม การตรึงเซลล์สาหร่ายสามารถใช้วัสดุทางการเกษตรในการตรึงเซลล์ได้หลายชนิด เช่น ใยฝ้าย ฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ในขณะที่วัสดุตรึงที่ทำให้มีการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินดีคือ โฟมโพลียูรีเทน (Mahesh และ Kannaiyan 1993 อ้างถึงใน Kumar และ Kannaiyan 2002) เพราะว่าสภาพของรูโฟมโพลียูรีเทนมีความคล้ายคลึงกับสภาพของโพรงใบของแหนแดงในธรรมชาติ การตรึงเซลล์มีผลในการกระตุ้นปริมาณคลอโรฟิลล์เอ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิโปรตีน นอกจากนี้ยังเพิ่มกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนและเพิ่มสัดส่วนของเฮทเทอโรซิสต์ *A. azollae* เมื่อถูกตรึงภายในเม็ดโฟมจะมีจำนวนเฮทเทอโรซิสต์เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 14 ถึง 17 เมื่อเทียบกับการเจริญอย่างอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kumar และ Kannaiyan (2002) ศึกษาพบว่า การตรึงเซลล์ *A. azollae*-AS-DS (รูปที่ 2.10) และ *A. variabilis*-Sao ในฟางข้าวทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียเพิ่มมากขึ้นเป็น 1685 และ 1540 นาโนโมล/มิลลิลิตรตามลำดับ ภายใน 16 วันหลังการเติมเชื้อเริ่มต้นเซลล์ตรึงในนาข้าวในอัตรา 2 กิโลกรัม/เฮกเตอร์

รูปที่ 2.9 เซลล์ตรึงเม็ดโฟมโพลียูรีเทนของ *A. azollae*
ที่มา : Kumar และ Kannaiyan (2002)

รูปที่ 2.10 เซลล์ตรึงในฟางข้าวของ *A. azollae*
ที่มา : Kumar และ Kannaiyan (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตแอมโมเนียแบบต่อเนื่องโดยอาศัยการผลิตโดยใช้แสงของ *Anabaena* ATCC 27893 ที่ตรึงในเม็ดอัลจิเนต โดยใช้ถังหมักแบบต่อเนื่องชนิดต่างๆ เช่น packed beds , fluidized beds , parallel plates และถังหมักแบบให้อากาศ (air lift reactor) พบว่าถังหมักแบบให้อากาศมีความเหมาะสมที่สุดในการผลิตแอมโมเนียในระดับห้องปฏิบัติการ เนื่องจากมีความเป็นเนื้อเดียวกัน แรงเฉือนต่ำ และมีประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนก๊าซ การใช้เมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน (methionine sulfoximine) อาจใช้แบบต่อเนื่องหรือเป็นช่วง ซึ่งจะให้อัตราการผลิตแอมโมเนียอยู่ในช่วง 4 ถึง 40 ไมโครโมลแอมโมเนีย/มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์/ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ โดยสามารถผลิตได้เป็นเวลานานกว่า 800 ชั่วโมง อัตราการผลิตที่ได้นี้สูงกว่าการผลิตแอมโมเนียโดย *Anabaena* ATCC 33047 ในรูปเซลล์อิสระ และ *A. azollae* ในรูปเซลล์อิสระและสูงกว่าการผลิตแอมโมเนียจากไนเตรตโดย *Anacystis nidulans* ในรูปเซลล์อิสระ (Kerby และคณะ 1989)

2.8 วัสดุตรึงเซลล์ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย

2.8.1 โซเดียมอัลจิเนต

โซเดียมอัลจิเนตเป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชั่นจำนวนมากที่สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชั่นต่างๆบนผนังเซลล์ได้ ซึ่งส่วนมากได้แก่ หมู่อะมิโนคาร์บอกซิลและไฮดรอกซิล อัลจิเนตเป็นวัสดุตรึงเซลล์ที่ดักจับเซลล์ได้ง่ายและสะดวกจึงเป็นที่นิยมใช้กันมาก เมื่อพิจารณาจากจำนวนงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ จะเห็นได้ว่าอัลจิเนตเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่นิยมใช้กันมากที่สุด จากโครงสร้างจะเห็นว่าอัลจิเนตประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลในแต่ละหน่วยย่อย ซึ่งจะไปจับยึดกับไอออนของโลหะบางชนิด เช่นแคลเซียมไอออน แบเรียมไอออน คอปเปอร์ไอออนและอะลูมิเนียมไอออน เป็นต้น ทำให้ได้เซลล์ที่มีความเสถียรและสามารถตรึงเซลล์โดยวิธีดักจับ (entrapment) ได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง เป็นผลทำให้เซลล์ส่วนมากยังคงมีชีวิตรอด ลักษณะรูปร่างของเม็ดเจลที่ได้จะเป็นเม็ดกลม โดยเม็ดเจลจะแข็งตัวได้เนื่องจากแคลเซียมไอออนไปแทนที่โซเดียมไอออนของโซเดียมอัลจิเนต ความแข็งของเม็ดเจลจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของเจล นอกจากนี้อัตราส่วนของกรดแมนนิวโรนิก (mannuronic acid) และกรดกลูลูโรนิก (glululuronic acid) จะมีผลต่อความเสถียรของเจลด้วย โดยถ้ามีกรดกลูลูโรนิกมากก็จะทำให้ได้เจลที่มีความเสถียรสูง (Yagishita และคณะ 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

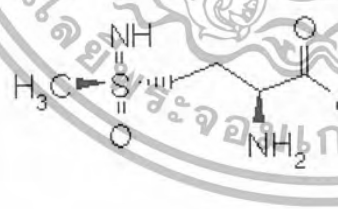
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.8.2 ไคโตซาน

ไคโตซานเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากเปลือกกุ้งและปูเป็นอนุพันธุ์ของไคติน ซึ่งไคตินเป็นสารกลุ่ม 2-อะซีทามิโด-2-ดีออกซี-บีตา-ดี-กลูโคไพราโนส (2-acetomido-2-deoxy-β-D-glucopynose) ต่อกันด้วยพันธะบีตา-(1-4) ส่วนไคโตซานได้มาจากการนำไคตินมาผ่านปฏิกิริยาดีอะซีเลชัน (deacylation) ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นจึงไม่มีหมู่อะซิทิล ไคโตซานเป็นสารกลุ่ม 2-อะมิโน-2-ดีออกซี-บีตา-ดี-กลูโคไพราโนส (2-amino-2-deoxy-β-D-glucopynose) ซึ่งละลายน้ำและสามารถทำให้เป็นเจลได้โดยใช้มัลติวาเลนต์แอนไอออนิกเคาน์เตอเรียน (multivalent anionic counterion) เช่น เฟอโรไซยาเนตหรือไพโรฟอสเฟต (pyrophosphate) (รินดาและคณะ 2541)

2.9 การใช้เมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนในการผลิตแอมโมเนีย

เมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน (methionine sulfoximine,MSX) เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายกรดอะมิโนกลูตาเมต (glutamate analogue) เป็นสารชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส นิยมใช้มากในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสเพื่อยับยั้งการนำแอมโมเนียที่ได้จากการตรึงไนโตรเจนของเซลล์ไปใช้ เมื่อเซลล์ไม่สามารถนำแอมโมเนียไปใช้ได้ก็จะปลดปล่อยออกสู่ภายนอกทำให้เพิ่มการผลิตแอมโมเนียได้ นอกจากนี้เมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนยังช่วยป้องกันการยับยั้งการตรึงไนโตรเจนโดยแอมโมเนียได้อีกด้วย



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

การผลิตแอมโมเนียโดย *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงใน hollow fibre photobioreactor (Wang และคณะ 1991) กรณีที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทำให้ของเหลวที่ได้มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย 600 ถึง 700 ไมโครโมลาร์ แต่ถ้าไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนความเข้มข้นของแอมโมเนียเหลือเพียง 120 ถึง 350 ไมโครโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
62084

Orr และ Haselkorn (1982) พบว่าการเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทำให้ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ไม่เพิ่มขึ้น แต่มีโปรตีนเพียงชนิดเดียวที่เพิ่มขึ้นคือ เอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยที่กรดอะมิโนสำหรับสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนสได้มาจากการย่อยสลายไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliprotein) และโปรตีนอื่น จากการศึกษาสรุปได้ว่าเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนสและการเกิดเฮทเทอโรซิสต์โดยที่ไม่เกิดการยับยั้งโดยแอมโมเนีย

Ramos และคณะ (1984) ศึกษาการผลิตแอมโมเนียใน *Anabaena* sp. สายพันธุ์ ATCC พบว่าการเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน 3.5 ถึง 4.0 นาโนโมล/ไมโครกรัมของคลอโรฟิลล์ จะลดการทำงานของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสอย่างรวดเร็วและยับยั้งการเจริญของเซลล์ แต่กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ภายหลังการเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนไปแล้ว 4 ชั่วโมงและจะเพิ่มสู่ระดับสูงสุดซึ่งประมาณ 2 เท่าของระดับเริ่มต้น การผลิตแอมโมเนียจะเพิ่มขึ้นตามกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่เพิ่มขึ้น โดยที่แอมโมเนียส่วนใหญ่ร้อยละ 90 จะถูกปลดปล่อยออกสู่อาหาร ซึ่งมีปริมาณสูง 25 ถึง 30 ไมโครโมลาร์/มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์/ชั่วโมง หลังจากการเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนไปแล้ว 20 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสจะเริ่มฟื้นตัว ทำให้แอมโมเนียในอาหารลดลงเนื่องจากเซลล์นำแอมโมเนียไปใช้ในการเจริญเติบโต รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสก็ลดลงด้วย ภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกันแต่ไม่มี *A. azollae* เมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนยังคงทำงานได้อย่างน้อย 48 ชั่วโมง ดังนั้นผลการยับยั้งของเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนที่หยุดลงอาจเกิดจากเซลล์ *A. azollae* เปลี่ยนรูปเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนไปมากกว่าการสลายตัวของเมทไธโอนีน-ซัลฟอกซิมีน ดังนั้นการเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุกๆ 20 ชั่วโมง จะช่วยรักษาอัตราการผลิตแอมโมเนียสูงสุดได้ประมาณ 48 ชั่วโมง แต่หลังจากนั้นอัตราการผลิตแอมโมเนียจะลดลงอย่างต่อเนื่องทั้งๆที่เอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสยังไม่ทำงาน สำหรับสาเหตุน่าจะเกิดจากการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสลายตัวของเซลล์ (autolysis) ในเวลาต่อมาไม่นานด้วย

จากการศึกษาของ Ramos และคณะ (1984) พบว่าการเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทำให้เซลล์ขาดแคลนธาตุไนโตรเจนโดยเฉพาะกลูตามีนและอนุพันธ์ของกลูตามีนทำให้มีการทดลองเพื่อยืดระยะเวลาการผลิตแอมโมเนียและลดการขาดแคลนธาตุไนโตรเจนโดยการดำเนินการ 2 กรณี คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรณีที่ 1 เติมกลูตามีน 0.2 มิลลิโมลาร์ ในชั่วโมงที่ 40 และเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนตามปกติ (ทุกๆ 20 ชั่วโมง) ผลทำให้การผลิตแอมโมเนียดำเนินต่อไปในอัตราคงที่อย่างน้อย 32 ชั่วโมง

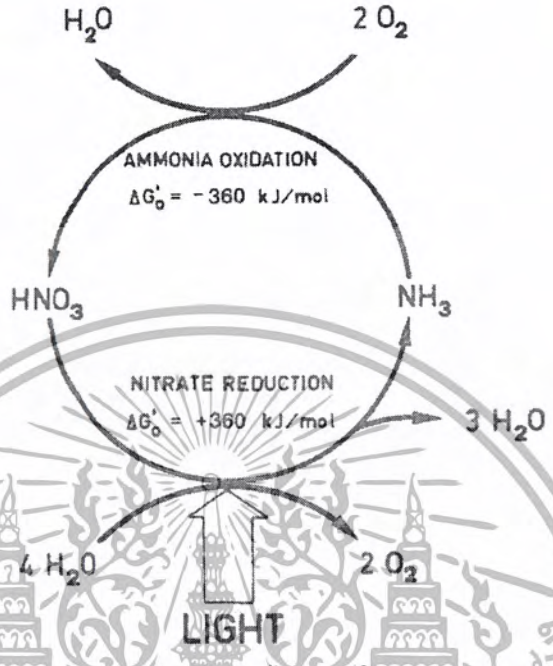
กรณีที่ 2 เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน เป็นเวลา 40 ชั่วโมง แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์มาเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยเพาะเลี้ยงสลับกันเช่นนี้ ผลทำให้การผลิตแอมโมเนียเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 7 วัน แต่ภายหลังจาก 7 วัน เซลล์เกิดความต้านทานต่อเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน เนื่องจากการปรับตัวของเซลล์ ทำให้ต้องเพิ่มความเข้มข้นของเมทไธโอนีน-ซัลฟอกซิมีนเป็น 100 ถึง 150 ไมโครโมลาร์ เพื่อที่จะยับยั้งเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสได้อย่างสมบูรณ์

นอกจากนี้เมื่อทำการทดลองสลับการเติมระหว่างเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนและฟอสฟิโนธิซิน (phosphinothricin) ทำให้สามารถผลิตแอมโมเนียได้อย่างต่อเนื่องได้นานกว่า 2 สัปดาห์

Jha และคณะ (1999) พบว่า *Anabaena variabilis* เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน 0.1 มิลลิโมลาร์ก่อนเป็นเวลา 2 ถึง 3 ชั่วโมงจะลดผลการยับยั้งเอนไซม์ไนโตรจีเนสโดยแอมโมเนียได้ แต่ถ้าเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนพร้อมกับแอมโมเนียเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนจะไม่สามารถป้องกันการยับยั้งเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้

Ramos และคณะ (1982) ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตแอมโมเนียโดยสาหร่าย *Anacystis nidulans* ในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน โดยใช้ไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน (รูปที่ 2.12) พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนกับความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 1 ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 40 องศาเซลเซียส และพีเอชที่เหมาะสมคือ 7 ถึง 10 สามารถกระตุ้นการผลิตแอมโมเนียได้โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์หรือไบคาร์บอเนต แต่จะไม่มีผลเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียเพิ่มถึง 30 มิลลิโมลาร์ อัตราการผลิตแอมโมเนียมีผลจากสหสัมพันธ์อย่างน้อย 4 ปัจจัย คือ ความเข้มของแสง ความหนาแน่น ความลึก และอัตราการกวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

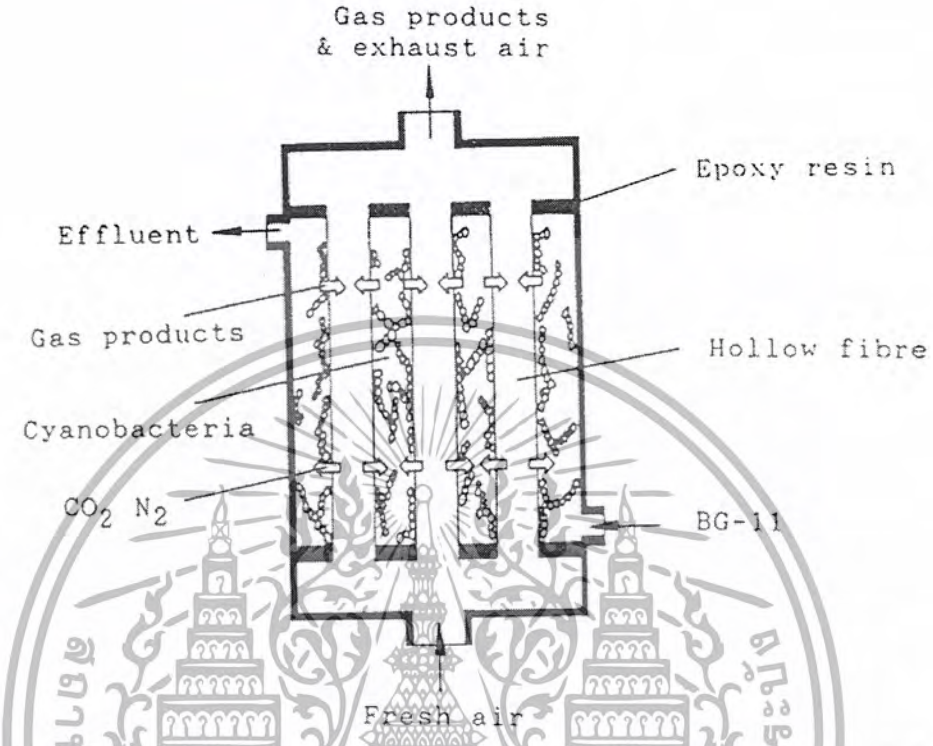


รูปที่ 2.12 กระบวนการผลิตแอมโมเนียจากไนเตรตโดย *Anacystis nidulans*

ที่มา : Ramos และคณะ (1982)

Wang และคณะ (1991) ศึกษาการผลิตแอมโมเนียแบบต่อเนื่องโดย *A. azollae* ในถังหมักชนิดเส้นใยกลวง (hollow fibre bioreactor) โดยที่เซลล์อยู่ในรูปเซลล์ตรึงภายในรูพรุนของเส้นใยกลวง (รูปที่ 2.13) ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน ซึ่งได้สารละลายแอมโมเนียความเข้มข้น 600-700 ไมโครโมลาร์ และ 120-350 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ถังหมักชนิดเส้นใยกลวงเหมาะสมต่อการเจริญของ *A. azollae* ทั้งในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง เนื่องจากมีระยะทางการแพร่ของอาหารและสารเมตาบอไลต์สั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.13 การผลิตแอมโมเนียแบบต่อเนื่องโดย *A. azollae* ในถังหมักชนิดเส้นใยกลวง (hollow fibre bioreactor)

ที่มา : Wang และคณะ (1991)

2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตแอมโมเนียโดยการตรึงไนโตรเจน

2.10.1 ผลของแอมโมเนียมไอออน

แอมโมเนียจากภายนอกมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอย่างรวดเร็ว ถึงแม้ว่าผลการยับยั้งจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแต่ก็ไม่ต่างกันมากนัก จากการศึกษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนได้จำนวน 10 สปีชีส์ให้ผลไม่แตกต่างกัน คือ การเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 1 มิลลิโมลาร์ลงในอาหารทำให้ทั้ง 10 สปีชีส์สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะทำการคัดแยกสายพันธุ์ที่ทนแอมโมเนียจากธรรมชาติ จากการศึกษาผลของพีเอชต่อการการยับยั้งเอนไซม์ไนโตรจีเนสโดยแอมโมเนียพบว่า ในสภาวะด่างหลังการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะสูญเสียไปร้อยละ 87 แต่ที่สภาวะที่เป็นกลางมีการสูญเสียเพียงร้อยละ 40 ซึ่งทั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาจเป็นเพราะที่สภาวะด่างแอมโมเนียสามารถเข้าสู่เซลล์ได้รวดเร็วกว่าที่สภาวะเป็นกลาง แอมโมเนียมไอออนไม่เพียงแต่ยับยั้งการแสดงออกของยีนควบคุมการตรึงไนโตรเจน (การสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนส) แต่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสด้วย ซึ่งก็คือแอมโมเนียมไอออนยับยั้งทั้งในระดับยีนและระดับสรีระ (Dixon และ Wheeler 1986)

Bottomley และคณะ (1979) ศึกษาพบว่า การเพาะเลี้ยง *Anabaena* sp. เอนไซม์ไนโตร-จีเนสจะถูกยับยั้งบางส่วน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ระดับของแอมโมเนียภายนอกที่สูงมีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่ทำให้มีการแสดงออกของกิจกรรม ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเพียงบางส่วน การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะยับยั้งการ ดูดกลืนแอมโมเนีย

Orr และ Haselkorn (1982) ศึกษาพบว่าใน *Anabaena* sp. 7120 การเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทสโดยการย้าย *Anabaena* sp. 7120 ลงในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสจะหยุดลงทันทีที่มีการเติมแอมโมเนีย

2.10.2 ผลของสภาวะที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนในอาหาร

Orr และ Haselkorn (1982) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสใน *Anabaena* sp. 7120 พบว่า *Anabaena* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าภายใน 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ใช้สำหรับเปลี่ยนเซลล์ปกติไปเป็นเฮทเทอโรซิสต์และเริ่มการตรึงไนโตรเจน

เฮทเทอโรซิสต์ของ *Anabaena* HA101 ถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มขึ้นได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากแอมโมเนียมไนเตรต การสร้างเฮทเทอโรซิสต์จะถูกยับยั้งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรต 5 มิลลิโมลาร์รวมทั้งเฮทเทอโรซิสต์ที่มีอยู่ก่อนแล้วก็จะสลายไปด้วย (Huang และ Shyu 1987)

2.10.3 ผลของออกซิเจน

Dixon และ Wheeler (1986) ศึกษาผลของความดันย่อย (partial pressure) ของก๊าซออกซิเจน (pO_2) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสใน *Anabaena cylindrical* ในสภาวะที่มีและไม่มีก๊าซไนโตรเจนพบว่า ในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจนมากเกินพอในสิ่งแวดล้อมจะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส แต่ในสภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจนกิจกรรมของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรจีเนสก็ถูกยับยั้งเช่นกัน อย่างไรก็ตามสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (ความดันย่อยก๊าซออกซิเจน 0.001 ถึง 0.1 บรรยากาศ) กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกกระตุ้นและอาจเพิ่มถึงระดับสูงสุด ในเซลล์ที่เจริญในสภาวะที่มีก๊าซไนโตรเจนกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสถูกยับยั้งร้อยละ 50 โดยความดันย่อยก๊าซออกซิเจน 0.5 บรรยากาศ แต่ในเซลล์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีก๊าซไนโตรเจน กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสถูกยับยั้งร้อยละ 50 โดยความดันย่อยก๊าซออกซิเจน 0.35 บรรยากาศ

เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของ เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) ซุปเปอร์ไฮโดรออกซิเดส (superhydroxidase) และซุปเปอร์ออกซิเดส (superoxidase) ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนได้ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสสูงที่สุดใน *Anabaena* 7120 และ *Gloeocapsa* ดังนั้นในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส อาจเป็นเอนไซม์สำคัญในการปกป้องเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากออกซิเจน (Dixon และ Wheeler 1986)

2.10.4 ผลของแสง

กระบวนการตรึงไนโตรเจนส่วนใหญ่เกิดในช่วงที่มีแสงและจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงที่ไม่มีแสง แต่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนการตรึงไนโตรเจนลดลงช้ากว่า จากการเปรียบเทียบผลของออกซิเจนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในสภาวะที่มีและไม่มีแสงพบว่า ในสภาวะที่ไม่มีแสงการยับยั้งเอนไซม์ไนโตรจีเนสเกิดได้รวดเร็วกว่าในสภาวะที่มีแสง ซึ่งอัตราการยับยั้งแปรผันตามปริมาณออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสและเอนไซม์ซุปเปอร์ออกซิเดส ของ *Anabaena* สามารถเหนี่ยวนำได้ด้วยความเข้มแสง ซึ่งแสดง ให้เห็นว่ากลไกการปกป้องเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากออกซิเจนเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของแสง (Dixon และ Wheeler 1986)

Jha และคณะ (1999) ศึกษาพบว่า *Anabaena variabilis* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 10 วัตต์/ตารางเมตรที่พีเอชเป็นกลาง แอมโมเนียมไอออนจะไม่มีผลยับยั้งการตรึงไนโตรเจน (วัดจากวิธีอะเซทิลีนรีดักชั่น) แต่ที่ความเข้มของแสงต่ำ (1.3 วัตต์/ตารางเมตร) แอมโมเนียมไอออนจะยับยั้งการตรึงไนโตรเจนอย่างสมบูรณ์ ที่พีเอช 8 การตรึงไนโตรเจนลดลง 2 เท่าหลังการเติมแอมโมเนียมไอออน 1 มิลลิโมลาร์ และผลการยับยั้งการตรึงไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อพีเอชเป็น 9 และ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสขณะไม่มีแสงจะถูกยับยั้งโดยแอมโมเนียมไอออนในช่วงพีเอชค่อนข้างกว้าง (พีเอช 6 ถึง 10) แต่ผลการยับยั้งจะลดลงทันทีหลังจากได้รับแสงไฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vyas และ Kumar (1995) พบว่าชนิดของแหล่งกำเนิดแสงและชนิดของแสงมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยที่ *Anabaena variabilis* , *Nostoc* sp. และ *Westiellopsis prolifica* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงที่สุด เมื่อใช้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ แต่ใน *Nostoc spongiaeforme* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงที่สุดเมื่อใช้แสงจากหลอดไฟกลม (incandescent light) *N. spongiaeforme* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงที่สุดเมื่อให้แสงสีน้ำเงิน (blue light) ในขณะที่ *A. variabilis* , *Nostoc* sp. และ *W. prolifica* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงที่สุดเมื่อให้แสงสีแดง (red light)

2.10.5 ผลของกรดอะมิโน

Dixon และ Wheeler (1986) พบว่าจากการทดสอบกรดอะมิโน 6 ชนิด กรดกลูตามิก กรดแอสพาติก อาร์จินีนและเซอรีนมีผลเพียงเล็กน้อยต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส แต่กลูตามีนและแอสพาราจีนมีผลการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอย่างเห็นได้ชัด กลูตามีนมีผลการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูง แต่กลูตามีนแม้ว่าจะมีความเข้มข้นสูงก็ไม่มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส

2.10.6 ผลของพีเอช

ในอาหารที่พีเอชเป็นกลางการเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน 5 ไมโครโมลาร์ ทำให้กิจกรรมของเอ็นไซม์กลูตามีนซินเทเทส สูญเสียไปจนหมดภายใน 30 นาที แต่ที่สภาวะเป็นด่าง เช่น ที่พีเอช 9 มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสเพียงร้อยละ 60 (Dixon และ Wheeler 1986)

2.10.7 ผลของสารบางชนิด

Rozen และ Telor (1986) ศึกษาผลของน้ำตาลชนิดต่างๆในอาหารต่อการเพาะเลี้ยง *A. azollae* พบว่า น้ำตาลฟรุกโตสสามารถส่งเสริมกิจกรรมของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและอะเซทิลีนรีดักชั่นได้แม้ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสต่ำเพียง 0.5 ถึง 1.0 โมลาร์ น้ำตาลซูโครสให้ผลเช่นเดียวกันแต่ต้องใช้ที่ความเข้มข้นสูง (10 ถึง 20 โมลาร์) ในขณะที่น้ำตาลกลูโคสให้ผลเพียงเล็กน้อย และพบว่าระดับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่ำกว่าระดับของอะเซทิลีนรีดักชั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jha และคณะ (1999) ได้ศึกษาผลของยูเรียและไนเตรตต่อการยับยั้งการตรึงไนโตรเจนใน *Anabaena variabilis* ทั้งในกรณีที่มีแสงและไม่มีแสงพบว่า ยูเรียและไนเตรตไม่มีผลยับยั้งการตรึงไนโตรเจน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีการดูดซึมยูเรียและไนเตรตต่ำและเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นของยูเรียและไนเตรตไปเป็นแอมโมเนียในอัตราที่ต่ำ

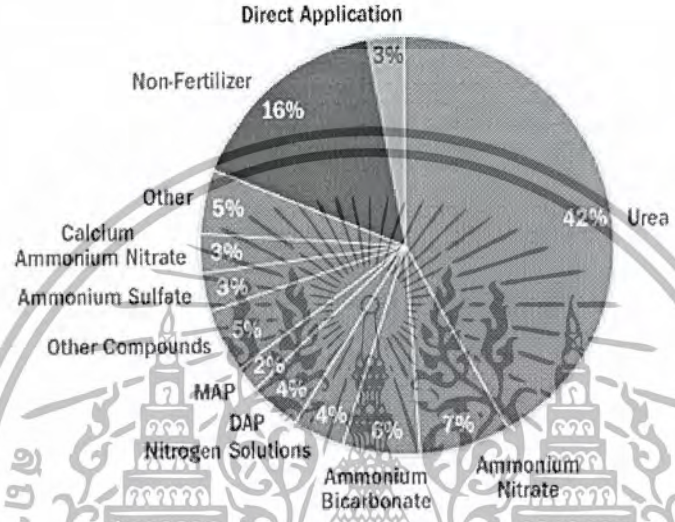
การใช้สารฆ่าเชื้อราบาวิสทิน (bavistin) และวิตทาแวกซ์ (vitavax) กับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในรูปเซลล์ตรึงทำให้มีการผลิตแอมโมเนียในอัตราที่สูงขึ้นเนื่องจากสารฆ่าเชื้อราเหล่านี้ช่วยกระตุ้นเอนไซม์ไนโตรจีเนสและยับยั้งเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส (Kannaiyan และคณะ 1997) นอกจากนี้สารกำจัดศัตรูพืช 3 ชนิด (2,4-D basalin และ aldrin) ยับยั้งการเหนี่ยวนำของเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนต่อการผลิตแอมโมเนียของ *Nostoc linkia* แต่ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 100 ถึง 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะกระตุ้นการผลิตแอมโมเนีย (Mishra และคณะ 1989)

2.11 การใช้ประโยชน์จากแอมโมเนีย (ชมพูนุช ,2542)

1. ใช้เป็นปุ๋ย ประมาณสามในสี่ส่วนของแอมโมเนียที่ผลิตได้ จะใช้เพื่อทำปุ๋ย เนื่องจากเป็นสารที่ละลายน้ำจึงสามารถเติมลงในน้ำเพื่อใช้ฉีดพ่นให้แก่พืช หรือฉีดเป็นก๊าซลงในดิน
2. เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิต ยูเรีย ซึ่งจะใช้เป็นปุ๋ย ใช้ในโรงงานผลิตเรซิน เครื่องสำอางบางชนิดและยา
3. ใช้ในระบบทำความเย็น เนื่องจากก๊าซแอมโมเนียมีจุดเดือดต่ำ (- 33°C) ในขณะระเหยจึงสามารถดูดความร้อนไว้ได้มาก ไม่กัดกร่อน และง่ายต่อการเก็บรักษา ซึ่งเหมาะต่อการนำมาใช้ในระบบทำความเย็น
4. ใช้ชุบไม้เพื่อให้ไม่มีความยืดหยุ่นทำให้ง่ายต่อการแกะสลัก และเมื่อแอมโมเนียระเหยออกไปไม้ก็จะกลับมาแข็งเหมือนเดิม
5. เปลี่ยนแอมโมเนียที่ผลิตได้ให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต ซึ่งสามารถนำมาใช้ในวัตถุระเบิด เช่น ทีเอ็นที และ ดินระเบิด
6. ใช้เป็นยาดมในรูปของแอมโมเนียมคาร์บอเนต
7. เมื่อละลายน้ำจะเกิดเป็น แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งมีการใช้ทั่วไปในรูปผลิตภัณฑ์ที่ใช้ฆ่าเชื้อโรคและทำความสะอาดตามบ้านเรือน
8. ในรูปของแอมโมเนียมคลอไรด์ใช้เป็นน้ำยาทำความสะอาดโลหะก่อนจะนำไปทาสีชุบด้วยไฟฟ้า หรือบัดกรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอมโมเนียสามารถใช้เป็นปุ๋ยได้โดยตรงหรืออาจใช้ในการผลิตปุ๋ยชนิดอื่น และใช้ในการผลิตสารทางอุตสาหกรรมอื่นๆอีกมาก ทั่วโลกมีการใช้แอมโมเนียร้อยละ 81 ในการผลิตเป็นปุ๋ย ร้อยละ 16 ใช้ในประโยชน์ด้านอื่น และ มีเพียงร้อยละ 3 ที่ใช้ในรูปของแอมโมเนียโดยตรง (รูปที่ 2.14)



รูปที่ 2.14 แผนภูมิแสดงการใช้ประโยชน์จากแอมโมเนียในด้านต่างๆ

ที่มา : www.potashcorp.com/ammonia/usefulness.

2.12 การวัดปริมาณแอมโมเนียโดยวิธี Nesslerization (Morrison, 1971)

เนสเลอร์ไรเซชั่น (nesslerization) เป็นวิธีการวัดแอมโมเนียวิธีแรกโดยใช้เทคนิคการวัดสี ซึ่งนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง วิธีนี้ใช้สารผสมอัลคาไลด์ระหว่างโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) และเมอร์คิวรีคลอไรด์ (HgCl) เติมลงในตัวอย่างแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว

ความแม่นยำของการเกิดสีอาจน้อยลงเนื่องจากสารอาจทำปฏิกิริยากับไอออนของสารอนินทรีย์ในสารละลาย ซึ่งทำให้ผลที่ได้คลาดเคลื่อนจึงต้องทำการบ่มตัวอย่างที่จะทดสอบการบ่มก่อน การบ่มตัวอย่างทำได้โดยการเติมซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) และสารละลายเบส ลงไปเพื่อทำให้แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) และซัลไฟด์ตกตะกอน ซึ่งไอออนเหล่านี้จะทำให้เกิดการขุ่นเมื่อทำปฏิกิริยากับเนสเลอร์รีเอเจนท์ (nessler reagent) เนื่องจากตะกอนที่เกิดขึ้นทำให้สารแขวนลอยและสารสีลดลง การเติมอีดีทีเอ (EDTA) หรือสารละลายเกลือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรเชลล์ (rochelle salt solution) จะช่วยยับยั้งการเกิดตะกอนของแคลเซียมไอออน แมกนีเซียมไอออนที่เหลือซึ่งอยู่ในรูปอัลคาไลน์เนสเลอร์รีเอเจนท์ (alkaline nessler reagent) อย่างไรก็ตาม การใช้อีดีทีเอจะต้องใช้เนสเลอร์รีเอเจนท์ในปริมาณมากเพื่อให้แน่ใจว่ามีเนสเลอร์รีเอเจนท์เหลืออยู่เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ในตัวอย่าง

ปฏิกิริยาระหว่างเนสเลอร์รีเอเจนท์กับแอมโมเนียทำให้สีน้ำตาลที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นในช่วงกว้าง เกิดสีเหลืองเมื่อมีความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำ (0.4-0.5 มิลลิกรัม/ลิตร) สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 ถึง 450 นาโนเมตร เมื่อมีช่วงกว้างรับแสง 1 เซนติเมตร สีแดงน้ำตาลเมื่อค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมีค่าประมาณ 19 มิลลิกรัม/ลิตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 ถึง 500 นาโนเมตร

ในการเตรียมรีเอเจนท์ที่ใช้ในการทดสอบการเกิดสีต้องใช้น้ำที่ปราศจากแอมโมเนีย การเกิดสีจะเกิดขึ้นเมื่อเติมรีเอเจนท์ลงในสารละลายที่ผ่านการตกตะกอนไอออนที่ไม่ต้องการออกแล้วและทิ้งไว้ประมาณ 15 นาทีจะเกิดสี จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 ถึง 425 นาโนเมตร ทำการเตรียมกราฟมาตรฐานเพื่อใช้หาค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียในสารละลายตัวอย่างทำได้โดย นำสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆมาวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับรีเอเจนท์โดยใช้น้ำที่ปราศจากแอมโมเนียเป็นแบลงค์ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่อ่านได้สามารถนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Anabaena azollae ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์จากแหนแดงในแหล่งธรรมชาติ

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 อาหารเลี้ยงสาหร่าย BG-11

3.2.2 อะซิโตน (acetone)

3.2.3 โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate)

3.2.2 แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride)

3.2.3 เนสเลอร์ รีเอเจนท์ (nessler reagent)

3.2.4 ซิงค์ซัลเฟต (zinc sulfate)

3.2.5 อีดีทีเอ (EDTA)

3.2.6 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)

3.2.7 กรดอะซิติก (acetic acid)

3.2.8 โซเดียมซิเตรต (sodium citrate)

3.2.9 แอมโมเนียมคลอไรด์ (ammonium chloride)

3.2.10 โซเดียมไพโรฟอสเฟต (sodium pyrophosphate)

3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงงาน

3.3.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ฟลากส์ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต

3.3.2 เครื่องเขย่า (shaker) (New Brunswick Scientific Brunswick Scientific USA)

3.3.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) (Labofuge 6000 Heraeus Christ)

3.3.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Model PHB2 Yokokawa Electric Corporation)

3.3.5 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)(SS-325 Tomy)

3.3.6 ตู้ปลอดเชื้อ (Model ABS 1200 Sciencetech)

3.3.7 เข็มฉีดยา ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.8 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด (A200S Scientific Promotion)

3.3.9 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic 20 Bausch and Lomb)

3.3.10 กล้องจุลทรรศน์ (Model CHS Olympus)

3.3.11 หลอดไฟให้แสง

3.3.12 ชุดกรองดูดอากาศ (Suction pump)

3.3.13 กระดาษกรอง Whatman GF/C เบอร์ 5

3.3.14 ตู้อบ (oven) (Mammert)

3.3.15 โถดูดความชื้น (Desiccator) (Glaswerk wertheim GL32)

3.3.16 ไมโครปิเปต (Micropipette) (Pipetman Gilson France)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การแยก *A. azollae* จากแหนแดง

3.4.1.1 นำต้นแหนแดงมาตัดส่วนรากทิ้งไป แล้วล้างด้วยน้ำให้สะอาด

3.4.1.2 นำแหนแดงที่ได้มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (sodium hypochloride) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่มีสารลดแรงตึงผิว ทวีน - 80 (tween-80) 2-3 หยด เป็นเวลา 5 นาที

3.4.1.3 นำแหนแดงที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาล้างด้วยน้ำที่ผ่านการสเตอริไรซ์

3.4.1.4 นำแหนแดงที่ได้มาใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วบดด้วยแท่งแก้วปลายมนให้ละเอียด

3.4.1.5 เติมอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนปริมาณเล็กน้อยลงในหลอดทดลอง

3.4.1.6 ใช้หลอดหยดที่ผ่านการสเตอริไรซ์ดูดเฉพาะส่วนของเหลวใส่ลงในอาหารเหลว BG-11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน *A. azollae* โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน จนกระทั่งเห็น *A. azollae* เจริญเป็นแผ่นลอยบนผืนหน้าอาหาร

3.4.1.7 เติมยาปฏิชีวนะเตตราไซคลินลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 มิลลิกรัม/ลิตร แล้วทำการเขย่าเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อทำลายแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร

3.4.1.8 ทำการแยกเชื้อ *A. azollae* ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิครอยขีดในอาหารวุ้นสูตร BG-11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน

3.4.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตแอมโมเนียโดยเซลล์อิสระกับเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตและเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซาน

3.4.2.1 เตรียมเซลล์ตรึง *A. azollae* ในเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตและไคโตซานปริมาตร 75 มิลลิลิตรโดยให้มีความหนาแน่นของเซลล์เป็น 20-30 ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์ / มิลลิลิตร

3.4.2.2 นำเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตและเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานที่ได้มาใส่ลงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนปริมาตร 150 มิลลิลิตร จะได้ความหนาแน่นของเซลล์ *A. azollae* เริ่มต้นเป็น10-15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์ /มิลลิลิตร สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย จะทำการหมุนเหวี่ยงนำตะกอนเซลล์มาใส่ลงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน

3.4.2.3 เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนลงในอาหารที่เตรียมไว้ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 35 ไมโครโมลาร์

3.4.2.4 ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที และ มีการให้แสงตลอดเวลา (ความเข้มแสง 2000 ลักซ์)

3.4.2.5 เก็บตัวอย่างอาหาร 5 มิลลิลิตร มาวัดปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้น และวัดการเจริญเติบโตโดยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์จากตัวอย่างเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตและไคโตซาน 1.25 กรัม ทุกๆ 3 ชั่วโมง จนกระทั่งปริมาณแอมโมเนียลดลง

3.4.3 การหาระยะเวลาที่ *A. azollae* สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

3.4.3.1 เตรียมเซลล์ตรึงของ *A. azollae* ในเม็ดวัสดุตรึงที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยให้มีความหนาแน่นของเซลล์เป็น 20 ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร

3.4.3.2 นำเซลล์ตรึงที่ได้มาเติมลงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนปริมาตร 300 มิลลิลิตร จะได้ความหนาแน่นของเซลล์ *A. azollae* เริ่มต้นเป็น 10-15 มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ /มิลลิลิตร

3.4.3.3 เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 35 ไมโครโมลาร์

3.4.4.1 ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที มีการให้แสงตลอดเวลา (ความเข้มแสง 2000 ลักซ์) และทำการเติมเมท-ไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุกช่วงเวลาที่แอลเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนหมดฤทธิ์การยับยั้ง (ระยะเวลาการยับยั้งโดยเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนได้จากการข้อ 3.4.2) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 35 ไมโครโมลาร์

3.4.3.4 เก็บตัวอย่างอาหารมาวัดปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้น จนกระทั่งปริมาณแอมโมเนียลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การผลิตแอมโมเนียโดย *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงจากการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะสลับกัน (สภาวะที่มี และ ไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน)

3.4.4.1 เตรียมเซลล์ตรึงของ *A. azollae* ในเม็ดวัสดุตรึงที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยให้มีความหนาแน่นของเซลล์เป็น 20-30 มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร

3.4.4.2 นำเซลล์ตรึงที่ได้มาเติมลงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนปริมาตร 300 มิลลิลิตร จะได้ความหนาแน่นของเซลล์ *A. azollae* เริ่มต้นเป็น 10-15 มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร

3.4.4.3 เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 35 ไมโครโมลาร์ โดยเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนความเข้มข้น 5.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3.4.4.4 ทำการเพาะเลี้ยงโดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที มีการให้แสงตลอดเวลา (ความเข้มแสง 2000 ลักซ์) และทำการเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุกช่วงเวลาที่เมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนหมดฤทธิ์การยับยั้ง (ระยะเวลาการยับยั้งโดย เมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนได้จากข้อ 3.4.2) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 35 ไมโครโมลาร์

3.4.4.5 เมื่อถึงระยะเวลานานที่สุดที่ *A. azollae* สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนให้ทำการย้ายเม็ดตรึงเซลล์สาหร่าย *A.azollae* มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน และไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์ได้ใช้ไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงไปใช้ในการฟื้นตัวของเซลล์

3.4.4.6 หลังปล่อยให้เซลล์ฟื้นตัวในอาหารไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายเม็ดตรึงเซลล์ *A. azollae* กลับมาเพาะเลี้ยงในอาหารเดิม เพาะเลี้ยง 2 สภาวะสลับกันเช่นนี้ไปเรื่อยๆ

3.4.4.7 เก็บตัวอย่างอาหารมาวัดปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.4.3 ทำ 3 ซ้ำ มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design,CRD) ดังนั้นจึงต้องวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance,ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SDSS/PC version 11ในการวิเคราะห์ F-test และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีวิเคราะห์ของ Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

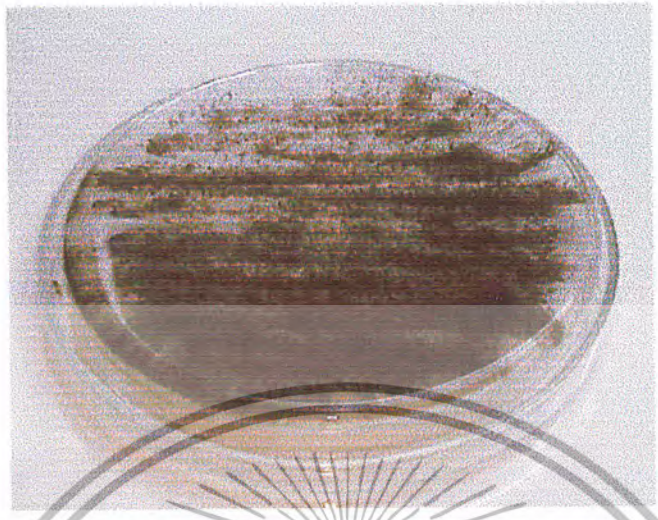
บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การแยก *A. azollae* จากแหนแดง

จากการแยกเชื้อ *A. azollae* จากแหนแดงด้วยวิธีการนำแหนแดงมาบดและทำเทคนิครอยขีดในจานเพาะเชื้อ แล้วนำมาส่องกล้องจุลทรรศน์ดูโครงสร้างเซลล์โดยเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่พบในแหนแดง (รูปที่ 4.1) จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้มาเพิ่มจำนวนในอาหารแข็ง(รูปที่ 4.2) และอาหารเหลว (รูปที่ 4.3) โดยลักษณะของโคโลนีจะมีสีน้ำตาล เซลล์สีซีดจางและพบว่าเซลล์เฮทเทอโรซิสต์มีจำนวนมากกว่าที่พบในโพรงใบของแหนแดงซึ่งให้ผลตรงกับการทดลองของ Brouers และคณะ(1989) เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่ายเป็นอาหาร BG-11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน ทำให้เซลล์ของสาหร่ายมีสีเปลี่ยนแปลงไป (ลัดดา, 2545) และทำให้เกิดเซลล์เฮทเทอโรซิสต์เพิ่มขึ้นเนื่องจากเซลล์ขาดแหล่งไนโตรเจนในอาหาร จึงต้องมีการสร้างเซลล์เฮทเทอโรซิสต์เพื่อตรึงก๊าซไนโตรเจนมาเป็นแหล่งไนโตรเจนแล้วเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมากขึ้นเพื่อใช้ในการเจริญของเซลล์ (Huang และ Shyu 1987)

รูปที่ 4.1 *A. azollae* ที่แยกได้จากแหนแดงใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



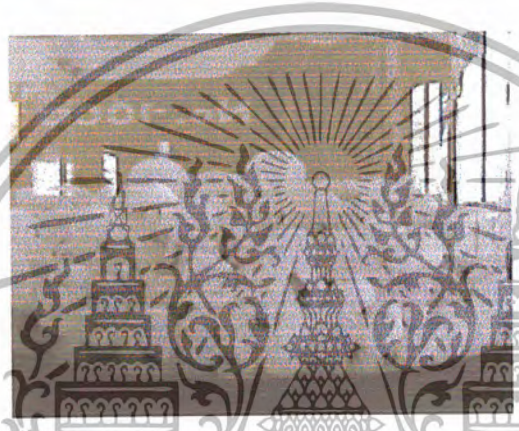
รูปที่ 4.2 การเพิ่มจำนวน *A. azollae* ในอาหารแข็ง

รูปที่ 4.3 การเพิ่มจำนวน *A. azollae* ในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตแอมโมเนียโดยเซลล์อิสระกับเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานและเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต

การเพาะเลี้ยง *A. azollae* เพื่อผลิตแอมโมเนีย ได้เปรียบเทียบลักษณะการเจริญของเซลล์ในรูปเซลล์อิสระ เซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซาน และ เซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตแอมโมเนียในแต่ละลักษณะการเจริญดังกล่าว สำหรับลักษณะการเจริญของเซลล์อิสระแสดงดังรูปที่ 4.3 ส่วนลักษณะการเจริญในรูปเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานและเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตแสดงดังรูปที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ



รูปที่ 4.4 *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซาน

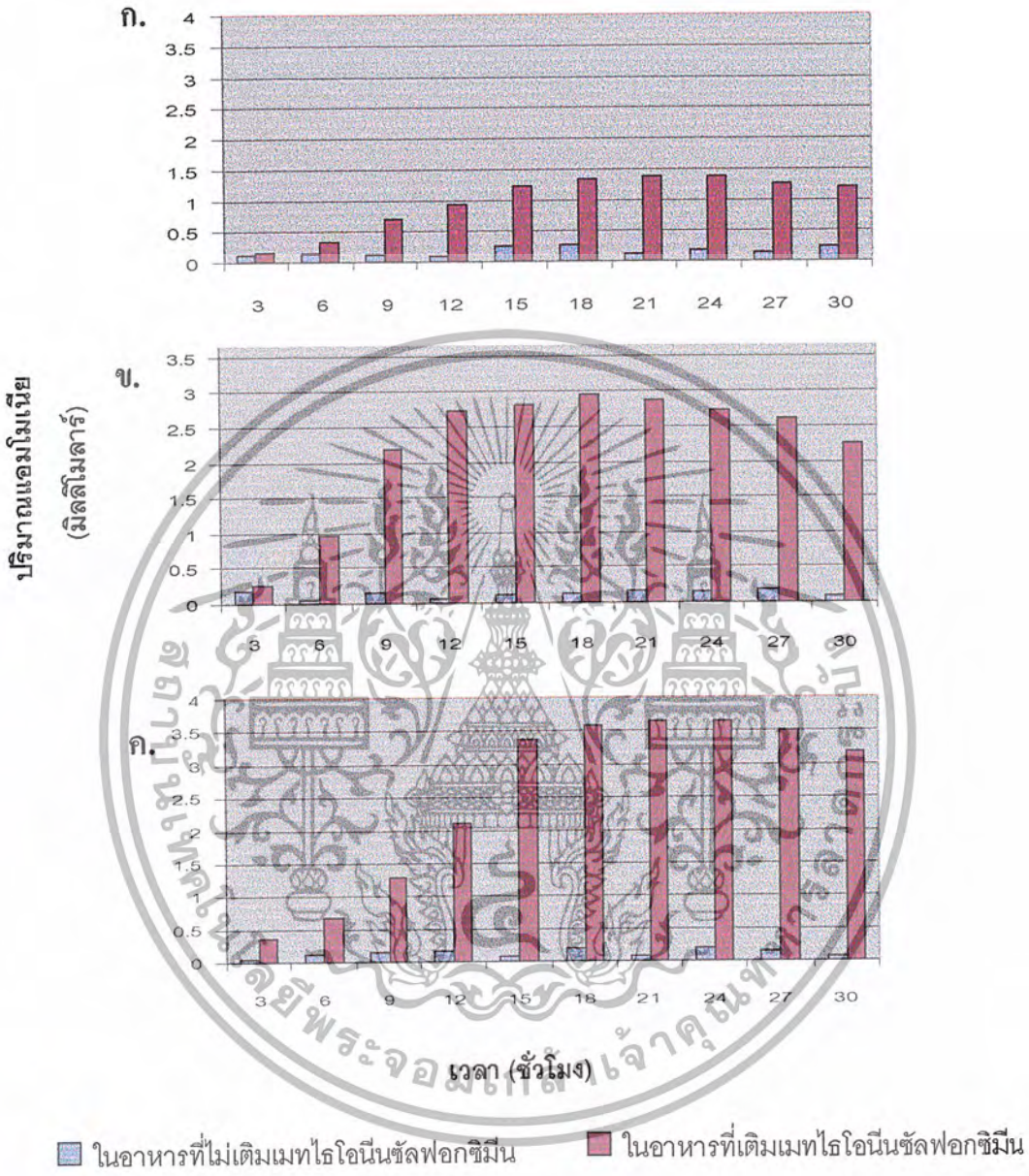
รูปที่ 4.5 *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้ที่ระยะเวลาต่างๆจากการเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในรูปเซลล์อิสระ เซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานและเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต ทั้งในอาหารที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน แสดงดังรูปที่ 4.6 และผลการเปรียบเทียบการผลิตแอมโมเนียในอาหารที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนแสดงดังรูปที่ 4.7 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าในอาหารที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทั้งการเพาะเลี้ยงในรูปเซลล์อิสระ เซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานและเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต มีการผลิตแอมโมเนียสูงกว่าในอาหารที่ไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนในทุกระยะเวลาการผลิต และจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ ค1) ปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้ในอาหารที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนจะเริ่มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ95ภายในเวลา 6 ชั่วโมง ในอาหารที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน การผลิตแอมโมเนียโดย *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตสามารถผลิตแอมโมเนียได้สูงสุด คือ 3.66 มิลลิโมลาร์(ในชั่วโมงที่ 24) รองลงมา คือ เซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานผลิตได้ 2.95 มิลลิ โมลาร์ (ในชั่วโมงที่ 18) และเซลล์อิสระผลิตแอมโมเนียได้เพียง 1.38 มิลลิโมลาร์ (ในชั่วโมงที่ 24) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตแอมโมเนียโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง (ทั้งเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตและเซลล์ตรึงในเม็ด ไคโตซาน) พบว่าการผลิตแอมโมเนียโดยเซลล์ตรึงให้ปริมาณแอมโมเนียสูงกว่ามาก ดังนั้นการผลิตแอมโมเนียโดยเซลล์ตรึงจึงมีประสิทธิภาพมากกว่าการผลิตโดยเซลล์อิสระ

จากการเปรียบเทียบการผลิตแอมโมเนียโดยเซลล์ตรึงในวัสดุตรึงเซลล์ทั้งสองชนิด (อัลจิเนตและไคโตซาน)พบว่าการผลิตแอมโมเนียโดยเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานสามารถผลิตแอมโมเนียได้อย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก โดยได้ปริมาณแอมโมเนียสูงกว่าการผลิตโดยเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต แต่หลังจากชั่วโมงที่ 12 อัตราการผลิตแอมโมเนียจะลดลงและคงที่ในที่สุด แต่เซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตยังคงมีการผลิตแอมโมเนียต่อไป ทำให้ปริมาณแอมโมเนียสูงสุดที่ผลิตได้โดยเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตมีปริมาณสูงกว่าการผลิตโดยเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซาน โดยปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้โดยเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตมีช่วงที่สามารถผลิตแอมโมเนียได้ปริมาณมากคือ ในชั่วโมงที่ 18 21 และ 24 สามารถผลิตแอมโมเนียได้ 3.59 3.65 และ 3.66 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ โดยปริมาณแอมโมเนียที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ ค2) อัลจิเนตเป็นวัสดุตรึงเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากทำให้มีการผลิตแอมโมเนียได้สูงสุด เพราะฉะนั้นจึงใช้ *A.azollae* ในรูปเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตในการทดลองต่อไปและช่วงเวลาที่ปริมาณแอมโมเนียผลิตได้มากที่สุด(ประมาณชั่วโมงที่ 20) จะเป็นระยะเวลาที่เมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนออกฤทธิ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



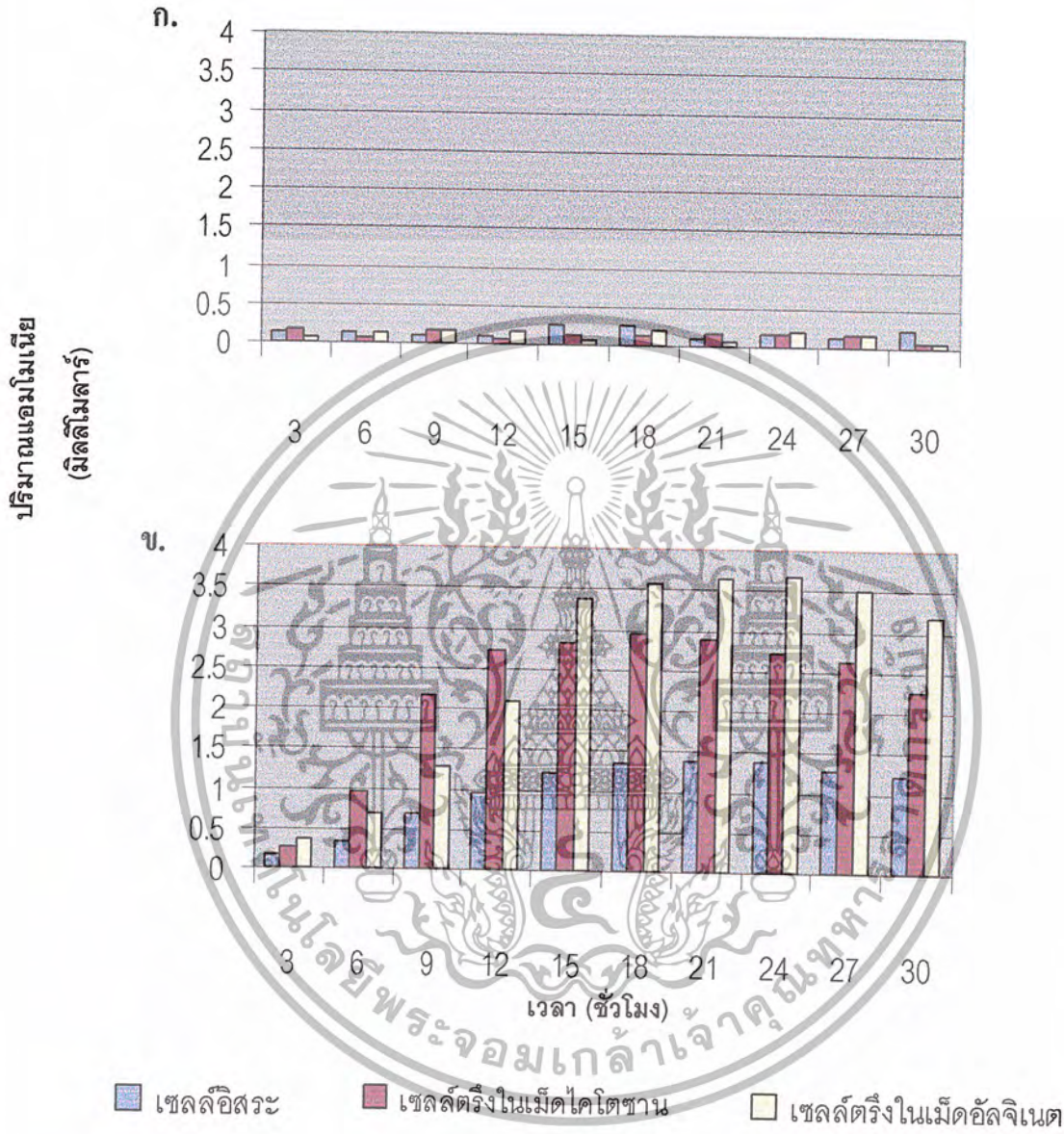
รูปที่ 4.6 ปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้ที่ระยะเวลาต่างๆจากการเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในอาหารที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ก. การเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในรูปเซลล์อิสระ

ข. การเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซาน

ค. การเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้ที่ระยะเวลาต่างๆจากการเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในรูป เซลล์อิสระ เซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซาน และ เซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต

ก. การเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในอาหารที่ไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

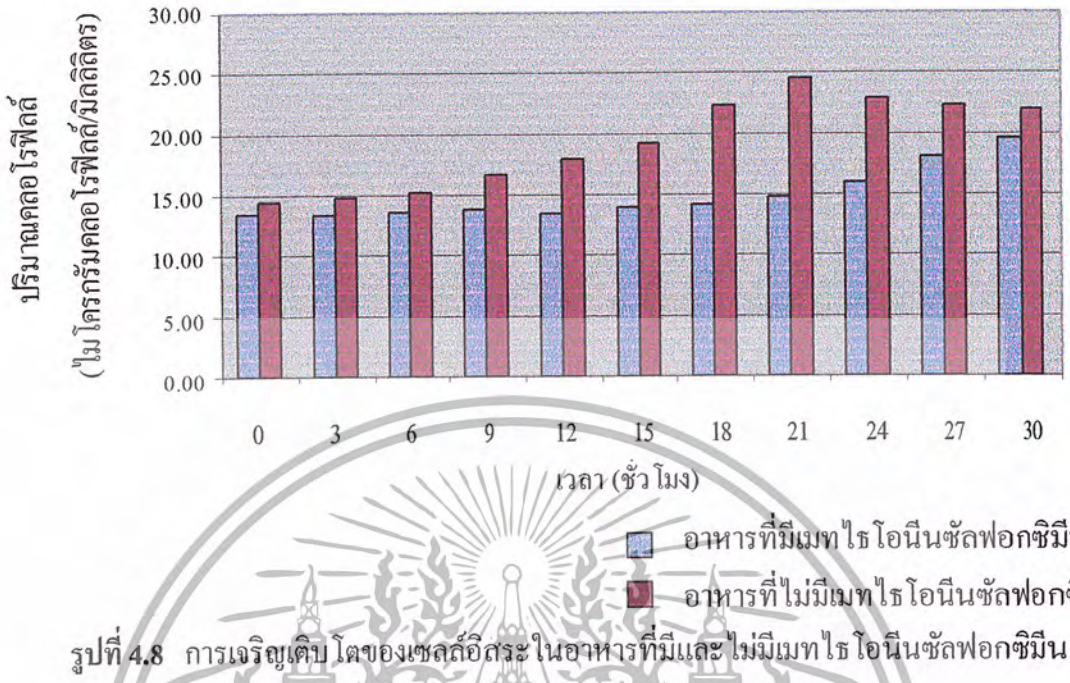
ข. การเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในอาหารที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

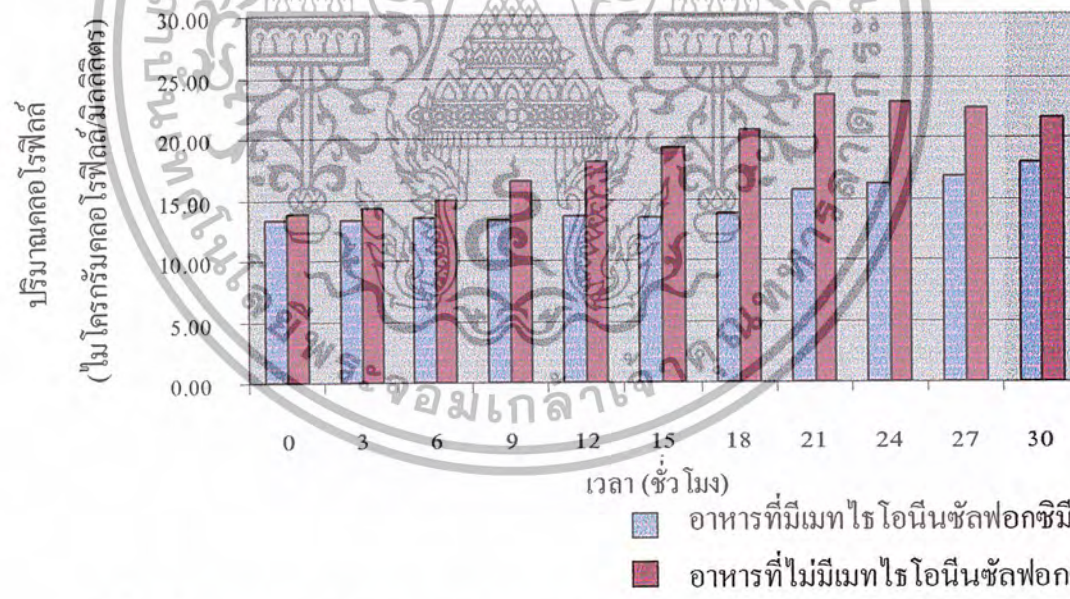
การตรึงเซลล์โดยใช้ไคโตซานมีขั้นตอนการตรึงเซลล์ที่ยุ่งยากและใช้เวลานานกว่าการตรึงเซลล์โดยใช้อัลจิเนต อีกทั้งยังใช้สารเคมีที่รุนแรงต่อเซลล์ เช่น การใช้กรดอะซิติกในการละลายเกล็ดไคโตซาน และ การใช้สารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตในการขึ้นรูปเม็ดไคโตซาน ซึ่งสารละลายทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติเป็นกรดซึ่งอันตรายต่อเซลล์ ในการขึ้นรูปเม็ดไคโตซานต้องแช่เม็ดไคโตซานทิ้งไว้ในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตนานถึง 1 ชั่วโมง ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบวัสดุตรึงทั้งสองชนิดแล้วการตรึงเซลล์โดยอัลจิเนตจึงทำได้สะดวกรวดเร็วกว่าไม่ใช้สารเคมีที่อันตรายต่อเซลล์และจากการทดลองยังได้ปริมาณแอมโมเนียสูงกว่าอีกด้วย นอกจากนี้เม็ดไคโต-ซานที่ได้มีลักษณะขาวขุ่น (รูปที่4.4) ทำให้แสงส่องผ่านได้ไม่ดีเป็นผลเสียต่อ *A. azollae* ซึ่งต้องการใช้แสงในการดำรงชีวิตด้วยลักษณะการทึบแสงของเม็ดไคโตซานนี้เองจึงอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานสามารถผลิตแอมโมเนียได้น้อยกว่าเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในอาหารที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนปริมาณแอมโมเนียในอาหารจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆเป็นระยะเวลาหนึ่งหลังจากนั้นปริมาณแอมโมเนียในอาหารจะเริ่มคงที่และในที่สุดปริมาณแอมโมเนียในอาหารก็จะลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนที่เติมลงไปหมดฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส (Ramos และคณะ 1984) ทำให้เซลล์นำแอมโมเนียที่ได้จากการตรึงก๊าซไนโตรเจนรวมทั้งแอมโมเนียที่อยู่ในอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตแอมโมเนียในอาหารจึงลดลงในการทดลองนี้จึงได้ทำการวัดการเจริญเติบโตของ *A. azollae* ร่วมด้วยโดยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ (ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร) เพื่อยืนยันผลของเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน ซึ่งให้ผลดังรูปที่ 4.8 และ 4.9 (เนื่องจากไม่พบวิธีการละลายเม็ดไคโตซานเพื่อวัดปริมาณคลอโรฟิลล์จึงไม่สามารถวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานได้) พบว่าในอาหารที่ไม่มีเมทไธโอ-นีนซัลฟอกซิมีนเซลล์จะมีการเจริญเติบโตปกติ แต่ในอาหารที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนในช่วงที่เมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนยังมีผลยับยั้งเอนไซม์กลูตามีนซินเทสจะไม่มีการเจริญเติบโตของเซลล์(ปริมาณคลอโรฟิลล์คงที่) แต่เมื่อเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนหมดฤทธิ์ยับยั้งเซลล์จะเริ่มมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น จากการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ทางสถิติ (ตารางที่ ค3) พบว่าทั้งในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงการเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหารที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนมีความแตกต่างจากในอาหารที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในทุกช่วงเวลาการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงควรเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนเพิ่มลงไปอีกเพื่อให้การผลิตแอมโมเนียดำเนินต่อไป ซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน คือ ทุก 20 ชั่วโมง เพราะฉะนั้นการทดลองที่ 3 จะเพาะเลี้ยงโดยเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุก 20 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 การเจริญเติบโตของเซลล์อิสระในอาหารที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน



รูปที่ 4.9 การเจริญเติบโตของเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตในอาหารที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตแอมโมเนียจากการตรึงก๊าซไนโตรเจนของ *A. azollae* กับการผลิตแอมโมเนียจากไนเตรตของ *Anacystis nidulans* (Ramos และคณะ1982) ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวไม่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ ภายในเวลา 20 ชั่วโมง *A. nidulans* ผลิตแอมโมเนียได้ 4.20 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมากกว่าปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้จาก *A. azollae* (3.66.มิลลิโมลาร์) พบว่าการผลิตแอมโมเนียจากสาหร่าย *A. azollae* มีข้อได้เปรียบคือ *A. azollae* ใช้ก๊าซไนโตรเจนจากอากาศเป็นแหล่งไนโตรเจนได้แต่ *A. nidulans* ต้องใช้ไนเตรตที่เติมลงในอาหารเพื่อเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนีย ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงกว่าและไนเตรตที่เติมลงไปอาจมีราคาแพงกว่าแอมโมเนียที่ผลิตได้ก็เป็นได้ จึงอาจไม่คุ้มค่าต่อการนำมาผลิตจริง นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงแบบ 2 สภาวะสลับกัน *A. nidulans* เป็นเซลล์เดี่ยวทำให้การปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ทำได้ยากกว่าพวกที่เป็นเส้นสาย เช่น *Anabaena* sp. ATCC 33047 และยากกว่า *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึง

4.3 การหาระยะเวลาที่ *A. azollae* สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

เนื่องจากเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนที่เติมลงในอาหารออกฤทธิ์ได้นาน 20 ชั่วโมง ดังนั้นเพื่อให้การผลิตแอมโมเนียสามารถดำเนินต่อไปได้จึงได้เพาะเลี้ยง *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตโดยเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุก 20 ชั่วโมงให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 35 ไมโครโมลาร์ ปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้แสดงดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.10 จากผลการทดลองพบว่าการเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุก 20 ชั่วโมงทำให้การผลิตแอมโมเนียสามารถดำเนินต่อไปได้นานขึ้น โดยปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและได้ปริมาณแอมโมเนียสูงสุด 7.59 มิลลิโมลาร์ในชั่วโมงที่ 60 แต่หลังจากชั่วโมงที่ 60 ปริมาณแอมโมเนียจะลดลง (ในชั่วโมงที่ 66 และ 73 มีปริมาณแอมโมเนียเท่ากับ 7.40 และ 7.05 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ) และเนื่องจากเซลล์ตายเพราะขาดแคลนธาตุไนโตรเจนสำหรับใช้สังเคราะห์สารเพื่อใช้ในการดำรงชีวิต (Ramos และคณะ 1984) ดังนั้นระยะเวลานานที่สุดที่ *A. azollae* สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน คือ 60 ชั่วโมง

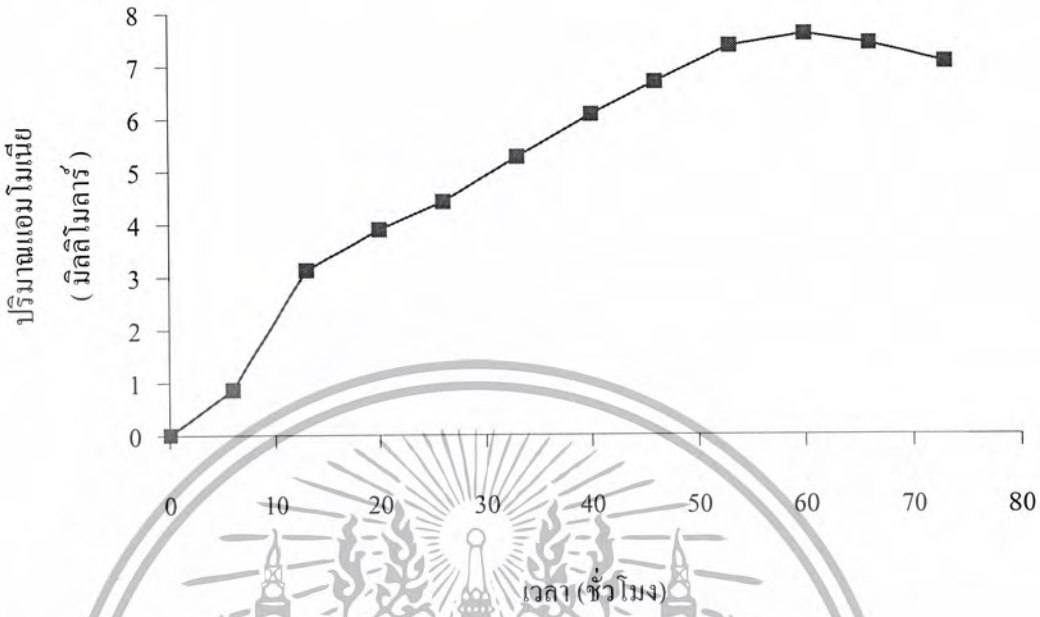
A. azollae สามารถทนต่อสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนได้นาน 60 ชั่วโมง ในขณะที่ *Anabaena* sp. ATCC 33047 ในการทดลองของ Ramos และคณะ (1984) ทนได้นานเพียง 40 ชั่วโมงดังนั้นถึงแม้ว่าภายในระยะเวลาที่เมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนออกฤทธิ์ (20 ชั่วโมง) *A. azollae* ผลิตแอมโมเนียได้เพียง 3.66 มิลลิโมลาร์ ซึ่งน้อยกว่า *Anabaena* sp. ATCC 33047 (4.50 มิลลิโมลาร์) แต่เนื่องจาก *A. azollae* สามารถทนต่อสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนได้นานกว่าทำให้สุดท้ายแล้ว *A. azollae* สามารถผลิตแอมโมเนียได้มากกว่า (*A. azollae* ผลิตได้ 7.59 มิลลิโมลาร์ ภายใน 60 ชั่วโมง *Anabaena* sp. ATCC 33047 ผลิตได้ 5.70 มิลลิโมลาร์ ภายใน 40 ชั่วโมง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้ที่ระยะเวลาต่างๆจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตโดยเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุก 20 ชั่วโมง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแอมโมเนีย (มิลลิโมลาร์)
0	0.0000
6	0.8614
13	3.1253
20	3.8911
26	4.4167
33	5.2648
40	6.0725
46	6.6845
53	7.3621
60	7.5904
66	7.4064
73	7.0547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้ที่ระยะเวลาต่างๆจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตโดยเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุก 20 ชั่วโมง

4.4 การผลิตแอมโมเนียโดย *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงจากการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะสลับกัน (สภาวะที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน)

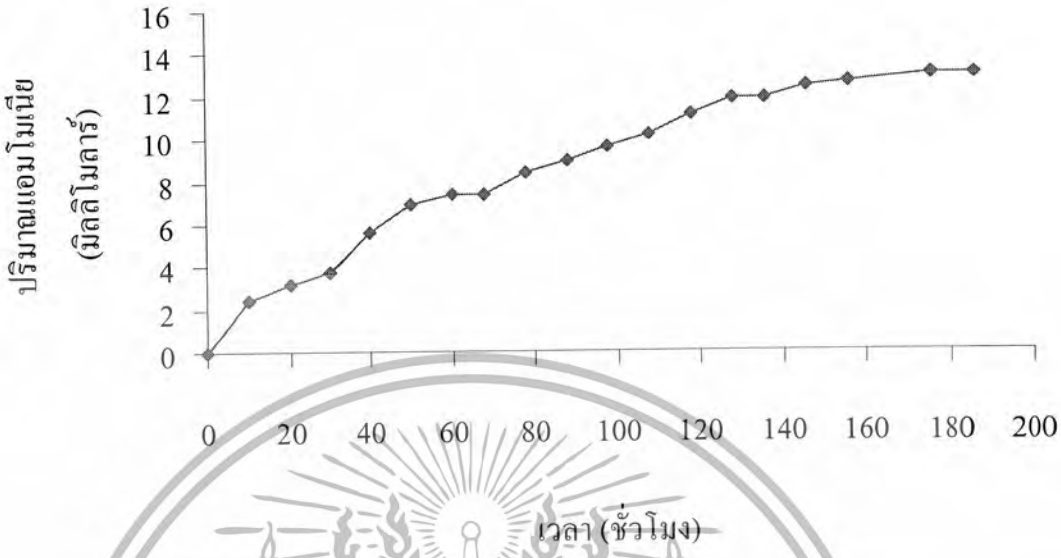
การเพาะเลี้ยง 2 สภาวะสลับกัน คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุก 20 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมงซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์สามารถทนต่อสภาวะที่มีเมทไธโอนีน ซัลฟอกซิมีนได้ หลังจากนั้นจะกรองย้ายเม็ดตรึงเซลล์ *A. azollae* ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง (เพื่อให้เซลล์ฟื้นตัวจากสภาพขาดแคลนธาตุไนโตรเจนภายในเซลล์) เพาะเลี้ยง 2 สภาวะสลับกันเช่นนี้ไปเรื่อยๆผลการเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตจากการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะสลับกันแสดงดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตแบบ 2 สภาวะสลับกันที่ระยะเวลาต่างๆ

สภาวะการเพาะเลี้ยง	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแอมโมเนีย (มิลลิโมลาร์)
	0	0.0000
สภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน 60 ชั่วโมง	10	2.469
	20	3.227
	30	3.762
	40	5.612
	50	6.930
	60	7.368
สภาวะที่ไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน 8 ชั่วโมง		
สภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน 60 ชั่วโมง	68	7.434
	78	8.387
	88	8.956
	98	9.675
	108	10.200
	118	11.170
	128	11.817
สภาวะที่ไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน 8 ชั่วโมง		
สภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน 60 ชั่วโมง	136	11.925
	146	12.415
	156	12.630
	176	12.974
	186	12.993

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตแบบ 2 สภาวะสลับกันที่ระยะเวลาต่างๆ

จากผลการทดลองพบว่า กระบวนการผลิตแอมโมเนียโดยการเพาะเลี้ยงแบบ 2 สภาวะสลับกันทำให้สามารถยืดระยะเวลาการผลิตแอมโมเนียได้นานขึ้น ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้น จนถึงชั่วโมง 60 และมีค่าค่อนข้างคงที่ในชั่วโมงที่ 68 (ในชั่วโมงที่ 60 และ 68 มีปริมาณแอมโมเนีย 7.37 และ 7.43 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ) เนื่องจากมีการเปลี่ยนสภาวะมาเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน เมื่อเปลี่ยนสภาวะการเลี้ยงโดยเลี้ยงในอาหารที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนพบว่าปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นไปอย่างรวดเร็ว เป็นเวลานาน 60 ชั่วโมงแล้วทำการเปลี่ยนสภาวะอีกครั้ง ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 128 โดยได้ปริมาณแอมโมเนียเป็น 11.81 มิลลิโมลาร์ แต่หลังจากนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปพบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอมโมเนียช้าลงเรื่อยๆ แต่ก็ยังมีปริมาณแอมโมเนียสูงถึง 12.99 มิลลิโมลาร์ในชั่วโมงที่ 186 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการทดลอง ดังนั้นการผลิตแอมโมเนียโดย *A. azollae* จากการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะสลับกันสามารถผลิตแอมโมเนียได้อย่างมีประสิทธิภาพภายในเวลา 128 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Ramos และคณะ (1984) ซึ่งได้นำการผลิตแอมโมเนียแบบ 2 สภาวะสลับกันมาใช้กับ *Anabaena* sp. ATCC 33047 ในรูปเซลล์อิสระ พบว่าการใช้ *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงทำให้เกิดความคล่องตัวในกระบวนการผลิต โดยเฉพาะในขั้นตอนการแยกเซลล์ออกจากอาหารเพื่อเปลี่ยนสภาวะสามารถทำได้สะดวกโดยการกรองย้ายเม็ดตรึงเซลล์ในขณะที่การเพาะเลี้ยง *Anabaena* sp. ATCC 33047 ซึ่งอยู่ในรูปเซลล์อิสระจำเป็นต้องปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ซึ่งทำได้ยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูงกว่า นอกจากนี้การทดลองของ Ramos และคณะ (1984) จะย้ายเซลล์สู่อาหารที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนชุดใหม่ทุกครั้งหลังจากให้เซลล์ฟื้นตัวในอาหารที่ปราศจากเมทไธ-โอนีนซัลฟอกซิมีน ทำให้สิ้นเปลืองอาหารและสารเคมีปริมาณมากและยังทำให้สารละลายแอมโมเนียที่ได้มีความเข้มข้นต่ำ ยากต่อการเก็บเกี่ยวแอมโมเนียและก่อให้เกิดของเสียปริมาณมากด้วย แต่การใช้ *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึง ใช้อาหารที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนชุดเดิมในการทดลองทำให้ไม่เกิดปัญหาดังกล่าว ดังนั้นการผลิตแอมโมเนียโดย *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงจึงมีประสิทธิภาพมากกว่าการผลิตโดย *Anabaena* sp. ATCC 33047 ในรูปเซลล์อิสระ

การผลิตแอมโมเนียโดยการเพาะเลี้ยง *A. azollae* แบบ 2 สภาวะสลับกันสามารถพัฒนาสู่การผลิตในระดับถังหมักได้ ดังเช่นการทดลองของ Wangและคณะ (1991) ซึ่งผลิตแอมโมเนียโดย *A. azollae* ในถังหมักชนิดเส้นใยกลวง (hollow fibre bioreactor) โดยเซลล์อยู่ในรูปเซลล์ตรึงภายในรูพรุนของเส้นใยกลวง สามารถนำการเพาะเลี้ยงแบบ 2 สภาวะสลับกันมาใช้ด้วยได้โดยการเปลี่ยนถ่ายชนิดของอาหารในถังหมักซึ่งทำได้ง่ายและสะดวกแสดงถึงความสามารถในการพัฒนาไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 การแยก *A. azollae* จากแหนแดง

A. azollae ที่แยกได้จากแหนแดงจากการเปรียบเทียบโครงสร้างของสาหร่ายที่พบในแหนแดง โดยเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน พบว่าลักษณะโคโลนีของสาหร่ายจะเป็นสีน้ำตาล เซลล์สีซีดจางลงและพบเซลล์เฮทเทอโรซิสต์เป็นจำนวนมาก เนื่องจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน เซลล์เฮทเทอโรซิสต์ที่เกิดขึ้นทำหน้าที่ตรึงก๊าซไนโตรเจนแล้วเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนียทำให้สามารถนำสาหร่ายมาใช้ในการผลิตแอมโมเนียได้

5.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตแอมโมเนียโดยเซลล์อิสระกับเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานและเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตแอมโมเนียของเซลล์อิสระ เซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตและเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานในสภาวะที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนพบว่า ลักษณะการเจริญทั้ง 3 ลักษณะ ปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้ในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนมีมากกว่าสภาวะที่ไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญทั้ง 3 ลักษณะในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนพบว่า ปริมาณแอมโมเนียของเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตมากที่สุด โดยมีปริมาณแอมโมเนียสูงถึง 3.59 3.65 และ 3.66 มิลลิโมลาร์ ในชั่วโมงที่ 18 21 และ 24 ตามลำดับ ในช่วงเวลานี้เป็นช่วงที่สามารถผลิตแอมโมเนียได้มากที่สุดระยะเวลาที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสเป็นเวลานานประมาณ 20 ชั่วโมงจากนั้นปริมาณแอมโมเนียจะลดลง เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของ *A. azollae* พบว่าในสภาวะที่ไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนสาหร่ายเจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนและพบว่า เซลล์อิสระสามารถเจริญได้ดีกว่าเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 การหาระยะเวลาที่ *A. azollae* สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

เมื่อเลี้ยง *A. azollae* ในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตโดยเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุกๆ 20 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลาที่เมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนหมดฤทธิ์ เพื่อทดสอบระยะเวลาที่ *A. azollae* ทนต่อสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนได้ พบว่า *A. azollae* สามารถผลิตแอมโมเนียได้ไปจนถึงชั่วโมงที่ 60 ซึ่งมีปริมาณแอมโมเนียเท่ากับ 7.59 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นปริมาณแอมโมเนียจะลดลง ดังนั้นระยะเวลาที่เซลล์สาหร่ายทนต่อสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนจึงเป็นเวลานาน 60 ชั่วโมง

5.4 การผลิตแอมโมเนียโดย *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงจากการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะสลับกัน (สภาวะที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน)

จากการเลี้ยง *A. azollae* ในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต 2 สภาวะสลับกันพบว่าปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้ในสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน เพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 60 และเมื่อเปลี่ยนเป็นสภาวะที่ไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนเป็นเวลา 8 ชั่วโมงปริมาณแอมโมเนียค่อนข้างคงที่ เมื่อเปลี่ยนเป็นสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนอีกครั้ง ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วไปเป็นเวลา 60 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 128 ซึ่งมีปริมาณแอมโมเนียสูงถึง 11.81 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นมีการเปลี่ยนเป็นสภาวะที่ไม่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน ปริมาณแอมโมเนียค่อนข้างคงที่เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นสภาวะที่มีเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนอีกครั้ง พบว่าอัตราการเพิ่มของปริมาณแอมโมเนียน้อยลง แต่ยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 186 ปริมาณแอมโมเนียที่ได้ยังคงมีปริมาณแอมโมเนียสูงถึง 12.99 มิลลิโมลาร์

5.5 ข้อเสนอแนะ

5.5.1 ถึงแม้ว่า *A. azollae* จะเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแอมโมเนีย แต่การเพิ่มความสามารถในการผลิตแอมโมเนียให้ดียิ่งขึ้นจึงควรปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยซึ่งการปรับปรุงพันธุ์ *A. azollae* คงทำได้ไม่ยากเนื่องจาก *A. azollae* มีข้อมูลการศึกษาอยู่มากรวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมก็มีการศึกษามามากเช่นกัน หรืออาจปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ เอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น ไนโตรกัวนิดีน (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine) ซึ่งประสบความสำเร็จมาแล้วในการปรับปรุงพันธุ์ *Anabaena* sp. CA ให้มีความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนสูงขึ้น (Gotto และคณะ 1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5.2 นอกจากอัลจิเนตและไคโตซานแล้ว *A. azollae* สามารถถูกตรึงในวัสดุตรึงเซลล์ได้หลายชนิด เช่น เม็ดโฟมโพลียูรีเทน เม็ดโฟมโพลีไวนิล ซังข้าวโพด ฟางข้าว ชานอ้อย และเส้นใยกลวง (hollow fibre) เป็นต้น ดังนั้นจึงควรศึกษาวัสดุตรึงที่เหมาะสมเพื่อให้ผลิตแอมโมเนียได้สูงสุด และ เลือกใช้วัสดุตรึงเซลล์ที่เหมาะสมต่อการใช้งานและเหมาะสมต่อกระบวนการที่ใช้

5.5.3 เนื่องจากมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงก๊าซไนโตรเจนเพื่อผลิตแอมโมเนีย จึงควรมีการควบคุมปัจจัยต่างๆให้เหมาะสมเพื่อให้สามารถผลิตแอมโมเนียได้สูงขึ้น

5.5.4 ปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้มีปริมาณสูงมาก ซึ่งอาจทำให้ค่าพีเอชในอาหารสูงขึ้น ทำให้มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแอมโมเนียของเซลล์ได้ แต่ในการทดลองนี้ไม่ได้ศึกษาพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการทดลอง จึงไม่สามารถทราบผลของพีเอชในอาหารที่เกิดจากปริมาณแอมโมเนียที่เพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นถ้ามีการทดลองต่อไปควรมีการติดตามค่าพีเอชในระหว่างการทดลองเพื่อศึกษาผลของพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยและอาจมีการควบคุมพีเอชให้คงที่เหมาะสมต่อการผลิตแอมโมเนีย

5.5.5 สำหรับเม็ดตรึงเซลล์ *A. azollae* ที่ไม่ได้ใช้แล้วสามารถใช้เป็นปุ๋ยได้ ดังการทดลองของ Kumar และ Kannaiyan (2002) ที่ใช้เม็ดตรึงเซลล์ของ *A. azollae* เป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าวซึ่งสามารถใช้ทดแทนปุ๋ยเคมีได้ดีทำให้ลดปัญหาของเสียและการกำจัดของเสียจากเม็ดตรึงเซลล์ *A. azollae* ที่ไม่ได้ใช้งานแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชมพูนุช ไชยรักษ์. 2542. **ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส.** กรุงเทพฯ : บริษัท นานมีบุ๊คส์ จำกัด.

มนตรี จุฬาวัฒนทล. 2542. **การสังเคราะห์แสงและการตรึงไนโตรเจน.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยมหิดล

รินดา คันธวร, อำภา เริงปรีดารมย์ และอุดมมฤทธิ์ วิทูรชวลิตวงษ์. 2541. **การใช้ไคโตแซนตรึงรูปสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 เพื่อใช้ดูดซับโครเมียม(+6).** โครงงานพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2545. **แพลงก์ตอนพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิริภัค สระตันติ์. 2543. **ชีวเคมีเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สรวิศ เผ่าทองสุข. 2543. **สาหร่าย.** เอกสารเผยแพร่ชุดโครงการอุดสาหกรรมสัตว์น้ำ สกว. ชุดที่2 . กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Bottomley, P. J.; J. F. Grillo; C. Van Baalen and F. R. Tabita. 1979. Synthesis of nitrogenase and heterocysts by *Anabaena* sp. CA in the presence of high levels of ammonia. **Journal of Bacteriology.** 140(3) : 938-943.

Brouers, M.; H. De Jong; D. J. Shi and D. O. Hall. 1989. Immobilized cells : an appraisal of the methods and applications of cell immobilization techniques. In : **Algal and Cyanobacterial biotechnology**, pp. 272-293. Cresswell R. C.; T. A. V. Rees and N. Shah, eds. England : Longman scientific and technical.

Dixon, R. O. D. and C. T. Wheeler. 1986. **Nitrogen Fixation in Plants**. New York : Chapman and Hall.

Gotto, J. W.; F. R. Tabita and C. Van Baalen. 1980. Novel mutant of *Anabaena* sp. strain CA which grows on N_2 but not on combined nitrogen. **Journal of Bacteriology.** 143(3) : 1395-1402

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gregor, J. and B. Marsalek. 2004. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of *in vitro*, *in vivo* and *in situ* methods. **Water Research.** 38 : 517-522

Hori, K.; S. Ishii; G. Ikeda; J. Okamoto; Y. Tanji; C. Weeraphasphong and H. Unno. 2002. Behavior of filamentous cyanobacterium *Anabaena* spp. in water column and its cellular characteristics. **Biochemical Engineering Journal**. 10(3) : 217-225.

Huang, C. Y. and C. F. Shyu. 1987. The mottling on radiographs for thin Inconel Alloy 718 welds . **Proceedings of the 4th European Conference on Non-Destructive Testing**. 3 : 2025–2034.

Jha, M.; A. F. Yakunin; V. N. Chan and I. N. Gogotov. 1999. Effect of ammonium on the nitrogenase activity of *Anabaena variabilis*. In : **Highligh of Nitrogen Fixation Research,** pp. 531-532. Esperanza Martinez and Georgina Hernardez, eds. New York : Kluwer Academic / Plenum Publishers.

Kannaiyan, S.; S. J. Aruna; S. Merina; P. Kumari and D. O. Hall. 1997. Immobilized cyanobacteria as a biofertilizer for rice crops. **Journal of Applied Phycology.** 9(2) : 167-174.

Kerby, N. W.; P. Rowell and W. D. P. Stewart. 1989. The transport, assimilation and production of nitrogenous compounds by cyanobacteria and microalgae. In : **Algal and Cyanobacterial biotechnology,** pp. 50-90. Cresswell, R. C.; T. A. V. Rees and N. Shah, eds. England : Longman scientific and technical.

Kumar, K. and S. Kannaiyan. 2002. Mass production of carrier based polyurethane foam (PUF) immobilized cyanobacterial inoculum for rice. **17th WCSS Symposium**, 14-21 August 2002, Thailand.

Mahesh, J. and S. Kannaiyan. 1993. Effect of immobilization of cyanobacteria in solid matrix on ammonia excretion and nitrogen fixing activity. Biotecnology Letters. 155(9) : 975-978. อ้างถึงใน Kumar, K. and S. Kannaiyan. 2002. Mass production of carrier based polyurethane foam (PUF) immobilized cyanobacterial inoculum for rice. **17th WCSS Symposium**, 14-21 August 2002, Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mishra, A. K.; A. B. Pandey and H. D. Kumar. 1989. Effects of three pesticides on MSX-induced ammonia photoproduction by cyanobacterium *Nostoc linckia*. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 18(2) : 145-148.

Morrison, G. R. 1971. Microchemical determination of organic nitrogen with nessler reagent. **Analytical Biochemistry** . 43(2) : 527-532.

Orr, J. and R. Haselkorn. 1982. Regulation of glutamine synthetase activity and synthesis in free-living and symbiotic *Anabaena* spp. **Journal of Bacteriology.** 152(2) : 626-635.

Ramos, J. L.; M. G. Guerrero and M. Losada. 1982. Optimization of conditions for photoproduction of ammonia from nitrate by *Anacystis nidulans*. **Applied and Environmental Microbiology.** 44(5) : 1013-1019.

Ramos, J. L.; M. G. Guerrero and M. Losada. 1982. Sustained photoproduction of ammonia from nitrate by *Anacystis nidulans*. **Applied and Environmental Microbiology.** 44(5) : 1020-1025.

Ramos, J. L.; M. G. Guerrero and M. Losada. 1984. Sustained photoproduction of ammonia from dinitrogen and water by nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain ATCC 33047. **Applied and Environmental Microbiology.** 48(3) : 114-118.

Rees, T. A. V. 1989. The biotechnological potential of symbiotic algae and cyanobacteria. In : **Algal and Cyanobacterial biotechnology**. 115-136. Cresswell, R. C.; T. A. V. Rees and N. Shah, eds. New York : Longman scientific and technical.

Rozen, A. and T. Elisha. 1986. Sugar supported H_2 production and C_2H_2 reduction by the cyanobiont *Anabaena azollae*. **Journal of Biomass.** 4(11) : 121-128.

Vyas, D. and H. D. Kumar. 1995. Nitrogen fixation and hydrogen uptake in four cyanobacteria. **International Journal of Hydrogen Energy.** 2(20) : 163-168.

Wang, S. C.; M. R. Jin and D. O. Hall. 1991. Immobilization of *Anabaena azollae* in hollow fibre photobioreactors for ammonia production. **Bioresource Technology.** 38 : 85-90.

Weare, N. M. and K. T. Shanmugam. 1976. Photoproduction of ammonium ion from N_2 in *Rhodospirillum rubrum*. **Archeabacteria Microbiology.** 110(23) : 207-213.

Yagishita, T.; S. Sawayama; K. Tsukahara and T. Ogi. 1998. Performance of photosynthetic electrochemical cells using immobilized *Anabaena variabilis* M-3 in discharge/culture cycles. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 85(5) : 546-549.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://biotech.szbk.u-szeged.hu/KK_Jegyzet/pic/heterocyst.gif

http://www.botany.wisc.edu/courses/botany_330/AnabaenaAzolla2.html

http://www.com.univ-mrs.fr/.../ images/nitfix.jpg

http://www.dipbot.unict.it/sistematica_es/Azolla.html

http://www.home.aone.net.au/byzantium/ferns/descriptions/azolla/azpinnata.html

http://www.hort.purdue.edu/.../ ammonia/am00006.htm

http://www.isis.de/members/~ralfwagner/Blaualgen.html

http://www.ku.ac.th/AgrInfo/thaifish/aqplant/aqpt013.html

http://nbsp.sonoma.edu/resources/presentations/derekpres/05Microbe%20lecture/sld005.htm

http://www.soils.umn.edu/academics/classes/soil3612/Symbiotic_Nitrogen_Fixation/Other.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และวิธีการเตรียมการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Hori, 2002)

ตารางที่ ก1 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงสาหร่าย BG-11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น
K_2HPO_4	0.04 g/l
$MgSO_4.7H_2O$	0.075 g/l
$CaCl_2.2H_2O$	0.036 g/l
Citric acid	6.0 mg/l
Ferric ammonium citrate	6.0 mg/l
EDTA	1.0 Mg/l
$NaCO_3$	0.02 mg/l
H_3BO_3	2.86 mg/l
$MnCl_2.4H_2O$	1.81 mg/l
$ZnSO_4.7H_2O$	0.222 mg/l
$NaMoO_4.2H_2O$	0.39 mg/l
$CuSO_4.5H_2O$	0.079 mg/l
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.049 mg/l
ปรับพีเอชให้ได้ 7.1	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเพาะเลี้ยง *Anabaena azollae* ในสภาพอิสระ

เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร BG-11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที โดยให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ทำการต่อเชื้อ (subculture) เมื่อเห็นว่ามีความหนาแน่นของเซลล์มาก และตรวจสอบการปนเปื้อนอย่างสม่ำเสมอโดยส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การเตรียมเซลล์เริ่มต้น *Anabaena azollae*

3.1 เก็บตัวอย่างเซลล์อิสระ *A. azollae* ที่เพาะเลี้ยงไว้ปริมาตร 5 มิลลิลิตรไปวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เพื่อคำนวณความหนาแน่นของเซลล์ ในหน่วยไมโครกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร

3.2 คำนวณปริมาตรของเซลล์อิสระเริ่มต้นที่ต้องการใช้เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์(ปริมาณคลอโรฟิลล์) ในสารละลายที่ต้องการ

3.3 นำเซลล์อิสระ *A. azollae* ที่เพาะเลี้ยงไว้ปริมาตรที่ต้องการไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3200 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

3.4 เทส่วนของเหลวใสทิ้งแล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปละลายในอาหารเหลวในกรณีที่ต้องการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ หรือละลายในสารละลายอัลจิเนตหรือสารละลายไคโตซานในกรณีที่ต้องการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงเพื่อให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ในหน่วยไมโครกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร ตามที่ต้องการ

4. การตรึงเซลล์โดยใช้ไคโตซาน (รินดาและคณะ 2541)

4.1 เตรียมสารละลายไคโตซานโดยใช้ไคโตซานที่เป็นเกล็ด 10 กรัม เติมกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 2 จากนั้นนำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 วัน

4.2 เติมเซลล์ในรูปของตะกอนเซลล์ที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงลงในสารละลายไคโตซานที่เตรียมไว้ แล้วผสมให้เข้ากัน

4.3 นำสารละลายไคโตซานที่ผสมเซลล์เรียบร้อย แล้วหยดลงในสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟตเข้มข้นร้อยละ 1.5 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยมีการกวนตลอดเวลา

4.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้เม็ดไคโตซานมีความคงตัวดีขึ้น

4.5 นำเซลล์ตรึงเม็ดไคโตซานที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การตรึงเซลล์โดยใช้โซเดียมอัลจิเนต (Brouers และคณะ 1989)

5.1 เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต โดยชั่งโซเดียมอัลจิเนต 1 กรัมในน้ำที่ปราศจากไอออน (Deionization) ปริมาตร 99 มิลลิลิตรและกวนตลอดเวลาจนกลายเป็นเนื้อเดียวกัน

5.2 การขึ้นรูปโซเดียมอัลจิเนต เตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ 14.7 กรัม ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน 1 ลิตร นำสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในเข็มฉีดยาปริมาตร 25 มิลลิลิตรแล้วนำไปหยดในบีคเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตรที่มีสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และกวนตลอดเวลา ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่งโมง เพื่อให้เม็ดโซเดียมอัลจิเนตมีความคงตัวดีขึ้นและปรับสภาพให้เป็นกลางโดยใช้น้ำที่ปราศจากไอออนล้าง 2 ครั้ง

6. การละลายเซลล์ตรึงเม็ดอัลจิเนต (Brouers และคณะ 1989)

6.1 นำเซลล์ตรึงเม็ดอัลจิเนตมาเติมลงในสารละลายโซเดียมซิเตรตความเข้มข้นร้อยละ 15

6.2 ทำการคนตลอดเวลาจนกระทั่งเซลล์ตรึงเม็ดอัลจิเนตละลายจนหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. การวัดปริมาณแอมโมเนียในสารละลาย (Morrison, 1971)

1.1 สารเคมี

3.1.1 เนสเลอร์รีเอเจนท์ (Nessler reagent)

ละลาย HgI_2 100 กรัม และ KI 70 กรัม ในน้ำเล็กน้อย แล้วคนเบาๆ นำมาเทลงในสารละลาย NaOH 160 กรัม ที่ละลายอยู่ในน้ำ 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ปิดฝาและเก็บไว้ในที่มืด

3.1.2 สารละลายซิงค์ซัลเฟต

ละลาย $ZnSO_4.7H_2O$ 100 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

3.1.3 EDTA

ละลายไดโซเดียมเอทิลีนไดเอมีนเตตร้าอะซิเตต 50 กรัม ในน้ำ 60 มิลลิลิตรที่มี NaOH 10 กรัม ละลายอยู่ ให้ความร้อนเล็กน้อยแล้วเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียมตัวอย่าง

กำจัด chlorinated ออกจากตัวอย่างโดยการเติม chlorinating agent โดยเติม $ZnSO_4$ 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม 6 N NaOH 0.4-0.5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ทิ้งไว้ 2-3 นาที จะเกิดตะกอนขุ่นขึ้นกรองเอาตะกอนออก

1.3 การเกิดสี

1.3.1 นำตัวอย่างที่ผ่านการกรองปริมาตร 10 มิลลิลิตร

1.3.2 เติม EDTA 1 หยดเขย่าให้เข้ากันแล้วเติมเนสเลอร์รีเอเจนท์ 0.5 มิลลิลิตร

1.3.3 ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาทีเกิดสี

1.3.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร โดยใช้น้ำที่ปราศจากแอมโมเนียเป็นแบลงค์

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในสารละลาย

ทำได้จากนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหาปริมาณแอมโมเนีย โดยทำการแทนค่าสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานก็จะได้ปริมาณแอมโมเนียในสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การสร้างกราฟมาตรฐานของแอมโมเนียจากการวัดโดยวิธีของเนสเลอร์ (Morrison, 1971)

2.1 วิธีการวัดปริมาณแอมโมเนีย

2.1.1 ทำการเตรียมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่รู้ความเข้มข้นแน่นอน

2.1.2 นำลายละลายมาทดสอบกับเนสเลอร์รีเอเจนท์

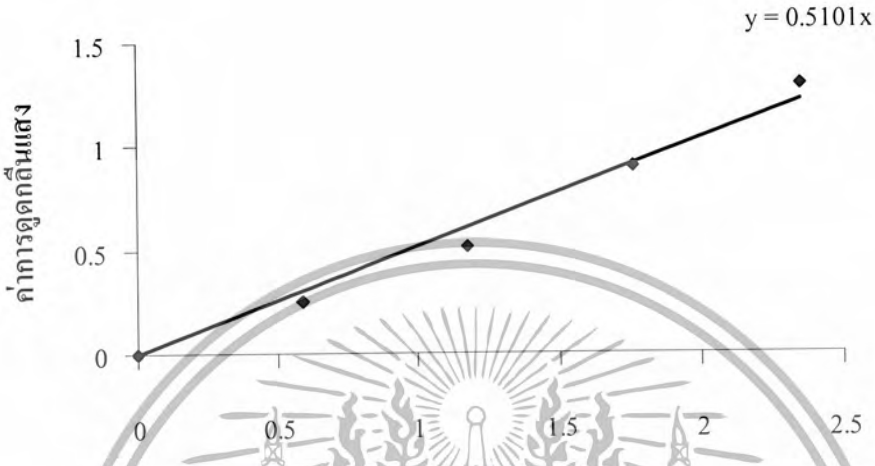
2.1.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร

2.1.4 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอมโมเนียและค่าการดูดกลืนแสง

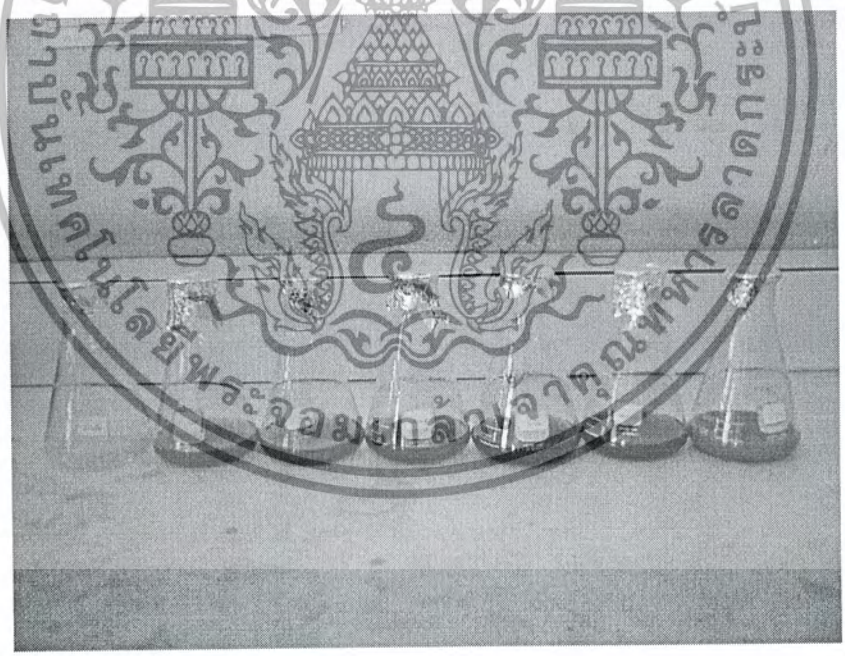
ตารางที่ ข1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตรที่ได้จากการวัดปริมาณแอมโมเนียในสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ปริมาณแอมโมเนียในสารละลายมาตรฐาน (mM)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 425 nm
0.0000	0.000
0.5882	0.256
1.1764	0.434
1.7646	0.899
2.3528	1.295

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข1 กราฟมาตรฐานปริมาณแอมโมเนีย



รูปที่ ข2 สีของสารประกอบเชิงซ้อนของเนสเลอร์รีเอเจนท์ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข2 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตรในการหาปริมาณแอมโมเนียของเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงในระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.256	0.324	0.307	0.408	0.503	0.561	0.601	0.582	0.563	0.532
2	0.226	0.229	0.335	0.419	0.579	0.572	0.583	0.554	0.551	0.518
3	0.244	0.268	0.366	0.429	0.565	0.580	0.546	0.598	0.575	0.537

ตารางที่ ข3 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตรในการหาปริมาณแอมโมเนียของเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงในระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.235	0.303	0.416	0.477	0.486	0.507	0.520	0.469	0.445	0.433
2	0.218	0.309	0.434	0.487	0.499	0.501	0.501	0.500	0.498	0.443
3	0.240	0.297	0.431	0.482	0.488	0.510	0.476	0.477	0.473	0.429

ตารางที่ ข4 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตรในการหาปริมาณแอมโมเนียของเซลล์อิสระที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงในระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.218	0.239	0.280	0.310	0.330	0.341	0.346	0.345	0.340	0.326
2	0.227	0.240	0.271	0.300	0.330	0.343	0.345	0.349	0.337	0.330
3	0.218	0.235	0.274	0.293	0.327	0.339	0.344	0.344	0.328	0.325

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข5 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ของเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงในระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.213	0.210	0.233	0.216	0.208	0.227	0.217	0.214	0.211	0.206
2	0.208	0.226	0.212	0.220	0.216	0.218	0.206	0.229	0.225	0.216
3	0.210	0.215	0.214	0.227	0.215	0.232	0.215	0.234	0.217	0.212

ตารางที่ ข6 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ของเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงในระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.215	0.213	0.229	0.210	0.221	0.230	0.218	0.224	0.230	0.221
2	0.241	0.212	0.213	0.213	0.216	0.206	0.229	0.213	0.215	0.205
3	0.212	0.205	0.220	0.214	0.215	0.217	0.216	0.222	0.223	0.213

ตารางที่ ข7 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ของเซลล์อิสระที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงในระยะเวลาต่างๆ (ชั่วโมง)									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.213	0.217	0.206	0.207	0.234	0.235	0.228	0.214	0.208	0.216
2	0.212	0.224	0.215	0.212	0.220	0.222	0.207	0.239	0.230	0.225
3	0.226	0.215	0.226	0.233	0.237	0.240	0.214	0.216	0.215	0.245

หมายเหตุ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร เมื่อเริ่มต้นการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0) ใช้เป็นค่าแบลงค์ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 วิธีการคำนวณปริมาณแอมโมเนีย

สารละลายที่นำมาวัดปริมาณแอมโมเนียปริมาตร 25 มิลลิลิตร คือ สารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5019 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

จากกราฟมาตรฐานแอมโมเนีย ได้ความสัมพันธ์ว่า

ความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนีย (มิลลิโมลาร์) = $1.9604\ (Abs_{425})$

โดยที่ Abs_{425} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร

สารละลายที่นำมาวัดปริมาณแอมโมเนีย 1000 มิลลิลิตร จะมีแอมโมเนีย = $1.9604\ (Abs_{425})$ มิลลิโมล

สารละลายที่นำมาวัดปริมาณแอมโมเนีย 25 มิลลิลิตร จะมีแอมโมเนีย = $\frac{1.9604\ (Abs_{425})}{40}$ มิลลิโมล

= $0.04901(Abs_{425})$ มิลลิโมล

สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5019 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มีแอมโมเนีย

= $0.5019/50 = 10.038 \times 10^{-3}$ มิลลิโมล

ดังนั้นสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร จะมีแอมโมเนีย = $0.04901(Abs_{425}) - 10.038 \times 10^{-3}$ มิลลิโมล

สารละลายตัวอย่าง 1000 มิลลิลิตร จะมีแอมโมเนีย = $(0.04901(Abs_{425}) - 10.038 \times 10^{-3})200$ มิลลิโมล

= $9.802(Abs_{425}) - 2.0076$ มิลลิโมล

ดังนั้นสารละลายตัวอย่างจะมีความเข้มข้นของแอมโมเนีย = $9.802(Abs_{425}) - 2.0076$ มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข8 ปริมาณแอมโมเนียจากเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ปริมาณแอมโมเนีย(mM)ที่ได้ในระยะเวลาต่างๆ (ชั่วโมง)									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.502	1.168	1.000	1.992	2.923	3.491	3.883	3.697	3.511	3.207
2	0.208	0.237	1.276	2.099	3.668	3.599	3.707	3.423	3.393	3.070
3	0.384	0.619	1.580	2.197	3.531	3.678	3.344	3.854	3.629	3.256
เฉลี่ย	0.365	0.677	1.285	2.096	3.374	3.589	3.645	3.658	3.511	3.178

ตารางที่ ข9 ปริมาณแอมโมเนียจากเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ปริมาณแอมโมเนีย(mM)ที่ได้ในระยะเวลาต่างๆ (ชั่วโมง)									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.296	0.962	2.07	2.668	2.756	2.962	3.089	2.590	2.354	2.237
2	0.129	1.021	2.246	2.766	2.884	2.903	2.903	2.893	2.874	2.335
3	0.345	0.904	2.217	2.717	2.776	2.991	2.658	2.668	2.629	2.197
เฉลี่ย	0.257	0.962	2.178	2.717	2.805	2.952	2.883	2.717	2.619	2.256

ตารางที่ ข10 ปริมาณแอมโมเนียจากเซลล์อิสระที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ปริมาณแอมโมเนีย(mM)ที่ได้ในระยะเวลาต่างๆ (ชั่วโมง)									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.129	0.335	0.737	1.031	1.227	1.335	1.384	1.374	1.325	1.188
2	0.217	0.345	0.649	0.933	1.227	1.354	1.374	1.413	1.296	1.227
3	0.129	0.296	0.678	0.864	1.198	1.315	1.364	1.364	1.207	1.178
เฉลี่ย	0.158	0.325	0.688	0.943	1.217	1.335	1.374	1.384	1.276	1.198

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข11 ปริมาณแอมโมเนียจากเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ปริมาณแอมโมเนีย(mM)ที่ได้ในระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.080	0.051	0.276	0.110	0.031	0.217	0.119	0.090	0.061	0.012
2	0.031	0.208	0.070	0.149	0.110	0.129	0.012	0.237	0.198	0.110
3	0.051	0.100	0.090	0.217	0.100	0.266	0.100	0.286	0.199	0.070
เฉลี่ย	0.054	0.120	0.145	0.159	0.080	0.204	0.077	0.204	0.153	0.064

ตารางที่ ข12 ปริมาณแอมโมเนียจากเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ปริมาณแอมโมเนีย(mM)ที่ได้ในระยะเวลาต่างๆ (ชั่วโมง)									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.100	0.080	0.237	0.051	0.159	0.246	0.129	0.188	0.246	0.159
2	0.355	0.070	0.080	0.080	0.110	0.012	0.237	0.080	0.100	0.002
3	0.070	0.002	0.149	0.090	0.100	0.119	0.110	0.168	0.178	0.080
เฉลี่ย	0.175	0.051	0.155	0.074	0.123	0.126	0.159	0.145	0.175	0.080

ตารางที่ ข13 ปริมาณแอมโมเนียจากเซลล์อิสระที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ปริมาณแอมโมเนีย(mM)ที่ได้ในระยะเวลาต่างๆ (ชั่วโมง)									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.080	0.119	0.012	0.021	0.286	0.296	0.227	0.090	0.031	0.110
2	0.070	0.188	0.100	0.070	0.149	0.168	0.021	0.335	0.247	0.198
3	0.208	0.100	0.208	0.208	0.315	0.345	0.090	0.110	0.100	0.394
เฉลี่ย	0.119	0.136	0.107	0.100	0.250	0.270	0.113	0.178	0.126	0.234

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข14 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตรที่วัดได้ที่ระยะเวลาต่างๆ จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตโดยเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุก 20 ชั่วโมง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสง		
		1	2	3
6	1	0.304	0.286	0.289
13	1	0.515	0.527	0.530
20	1	0.601	0.598	0.606
26	1	0.654	0.663	0.649
33	1	0.737	0.749	0.740
40	2	0.523	0.512	0.509
46	2	0.558	0.532	0.547
53	2	0.577	0.584	0.580
60	2	0.590	0.599	0.586
66	2	0.586	0.584	0.579
73	2	0.571	0.567	0.558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข15 ผลของปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้ที่ระยะเวลาต่างๆ จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตโดยเติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีนทุก 20 ชั่วโมง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง			
	1	2	3	เฉลี่ย
6	3.883	3.854	3.932	3.890
13	4.403	4.491	4.354	4.416
20	5.216	5.334	5.246	5.265
26	6.238	6.022	5.963	6.074
33	6.924	6.414	6.708	6.682
40	7.296	7.434	7.355	7.362
46	7.551	7.728	7.473	7.584
53	7.473	7.434	7.336	7.414
60	7.179	7.100	6.924	7.068
66	3.883	3.854	3.932	3.890
73	4.403	4.491	4.354	4.416

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข16 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตรที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตแบบ 2 สภาวะสลับกันที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสง		
		1	2	3
10	1	0.454	0.528	0.461
20	1	0.528	0.535	0.529
30	1	0.577	0.597	0.592
40	1	0.791	0.758	0.783
50	2	0.561	0.560	0.554
60	2	0.589	0.576	0.577
68	2	0.581	0.583	0.580
78	2	0.622	0.636	0.640
88	2	0.653	0.669	0.663
98	2	0.703	0.707	0.685
108	3	0.563	0.548	0.544
118	3	0.581	0.582	0.591
128	3	0.605	0.611	0.604
136	3	0.608	0.611	0.612
146	3	0.619	0.628	0.634
156	3	0.633	0.641	0.629
176	3	0.649	0.646	0.642
186	3	0.632	0.653	0.655

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข17 ผลของปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยง *A. azollae* ในรูปเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตแบบ 2 สภาวะสลับกันที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง			
	1	2	3	เฉลี่ย
10	2.443	2.452	2.511	2.469
20	3.268	3.236	3.178	3.227
30	3.648	3.844	3.795	3.762
40	5.746	5.422	5.667	5.612
50	6.983	6.963	6.845	6.930
60	7.531	7.277	7.296	7.368
68	7.532	7.414	7.355	7.434
78	8.178	8.453	8.531	8.387
88	8.786	9.100	8.982	8.956
98	9.766	9.845	9.414	9.675
108	10.533	10.092	9.974	10.200
118	11.062	11.091	11.356	11.170
128	11.768	11.944	11.738	11.817
136	11.856	11.944	11.974	11.925
146	12.180	12.444	12.621	12.415
156	12.591	12.826	12.474	12.630
176	13.062	12.973	12.886	12.974
186	12.562	13.179	13.238	12.993

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ (Gregor และ Marsalak, 2004)

3.1 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

3.1.1 ทำการปั่นเหวี่ยงสาหร่ายเพื่อแยกสาหร่ายออกจากอาหารเหลว โดยปั่นเหวี่ยงสารละลายสาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 3,200 rpm นาน 15 นาที

3.1.2 แยกเอาส่วนใสทิ้งไปแล้ว นำสาหร่ายที่แยกได้มาสกัดคลอโรฟิลล์โดยเติม 80 เปอร์เซ็นต์อะซิโตนลงไปแล้วทิ้งไว้ 1 คืนในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.3 นำสารละลายอะซิโตนที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 โนนาเมตร

3.1.4 คำนวณค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ในหน่วยมก.คลอโรฟิลล์ต่อ มล. ดังสมการ

$$\text{มก.คลอโรฟิลล์ต่อมล.} = (0.0202 \times Abs_{645}) + (0.00802 Abs_{663})$$

ตารางที่ ข18 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร ในชั่วโมงที่										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.241	0.230	0.242	0.240	0.238	0.235	0.249	0.284	0.294	0.302	0.326
2	0.237	0.234	0.239	0.240	0.241	0.242	0.244	0.272	0.284	0.295	0.324
3	0.230	0.235	0.242	0.234	0.247	0.237	0.245	0.281	0.292	0.300	0.319
ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร ในชั่วโมงที่										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.227	0.247	0.225	0.233	0.240	0.245	0.232	0.284	0.284	0.293	0.311
2	0.231	0.239	0.238	0.240	0.242	0.243	0.240	0.262	0.275	0.288	0.299
3	0.238	0.246	0.248	0.235	0.238	0.241	0.242	0.276	0.284	0.295	0.302

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข19 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์อิสระที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร ในชั่วโมงที่										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.234	0.228	0.238	0.239	0.232	0.257	0.256	0.270	0.287	0.350	0.337
2	0.240	0.240	0.243	0.246	0.241	0.239	0.249	0.260	0.282	0.333	0.363
3	0.246	0.243	0.245	0.247	0.244	0.248	0.254	0.259	0.286	0.328	0.350
ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร ในชั่วโมงที่										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.243	0.239	0.241	0.242	0.224	0.242	0.246	0.264	0.286	0.274	0.336
2	0.239	0.240	0.240	0.243	0.239	0.243	0.245	0.257	0.273	0.291	0.356
3	0.232	0.238	0.242	0.247	0.248	0.250	0.253	0.256	0.269	0.278	0.337

ตารางที่ ข20 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร ในชั่วโมงที่										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.252	0.247	0.259	0.253	0.258	0.263	0.269	0.299	0.322	0.335	0.349
2	0.249	0.253	0.258	0.257	0.253	0.264	0.268	0.304	0.317	0.336	0.340
3	0.244	0.256	0.254	0.266	0.262	0.259	0.258	0.301	0.310	0.318	0.333
ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร ในชั่วโมงที่										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.235	0.239	0.242	0.249	0.241	0.256	0.258	0.277	0.280	0.294	0.303
2	0.231	0.234	0.247	0.251	0.259	0.259	0.266	0.269	0.286	0.287	0.352
3	0.242	0.247	0.244	0.246	0.247	0.262	0.262	0.271	0.279	0.298	0.348

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข21 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์อิสระที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร ในชั่วโมงที่										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.267	0.270	0.271	0.275	0.279	0.283	0.290	0.304	0.327	0.341	0.356
2	0.259	0.264	0.273	0.267	0.275	0.279	0.287	0.317	0.330	0.349	0.349
3	0.255	0.269	0.268	0.276	0.280	0.288	0.287	0.299	0.334	0.339	0.348
ชุดการทดลองที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร ในชั่วโมงที่										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	0.242	0.246	0.239	0.249	0.256	0.252	0.264	0.283	0.286	0.297	0.316
2	0.247	0.245	0.250	0.254	0.239	0.259	0.257	0.279	0.290	0.299	0.306
3	0.238	0.240	0.253	0.244	0.259	0.263	0.261	0.268	0.288	0.304	0.311

หมายเหตุ เซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานไม่ได้ถูกวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เนื่องจากไม่พบวิธีการละลายเม็ดไคโตซานเพื่อวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์

อัตราส่วนของ น้ำหนักเม็ดเจลตรึงสาหร่าย : ปริมาตรอาหาร เป็น 1.25 กรัม : 5 มิลลิลิตร ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างอาหารปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปวัดปริมาณแอมโมเนียจะเก็บเม็ดเจลตรึงสาหร่ายออกมา 1.25 กรัม มาวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยการสกัดด้วยสารละลายอะซีโตนเข้มข้นร้อยละ 80 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

จากสูตร

ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ (ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์/มล.) = $20.2(Abs_{645}) + 8.02(Abs_{663})$

ในสารละลายอะซิโตน 10 มิลลิลิตร จะมีคลอโรฟิลล์ = $202 (Abs_{645}) + 80.2(Abs_{663})$ ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์

ในเม็ดตรึงสาหร่าย 1.25 กรัม จะมีคลอโรฟิลล์ = $202 (Abs_{645}) + 80.2(Abs_{663})$ ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์

ในสารละลายอาหาร 5 มิลลิลิตร จะมีคลอโรฟิลล์ = $202 (Abs_{645}) + 80.2(Abs_{663})$ ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์

ดังนั้นในสารละลายอาหารจะมีความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์

= $(202 (Abs_{645}) + 80.2(Abs_{663}))/ 5$ ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร

= $40.4 (Abs_{645}) + 16.04(Abs_{663})$ ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข22 ผลของปริมาณคลอโรฟิลล์เพื่อใช้ในการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ปริมาณคลอโรฟิลล์(ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร)										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	13.38	13.25	13.39	13.43	13.47	13.42	13.78	16.03	16.43	16.90	18.16
2	13.29	13.29	13.47	13.55	13.62	13.68	13.71	15.19	15.89	16.54	17.89
3	13.11	13.44	13.76	13.22	13.80	13.44	13.78	15.78	16.35	16.85	17.73
เฉลี่ย	13.26	13.33	13.54	13.40	13.63	13.51	13.76	15.67	16.22	16.76	17.93

ตารางที่ ข23 ผลของปริมาณคลอโรฟิลล์เพื่อใช้ในการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในเซลล์อิสระที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ปริมาณคลอโรฟิลล์(ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร)										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	13.72	13.05	13.48	13.54	13.00	14.26	14.29	15.14	16.18	18.54	19.00
2	13.53	13.55	13.70	13.84	13.57	13.55	13.99	14.63	15.77	18.12	20.04
3	13.66	13.64	13.78	13.94	13.84	14.03	14.32	14.57	15.87	17.71	19.55
เฉลี่ย	13.64	13.41	13.65	13.77	13.47	13.95	14.20	14.78	15.94	18.12	19.53

ตารางที่ ข24 ผลของปริมาณคลอโรฟิลล์เพื่อใช้ในการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ปริมาณคลอโรฟิลล์(ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร)										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	13.95	13.81	14.35	14.22	14.29	14.73	15.01	16.52	17.55	18.25	18.96
2	13.77	13.98	14.39	14.38	14.38	14.82	15.01	16.60	17.39	18.18	18.71
3	13.74	14.30	14.19	14.55	14.55	14.63	14.63	16.49	17.00	17.63	18.25
เฉลี่ย	13.82	14.03	14.31	14.38	14.40	14.73	14.88	16.54	17.31	18.02	18.64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข25 ผลของปริมาณคลอโรฟิลล์เพื่อใช้ในการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในเซลล์อิสระที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

ชุดการทดลองที่	ปริมาณคลอโรฟิลล์(ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร)										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	14.67	14.85	14.78	15.10	15.38	15.48	15.95	16.82	17.80	18.54	19.45
2	14.43	14.60	14.80	14.80	14.94	15.51	15.80	16.88	17.97	18.90	19.13
3	14.12	14.77	14.89	15.06	15.47	15.73	15.81	16.38	18.11	18.57	19.05
เฉลี่ย	14.40	14.74	14.82	14.99	15.26	15.57	15.85	16.69	17.96	18.67	19.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่โดยใช้ค่าสถิติ Duncans's new multiple rang test (DMRT)

จากตารางที่ ข8 ข9 ข10 ข11 ข12และข13 สามารถนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างในการผลิตแอมโมเนียของเซลล์อิสระ เซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต และเซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานที่มีและไม่มีเมทไธ-โอนีนซัลฟอกซิมีนในเวลาต่างๆ (ตารางที่ ค1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค1 การเปรียบเทียบการผลิตแอมโมเนียของเซลล์อิสระและเซลล์สาหร่ายในวัสดุตรึงที่เวลาต่างๆที่มีและไม่มีเมทไธโอนีนในระยะเวลาต่างๆ

ลักษณะการเจริญของสาหร่าย	ปริมาณแอมโมเนีย (mM) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
(1)	0.37^{a}	0.68^{ab}	1.29^{b}	2.10^{b}	3.37^{a}	3.59^{a}	3.65^{a}	3.66^{a}	3.51^{a}	3.18^{a}
(2)	0.26^{ab}	0.96^{a}	2.18^{a}	2.72^{a}	2.81^{b}	2.95^{b}	2.88^{b}	2.72^{b}	2.62^{b}	2.26^{b}
(3)	0.16^{b}	0.33^{bc}	0.69^{c}	0.94^{c}	1.22^{c}	1.34^{c}	1.37^{c}	1.38^{c}	1.27^{c}	1.20^{c}
(4)	0.05^{b}	0.12^{c}	0.15^{d}	0.16^{d}	0.08^{d}	0.20^{d}	0.08^{d}	0.20^{d}	0.15^{d}	0.06^{e}
(5)	0.18^{ab}	0.05^{c}	0.15^{d}	0.07^{d}	0.12^{d}	0.13^{d}	0.16^{d}	0.15^{d}	0.18^{d}	0.08^{e}
(6)	0.12^{b}	0.14^{c}	0.11^{d}	0.10^{d}	0.25^{d}	0.27^{d}	0.11^{d}	0.18^{d}	0.13^{d}	0.23^{d}

หมายเหตุ - (1) เซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

(2) เซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

(3) เซลล์อิสระที่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

(4) เซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

(5) เซลล์ตรึงในเม็ดไคโตซานที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

(6) เซลล์อิสระที่ไม่เติมเมทไธโอนีนซัลฟอกซิมีน

- ตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขั้นตอนการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของสาหร่ายเพื่อให้ปริมาณแอมโมเนียมากที่สุด จากตารางที่ ข8 สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณแอมโมเนียในเลี้ยงเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 18 21 และ 24 ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ผลิตแอมโมเนียได้มากที่สุด (ตารางที่ ค2)

ตารางที่ ค2 การเปรียบเทียบปริมาณแอมโมเนียที่ผลิตได้ในการเลี้ยงเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนต ในชั่วโมงที่ 18 21 และ 24

ชั่วโมงที่	ปริมาณแอมโมเนีย (mM)
18	3.59[a]
21	3.65[a]
24	3.66[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ ข22 ข23 ข24 และ ข25 สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณคลอโรฟิลล์ในการเลี้ยงเซลล์สาหร่ายแบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่มีและไม่มีเมทไทโอนีนซัลฟอกซิมีนได้เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่ายในแต่ละลักษณะ (ตารางที่ ค3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค3 ผลการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในแต่ละลักษณะการเจริญ

ลักษณะ	ปริมาณคลอโรฟิลล์ (ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์/มิลลิลิตร) ในชั่วโมงที่										
การเจริญ	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
(1)	13.26^{c}	13.33^{c}	13.54^{b}	13.40^{c}	13.63^{b}	13.51^{b}	13.76^{c}	15.67^{d}	16.22^{b}	16.76^{c}	17.93^{c}
(2)	13.51^{b}	13.40^{c}	13.64^{b}	13.77^{b}	13.46^{b}	13.95^{b}	14.20^{c}	14.78^{c}	15.94^{b}	18.12^{b}	19.64^{b}
(3)	13.82^{b}	14.31^{b}	14.99^{a}	16.54^{a}	18.02^{a}	19.23^{a}	20.61^{b}	23.49^{b}	22.82^{a}	22.37^{a}	21.58^{a}
(4)	14.40^{a}	14.82^{a}	15.26^{a}	16.69^{a}	17.96^{a}	19.21^{a}	22.36^{a}	24.57^{a}	22.89^{a}	22.27^{a}	21.92^{a}

หมายเหตุ - (1) เซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่เติมเมทไทโอนีนซัลฟอกซิมีน

(2) เซลล์อิสระที่เติมเมทไทโอนีนซัลฟอกซิมีน

(3) เซลล์ตรึงในเม็ดอัลจิเนตที่ไม่เติมเมทไทโอนีนซัลฟอกซิมีน

(4) เซลล์อิสระที่ไม่เติมเมทไทโอนีนซัลฟอกซิมีน

- ตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้