

การเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของไซยาโนแบคทีเรีย
Synechocystis sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและ
สายพันธุ์กลาย

GROWTH AND LIPID ACCUMULATION OF WILDTYPE
AND MUTANT STRAINS OF CYANOBACTERIUM
Synechocystis sp. PCC 6803



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GROWTH AND LIPID ACCUMULATION OF WILDTYPE
AND MUTANT STRAINS OF CYANOBACTERIUM

Synechocystis sp. PCC 6803



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย Growth and lipid accumulation of wildtype and mutant strains of cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
ชื่อนักศึกษา	นางสาวอาทิตย์ยา สุขะหลาน รหัสนักศึกษา 63050436
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2566

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ	
รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การเจริญเติบโตและการสะสมลิปิดของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย
ชื่อนักศึกษา	นางสาวอาทิตย์ยา สุยะหลาน รหัสนักศึกษา 63050436
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์

บทคัดย่อ

ปัญหาเชื้อเพลิงฟอสซิลที่มีปริมาณจำกัดและก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมอย่างรุนแรง จึงทำให้เกิดความสนใจในการค้นหาพลังงานสะอาด หมุนเวียนได้และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยพลังงานสะอาดที่น่าสนใจ คือ ไบโอดีเซลสามารถผลิตได้จากลิพิดจากพืช สัตว์หรือสาหร่ายขนาดเล็ก ซึ่งสาหร่ายขนาดเล็กจำพวกไซยาโนแบคทีเรียถือเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลที่มีศักยภาพอย่างมาก โดยในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจากการทดลองการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1% มีการสะสมลิพิดและการเจริญเติบโตที่สูงกว่าในอาหารเหลว BG11 และในสภาวะการขาดธาตุไนโตรเจน โดยสายพันธุ์ที่มีปริมาณลิพิดสูงสุดและอัตราการผลิตสูงสุด คือ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔP ในวันที่ 7 โดยจะมีปริมาณลิพิดและอัตราการผลิตลิพิดเท่ากับ 29.400 ± 0.741 เปอร์เซ็นต์ และ 15.435 ± 0.039 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวันเนื่องจากการเติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลทำให้การเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นจึงส่งผลให้ปริมาณชีวมวลเพิ่มสูงมากขึ้น

คำสำคัญ : การเจริญเติบโต, การสะสมลิพิด, ไซยาโนแบคทีเรีย

Title	Growth and lipid accumulation of wildtype and mutant strains of cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
Students	Miss Arthittaya Suyalan Student ID 63050436
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2023
Advisor	Assoc.Prof.Dr. Saranya Phunpruch

Abstract

The limited availability of fossil fuels and serious environmental issues have increased people's interest in finding clean and renewable energy sources. One intriguing option is biodiesel, which can be produced from the lipids of plants, animals, or algae. Cyanobacteria are promising raw materials for biodiesel production due to their significant potential. This study focuses on the factors influencing the growth and lipid accumulation of wild-type and mutant strains of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Adding glucose to BG11 medium during cultures was investigated. A concentration of 0.1% glucose resulted in higher growth and lipid accumulation under nitrogen deprivation conditions in BG11 medium, yielding the highest lipid content of $29.400 \pm 0.741\%$ and production of 15.435 ± 0.039 mg/L/day. At the 7th day of cultivation, the mutant strain *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔP exhibited a lipid content of $29.400 \pm 0.741\%$ and lipid production of 15.435 ± 0.039 mg/L/day.

Keywords : Growth, Lipid accumulation, Cyanobacteria

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความช่วยเหลือและการถ่ายทอดวิชาความรู้จาก รศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ให้คำแนะนำและให้ข้อคิดเห็นในการวิจัย การแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขโครงการพิเศษเล่มนี้ ทำให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความเมตตาและการเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ธนะกาญจน์ มัญชุพานี อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการอบรมให้ความรู้ รวมทั้งข้อแนะนำด้านการปฏิบัติงาน ตลอดเวลาในการศึกษาที่แห่งนี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ ที่ช่วยเหลือในการเบิกอุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลองนี้ ทำให้เกิดผลสำเร็จในงาน รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ ในห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล ที่ให้คำปรึกษาและข้อแนะนำในทุกๆ เรื่อง

ประโยชน์และคุณค่าของโครงการพิเศษฉบับนี้ ผู้จัดทำขอขอบแต่ บิดา มารดา คณาจารย์ ที่ให้การอบรมสั่งสอน ฝ่าฝืนและให้ทุนทรัพย์ในการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ช่วยให้กำลังใจในการแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่างๆ โครงการพิเศษคงไม่สำเร็จได้ด้วยดีถ้าไม่มีบุคคลที่เอื้อนามนี้

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงการพิเศษเล่มนี้จะให้คุณประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจศึกษาเกี่ยวกับ การเจริญเติบโตและการสะสมลิปิดของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย เพื่อนำไปสู่การปรับปรุงและพัฒนาต่อในงานวิจัยด้านการปรับปรุงการผลิตของไซยาโนแบคทีเรียต่อไป

อาทิตยา สุยะหลาน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 พลังงานทดแทน.....	4
2.2 ลิพิด.....	5
2.2.1 โครงสร้างลิพิด.....	5
2.2.2 ประเภทของลิพิด.....	5
2.3 ไชยาโนแบคทีเรีย.....	6
2.3.1 ลักษณะของไชยาโนแบคทีเรีย.....	6
2.3.2 โครงสร้างของไชยาโนแบคทีเรีย.....	6
2.3.3 ประโยชน์ของไชยาโนแบคทีเรีย.....	6
2.4 ไชยาโนแบคทีเรีย <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	7
2.4.1. ลักษณะและโครงสร้าง <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	7
2.4.2. <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย.....	8
2.5 การสะสมลิพิดภายในของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	9
2.5.1 กระบวนการสังเคราะห์ลิพิด.....	9
2.5.2 วิธีการสกัดลิพิด.....	9
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 ไชยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในโรงงานพิเศษ.....	12
3.2 สารเคมี.....	12
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	12
3.2.2 สารเคมี.....	12
3.3 อุปกรณ์.....	12
3.4 วิธีการดำเนินงาน.....	14
3.4.1 การเพาะเลี้ยง <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	14
3.4.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ.....	14
3.4.1.2 การเพาะเลี้ยง <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ต่างๆ.....	14
3.4.2 การวัดการเจริญของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 ทั้ง 8 สายพันธุ์.....	14
3.4.2.1 การวัดการเจริญของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 โดยการวัดค่า	
การดูดกลืนแสง.....	14
3.4.2.2 การวัดการเจริญของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 โดยการวัด	
ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ.....	15
3.4.3 การสกัดลิพิดด้วยวิธี Single step.....	16
3.4.3.1 วิธีการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	16
3.4.3.2 การสกัดลิพิดด้วยวิธี Single step.....	16
3.4.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลิพิดของ <i>Synechocystis</i> sp.	
PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย.....	17
3.4.4.1 การศึกษาผลของการเติมน้ำตาลกลูโคสต่อการสะสมลิพิดของ	
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	17
3.4.4.2 การศึกษาผลของการขาดธาตุไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิดของ	
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 ในสภาวะการขาดธาตุไนโตรเจน.....	18
3.4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	18
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	19
4.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสาย	
พันธุ์กลาย.....	19
4.1.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง.....	19
4.1.2 ผลการวัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ.....	20
4.2 ผลการวัดปริมาณลิพิด(%) อัตราการผลิตลิพิดและอัตราการผลิตชีวมวลของ	
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย.....	23
4.3 ผลของการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลิพิดภายใน <i>Synechocystis</i> sp.	
PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย.....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับงานวิชาการเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1 ผลของการศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีผลต่อการ สะสมลิพิดภายใน <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและ สายพันธุ์กลาย.....	26
4.3.1.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง.....	26
4.3.1.2 ผลการวัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ.....	28
4.3.1.3 ผลการวัดปริมาณลิพิด อัตราการผลิตลิพิดและอัตราการผลิตชีวมวล.....	30
4.3.2 ผลของการศึกษาการขาดธาตุไนโตรเจนที่มีผลต่อการสะสมลิพิดภายใน <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย.....	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	37
5.1 สรุปผลงานวิจัย	37
5.2 ข้อเสนอแนะ	38
เอกสารอ้างอิง.....	39
ภาคผนวก.....	43
ภาคผนวก ก.....	44

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 อัตราการเจริญจำเพาะและระยะเวลาการทวีคูณของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ตั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร...	20
4.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ตั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย	22
4.3 อัตราการผลิตชีวมวล ปริมาณลิพิดและอัตราการผลิตลิพิดของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ตั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในวันที่ 7 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง.....	25
4.4 อัตราการเจริญจำเพาะและระยะเวลาการทวีคูณของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803สายพันธุ์ตั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.1%	27
4.5 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ตั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1%.....	30
4.6 อัตราการผลิตชีวมวล ปริมาณลิพิดและอัตราการผลิตลิพิดของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ตั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1% ในวันที่ 7 และ 14	33
4.7 อัตราการผลิตชีวมวล ปริมาณลิพิดและอัตราการผลิตลิพิดของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ตั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 7 วันและที่บ่มในอาหารขาดไนโตรเจนเป็นเวลา 3 วัน.....	36

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การผลิตไบโอดีเซล	4
2.2 โครงสร้างภายในเซลล์ของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	7
2.3 กระบวนการสังเคราะห์ชีวภาพภายในเซลล์ของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม	8
2.4 กระบวนการสังเคราะห์ลิพิดภายในเซลล์ของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	9
4.1 การเจริญเติบโตของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร	20
4.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ กลาย	21
4.3 ปริมาณลิพิดของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย	24
4.4 อัตราการผลิตลิพิดของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ของวันที่ 7 และ 14	24
4.5 การเจริญเติบโตของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ที่ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.1%	27
4.6 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ กลาย	29
4.7 ปริมาณลิพิดของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายของ ในอาหารเหลว BG11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1% ที่เพาะเลี้ยงในวันที่ 7 และ 14	31
4.8 อัตราการผลิตลิพิดของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1% ในวันที่ 7 และ 14	32
4.9 ปริมาณลิพิดของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่บ่ม ในอาหารขาดไนโตรเจนเป็นเวลา 3 วัน	35
4.10 อัตราการผลิตลิพิดของ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ กลายที่บ่มในอาหารขาดไนโตรเจนเป็นเวลา 3 วัน	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พลังงานเป็นองค์ประกอบขั้นพื้นฐานที่มีอิทธิพลต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ปัจจุบัน ทั่วโลกมีการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล ได้แก่ น้ำมัน ก๊าซธรรมชาติและถ่านหิน เป็นแหล่งพลังงานหลักโดยคิดเป็นประมาณ 86 เปอร์เซ็นต์ ของพลังงานทั้งหมด เมื่อประชากรโลกเพิ่มขึ้นทำให้ความต้องการในการใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด มีการประเมินว่าความต้องการพลังงานจะเพิ่มขึ้นมากกว่า 1 ใน 3 ในช่วงปี พ.ศ. 2578 แต่เชื้อเพลิงฟอสซิลมีปริมาณจำกัดและไม่สามารถนำมาหมุนเวียนได้ ปริมาณเชื้อเพลิงฟอสซิลสำรองก็ไม่อาจเพียงพอในอนาคต หากอัตราการบริโภคยังคงไม่เปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะในภาคอุตสาหกรรมและการขนส่ง นอกจากนี้ การเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลยังก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ ทำให้สภาพอากาศเปลี่ยนแปลงและเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะโลกร้อนจากการปล่อยก๊าซเรือนกระจกและเกิดละอองลอยที่มาจากการจราจร การผลิตไฟฟ้า โรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งก๊าซพวกนี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ระบบทางเดินหายใจและโรคอื่นๆ ในมนุษย์ มีงานวิจัยที่ได้ทำการประเมินผลกระทบที่เกิดจากมลพิษทางอากาศและก๊าซเรือนกระจกที่มีผลต่อสุขภาพประชาชน สภาพภูมิอากาศ พบว่า อัตราการเสียชีวิตที่เกิดจากมลพิษทางอากาศที่มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิลคิดเป็น 65% จึงจำเป็นต้องยุติการปล่อยก๊าซที่เกี่ยวข้องกับเชื้อเพลิงฟอสซิลให้เร็วที่สุด ด้วยเหตุทั้งหมดที่กล่าวมานี้ทำให้เกิดความสนใจในการค้นหาพลังงานที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สะอาด หมุนเวียนได้และยั่งยืนมาทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิล (Hossain, 2020; Al-Humairi, 2022; Miriam, 2017; Abas, 2015; Lelieveld, 2018)

พลังงานทดแทน คือ พลังงานที่ใช้แทนพลังงานจากน้ำมันเชื้อเพลิง ได้มาจากทรัพยากรตามธรรมชาติที่เติมได้ไม่จำกัด ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังน้ำ พลังงานความร้อนใต้พิภพ พลังงานทางทะเล พลังงานชีวภาพ โดยพลังงานทดแทนจะช่วยลดการปล่อยก๊าซและมลพิษทางอากาศได้ ช่วยลดต้นทุนและเพิ่มการเข้าถึงพลังงานได้เยอะมากขึ้น ยังถือเป็นแหล่งพลังงานที่สะอาดและยั่งยืน (United States Department of Energy, 1944) ในปัจจุบัน นักวิจัยมีความสนใจต่อการผลิตพลังงานชีวภาพเป็นจำนวนมาก เนื่องจากเป็นพลังงานที่หาได้จากวัสดุอินทรีย์ซึ่งหาได้โดยทั่วไป เช่น พืชผลหรือเศษพืชผลจากการเก็บเกี่ยว ขยะอินทรีย์จากครัวเรือน ธุรกิจและฟาร์ม เป็นต้น (Sustainable Energy Authority of Ireland (SEAI), 2023)

ปัจจุบัน ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงทดแทนและยั่งยืนสำหรับยานยนต์ที่มีแนวโน้มมากที่สุด ช่วยลดการปล่อย CO₂, SO₂, CO, HC และยังเป็นหนึ่งในพลังงานทางเลือกที่ใช้สำหรับเครื่องยนต์ได้ดี เนื่องจากมีความหนาแน่น และคุณสมบัติการเผาไหม้ใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลทั่วไป สามารถผลิตได้จากการรวมกันของน้ำมันหรือไขมันในธรรมชาติกับเมทานอลหรือเอทานอล วิธีการผลิตไบโอดีเซล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายวิธี เช่น การผสมโดยตรงหรือ Micro emulsion แต่วิธีที่นิยม คือ Transesterification เป็นปฏิกิริยาทางเคมีของไตรกลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์สายสั้นที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตโมโนเอสเทอร์ ส่วนวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตจะมีต้นทุนที่ถูกกว่าน้ำมันดีเซลทั่วไป เช่น น้ำมันที่บริโภคไม่ได้ ไขมันสัตว์ น้ำมันที่ใช้แล้ว ผลพลอยที่ได้จากการกลั่นน้ำมันพืชและไขมันที่ได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก (Huang และคณะ, 2012)

ลิปิด หรือ ไขมัน เป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ โครงสร้างโดยทั่วไปประกอบด้วย กลีเซอรอล โมเลกุลที่มีกรดไขมัน (หมู่ที่ไม่ชอบน้ำ) และหมู่ฟอสเฟต (หมู่ที่ชอบน้ำ) ในเยื่อหุ้มเซลล์ ฟอสโฟลิพิดจะจัดเรียงเป็น 2 ชั้น ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์และเป็นเกราะป้องกันโมเลกุลบางชนิด ให้โมเลกุลสามารถเข้าออกเซลล์ได้ (Ahmed และคณะ, 2023) ในงานวิจัยต่างๆ มีการประยุกต์ใช้ลิปิดเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์หลากหลายประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์อาหาร ผลิตภัณฑ์ยา ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และที่กำลังเป็นที่น่าสนใจในปัจจุบัน คือ การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันจากพืช เช่น มะพร้าว ปาล์ม น้ำมัน ถั่วลิสง งา ทานตะวัน ละหุ่ง ถั่วเหลือง (สถาบันพลังงาน มช., 2020) แต่ในความเป็นจริง การจะสกัดน้ำมันต้องใช้พืชจำนวนมาก ทำให้ต้องใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกที่มีขนาดใหญ่และบรรจุได้เยอะ อีกทั้งยังต้องใช้เครื่องมือและแรงคนจำนวนมาก นักวิจัยจึงมุ่งเน้นไปที่พืชหรือสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็ก ใช้พื้นที่น้อยและเจริญเติบโตได้ไว ซึ่งก็คือ สาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ ไดอะตอม สาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีน้ำตาลทองและไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรีย หรือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่มีหลากหลายสายพันธุ์ ทำให้สามารถเลือกสายพันธุ์ให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมตามภูมิประเทศและภูมิอากาศตามแต่ละพื้นที่ได้ มีอัตราการเจริญเติบโตสูง ใช้พื้นที่และระยะเวลาในการผลิตน้อย ในกระบวนการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียต้องการเพียงแค่แสง น้ำ แห่่งคาร์บอนและสารอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส เหล็กและกำมะถัน นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงสายพันธุ์หรือปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงให้ไซยาโนแบคทีเรียมีการให้ผลิตลิปิดที่มากขึ้นหรือมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงขึ้น (Hannon และคณะ, 2010) จากที่กล่าวมาข้างต้น โครงการพิเศษนี้จึงสนใจศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิปิดภายใน *Synechocystis sp. PCC 6803* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis sp. PCC 6803* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย
- 2) เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมปริมาณลิปิดใน *Synechocystis sp. PCC 6803* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ศึกษาการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายรวมทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Synechocystis* sp. PCC 6803 wildtype (WT), *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔG , *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔH , *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔP , *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔGH , *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔGP , *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔHP , *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔGHP ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ธนะกานจน์ มัญชุพานี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยการเพาะเลี้ยง *Synechocystis* sp. PCC 6803 แต่ละสายพันธุ์ ในอาหารเหลว BG11 เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน โดยนำมาวัดค่า A_{730} และตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ โดยทำการสกัดคลอโรฟิลล์ เอ ด้วยเอทานอลในตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรและวัดปริมาณด้วยการวัดค่า A_{665}

2) ศึกษาการสะสมลิพิดใน *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายรวมทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ด้วยการวัดอัตราการผลิตชีวมวล ร้อยละปริมาณลิพิด (%) และอัตราการผลิตลิพิด โดยเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 และ 14 วัน ตรวจสอบอัตราการผลิตชีวมวลด้วยการทำ Dry cell weight ในวันที่ 7 และ 14 และตรวจสอบร้อยละปริมาณลิพิด (%) และอัตราการผลิตลิพิด ด้วยการสกัดลิพิดด้วยวิธี Single step by Alexon และคณะ

3) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและปริมาณการสะสมลิพิดของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้ง 7 สายพันธุ์ โดยเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนภายในอาหาร BG11 คือ น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1%

4) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและปริมาณการสะสมลิพิดของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้ง 7 สายพันธุ์ ในสภาวะขาดธาตุไนโตรเจนในอาหาร BG11

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบความสามารถในการเจริญเติบโตของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้ง 7 สายพันธุ์

2) ทราบปริมาณการสะสมลิพิดของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้ง 7 สายพันธุ์

3) ทราบถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้ง 7 สายพันธุ์

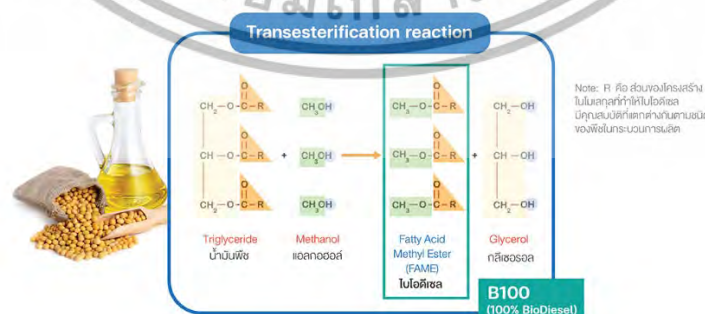
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลังงานทดแทน

พลังงานทดแทนมาจากทรัพยากรที่ทดแทนได้ตามธรรมชาติอย่างไม่จำกัด โดยมีแหล่งพลังงาน ได้แก่ แสงแดด กระแสน้ำ ลม ชีวมวลและความร้อนจากเปลือกโลก สามารถนำมาแปลงเป็นพลังงานสะอาดและใช้งานได้หลายประเภท (Office of Energy Efficiency & Renewable Energy, 2023) ได้แก่ พลังงานงานแสงอาทิตย์, พลังงานน้ำ, พลังงานลม, พลังงานชีวภาพ, พลังงานความร้อนใต้พิภพและไฮโดรเจนและเชื้อเพลิงทดแทนอื่นๆ พลังงานชีวภาพเป็นพลังงานทดแทนชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นเมื่อเราเผาเชื้อเพลิงชีวมวลซึ่งใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับยานยนต์ เชื้อเพลิงชีวมวลมาจากวัสดุอินทรีย์ เช่น เศษเหลือจากการเก็บเกี่ยว พืชผลที่ปลูกโดยเฉพาะ และขยะอินทรีย์จากบ้าน ธุรกิจและฟาร์ม พลังงานชีวภาพเป็นพลังงานทดแทนคาร์บอนต่ำ เนื่องจากคาร์บอนที่ถูกปล่อยออกมาจากการใช้เชื้อเพลิงชีวมวลจะถูกพืชผลการเกษตรที่ปลูกโดยเฉพาะใช้ในระหว่างวงจรเจริญเติบโตจึงทำให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ การใช้พลังงานชีวภาพยังช่วยปรับปรุงระบบการจัดการขยะอินทรีย์และป่าไม้ของเราอีกด้วย (Sustainable Energy Authority of Ireland (SEAI), 2023)

ไบโอดีเซล (Biodiesel) หรือ Fatty acid methyl ester (FAME) คือน้ำมันที่ผลิตจากพืช ซึ่งถือเป็น “เชื้อเพลิงทางเลือก” ที่ผลิตได้จากไขมันจากพืช เช่น ปาล์ม ถั่วเหลือง มะพร้าว หรือจากไขมันสัตว์หรือน้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้วเป็นสารจำพวกไตรกลีเซอไรด์ โดยสามารถผลิตได้จากการนำน้ำมันพืชบริสุทธิ์มาผ่านกระบวนการทางเคมี เรียกว่า ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) ดังรูปที่ 2.1 ด้วยการเติมสารประเภทแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล (Methanol) และสารเร่งปฏิกิริยา ได้เป็นไบโอดีเซลและกลีเซอรอล จากนั้น ขั้นตอนสุดท้ายให้ทำการแยกกลีเซอรอลออกก็จะได้ไบโอดีเซลที่บริสุทธิ์สามารถนำไปใช้งานได้ (Apex chemical, 2023)



รูปที่ 2.1 การผลิตไบโอดีเซล (Apex chemical, 2023)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ลิพิด

ลิพิด (Lipid) เป็นสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน โดยปกติ ลิพิดจะมีจำนวนธาตุออกซิเจนน้อยกว่าคาร์บอนและไฮโดรเจนมาก ส่วนใหญ่จะไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม เบนซีน เป็นต้น (ดร.อนุสรณ์ เชิดทอง, 2554) ลิพิดบางกลุ่มมีทั้งโครงสร้างที่แสดงการมีขั้วด้วย ซึ่งเป็นกลุ่มที่แสดงคุณสมบัติทั้ง 2 อย่าง คือทั้งชอบน้ำและไม่ชอบน้ำอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน (สุภัตรา ทรัพย์อุการ, 2562)

2.2.1 โครงสร้างลิพิด

โดยทั่วไปลิพิดจะมีโครงสร้างเป็นสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon) ในขณะที่จะมีบางกลุ่มที่เป็นแบบแอมฟิฟิล (Amphiphile) โดยจะมีโครงสร้างแบ่งเป็นส่วนหัวและหาง โดยส่วนหัวจะประกอบด้วยกลีเซอรอลต่อกับหมู่ฟอสเฟตเป็นด้านที่มีขั้วและชอบน้ำ ส่วนหางจะเป็นสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon) ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ คือ กรดไขมันเป็นสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน โดยลิพิดเหล่านี้จะมีโครงสร้างอยู่ 3 แบบ (ดร.อนุสรณ์ เชิดทอง, 2554) คือ

1. ไมเซลล์ (Micelle) โดยจะหันส่วนที่มีขั้วไว้ด้านนอกเพื่อสัมผัสกับน้ำและจะเอาส่วนหางเอาไว้ด้านใน
2. แผ่นชั้นเดียว (Monolayer) มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มชั้นเดียว ลอยอยู่บนผิวน้ำ ส่วนที่มีขั้วจะสัมผัสกับน้ำ ส่วนที่ไม่ชอบจะหันไปทางอากาศ
3. แผ่นสองชั้น (Bilayer) จะหันส่วนที่ชอบน้ำไว้ด้านนอกผิว 2 ด้าน และเอาส่วนที่ไม่ชอบน้ำไว้ตรงกลาง จะพบได้ในเยื่อหุ้มเซลล์ โครงสร้างแบบนี้จะช่วยเป็นเกราะป้องกันโมเลกุลบางชนิดก่อนเข้าสู่เซลล์ โดยตรวจสอบว่าโมเลกุลใดสามารถเข้าหรือออกเซลล์ได้ (Ahmed และคณะ, 2023)

2.2.2 ประเภทของลิพิด (สุภัตรา ทรัพย์อุการ, 2562 ; ดร.อนุสรณ์ เชิดทอง, 2554 ; Ahmed และคณะ, 2023)

1. ลิพิดเชิงเดี่ยว (simple lipid) ได้แก่ ไขมันและน้ำมัน เป็นเอสเทอร์กลีเซอรอลกับกรดไขมัน โดยปกติไขมันจะแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่น้ำมันโดยทั่วไปจะเป็นของเหลว ส่วน ไขหรือขี้ผึ้ง เป็นเอสเทอร์กรดไขมันกับแอลกอฮอล์จะพบได้บนใบพืชเพื่อปกคลุม และในมนุษย์พบได้ในผิวหนังบริเวณช่องหูเพื่อเป็นเกราะป้องกัน เรียกว่า ขี้หู
2. ลิพิดเชิงซ้อนหรือลิพิดเชิงประกอบ (compound lipid) ที่เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์และสารอื่น เช่น ฟอสโฟลิพิด (phospholipid), ไกลโคลิพิด (glycolipid), ลิโปโปรตีน (lipoprotein)
3. อนุพันธ์ของลิพิด (derived lipid) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายของลิพิดอย่างง่ายหรือลิพิดเชิงซ้อนที่ยังคงคุณสมบัติของลิพิดอยู่ ได้แก่ กรดไขมัน, โมโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerol) และไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ลิพิดอื่นๆ (miscellaneous lipid) เช่น สเตียรอยด์ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวน สเตียรอยด์ชนิดหนึ่งที่สำคัญคือคอเลสเตอรอล สามารถผลิตในตับและเป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมนสเตียรอยด์อื่นๆ เช่น เอสโตรเจน เทสโทสเตอโรน และคอร์ติซอล

2.3 ไชยาโนแบคทีเรีย

ไชยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดโพรคาริโอต ไม่มีเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ มีสารพันธุกรรมและรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงได้ สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น ในบ่อน้ำ ทะเล ดินที่มีความชื้น และบริเวณที่มีสภาพแวดล้อมรุนแรง เช่น ดินเค็ม ทะเลทรายและน้ำพุร้อน ส่วนในประเทศไทย แหล่งที่พบไชยาโนแบคทีเรียได้ เช่น น้ำพุร้อน นาเกลือ นาข้าว แหล่งน้ำเสียและบริเวณที่ใช้สำหรับการเดินทางทางน้ำ (สุรศักดิ์ ละลอกน้ำและบงกช บุญบุรพงษ์, 2555) ไชยาโนแบคทีเรียจัดเป็นผู้ผลิตที่สำคัญในระบบนิเวศ นอกจากนี้ ยังมีความสำคัญต่อวัฏจักรไนโตรเจนอีกด้วย (อ.ดร.อินทิรา ขุดแก้ว, 2558)

2.3.1 ลักษณะของไชยาโนแบคทีเรีย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไชยาโนแบคทีเรีย สามารถพบได้ทั้งเซลล์เดี่ยว (Single cell) หรือโคโลนี (Colony) และแบบเส้นสาย (Filamentous forms) ดังนี้

- 1) รูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนี รูปร่างของเซลล์มีหลากหลายรูปแบบ เช่น ทรงกลม รูปไข่ ทรงกระบอก (ท่อน) หรือแบบไข้วท้ายแหลม ส่วนพวกที่อยู่รวมกันเป็นโคโลนี อาจมองเห็นเป็นลักษณะกลม แบน เหลี่ยม (ยูวดี พิรพรพิศาล, 2549)
- 2) รูปร่างเป็นเส้นสาย เซลล์หลายเซลล์ที่ต่อกันเป็นสาย เรียกว่า ตรีโยคม (Trichome) อาจจะมีลักษณะตรงและเรียบ ไม่มีแตกแขนง จัดเป็นกลุ่มที่มีลักษณะเส้นสายแบบง่ายๆ หรือบางชนิดอาจจะมีปลายโค้งหรือบิดเกลียว หรือบางชนิดอาจจะแตกแขนง (ยูวดี พิรพรพิศาล, 2549)

2.3.2 โครงสร้างของไชยาโนแบคทีเรีย

องค์ประกอบของผนังเซลล์ จะมีชั้นบางๆ ของ Peptidoglycan และ Lipopolysaccharide เป็นเยื่อหุ้มชั้นนอก ซึ่งจะช่วยปกป้องและตรวจจับความเครียดจากสภาพแวดล้อม และยังช่วยการขนส่งสารอาหารและสารเมแทบอลิซึมที่จะผ่านเข้า-ออกเซลล์อีกด้วย (Malihe และ Hassan, 2022)

2.3.3 ประโยชน์ของไชยาโนแบคทีเรีย (สุรศักดิ์ ละลอกน้ำและบงกช บุญบุรพงษ์, 2555)

1. ด้านเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม ใช้ในการบำบัดน้ำเสียและเพิ่มปริมาณออกซิเจน
2. อุตสาหกรรมอาหาร ทำเป็นอาหารเสริม เนื่องจากไชยาโนแบคทีเรียเป็นแหล่งโปรตีนและมีรงควัตถุหลายชนิด ได้แก่ ไฟโคไซยานินและคลอโรฟิลล์ ทั้งยังสามารถใช้ทำเป็นสียผสมอาหารได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

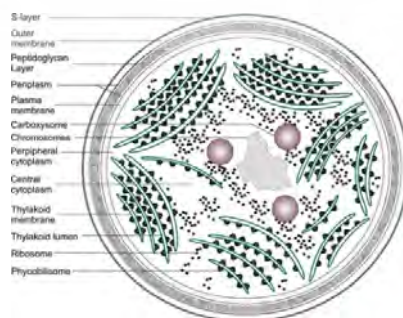
3. ด้านการแพทย์ ยกตัวอย่างเช่น การผลิตเอนไซม์เอสเทอร์และการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ ไฟโคไซยานินและแคโรทีนจากสไปรูลีนา การผลิตยาต้านแบคทีเรีย
4. ด้านการเกษตร ใช้ไซยาโนแบคทีเรียในการตรึงไนโตรเจนเพื่อเพิ่มผลผลิต นอกจากนี้ ยังใช้เป็นต้นแบบกลไกพืชชั้นสูงเพื่อพัฒนาพืชเศรษฐกิจให้สามารถนำไปปลูกในน้ำทะเลได้
5. แหล่งพลังงานทดแทน เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว เป็นแหล่งชีวโมเลกุลที่ดี เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนได้ เช่น การผลิตไบโอเอทานอล การผลิตไบโอดีเซล การผลิตไบโอไฮโดรเจนจากศักยภาพของไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้และการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยการสังเคราะห์แสง จึงถือว่าเป็นแหล่งพลังงานที่สะอาด

2.4 ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis sp. PCC 6803 ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ.1968 ที่ทะเลสาบน้ำจืด ในเมืองเบิร์กลีย์ รัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นสายพันธุ์ถูกใช้ในงานวิจัยอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถใช้แสงหรือสารประกอบอินทรีย์หรือทั้ง 2 อย่างในการสังเคราะห์คาร์บอนได้ จึงเหมาะต่อการศึกษากลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการปรับสภาพของความเครียดที่เกิดจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ และสามารถที่จะใช้แสงในการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลได้หลากหลายประเภท (Yi และคณะ, 2016)

2.4.1 ลักษณะและโครงสร้าง *Synechocystis* sp. PCC 6803

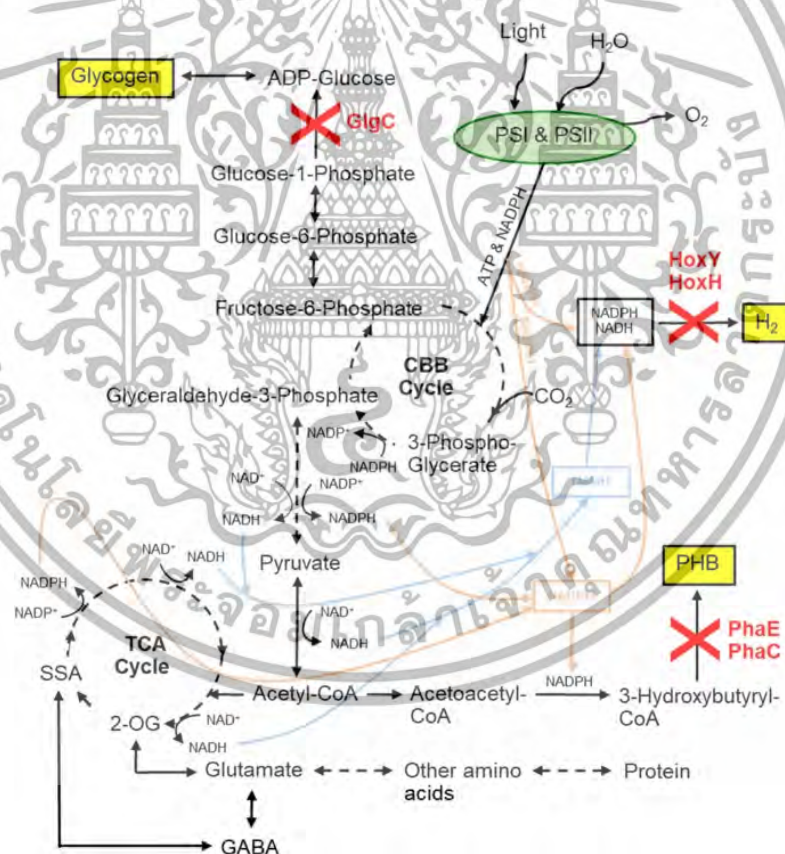
Synechocystis sp. PCC 6803 เป็นไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่มีลักษณะเป็นทรงกลม ถูกห่อหุ้มด้วยพลาสมาและเปปติโดไกลแคนและเยื่อหุ้มด้านนอก และภายในจะเรียกว่าเซ็นทรัลไซโตพลาสซึมที่ประกอบด้วยไทลาคอยด์อยู่ล้อมรอบถัดจากพลาสมาเมมเบรนและระหว่างไทลาคอยด์เมมเบรนก็จะมีไทลาคอยด์ ลูเมนเกาะอยู่พร้อมกับไฟโคบิลิโซม และไรโซโซมจะลอยอยู่ภายในกระจายอยู่ ส่วนตรงกลางเซลล์ คือโครโมโซม ที่ถูกล้อมด้วยคาร์บอกซิโซม ดังรูปที่ 2.2 (Lauren และคณะ, 2020)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างภายในเซลล์ของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Lauren และคณะ, 2020)
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย (ธนะกาญจน์ มณฑุพานี และคณะ, 2565)

ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลายประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ขาดยีน *glgC*, *phaE-phaC* และยับยั้งยีน *hoxY-hoxH* โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ไกลโคเจน นิวคลีโอไทด์ 301-1020 รหัสยีนของ *glgC* ซึ่งถอดและแปลรหัสเป็น ADP-glucose pyrophosphorylase ที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ไกลโคเจน โดยยีนจะถูกนำออกไปและแทนที่ด้วยยีนต้านคลอแรมฟินิโคล การยับยั้งการสังเคราะห์ PHB นิวคลีโอไทด์ 481-993 รหัสยีนของ *phaE*, 94bp internal spacer ของ *phaE-phaC* และ นิวคลีโอไทด์ 1-660 รหัสยีนของ *phaC* จะถูกนำออกไปเพื่อหยุดการทำงานของ *phaE-phaC* ที่เป็นหน่วยย่อยในการสังเคราะห์ PHB ถูกแทนที่ด้วยยีนต้านสเปกตินอไมซิน การยับยั้งการผลิตและการสลายไฮโดรเจน จะหยุดการทำงานของ *hoxY-hoxH* ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของ [NiFe]-hydrogenase และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์ไฮโดรเจน และโดยยีนจะถูกแทนที่ด้วยยีนต้านคานามัยซิน ดังรูปที่ 1



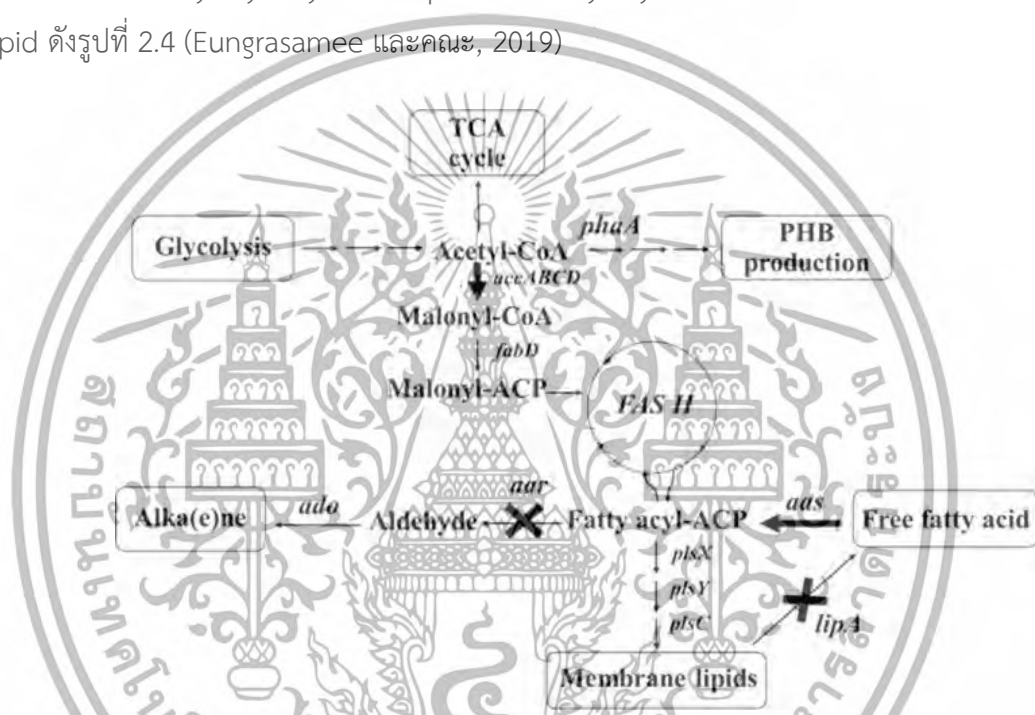
รูปที่ 2.3 กระบวนการสังเคราะห์ชีวภาพภายในเซลล์ของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม (ธนะกาญจน์ มณฑุพานี และคณะ, 2565)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การสะสมลิพิดภายในของ *Synechocystis* sp. PCC 6803

2.5.1 กระบวนการสังเคราะห์ลิพิด

กระบวนการสังเคราะห์ลิพิดในไซยาโนแบคทีเรีย เริ่มจาก Acetyl-CoA จะถูกแปลงเป็น Fatty acyl-acyl carrier protein (Fatty acyl-ACP) ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตลิพิด) เพื่อเข้ากระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน โดยขั้นตอนแรกเริ่มต้นด้วย Acetyl-CoA (ได้มาจากกระบวนการ Calvin cycle และการสลายของคาร์โบไฮเดรตและไขมัน) ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาด้วย Acetyl-CoA carboxylase (ACC) เปลี่ยนเป็น Malonyl-CoA จากนั้น จะเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน ได้ออกมาเป็น Fatty acyl-acyl carrier protein (Fatty acyl-ACP) ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต Lipid ดังรูปที่ 2.4 (Eungrasamee และคณะ, 2019)



รูปที่ 2.4 กระบวนการสังเคราะห์ลิพิดภายในเซลล์ของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Eungrasamee และคณะ, 2019)

2.5.2 วิธีการสกัดลิพิด

การสกัดทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. การสกัดด้วย Soxhlet เป็นการสกัดที่พิสูจน์ว่าสามารถสกัดลิพิดที่มีอยู่ในจุลินทรีย์สาหร่ายได้ถึง 100% วิธีทำคือนำสาหร่าย 1 กรัมสกัดด้วยตัวทำละลายปริมาตร 180 มิลลิลิตรในเครื่องมือ Soxhlet เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ในวิธีนี้ คือ เฮกเซนหรือสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 โดยตัวทำละลายในการสกัดลิพิดต้องมีส่วนมีขั้วของลิพิดภายในเซลล์เมมเบรนและเนื้อเยื่อแต่ต้องไม่ละลายด้านที่ไม่มีขั้วของลิพิด (Folch และคณะ, 1957)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การสกัดลิพิดด้วยวิธี Single step ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง 20-30 มิลลิกรัม ใส่หลอด Centrifuge จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 8 มิลลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex และเติมสารละลายเกลือความเข้มข้น 0.73 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดส่วนใสเหนือสารแขวนลอยทิ้งและทำซ้ำทั้งหมด 5 รอบ นำสารตัวอย่างไประเหยในเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) (Martin และคณะ, 2014)

3. วิธีการสกัดลิพิดโดย Bligh และ Dyer เริ่มจากนำสารหยาบผสมกับน้ำที่ปราศจากไอออน คลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 1.8:2:2 และนำมา Homogenized จากนั้น กรองเพื่อเศษเซลล์ออก (Bligh และคณะ, 1959)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Monshupanee และคณะ (2013) ศึกษาปริมาณไกลโคเจน ลิพิดและ PHB ภายในเซลล์ *Synechocystis* sp. PCC 6803 โดยพบว่าในสภาวะการเจริญเติบโตแบบใช้แสงพบว่าไกลโคเจน ลิพิดและ PHB มีปริมาณสะสมอยู่ที่ 22.7, 14.1, และ 2.4% ตามลำดับ ภายใต้สภาวะการขาดธาตุไนโตรเจนในไซยาโนแบคทีเรียมีการสะสมของไกลโคเจนและ PHB เพิ่มขึ้น แต่มีปริมาณลิพิดน้อยลง อยู่ที่ 11.2% แต่หากเพิ่มน้ำตาลกลูโคส 0.4% (w/v) ทำให้สภาวะการเจริญเติบโตเป็นแบบใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและปรับความเข้มข้นแสงที่เหมาะสมและใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 12 วัน พบว่าไกลโคเจน ลิพิดและ PHB เพิ่มขึ้นมีปริมาณสะสมอยู่ที่ 41.3, 16.7, และ 13.1% ของน้ำหนักแห้ง

Mavroudakis และคณะ (2019) ศึกษาลิพิดในเยื่อหุ้มเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ในสภาวะการขาดธาตุไนโตรเจน ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้ Easy Environmental Sonic Spray Ionizing Mass Spectrometry (EASI-MS) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งข้อมูลเชิงคุณภาพและปริมาณของลิพิด พบว่าการขาดธาตุไนโตรเจนมีผลต่อลิพิดภายในเยื่อหุ้มเซลล์

V. Senatore และคณะ (2023) ศึกษาการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. ในน้ำเสียในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง เป็นเวลา 120 วัน (สภาวะปกติ) เพื่อผลิตไฟโคบิลิโปรตีน PHB และลิพิด จากนั้นถ่ายโอนชีวมวลที่เก็บเกี่ยวได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบ Batch แนวตั้งในสภาวะขาดธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเพื่อให้เกิดการสะสมของ PHB และลิพิด และจะเก็บตัวอย่าง 3 เวลา คือ ทุกๆ 6, 8 และ 10 วัน พบว่าความเข้มข้นของชีวมวลอยู่ที่ 1.413 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตชีวมวลอยู่ที่ 173 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ภายในช่วงระยะเวลา 8 วันพบว่ามีเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาเมื่อทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ และในระยะเวลา 6 วัน มีการผลิตสารไฟโคบิลิโปรตีน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างต่อเนื่องในสภาวะปกติ โดยมีปริมาณสูงสุดอยู่ที่ 4.8% ของน้ำหนักชีวมวลแห้ง ส่วนปริมาณ PHB จะมีปริมาณสูงสุดอยู่ที่ 4.8% ของน้ำหนักชีวมวลแห้งในสภาวะการขาดธาตุ ส่วนลิวซีนมีปริมาณอยู่ที่ 44.7% ของน้ำหนักแห้งในสภาวะขาดธาตุไนโตรเจนภายในระยะเวลา 30 วัน

Cordeiro และคณะ วิจัยเกี่ยวกับอาหารเลี้ยงเชื้อและปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ผลผลิตชีวมวลและการผลิตชีวมวลของ *Microcystis* ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. novocekkii*, *M. aeruginosa*, *M. panniformis* และ *M. protocystis* โดยสกัดไขมันจาก Soxhlet ด้วยไดคลอโรมีเทน และเพิ่มผลผลิตชีวมวลและอัตราการชีวมวลให้สูงสุดด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ASM-1 ที่ใส่ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสปริมาณ 0.25-0.65 กรัมต่อลิตรและ 25-50.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าผลผลิตลิวซีนที่ได้จากการสกัดจาก *M. panniformis* และ *M. novocekkii* อยู่ที่ 35.8% และ 31.7% ตามลำดับ ซึ่งแปรผกผันกับปริมาณไนโตรเจน แต่แปรผันตรงตามปริมาณฟอสฟอรัส ส่วน *M. aeruginosa* มีปริมาณลิวซีนอยู่ที่ 23.3% ซึ่งแปรผกผันกับความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ในขณะที่ *M. protocystis* มีปริมาณลิวซีนสูงที่สุดอยู่ที่ 41.5% ในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการขาดธาตุสารอาหารต่ำเอื้อต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิวซีนของเซลล์ได้มากกว่า

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในโครงการพิเศษ

ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 8 สายพันธุ์ ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. ธนะกาญจน์ มัญชุพาทณี ได้แก่

1. *Synechocystis* sp. PCC 6803 WT
2. *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔG (ตัดยีน *glgC* ออก)
3. *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔH (ตัดยีน *hoxY-hoxH* ออก)
4. *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔP (ตัดยีน *phaE-phaC* ออก)
5. *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔGH (ตัดยีน *glgC* และ *hoxY-hoxH* ออก)
6. *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔGP (ตัดยีน *glgC* และ *phaE-phaC* ออก)
7. *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔHP (ตัดยีน *hoxY-hoxH* และ *phaE-phaC* ออก)
8. *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔGHP (ตัดยีน *glgC*, *hoxY-hoxH* และ *phaE-phaC* ออก)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.1.1 อาหาร BG11 (Rippka และคณะ, 1977) (ภาคผนวก ก)
- 3.2.1.2 น้ำตาลกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) 0.1 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.1.3 คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 3.2.1.4 กานามัยซิน (Kanamycin) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 3.2.1.5 สเปกตีโนมัยซิน (Spectinomycin) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.2 สารเคมี

- 3.2.2.1 คลอโรฟอร์ม
- 3.2.2.2 เมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)
- 3.2.2.3 สารละลายเกลือ 0.73 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Scale) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)

3.3.2 ช้อนตักสาร (Spatula)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.3 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glassware)
- 3.3.4 กระจกตวง (Measuring cylinder) (Kartell, Italy)
- 3.3.5 ทิปดูดสาร (Tip)
- 3.3.6 ไมโครปิเปต (Micropipette) (Labnet, USA)
- 3.3.7 เครื่องกวนให้ความร้อน (Hotplate magnetic stirrer) (Vision Scientific VS-130SH, Korea)
- 3.3.8 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)
- 3.3.9 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 3.3.10 จานเพาะเชื้อ (Plate) (Pyrex, USA)
- 3.3.11 เข็มเย็บเชื้อปลายกลม (Loop)
- 3.3.12 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
- 3.3.13 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (Scientific Industries Inc Vortex-Genie 2, USA)
- 3.3.14 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) (Scientific Promotion, Binder, Thailand)
- 3.3.15 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) (International Scientific Supply Co., LTD. HS123, Thailand)
- 3.3.16 กล้องจุลทรรศน์ชนิดถ่ายภาพได้ (Camera Microscope) (Euromex microscopes, Holland)
- 3.3.17 สไลด์ (Slide)
- 3.3.18 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Lab-Therm LT-X Incubator Shaker, Switzerland)
- 3.3.19 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortech Z383K, Germany)
- 3.3.20 เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาตรน้อยชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Microcentrifuge) (Labnet International Inc, Spectrafuge 24D, USA)
- 3.3.21 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1601, Japan)
- 3.3.22 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 3.3.23 โถดูดความชื้น (Desiccator) (Nikko, Japan)
- 3.3.24 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการดำเนินงาน

3.4.1 การเพาะเลี้ยง *Synechocystis* sp. PCC 6803

3.4.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Synechocystis* sp. PCC 6803 ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ด้วยวิธี Spread plate ใช้ยาปฏิชีวนะปริมาณ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหารแข็ง BG11 ประมาณ 20 มิลลิตร โดยแยกเป็นทั้งหมด 3 กลุ่ม

1. *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔG จะใช้อาหารที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร
2. *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔH , *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔGH และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔGHP จะใช้อาหารที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน (Kanamycin) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร
3. *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔP , *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔGP และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔHP จะใช้อาหารที่มียาปฏิชีวนะสเปกตีโนมายซิน (Spectinomycin) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

3.4.1.2 การเพาะเลี้ยง *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ต่างๆ

ทำการเพาะเลี้ยง *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย รวมทั้งหมด 8 สายพันธุ์ โดยการถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง BG11 ที่มียาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ด้วยวิธีการ Streak plate บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิตร โดยการเขย่าโคลนนี้เดี่ยวลงในอาหารเหลว ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เพาะเลี้ยงฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

3.4.2 การวัดการเจริญของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 ทั้ง 8 สายพันธุ์

3.4.2.1 การวัดการเจริญของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 โดยการวัดค่าการ

ดูดกลืนแสง

ทำการเขย่าโคลนนี้เดี่ยวจากจานเพาะเชื้อปริมาตร 1 ลูกบาศก์ ใส่ลงในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิตร นำฟลาสก์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ โดยนำเซลล์แขวนลอยมาใส่ในหลอดเซนต์ริฟิวจ์และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอน (Supernatant) ที่ จากนั้น ล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว BG11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 รอบ เมื่อได้ตะกอนเซลล์ (Cell pellet) แล้วจึงทำการกระจายเซลล์ในอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่า OD₇₃₀ เท่ากับ 0.1 จากนั้น จึงนำพลาสติกไปวางบนเครื่องเขย่าและเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด Eppendorf ทุก 2 วัน จำนวนตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำตัวอย่างเซลล์แขวนลอยมาวัดการเจริญโดยการวัดค่า OD₇₃₀ ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.4.2.2 การวัดการเจริญของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 โดยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ

ทำการเชื้อโคลนีเดี่ยวจากจานเพาะเชื้อปริมาตร 1 ลูกบาศก์ ใส่ลงในพลาสติกปริมาตร 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำพลาสติกไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้น ทำการเก็บเซลล์โดยนำเซลล์แขวนลอยมาใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวจ์และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอน (Supernatant) ทั้ง จากนั้น ล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 รอบ เมื่อได้ตะกอนเซลล์ (Cell pellet) แล้วจึงทำการกระจายเซลล์ในอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่า OD₇₃₀ เท่ากับ 0.1 จากนั้น จึงนำพลาสติกไปวางบนเครื่องเขย่าและเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด Eppendorf ทุก 2 วัน จำนวนตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำตัวอย่างเซลล์แขวนลอยแล้วนำตัวอย่างที่เก็บในแต่ละวันมาสกัดคลอโรฟิลล์ เอ โดยนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอน (Supernatant) ทั้ง จากนั้น เติมนเมทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (หรือจนกว่าตะกอนจะเป็นสีเทาทั้งหมด) นำตัวอย่างมาวัดการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร (OD₆₆₅) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) และนำค่า OD₆₆₅ ทั้งหมดมาคำนวณดังสมการต่อไปนี้ (Mackinney, 1941)

$$\text{Chlorophyll a (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = 12.7 \times \text{OD}_{665} \times \text{dilution factor}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การสกัดลิพิดด้วยวิธี Single step (Axelsson และคณะ, 2014)

3.4.3.1 วิธีการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงในหัวข้อ 3.4.1.2 เป็นเวลา 14 วัน เก็บเซลล์ทั้งหมดโดยนำเซลล์แขวนลอยมาใส่ใน Centrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บเซลล์จนครบทั้งหมด 400 มิลลิลิตร ดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอน (Supernatant) ที่จมนเหลือแค่ตะกอนเซลล์ (Cell pellet) จากนั้น นำไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำหลอด Centrifuge tube ที่มีตะกอนเซลล์ (Cell pellet) ไปชั่งน้ำหนักและคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งดังสมการต่อไปนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)} = \text{น้ำหนักหลอดที่มีเซลล์ (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดที่ปราศจากเซลล์ (กรัม)}$$

3.4.3.2 การสกัดลิพิดด้วยวิธี Single step

ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง 20-30 มิลลิกรัม ใส่หลอด Centrifuge จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex และเติมสารละลายเกลือความเข้มข้น 0.73 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดส่วนใสเหนือสารแขวนลอยทิ้งและทำซ้ำทั้งหมด 5 รอบ นำสารตัวอย่างไประเหยในเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) ในสภาวะอุณหภูมิ น้ำ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 474 มิลลิบาร์ ระเหยจนกว่าสารตัวอย่างจะเหลือปริมาณประมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้น เทสารตัวอย่างลงในหลอด Eppendorf ที่ชั่งน้ำหนักไว้ และนำไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้น ชั่งน้ำหนักหลอดและคำนวณปริมาณลิพิด (%) และอัตราการผลิตลิพิด (มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน) ดังสมการต่อไปนี้ (Miriam และคณะ, 2016)

$$\text{ปริมาณลิพิด (\%)} = (\text{น้ำหนักลิพิด} / \text{น้ำหนักเซลล์ที่ใช้สกัด}) \times 100$$

$$\text{อัตราการผลิตลิพิด (มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน)} = \text{ปริมาณลิพิด} \times \text{อัตราการผลิตชีวมวล} \\ (\text{มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน})$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการผลิตชีวมวล (มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน) = ((น้ำหนักเซลล์แห้ง × 1,000)/ปริมาตรเซลล์ที่ใช้เก็บ
เกี่ยว(มิลลิลิตร)) / วันที่เก็บเกี่ยวเซลล์

3.4.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลิตของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย

3.4.4.1 การศึกษาผลของการเติมน้ำตาลกลูโคสต่อการสะสมลิตของ *Synechocystis* sp. PCC 6803

3.4.4.1.1 การวัดการเจริญของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 โดยการวัดค่า OD₇₃₀ และปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงใน
หัวข้อ 3.4.1.2 เป็นเวลา 14 วัน จากนั้น ทำการเก็บเซลล์โดยนำเซลล์แขวนลอยมาใส่ในหลอดเซ็นตริ
ฟิวส์และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) ที่
ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดสารแขวนลอย
เหนือตะกอน (Supernatant) ทิ้ง จากนั้น ล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว BG11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความ
เข้มข้น 0.1% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 รอบ เมื่อได้ตะกอนเซลล์ (Cell pellet) แล้วจึงทำการ
กระจายเซลล์ ในอาหารเหลว BG11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่า OD₇₃₀ เท่ากับ 0.1 จากนั้น จึงนำพลาสติกไปวางบนเครื่อง
เขย่าและเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เก็บ
ตัวอย่างเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด Eppendorf ทุก 2 วัน จำนวนตัวอย่างละ 3
ซ้ำ นำตัวอย่างเซลล์แขวนลอยมาวัดการเจริญโดยการวัดค่า OD₇₃₀ ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ตามหัวข้อ 3.4.2.2

3.4.4.1.2 การสกัดลิตด้วยวิธี Single step

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงใน
หัวข้อ 3.4.1.2 เป็นเวลา 14 วัน จากนั้น ทำการเก็บเซลล์โดยนำเซลล์แขวนลอยมาใส่ในหลอดเซ็นตริ
ฟิวส์และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่
อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอนทิ้ง จากนั้น ล้าง
เซลล์ด้วยอาหารเหลว BG11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 3
รอบ เมื่อได้ตะกอนเซลล์แล้วจึงทำการกระจายเซลล์ ในอาหารเหลว BG11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 0.1% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่า OD_{730} เท่ากับ 0.1 จากนั้น จึงนำพลาสติกไปวางบนเครื่องเขย่าและเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เก็บเซลล์ทั้งหมดโดยนำเซลล์แขวนลอยมาใส่ใน Centrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บเซลล์จนครบทั้งหมด 400 มิลลิลิตร ดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอน (Supernatant) ที่จมนเหลือแค่ตะกอนเซลล์ (Cell pellet) จากนั้น นำไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำหลอด Centrifuge tube ที่มีตะกอนเซลล์ (Cell pellet) ไปชั่งน้ำหนักและคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งและหาปริมาณลิพิดตามวิธีในหัวข้อ 3.4.3.2

3.4.4.2 การศึกษาผลของการขาดธาตุไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิดของ

Synechocystis sp. PCC 6803 ในสภาวะการขาดธาตุไนโตรเจน

3.4.4.2.1 การเพาะเลี้ยงและปรับสภาพเซลล์

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงในหัวข้อ 3.4.1.2 เป็นเวลา 14 วัน จากนั้น นำมาเพาะเลี้ยงปรับสภาพเซลล์ โดยทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง จากนั้น ล้างเซลล์ในอาหารเหลว BG11 ที่ไม่ใส่โซเดียมไนเตรท ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 รอบ กระจายตะกอนเซลล์ ในอาหารเหลว BG11 ที่ไม่ใส่โซเดียมไนเตรท ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่า OD_{730} เท่ากับ 0.1 จากนั้น จึงนำพลาสติกไปวางบนเครื่องเขย่าและเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.4.4.2.2 การสกัดลิพิดด้วยวิธี Single step

เก็บเซลล์ทั้งหมดโดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยง นำตะกอนเซลล์ไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำหลอด Centrifuge tube ที่มีตะกอนเซลล์ไปชั่งน้ำหนักและคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง สกัดและวิเคราะห์หาปริมาณลิพิดดังหัวข้อ 3.4.4.1.2

3.4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการทดลองมาวิเคราะห์เปรียบเทียบผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA และการทดสอบ Posteriori Tests (Post Hoc Tests) ของ Duncan โดยใช้ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics

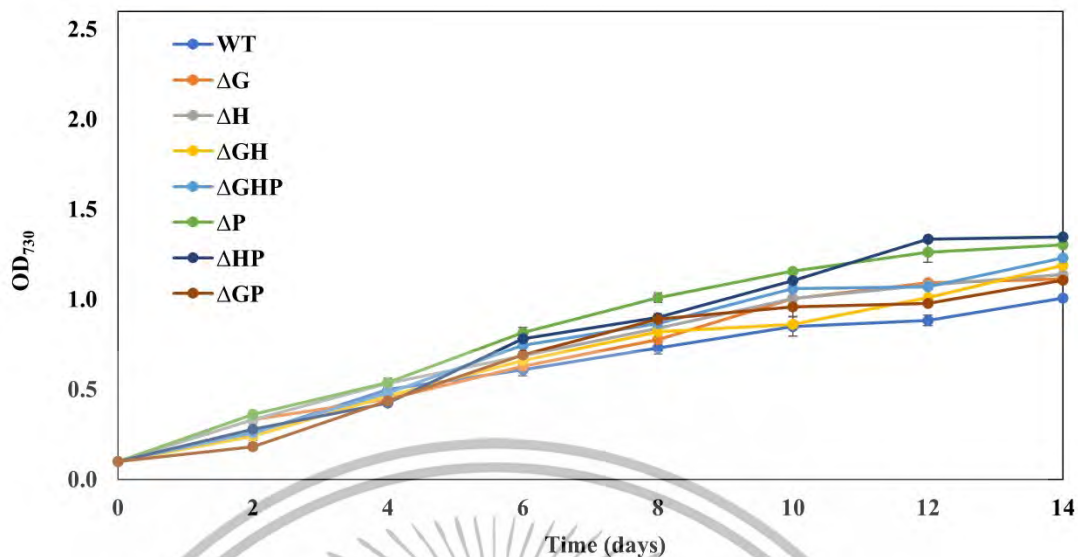
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย

4.1.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์) มาและเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียให้เท่ากันที่ค่า OD_{730} เท่ากับ 0.1 เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เริ่มตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 14 ทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำตัวอย่างที่เก็บในแต่ละวันมาวัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่า OD_{730} จะได้กราฟแสดงการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์ (รูปที่ 4.1) พบว่า *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิม, *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔG , ΔH , ΔP , ΔGH , ΔGP และ ΔGHP เข้าสู่ระยะ Log ในช่วง 8 วัน โดยทั่วไป *Synechocystis* sp. PCC 6803 จะเจริญได้ดีในสภาวะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่มีค่า pH อยู่ระหว่าง 7-8 (Yu และคณะ, 2013) แต่ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔHP จะมีระยะ Log อยู่ในช่วง 6 วัน เนื่องจากสายพันธุ์ข้างต้น มีเพียงยับยั้งการสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนและ PHB แต่ยังไม่สังเคราะห์ไกลโคเจนซึ่งสามารถย่อยเปลี่ยนเป็นกลูโคสเพื่อใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอน (Mills และคณะ, 2020) (รูปที่ 4.1) จากกราฟแสดงการเจริญเติบโต (รูปที่ 4.1) สามารถนำมาคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) และระยะเวลาการทวีคูณ (Doubling time) และเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 95% พบว่า *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔHP มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.329 ± 0.004 ชั่วโมง⁻¹ และมีระยะการทวีคูณเท่ากับ 2.104 ± 0.027 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร

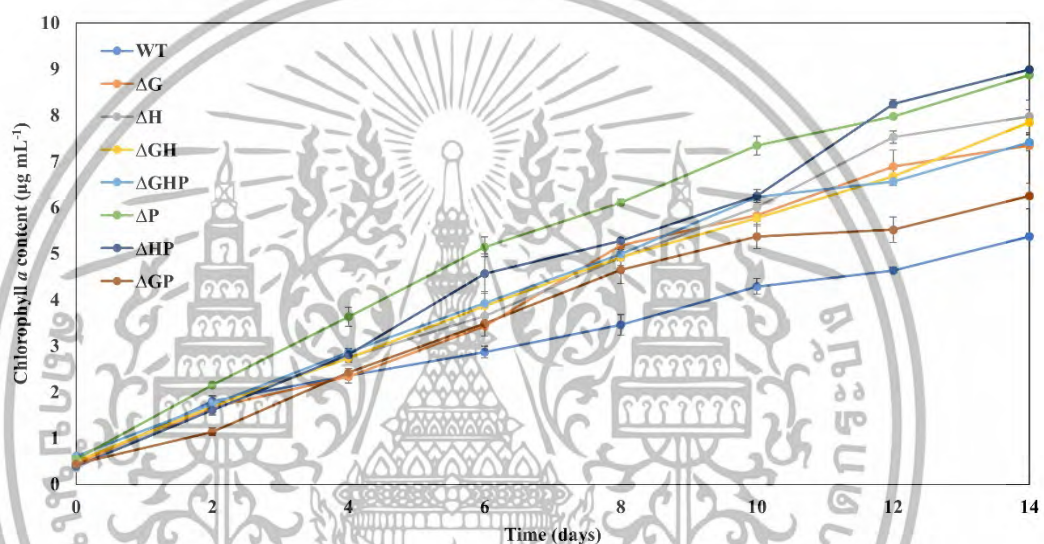
ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญจำเพาะและระยะเวลาการทวีคูณของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร

สายพันธุ์	อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน ⁻¹)	ระยะเวลาการทวีคูณ (วัน)
WT	0.242 ± 0.004 ^d	2.864 ± 0.043 ^d
ΔG	0.272 ± 0.006 ^c	2.549 ± 0.061 ^c
ΔH	0.289 ± 0.004 ^b	2.402 ± 0.036 ^b
ΔGH	0.286 ± 0.008 ^b	2.423 ± 0.065 ^b
ΔGHP	0.291 ± 0.002 ^b	2.378 ± 0.012 ^b
ΔP	0.295 ± 0.005 ^b	2.349 ± 0.039 ^b
ΔHP	0.329 ± 0.004 ^a	2.104 ± 0.027 ^a
ΔGP	0.292 ± 0.006 ^b	2.371 ± 0.049 ^b

4.1.2 ผลการวัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์) มาและเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่ 30 องศาเซลเซียส ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียให้เท่ากันที่ค่า OD₇₃₀ เท่ากับ 0.1 เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เริ่มตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 14 ทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำตัวอย่างมาวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ จากการสกัดคลอโรฟิลล์ เอ ด้วยเมทานอลและวัดค่า OD₆₆₅ จะได้กราฟแสดงปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ทั้ง 8 สายพันธุ์ (รูปที่ 4.2) พบว่าเชื้อทุกตัวมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เพิ่มขึ้นอย่างเอกสาร์นี้เป็นเอกสาร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อเนื่องและสูงสุดในวันที่ 14 เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ (Monshupanee และคณะ, 2002) พบว่า *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ในช่วงวันที่ 12-16 วัน จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งสายพันธุ์ที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ต่ำที่สุดเป็น *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ GP เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีการยับยั้งการสังเคราะห์ไกลโคเจน และ PHB จึงน่าจะส่งผลต่อการผลิตเม็ดสี (Monshupanee และคณะ, 2022) จากการคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ P และ Δ HP จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ สูงสุด เท่ากับ 8.869 ± 0.045 และ 8.992 ± 0.038 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)



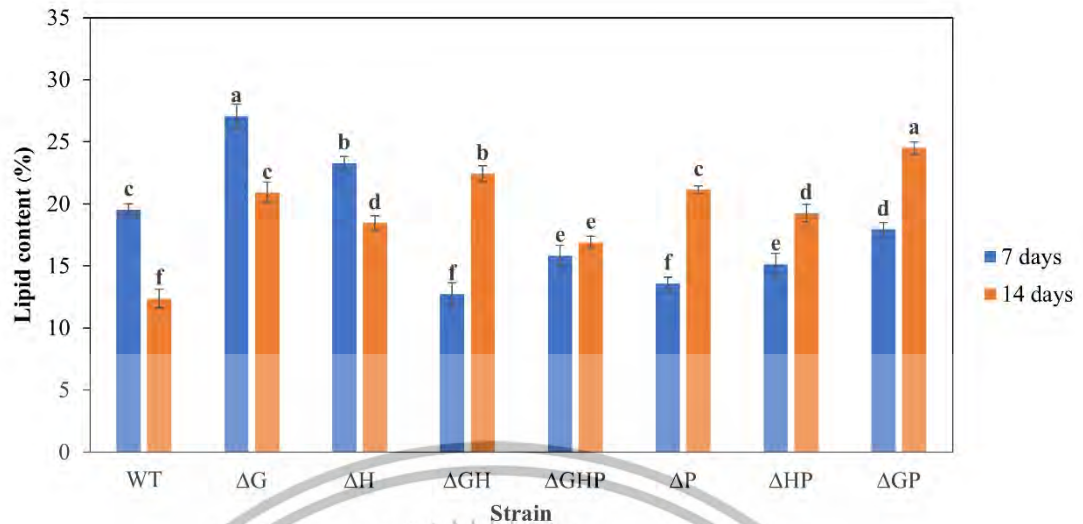
รูปที่ 4.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย

ตารางที่ 4.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย

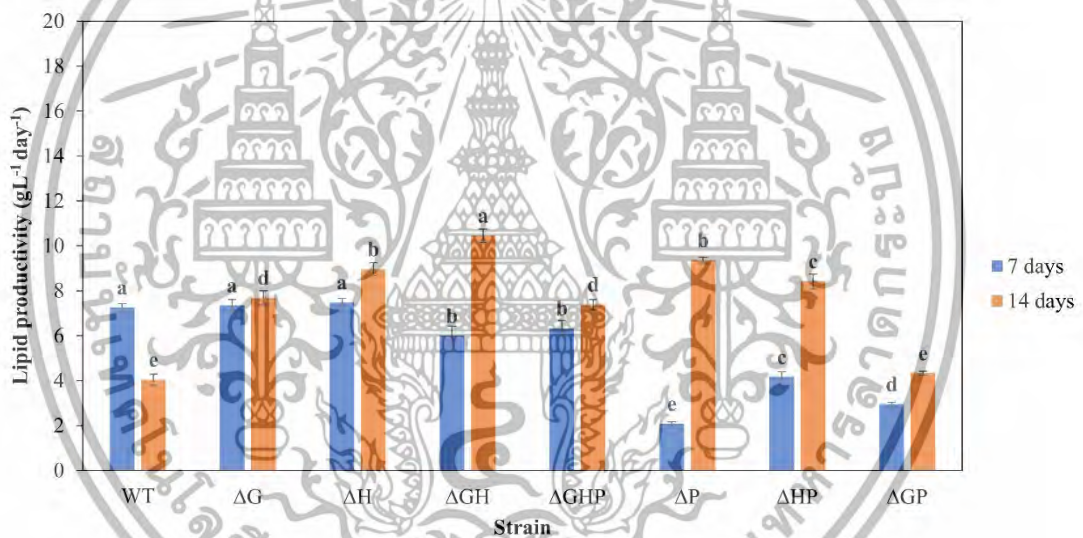
สายพันธุ์	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัม มิลลิลิตร ⁻¹)						
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12	วันที่ 14
WT	1.803 ± 0.038 ^b	2.354 ± 0.155 ^c	2.866 ± 0.130 ^f	3.454 ± 0.223 ^e	4.286 ± 0.171 ^e	4.636 ± 0.064 ^e	5.372 ± 0.064 ^e
ΔG	1.664 ± 0.150 ^{bc}	2.337 ± 0.064 ^c	3.425 ± 0.210 ^e	5.182 ± 0.063 ^{bc}	5.829 ± 0.229 ^c	6.888 ± 0.359 ^c	7.341 ± 0.076 ^c
ΔH	1.744 ± 0.172 ^{bc}	2.747 ± 0.106 ^b	3.649 ± 0.032 ^{cde}	4.915 ± 0.079 ^{cd}	6.007 ± 0.134 ^{bc}	7.523 ± 0.130 ^b	7.976 ± 0.358 ^b
ΔGH	1.685 ± 0.078 ^{bc}	2.739 ± 0.086 ^b	3.869 ± 0.070 ^{cd}	4.919 ± 0.169 ^{cd}	5.774 ± 0.070 ^c	6.674 ± 0.159 ^c	7.842 ± 0.273 ^b
ΔGHP	1.736 ± 0.045 ^{bc}	2.866 ± 0.086 ^b	3.924 ± 0.254 ^c	4.991 ± 0.127 ^{bc}	6.230 ± 0.156 ^b	6.560 ± 0.083 ^c	7.408 ± 0.182 ^c
ΔP	2.151 ± 0.019 ^a	3.632 ± 0.202 ^a	5.144 ± 0.216 ^a	6.109 ± 0.076 ^a	7.341 ± 0.198 ^a	7.971 ± 0.041 ^a	8.869 ± 0.045 ^a
ΔHP	1.604 ± 0.107 ^c	2.808 ± 0.077 ^b	4.568 ± 0.425 ^b	5.279 ± 0.051 ^b	6.248 ± 0.140 ^b	8.249 ± 0.095 ^a	8.992 ± 0.038 ^a
ΔGP	1.135 ± 0.083 ^d	2.421 ± 0.099 ^c	3.486 ± 0.121 ^{de}	4.650 ± 0.296 ^d	5.371 ± 0.268 ^d	5.517 ± 0.276 ^d	6.248 ± 0.275 ^d

4.2 ผลการวัดปริมาณลิพิด(%) อัตราการผลิตลิพิดและอัตราการผลิตชีวมวลของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์) ในอาหารเหลว BG11 ที่ 30 องศาเซลเซียส ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียให้เท่ากันที่ค่า OD₇₃₀ เท่ากับ 0.1 เป็นเวลา 14 วัน ทั้งหมด 4 ข้ำ แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์ไว้ในรูปเซลล์แห้งจากนั้นนำไปสกัดลิพิดด้วยวิธี Single step ทำการเปรียบเทียบปริมาณลิพิดและอัตราการผลิตลิพิดของแต่ละสายพันธุ์ในวันที่ 7 และ 14 (รูปที่ 4.3 และ 4.4) พบว่าในวันที่ 7 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔG จะมีปริมาณลิพิดสูงที่สุดและมีอัตราการผลิตสูงเทียบเท่ากับ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔH ส่วนในวันที่ 14 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔGP จะมีปริมาณลิพิดสูงที่สุด แต่ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔG จะมีอัตราการผลิตลิพิดสูงที่สุด มีรายงานพบว่าในช่วงระยะเริ่มแรกของ Stationary ไกลโคเจนและลิพิดจะถูกสะสมเพื่อใช้เป็นแหล่งกักเก็บคาร์บอน ต่อมาภายหลังระยะ Mid stationary จนถึงระยะ Late stationary ไกลโคเจนจะถูกสะสมเพิ่มขึ้นมากกว่าลิพิด (Monshupanee และคณะ, 2013) แต่ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔG และ ΔGP ถูกยั้งยั้งการสังเคราะห์ไกลโคเจนอาจทำให้มีการสะสมลิพิดเพิ่มขึ้นแทน ทำให้ปริมาณลิพิดเพิ่มมากขึ้นด้วย จากการคำนวณปริมาณลิพิด อัตราการผลิตชีวมวล อัตราการผลิตลิพิดและเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในวันที่ 7 และ 14 พบว่าในวันที่ 7 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔG จะมีปริมาณลิพิดสูงที่สุดเท่ากับ 27.065 ± 0.978 เปอร์เซ็นต์และมีอัตราการผลิตลิพิดสูงเทียบเท่า *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔH เท่ากับ 7.346 ± 0.027 , 7.252 ± 0.018 และ 7.479 ± 0.017 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ส่วนในวันที่ 14 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔGP จะมีปริมาณลิพิดสูงที่สุดเท่ากับ 24.500 ± 0.500 เปอร์เซ็นต์และอัตราการลิพิดเท่ากับ 4.331 ± 0.009 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งมีอัตราการลิพิดน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔGH ที่มีอัตราการผลิตลิพิดสูงที่สุดเท่ากับ 10.451 ± 0.030 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน เนื่องจาก *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔGH มีอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.047 กรัมต่อลิตรต่อวัน ในขณะที่ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔGP มีอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.018 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตารางที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 ปริมาณลิพิดของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย



รูปที่ 4.4 อัตราการผลิตลิพิดของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายของวันที่ 7 และ 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 อัตราการผลิตชีวมวล ปริมาณลิวตินและอัตราการผลิตลิวตินของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในวันที่ 7 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง

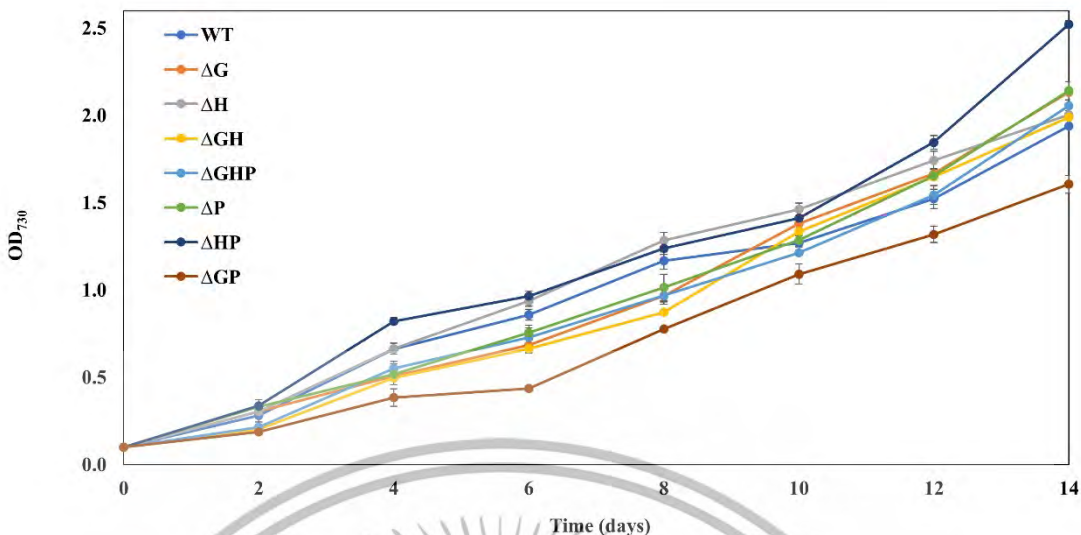
สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7 วัน			ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน		
	อัตราการผลิตชีวมวล (กรัม ลิตร ⁻¹ วัน ⁻¹)	ปริมาณลิวติน(%)	อัตราการผลิตลิวติน (มิลลิกรัม ลิตร ⁻¹ วัน ⁻¹)	อัตราการผลิตชีวมวล (กรัม ลิตร ⁻¹ วัน ⁻¹)	ปริมาณลิวติน(%)	อัตราการผลิตลิวติน (มิลลิกรัม ลิตร ⁻¹ วัน ⁻¹)
WT	0.037	19.524 ± 0.476 ^c	7.252 ± 0.018 ^a	0.033	12.361 ± 0.762 ^f	4.039 ± 0.025 ^e
ΔG	0.027	27.065 ± 0.978 ^a	7.346 ± 0.027 ^a	0.037	20.897 ± 0.842 ^c	7.687 ± 0.031 ^d
ΔH	0.032	23.268 ± 0.541 ^b	7.479 ± 0.017 ^a	0.049	18.452 ± 0.595 ^d	8.963 ± 0.029 ^b
ΔGH	0.047	12.727 ± 0.909 ^f	6.000 ± 0.043 ^b	0.047	22.424 ± 0.652 ^b	10.451 ± 0.030 ^a
ΔGHP	0.040	15.833 ± 0.833 ^e	6.333 ± 0.033 ^b	0.044	16.890 ± 0.502 ^e	7.389 ± 0.022 ^d
ΔP	0.015	13.573 ± 0.530 ^f	2.084 ± 0.008 ^e	0.044	21.131 ± 0.298 ^c	9.358 ± 0.013 ^b
ΔHP	0.028	15.143 ± 0.857 ^e	4.164 ± 0.024 ^c	0.044	19.246 ± 0.728 ^d	8.420 ± 0.032 ^c
ΔGP	0.016	17.935 ± 0.543 ^d	2.946 ± 0.009 ^d	0.018	24.500 ± 0.500 ^a	4.331 ± 0.009 ^e

4.3 ผลของการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลิพิดภายใน *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย

4.3.1 ผลของการศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่มีผลต่อการสะสมลิพิดภายใน *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย

4.3.1.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์) ในอาหารเหลว BG11 ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1% ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน มาวัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่า OD₇₃₀ พบว่าทุกสายพันธุ์จะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 2-8 (รูปที่ 4.5) ซึ่งคาดการณ์ว่าอาจเป็นระยะ Log มิงานวิจัยกล่าวว่า *Synechocystis* sp. PCC 6803 สามารถที่จะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลทำให้การเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพื่อใช้ในการตรึงคาร์บอนเพิ่มขึ้น (Tanniche และคณะ, 2020) จากผลการเจริญเติบโต สามารถนำไปคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) และระยะเวลาการทวีคูณ (Doubling time) และเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 95% พบว่า *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔH และ ΔHP มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.375 ± 0.003 ชั่วโมง⁻¹ และ 0.387 ± 0.003 ชั่วโมง⁻¹ ตามลำดับ และมีระยะเวลาการทวีคูณเท่ากับ 1.849 ± 0.014 ชั่วโมง และ 1.792 ± 0.015 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) เนื่องจาก *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔH และ ΔHP สามารถสังเคราะห์ไกลโคเจนได้ ทำให้น้ำตาลกลูโคสถูกนำมาใช้มากขึ้น การเจริญเติบโตจึงเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน (Monshupanee และคณะ, 2013)



รูปที่ 4.5 การเจริญเติบโตของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.1%

ตารางที่ 4.4 อัตราการเจริญจำเพาะและระยะเวลาการทวีคูณของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.1%

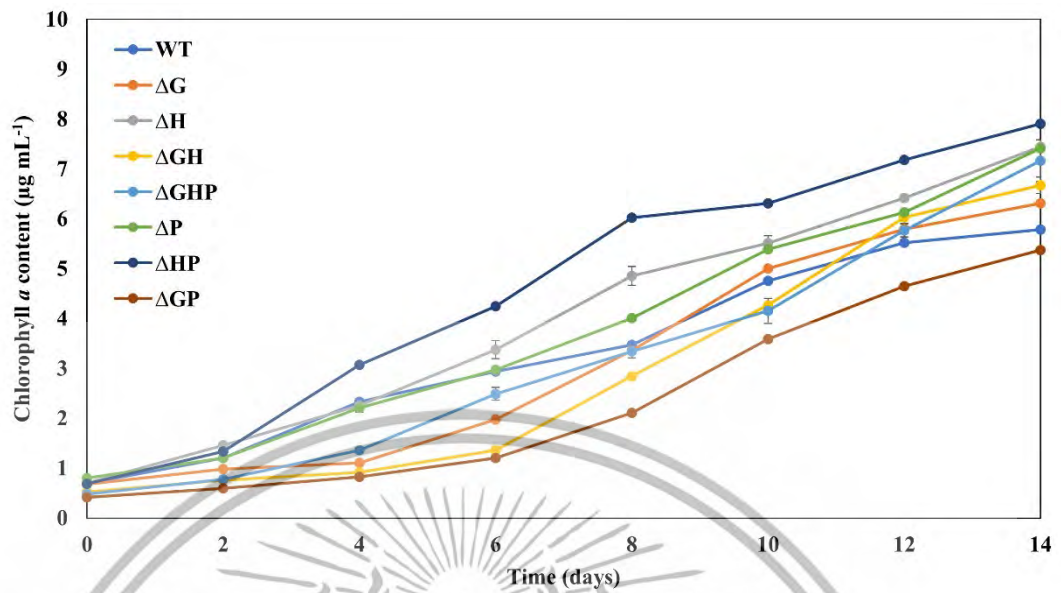
สายพันธุ์	อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน ⁻¹)	ระยะเวลาการทวีคูณ (วัน)
WT	0.360 ± 0.005 ^b	1.927 ± 0.026 ^{bc}
ΔG	0.309 ± 0.012 ^d	2.247 ± 0.084 ^e
ΔH	0.375 ± 0.003 ^a	1.849 ± 0.014 ^{ab}
ΔGH	0.326 ± 0.013 ^c	2.131 ± 0.085 ^d
ΔGHP	0.352 ± 0.010 ^b	1.969 ± 0.056 ^c
ΔP	0.317 ± 0.004 ^{cd}	2.188 ± 0.027 ^{de}
ΔHP	0.387 ± 0.003 ^a	1.792 ± 0.015 ^a
ΔGP	0.255 ± 0.005 ^e	2.718 ± 0.055 ^f

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.2 ผลการวัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์) ในอาหารเหลว BG11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1% ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำตัวอย่างมาวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ พบว่าทุกสายพันธุ์มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ สูงสุดในวันที่ 14 (รูปที่ 4.6) จากการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าในวันที่ 14 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ HP จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ สูงสุดเท่ากับ 7.908 ± 0.019 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.5) เมื่อเทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของทุกสายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่ไม่ได้เติมน้ำตาลกลูโคส ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจาก การเติมน้ำตาลกลูโคสในอาหารเหลว BG11 ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Synechocystis* อาจส่งผลกระทบต่อการสร้างเม็ดสี (Ryu และคณะ, 2004)





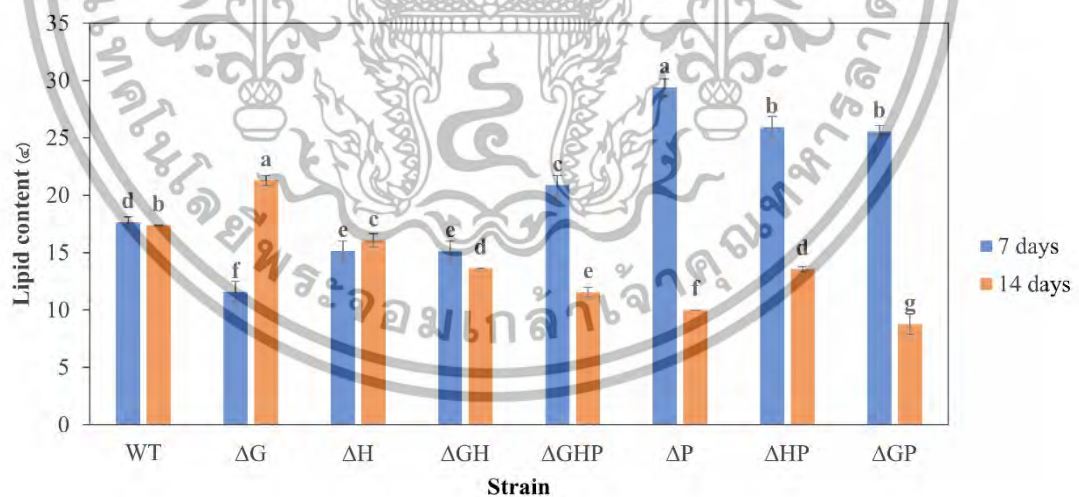
รูปที่ 4.6 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย

ตารางที่ 4.5 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1%

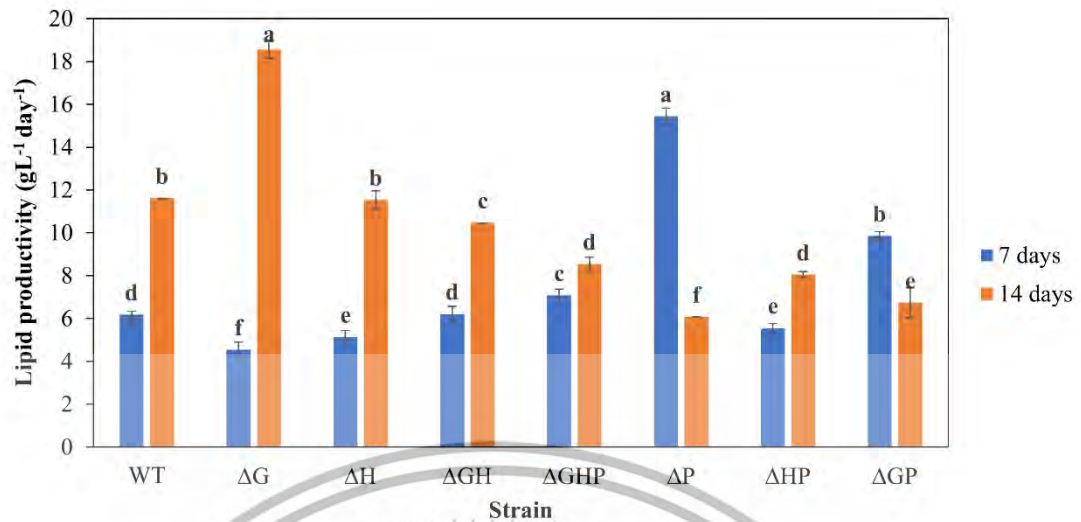
สายพันธุ์	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัม มิลลิลิตร ⁻¹)						
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12	วันที่ 14
WT	1.207 ± 0.022 ^c	2.333 ± 0.026 ^b	2.942 ± 0.026 ^c	3.471 ± 0.032 ^d	4.758 ± 0.039 ^d	5.525 ± 0.046 ^e	5.783 ± 0.039 ^e
ΔG	0.982 ± 0.019 ^d	1.105 ± 0.025 ^e	1.977 ± 0.041 ^e	3.361 ± 0.051 ^d	5.004 ± 0.038 ^c	5.795 ± 0.032 ^d	6.312 ± 0.013 ^d
ΔH	1.456 ± 0.019 ^a	2.256 ± 0.130 ^{bc}	3.374 ± 0.182 ^b	4.856 ± 0.191 ^b	5.512 ± 0.146 ^b	6.418 ± 0.041 ^b	7.446 ± 0.032 ^b
ΔGH	0.758 ± 0.019 ^e	0.914 ± 0.038 ^f	1.363 ± 0.019 ^f	2.845 ± 0.025 ^e	4.267 ± 0.025 ^e	6.033 ± 0.127 ^c	6.672 ± 0.165 ^c
ΔGHP	0.775 ± 0.013 ^e	1.359 ± 0.013 ^d	2.489 ± 0.127 ^d	3.341 ± 0.128 ^d	4.153 ± 0.248 ^e	5.770 ± 0.132 ^d	7.167 ± 0.421 ^b
ΔP	1.207 ± 0.038 ^c	2.210 ± 0.034 ^c	2.976 ± 0.039 ^c	4.009 ± 0.026 ^c	5.389 ± 0.048 ^b	6.130 ± 0.032 ^c	7.413 ± 0.026 ^b
ΔHP	1.334 ± 0.051 ^b	3.073 ± 0.034 ^a	4.250 ± 0.051 ^a	6.024 ± 0.041 ^a	6.308 ± 0.019 ^a	7.184 ± 0.053 ^a	7.908 ± 0.019 ^a
ΔGP	0.597 ± 0.013 ^f	0.826 ± 0.038 ^f	1.202 ± 0.041 ^e	2.112 ± 0.019 ^f	3.586 ± 0.019 ^f	4.652 ± 0.026 ^f	5.372 ± 0.034 ^f

4.3.1.3 ผลการวัดปริมาณลิพิด(%) อัตราการผลิตลิพิดและอัตราการผลิตชีวมวล

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์) ในอาหารเหลว BG11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1% ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 และ 14 วัน เก็บเกี่ยวเซลล์และนำเซลล์แห้งมาสกัดลิพิด ทำการเปรียบเทียบปริมาณลิพิดและอัตราการผลิตลิพิดของแต่ละสายพันธุ์ในวันที่ 7 และ 14 พบว่าในวันที่ 7 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔP จะมีปริมาณลิพิดและมีอัตราการผลิตสูงที่สุด ส่วนในวันที่ 14 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔG จะมีปริมาณลิพิดและมีอัตราการผลิตสูงที่สุด (รูปที่ 4.7 และ 4.8) จากการคำนวณปริมาณลิพิด อัตราการผลิตชีวมวล อัตราการผลิตลิพิดและเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4.3) พบว่าในวันที่ 7 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔP จะมีปริมาณลิพิดสูงที่สุดเท่ากับ 29.400 ± 0.741 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการผลิตลิพิดสูงสุดเท่ากับ 15.435 ± 0.039 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ส่วนในวันที่ 14 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔG จะมีปริมาณลิพิดสูงที่สุดเท่ากับ 21.286 ± 0.453 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตเท่ากับ 18.549 ± 0.039 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งสังเกตได้ว่าอัตราการผลิตลิพิดจะมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 แบบไม่เติมน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากอัตราการผลิตชีวมวลมีปริมาณที่สูงขึ้น (ตารางที่ 4.3 และ 4.6) เป็นผลมาจากน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มเข้าไปมีส่วนทำให้ปริมาณชีวมวลเพิ่มสูงขึ้น (Monshupanee และคณะ, 2013)



รูปที่ 4.7 ปริมาณลิพิดของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายของในอาหารเหลว BG11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1% ที่เพาะเลี้ยงในวันที่ 7 และ 14



รูปที่ 4.8 อัตราการผลิตลิพิดของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1% ในวันที่ 7 และ 14

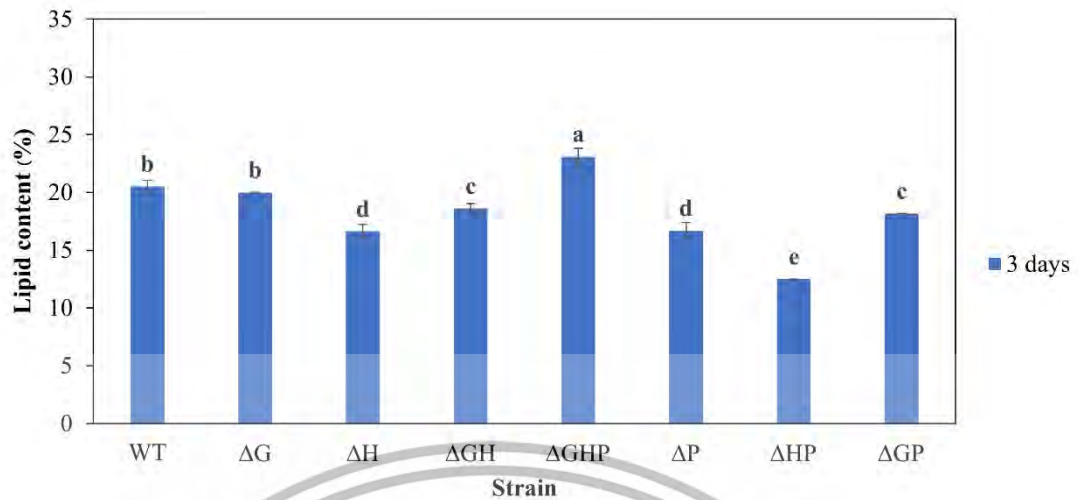
ตารางที่ 4.6 อัตราการผลิตชีวมวล ปริมาณลิวตินและอัตราการผลิตลิวตินของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.1% ในวันที่ 7 และ 14

สายพันธุ์	7 วัน			14 วัน		
	อัตราการผลิตชีวมวล (กรัม ลิตร ⁻¹ วัน ⁻¹)	ปริมาณลิวติน(%)	อัตราการผลิตลิวติน (มิลลิกรัม ลิตร ⁻¹ วัน ⁻¹)	อัตราการผลิตชีวมวล (กรัม ลิตร ⁻¹ วัน ⁻¹)	ปริมาณลิวติน(%)	อัตราการผลิตลิวติน (มิลลิกรัม ลิตร ⁻¹ วัน ⁻¹)
WT	0.035	17.655 ± 0.456 ^d	6.179 ± 0.016 ^d	0.067	17.391 ± 0.000 ^b	11.615 ± 0.000 ^b
ΔG	0.039	11.563 ± 0.938 ^f	4.542 ± 0.037 ^f	0.087	21.286 ± 0.453 ^a	18.549 ± 0.039 ^a
ΔH	0.034	15.143 ± 0.857 ^e	5.138 ± 0.029 ^e	0.072	16.071 ± 0.595 ^c	11.537 ± 0.043 ^b
ΔGH	0.041	15.125 ± 0.875 ^e	6.212 ± 0.036 ^d	0.077	13.636 ± 0.000 ^d	10.471 ± 0.000 ^c
ΔGHP	0.034	20.870 ± 0.870 ^c	7.081 ± 0.030 ^c	0.074	11.556 ± 0.444 ^e	8.543 ± 0.033 ^d
ΔP	0.053	29.400 ± 0.741 ^a	15.435 ± 0.039 ^a	0.061	10.000 ± 0.000 ^f	6.071 ± 0.000 ^f
ΔHP	0.021	25.938 ± 0.938 ^b	5.558 ± 0.020 ^e	0.059	13.563 ± 0.230 ^d	8.041 ± 0.014 ^d
ΔGP	0.039	25.543 ± 0.543 ^b	9.852 ± 0.021 ^b	0.077	8.773 ± 0.904 ^s	6.737 ± 0.069 ^e

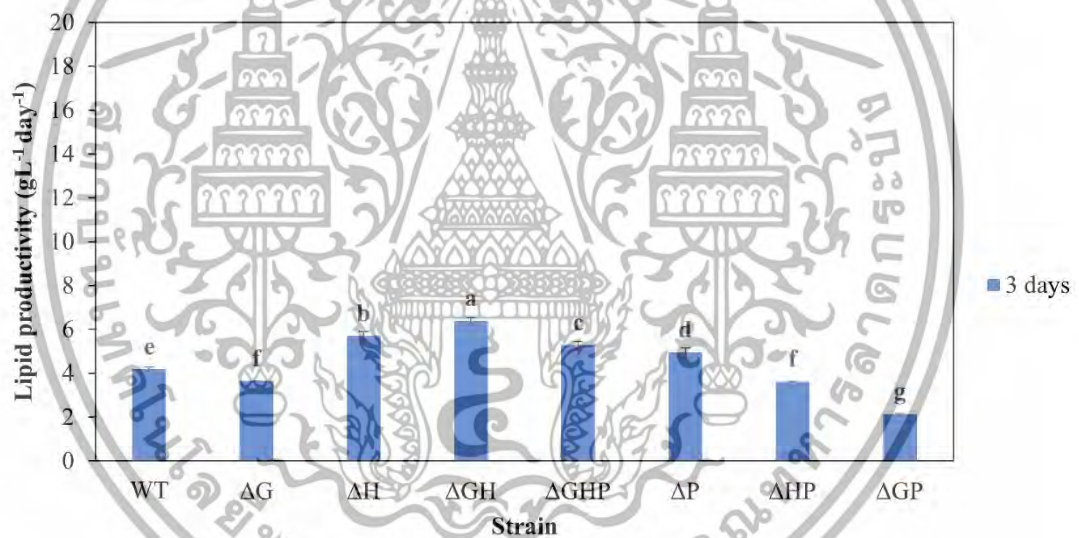
4.3.2 ผลของการศึกษาการขาดธาตุไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิดภายใน *Synechocystis* sp.

PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์) เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำเซลล์มาปรับสภาพในอาหารเหลว BG11 ที่ขาดธาตุไนโตรเจน (ไม่ใส่โซเดียมไนเตรทลงไปในการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะทำทั้งหมด 4 ข้ำ เก็บเกี่ยวเซลล์และนำเซลล์แห้งมาสกัดลิพิด ทำการเปรียบเทียบปริมาณลิพิดและอัตราการผลิตลิพิดของแต่ละสายพันธุ์พบว่า Δ GHP จะมีปริมาณลิพิดสูงที่สุดในขณะที่ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ GH มีอัตราการผลิตสูงที่สุดเมื่อเทียบกับอีก 7 สายพันธุ์ (รูปที่ 4.9 และ 4.10) จากการคำนวณปริมาณลิพิด อัตราการผลิตชีวมวล อัตราการผลิตลิพิดในระยะเวลา 3 วันหลังจากปรับสภาพเซลล์ในสภาวะการขาดธาตุไนโตรเจนและเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4.3) พบว่า *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ GHP จะมีปริมาณลิพิดสูงที่สุดเท่ากับ 23.103 ± 0.707 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการลิพิดเท่ากับ 5.281 ± 0.016 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งมีอัตราการลิพิดน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ GH ที่มีอัตราการผลิตลิพิดสูงที่สุดเท่ากับ 6.382 ± 0.015 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน เนื่องจาก *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ GH มีอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.034 กรัมต่อลิตรต่อวัน ในขณะที่ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ GP มีอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.023 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.1% จะเห็นได้ชัดว่าอัตราการผลิตชีวมวลและปริมาณลิพิดลดน้อยลง (ตารางที่ 4.6) อาจเป็นไปได้ว่าการขาดไนโตรเจนไม่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของ *Synechocystis* sp. PCC 6803



รูปที่ 4.9 ปริมาณลิพิดของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่บ่มในอาหารขาดไนโตรเจนเป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 4.10 อัตราการผลิตลิพิดของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่บ่มในอาหารขาดไนโตรเจนเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 อัตราการผลิตชีวมวล ปริมาณลิพิดและอัตราการผลิตลิพิดของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 7 วันและที่บ่มในอาหารขาดไนโตรเจนเป็นเวลา 3 วัน

สายพันธุ์	อัตราการผลิตชีวมวล (กรัม ลิตร ⁻¹ วัน ⁻¹)	ปริมาณลิพิด(%)	อัตราการผลิตลิพิด (มิลลิกรัม ลิตร ⁻¹ วัน ⁻¹)
WT	0.020	20.535 ± 0.536 ^b	4.180 ± 0.011 ^e
ΔG	0.018	20.000 ± 0.000 ^b	3.643 ± 0.000 ^f
ΔH	0.034	16.621 ± 0.621 ^d	5.699 ± 0.021 ^b
ΔGH	0.034	18.615 ± 0.433 ^c	6.382 ± 0.015 ^a
ΔGHP	0.023	23.103 ± 0.707 ^a	5.281 ± 0.016 ^c
ΔP	0.030	16.696 ± 0.696 ^d	4.949 ± 0.021 ^d
ΔHP	0.029	12.500 ± 0.000 ^e	3.616 ± 0.000 ^f
ΔGP	0.012	18.182 ± 0.000 ^c	2.143 ± 0.000 ^g

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ทั้ง 7 สายพันธุ์ และปัจจัยที่ส่งผลต่อการสะสมลิพิดโดยเพิ่มแหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาลกลูโคส และในสภาวะการขาดธาตุไนโตรเจนสรุปได้ว่า

5.1.1 จากการวัดการเจริญเติบโตของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้ง 7 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว BG-11 สรุปได้ว่า *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ HP มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.329 ± 0.004 ชั่วโมง⁻¹ และมีระยะการทวีคูณเท่ากับ 2.104 ± 0.027 ชั่วโมง และมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดเท่ากับ 8.992 ± 0.038 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 14

5.1.2 จากการวัดปริมาณลิพิด อัตราการผลิตลิพิดและอัตราการผลิตชีวมวลของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้ง 7 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว BG11 สรุปได้ว่า ในวันที่ 7 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ G จะมีปริมาณลิพิดสูงที่สุดเท่ากับ 27.065 ± 0.978 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการผลิตลิพิดเท่ากับ 7.346 ± 0.027 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ส่วนในวันที่ 14 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ GP จะมีปริมาณลิพิดสูงที่สุดเท่ากับ 24.500 ± 0.500 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการลิพิดเท่ากับ 4.331 ± 0.009 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งมีอัตราการลิพิดน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ GH ที่มีอัตราการผลิตลิพิดสูงที่สุดเท่ากับ 10.451 ± 0.030 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน เนื่องจาก *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ GH มีอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.047 กรัมต่อลิตรต่อวัน ในขณะที่ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ GP มีอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.018 กรัมต่อลิตรต่อวัน

5.1.3 จากการศึกษาผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญเติบโตของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้ง 7 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว BG11 ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.1% สรุปได้ว่า *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ H และ Δ HP มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.375 ± 0.003 ชั่วโมง⁻¹ และ 0.387 ± 0.003 ชั่วโมง⁻¹ ตามลำดับ และมีระยะการทวีคูณเท่ากับ 1.849 ± 0.014 ชั่วโมง และ 1.792 ± 0.015 ชั่วโมง⁻¹ และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย Δ HP มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ สูงสุดเท่ากับ 7.908 ± 0.019 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.1.4 จากการศึกษาผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการสะสมลิพิดของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้ง 7 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว BG11 ที่มีน้ำตาลกลูโคส เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.1% สรุปได้ว่า พบว่าในวันที่ 7 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔP จะมีปริมาณลิวตินสูงสุดเท่ากับ 29.400 ± 0.741 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการผลิตลิวตินสูงสุดเท่ากับ 15.435 ± 0.039 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และมีอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.053 กรัมต่อลิตรต่อวัน ส่วนในวันที่ 14 *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔG จะมีปริมาณลิวตินสูงสุดเท่ากับ 21.286 ± 0.453 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตเท่ากับ 18.549 ± 0.039 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวันและมีอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.087 กรัมต่อลิตรต่อวัน

5.1.5 จากการศึกษผลของการขาดธาตุไนโตรเจนต่อการสะสมลิวตินของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้ง 7 สายพันธุ์ สรุปได้ว่า *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔGHP จะมีปริมาณลิวตินสูงสุดเท่ากับ 23.103 ± 0.707 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตเท่ากับ 5.281 ± 0.016 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งมีอัตราการลิวตินน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔGH ที่มีอัตราการผลิตลิวตินสูงสุดเท่ากับ 6.382 ± 0.015 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน เนื่องจาก *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔGH มีอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.034 กรัมต่อลิตรต่อวัน ในขณะที่ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย ΔGP มีอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.023 กรัมต่อลิตรต่อวัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรทำการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 ในระยะเวลามากกว่า 14 วัน เพื่อศึกษาอายุของเซลล์อย่างชัดเจน

5.2.2 ควรศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมากกว่าความเข้มข้นเดี่ยว เพื่อทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสะสมลิวตินของ *Synechocystis* sp. PCC 6803

5.2.3 ควรศึกษาสภาวะทางกายภาพที่อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิวตินของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เช่น แสง, pH หรือ อุณหภูมิ เพื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสะสมลิวตินของ *Synechocystis* sp. PCC 6803

เอกสารอ้างอิง

- Md. Rezaul Islam Khan, Yushu Wang, Shajia Afrin, Lin He and Gang Ma. 2018. Glycogen and Extracellular Glucose Estimation from Cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. Bio-protocol Vol 8 Iss 09.
- APEX CHEMICALS. 2023. ไบโอดีเซล (Biodiesel) คืออะไร? เกิดขึ้นได้อย่างไร? และมีพัฒนาในประเทศไทยอย่างไร?. [Online]. เข้าถึงได้จาก <https://www.apexchemicals.co.th/>
- Chattip Prommuak, Prasert Pavasant, Armando T. Quitain, Motonobu Goto and Artiwan Shotipruk. 2012. Microalgal Lipid Extraction and Evaluation of Single-Step Biodiesel Production. ENGINEERING JOURNAL Volume 16 Issue 5
- Daming Huang, Haining Zhou and Lin Lin. 2012. Biodiesel: an Alternative to Conventional Fuel. Energy Procedia. 16 : 1874-1885.
- Imen Tanniche, Eva Collakova, Cynthia Denbow and Ryan S. Senger. 2020. Characterizing glucose, illumination, and nitrogen-deprivation phenotypes of *Synechocystis* PCC 6803 with Raman spectroscopy. Peer J.
- J. Lelieveld, K. Klingmüller, A. Pozzer, R. T. Burnett, A. Haines and V. Ramanathan. 2019. Effects of fossil fuel and total anthropogenic emission removal on public health and climate. PNAS vol.116. No.15 : 7192-7197.
- Janine Kaewbai-ngam, Nannaphat Sukkasam, Onuma Phoraksa, Aran Incharoensakdi and Tanakarn Monshupanee. 2021. Production of glycogen, PHB, biohydrogen, NAD(P)H, and proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803 disrupted in metabolically linked biosynthetic pathway(s). Journal of Applied Phycology. 34:1983–1995
- Kamonchanock Eungrasamee, Rui Miao, Aran Incharoensakdi, Peter Lindblad and Saowarath Jantaro. 2019. Improved lipid production via fattyacid biosynthesis and free fatty acid recycling in engineered *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biotechnology for Biofuels. 12:8.
- Lauren A. Mills, Alistair J. McCormick and David J. Lea-Smith. 2020. Current knowledge and recent advances in understanding metabolism of the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Bioscience Reports.

- Leonidas Mavrouidakis, Eleftheria-Angeliki Valsami, Sofia Grafanaki, Theofania-Pagona Andreadaki, Demetrios F. Ghanotakis and Spiros A. Pergantis. 2019. The effect of nitrogen starvation on membrane lipids of *Synechocystis* sp. PCC 6803 investigated by using easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *BBA-Biomembranes* 1861: 183027.
- Maciej Ciebiada, Katarzyna Kubiak and Maurycy Daroch. 2020. Modifying the Cyanobacterial Metabolism as a Key to Efficient Biopolymer Production in Photosynthetic Microorganisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, 7204.
- Malihe Mehdizadeh Allaf and Hassan Peerhossaini. 2022. Cyanobacteria: Model Microorganisms and Beyond. *Microorganisms*, 10, 696.
- Martin Axelsson and Francesco Gentili. 2014. A Single-Step Method for Rapid Extraction of Total Lipids from Green Microalgae. *PLoS ONE* 9(2): e89643.
- Md. Fuad Hossain, R.R. Ratnayake, Shamim Mahbub, K.L. Wasantha Kumara and D.N. Magana-Arachchi. 2020. Identification and culturing of cyanobacteria isolated from freshwater bodies of Sri Lanka for biodiesel production. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 27 : 1514-1520
- Meng Chen, Haiying Tang, Hongzhi Ma, Thomas C. Holland, K.Y. Simon Ng and Steven O. Salley. 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolect*. *Bioresource Technology*. 102: 1649-1655.
- Miguel Lopo, Arnau Montagud, Emilio Navarro, Isabel Cunha, Andrea Zille, Pedro Fernández de Córdoba, Pedro Moradas-Ferreira, Paula Tamagnini และ Javier F. Urchueguía. 2012. Experimental and Modeling Analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 Growth. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 22: 71–82.
- N. Abas, A. Kalair and N. Khan. 2015. Review of fossil fuels and future energy technologies. *Futures*. 69: 31-49.
- Nannaphat Sukkasam, Aran Incharoensakdi and Tanakarn Monshupanee. 2021. Disruption of Hydrogen Gas Synthesis Enhances the Cellular Levels of NAD(P)H, Glycogen, Poly(3-hydroxybutyrate) and Photosynthetic Pigments Under Specific Nutrient Condition(s) in Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol*. 63(1): 135–147.

- Nicolae Scarlat and Jean-Francois Dallemand. 2011. Recent developments of biofuels/bioenergy sustainability certification: A global overview. *Energy Policy*. 39: 1630-1646.
- Office of Energy Efficiency & Renewable Energy. 2023. Renewable Energy. [Online]. <https://www.energy.gov/eere/renewable-energy>
- RAQUEL S. CORDEIRO, IZABELA C.D. VAZ, SÉRGIA M.S. MAGALHÃES² and FRANCISCO A.R. BARBOSA. 2017. Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria. *An Acad Bras Cienc*. 89.
- Rosmarie Rippka, Josette Deruelles, John B. Waterbury, Michael Herdman and Roger Y. Stanier. 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General MicrobioZogy*. 111 : 1-61.
- Saba Ahmed, Parini Shah and Owaïs Ahmed. 2023. Biochemistry, Lipids. *StatPearls*. [Online]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525952/>
- Shurooq T. Al-Humairi, Jonathan G.M. Lee and Adam P. Harvey. 2022. Direct and rapid production of biodiesel from algae foamate using a homogeneous base catalyst as part of an intensified process. *Energy Conversion and Management*: X. 16.
- Sophie Mazard , Anahit Penesyan , Martin Ostrowski , Ian T. Paulsen and Suhelen Egan. 2016. Tiny Microbes with a Big Impact: The Role of Cyanobacteria and Their Metabolites in Shaping Our Future. *Mar. Drugs*, 14, 97.
- Sustainable Energy Authority of Ireland. 2023. What is Bioenergy?. [Online]. <https://www.seai.ie/technologies/bioenergy/what-is-bioenergy/>
- Thanakarn Monshupanee and Aran Incharoensakdi. 2013. Enhanced accumulation of glycogen, lipids and polyhydroxybutyrate under optimal nutrients and light intensities in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Applied Microbiology* ISSN. 116: 830-838.
- Takashi Osanai, Sousuke Imamura, Munehiko Asayama, Makoto Shirai, Iwane Suzuki, Norio Murata and Kan Tanaka. 2006. Nitrogen Induction of Sugar Catabolic Gene Expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research*. 13 : 185-195.
- Vincenzo Senatore, Estel Rueda, Marta Bellver, Rubén Díez-Montero, Ivet Ferrer, Tiziano Zarra, Vincenzo Naddeo and Joan García c. 2023. Production of phycobiliproteins, bioplastics and lipids by the cyanobacteria *Synechocystis* sp. treating secondary effluent in a biorefinery approach. *Science of the Total Environment*. 857.

- Yi Yu, Le You, Dianyi Liu, Whitney Hollinshead, Yinjie J. Tang and Fuzhong Zhang. 2013. Development of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a Phototrophic Cell Factory. *Marine Drugs*. 11(8) : 2894-2916
- ดร.อนุสรณ์ เชิดทอง. 2023. บทที่ 4 ลิพิดและกรดไขมัน (Lipids and Fatty Acids). [Online]. เข้าถึงได้จาก <https://ag2.kku.ac.th/eLearning/137748/.pdf>
- สิริพร สุธา. 2560. ความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในระบบนิเวศป่าชายเลนทางภาคตะวันออกของประเทศไทย. วิทยาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
- สุภัตรา ทรัพย์อุปการ. 2562. ลิพิด คืออะไร มาทำความรู้จักกันหน่อย. [Online]. เข้าถึงได้จาก <https://www.scimath.org/article-chemistry/item/>
- สุรศักดิ์ ละลอกน้ำและบงกช บุญบุรพงษ์. 2555. ศักยภาพของไซยาโนแบคทีเรียในนาคตประเทศไทย. วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้. ปีที่ 3 ฉบับที่ 2.
- อ.ดร.อินทรีรา ขุดแก้ว. 2558. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย. [Online]. เข้าถึงได้จาก <https://biology.ipst.ac.th/?p=2970>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนประกอบอาหาร BG11 (Rippka และคณะ, 1977)

Stock 100X BG11 ในปริมาตร 1 ลิตร (10 มิลลิลิตรต่อลิตร)

NaNO_3	149.55	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.48	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.6	กรัม
Citric acid ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$)	0.6	กรัม
Na_2EDTA	0.104	กรัม

Trace metal mix ในปริมาตร 1 ลิตร (1 มิลลิลิตรต่อลิตร)

H_3BO_4	2.86	กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.222	กรัม
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.352	กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079	กรัม
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0494	กรัม

สาร 3 ตัว 1000X ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร (1 มิลลิลิตรต่อลิตร)

Na_2CO_3	2	กรัม
$\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$	3.05	กรัม
FeNH_4 Citrate	0.6	กรัม



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ

วันที่ 28 เดือน มิถุนายน พ.ศ 2567

ข้าพเจ้า นางสาว อาทิตยา สุยะหลาน รหัสนักศึกษา 63050436

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การเจริญเติบโตและการสะสมลิพิดของไซยาโนแบคทีเรีย Synechocystis sp. PCC 6803 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย

ชื่อภาษาอังกฤษ Growth and Lipid Accumulation of Wildtype and Mutant Strains of Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 ปีการศึกษา 2566

เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.37%

ลงชื่อ อาทิตยา สุยะหลาน

(นางสาวอาทิตยา สุยะหลาน)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พุกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษได้ตรวจสอบโครงการพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ สรัญญา พันธุ์พุกษ์

(รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้