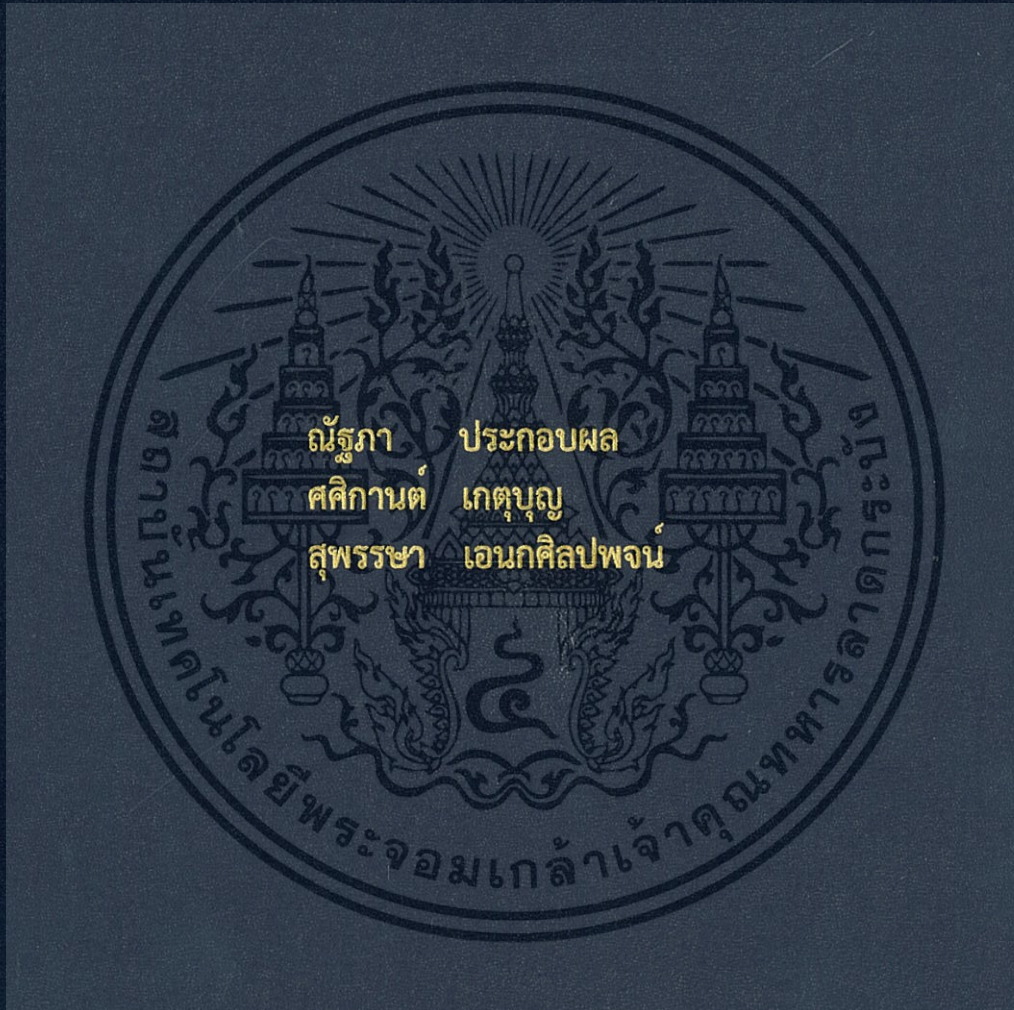


การผลิตโปรตีนของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหาร

GREEN ALGAL PROTEIN PRODUCTION IN NUTRIENTS  
DEPRIVATION MEDIA



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2560

# GREEN ALGAL PROTEIN PRODUCTION IN NUTRIENTS DEPRIVATION MEDIA



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE  
(ENVIRONMENTAL CHEMISTRY)  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY, FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การผลิตโปรตีนของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหาร  
GREEN ALGAL PROTEIN PRODUCTION IN NUTRIENTS  
DEPRIVATION MEDIA

ชื่อนักศึกษา นางสาวณัฐภา ประกอบผล รหัสนักศึกษา 57050598  
นางสาวศศิกานต์ เกตุบุญ รหัสนักศึกษา 57050642  
นางสาวสุพรรณษา เอนกศิลป์พจน์ รหัสนักศึกษา 57050653  
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)  
ภาควิชา เคมี  
ปีการศึกษา 2560  
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้  
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
(เคมีสิ่งแวดล้อม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. ชมพูนุท ไชยรักษ์ ประธานกรรมการ	
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการ	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตโปรตีนของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหาร	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐภา ประกอบผล	รหัสนักศึกษา 57050598
	นางสาวศศิกันต์ เกตุบุญ	รหัสนักศึกษา 57050642
	นางสาวสุพรรณษา เอนกศิลปพจน์	รหัสนักศึกษา 57050653
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)	
ภาควิชา	เคมี	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2560	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. เชิดศักดิ์	มณีนรัตน์รุ่งโรจน์

### บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กเป็นแหล่งอาหารที่หลากหลาย สามารถผลิตโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันจากเซลล์ได้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการนำสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Tetraspora* sp. CU2551, *Bumilleriopsis peterseniana*, KS01 และ KS03 มาสกัดและแยกโปรตีนในสภาวะการขาดธาตุอาหาร โดยนำเซลล์จากอาหาร TAP (Tris-Acetate-Phosphate) ย้ายสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ 11 สูตร ได้แก่ อาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP), อาหาร TAP ที่ขาดแคลเซียม (TAP-Ca), อาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N), อาหาร TAP ที่ขาดแมกนีเซียม (TAP-Mg), อาหาร TAP ที่ขาดกำมะถัน (TAP-S), อาหาร TAP ที่ขาดฟอสฟอรัส (TAP-P), อาหาร TAP ที่ขาดเหล็ก (TAP-Fe), อาหาร TAP ที่ขาดแมงกานีส (TAP-Mn), อาหาร TAP ที่ขาดสังกะสี (TAP-Zn), อาหาร TAP ที่ขาดทองแดง (TAP-Cu) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดโปรตีนโดยการให้ความร้อนสลับกับการใช้แรงเฉือน (glass bead vortexing) เพื่อทำลายผนังเซลล์ แล้วแยกเพื่อหาโปรตีนเครื่องหมายด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จากนั้นทำการตัดแบนด์โปรตีนเพื่อระบุชนิดด้วยวิธี LC-MS ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ KS03 ให้แบนด์โปรตีนที่น่าสนใจจำนวน 3 แบนด์ คือ KS03-B01, KS03-B02 และ KS03-B03 โดยแบนด์ KS03-B01 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 102% ในสภาวะอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) แบนด์ KS03-B02 มีการแสดงออกเพียง 44% ในสภาวะอาหาร TAP ที่ขาดแมกนีเซียม (TAP-Mg) และแบนด์ KS03-B03 มีการแสดงออกเพียง 2% ในสภาวะอาหาร TAP ที่ขาดเหล็ก (TAP-Fe) ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ Mass spectrometry คาดว่า KS03-B01 คือ เอนไซม์ RuBisCO แบนด์ KS03-B02 และ KS03-B03 คือโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (unknown) ส่วนในสาหร่ายอีก 3 สายพันธุ์ ได้ทำการตรวจสอบการเพิ่มขึ้น - ลดลงของโปรตีน โดยยังไม่ได้ระบุชนิดของโปรตีนเหล่านั้น

**คำสำคัญ :** *Bumilleriopsis peterseniana*, KS01, KS03, *Tetraspora* sp. CU2551, SDS-PAGE

และ การสกัดโปรตีนจากสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	GREEN ALGAL PROTEIN PRODUCTION IN NUTRIENTS DEPRIVATION MEDIA	
<b>Students</b>	Miss. Nattapa Prakobphol	Student ID 57050598
	Miss. Sasikan Katebun	Student ID 57050642
	Miss. Supansa Aneksinlapapot	Student ID 57050653
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Environmental Chemistry)	
<b>Department</b>	Chemistry	
<b>Faculty</b>	Science	
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
<b>Academic Year</b>	2017	
<b>Advisor</b>	Dr. Cherdasak Maneeruttanarungroj	

### Abstract

Green algae are various nutrient sources since they can produce protein carbohydrate and lipid. In this study, 4 green algae, *Tetraspora sp.* CU2551, *Bumilleriopsis peterseniana*, KS01 and KS03, were used for protein extraction and separation from nutrient deprivation media. Cells from TAP (Tris-Acetate-Phosphate) were used for adaptation in 11 nutrition deprivation conditions as TAP, calcium deprivation (TAP-Ca), potassium deprivation (TAP-K), nitrogen deprivation (TAP-N), magnesium deprivation (TAP-Mg), sulfur deprivation (TAP-S), phosphorus deprivation (TAP-P), ferric deprivation (TAP-Fe), manganese deprivation (TAP-Mn), zinc deprivation (TAP-Zn), copper deprivation (TAP-Cu) for 48 hours. Proteins were extracted using heat and shear force methods to break a cell organization, followed by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) method for protein separation. Interesting bands were excised and identified by LC-MS. The results showed that KS03 revealed 3 different brands indicated as KS03-B01, KS03-B02 and KS03-B03. KS03-B01 showed an increased expression as 102% when incubated in (Tris-Acetate-Phosphate), KS03-B02 showed a decreased expression yielding 44% when incubated in magnesium deprivation (TAP-Mg) and KS03-B03 showed a decreased expression representing 2% when incubated in ferric deprivation (TAP-Fe) KS03-B01 band was analyzed and showed identity as RuBisCO, the rest showed “unknown” protein. Up-down regulation were found in other algae with under investigated for band identification.

**Keywords :** *Bumilleriopsis peterseniana*, protein extraction from microalgae, KS01,

KS03, *Tetraspora sp.* CU2551 and SDS-PAGE

## กิตติกรรมประกาศ

แต่...ครูผู้แต่งแต้ม	ความฝัน
จัดจ่ายจัดแจงพลัน	แจ่มแจ้ง
มาเพิ่มเติมให้กัน	ถึงฝั่ง ฝันเฮย
ทุกอย่างที่ข้าฯแก้ง	โปรดให้โหล

คนข้างถนน 2553

โครงการพิเศษเรื่อง การผลิตโปรตีนของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหาร ฉบับนี้ สำเร็จสำเร็จจุล่งไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความอนุเคราะห์ ความช่วยเหลือ คำติชมที่เป็นประโยชน์ และความร่วมมือของผู้มีพระคุณหลายๆ ท่าน

ขอขอบพระคุณ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการปรับปรุงข้อบกพร่องของโครงการพิเศษนี้ ให้ความรู้ที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนดูแลและติดตามผลอย่างใกล้ชิดเสมอมา

ขอขอบพระคุณ กรรมการสอบโครงการพิเศษ ผศ.ดร.ชมพูนุท ไชยรักษ์ และ ดร.ธิชัย วัฒนวิจารณ์ ที่ให้ข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะต่างๆที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงและพัฒนาโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีวเคมี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ สาขาวิชาเคมี ที่ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ บิดา-มารดา และครอบครัวที่สนับสนุนให้ได้รับการศึกษา ตลอดจนเลี้ยงดูอบรมสั่งสอน เป็นกำลังใจ เป็นแรงผลักดันในการทำโครงการพิเศษให้สำเร็จจุล่งไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณมิตรภาพอันเป็นแรงขับเคลื่อนสำคัญ จากเพื่อน พี่ และน้อง รวมถึงทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวมานี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางผู้จัดทำโครงการพิเศษกราบขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ฉัฐภา	ประกอบผล
ศศิกานต์	เกตุบุญ
สุพรรณษา	เอนกศิลปจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
สารบัญแผนภูมิ	ญ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>2</b>
2.1 สาหร่าย	2
2.1.1 สาหร่ายสีเขียว	2
2.1.2 การจำแนกหมวดหมู่	2
2.2 การเลี้ยงสาหร่าย	5
2.2.1 อาหารสำหรับการเลี้ยงสาหร่าย	5
2.2.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย	6
2.2.3 ปัจจัยในการเจริญเติบโตของสาหร่าย	7
2.2.4 การแยกเชื้อสาหร่าย	8
2.3 สาหร่าย <i>Bumilleriopsis peterseniana</i>	10
2.4 สาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	11
2.5 การขาดธาตุอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย	11
2.6 Gel electrophoresis of protein	13
2.7 Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	14
2.8 โปรตีนมาตรฐาน	16
2.9 แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry; MS)	17
2.9.1 เทคนิค Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS)	18
2.9.2 เทคนิค Matrix assisted laser desorptiontime-of-flight-mass spectrometry (MALDITOFMS)	19
2.10 เอนไซม์ Rubisco	21
2.11 เทคนิคการวิเคราะห์โดยเครื่องถ่ายภาพเจลMolecular Imager GelDoc <sup>TM</sup> EZ	22
2.12 เทคนิคการวิเคราะห์โดยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.13 เทคนิคการใช้เครื่อง Laminar Flow Clean Bench (ตู้ลามินาร์)	25
2.14 เทคนิคการใช้เครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)	28
2.15 เทคนิคการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง	28
2.16 งานที่เกี่ยวข้อง	29
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>	<b>33</b>
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	33
3.1.1 เครื่องมือ	33
3.1.2 อุปกรณ์	33
3.2 สารเคมี	34
3.2.1 สารเคมีสำหรับทำอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์	
สูตรอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP)	
และสูตรอาหารที่ขาดธาตุอาหารอื่นๆ	34
3.2.2 สารเคมีสำหรับเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).	35
3.3 วิธีการเตรียมสารเคมี	35
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย	40
3.4.1 เพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ <i>Tetraspora</i> sp. CU2551, <i>Bumilleriopsis peterseniana</i> , KS01, KS03	40
3.4.2 การทำลายผนังเซลล์สาหร่ายเพื่อสกัดโปรตีน	42
3.4.3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีการ Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	43
3.4.4 การวิเคราะห์แบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหารด้วยเครื่อง LC- MS/MS	44
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล</b>	<b>46</b>
4.1 ผลการวิจัย	46
4.1.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตทางกายภาพของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03, <i>Bumilleriopsis peterseniana</i> , KS01 และ <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	46
4.1.2 ผลการศึกษาค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03, <i>Bumilleriopsis peterseniana</i> , KS01 และ <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	51

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.3 ค่าความเข้มข้นแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหาร ของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์	58
4.1.4 ผลการสังตรวจจากการนำแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะขาด ธาตุอาหาร ของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03 จำนวน 3 แบนด์ ไปวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยกลางด้านชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	66
4.2 วิจารณ์ผล	67
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b>	<b>68</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย	68
5.2 ข้อเสนอแนะ	69
เอกสารอ้างอิง	70
ภาคผนวก ก	72



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 3.1 การเตรียม Stacking gel และ Separating gel ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร	39
ตารางที่ 3.2 การเตรียมสารละลาย Loading Buffer (Loading Dye) อัตราส่วน 5X ปริมาตร 5 มิลลิลิตร	39
ตารางที่ 3.3 การเตรียมสารละลาย Running Buffer อัตราส่วน 1X ปริมาตร 1ลิตร	40
ตารางที่ 4.1 แสดงค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03	52
ตารางที่ 4.2 แสดงค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสายพันธุ์ <i>Bumilleriopsis peterseniana</i>	53
ตารางที่ 4.3 แสดงค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสายพันธุ์ KS01	54
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสายพันธุ์ <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	55



## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย	7
รูปที่ 2.2 ลักษณะการลากเส้นบนอาหารวุ้น	9
รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการคัดแยกเชื้อบนอาหารวุ้น	10
รูปที่ 2.4 เซลล์สาหร่าย <i>Bumilleriopsis peterseniana</i>	10
รูปที่ 2.5 เซลล์สาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	11
รูปที่ 2.6 การเข้าจับของ SDS กับโปรตีน ซึ่งจะทำให้โปรตีนมีรูปร่างเป็นเส้นเหยียด และมีประจุลบ	14
รูปที่ 2.7 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แบบ discontinuous gel	15
รูปที่ 2.8 เครื่อง SDS-PAGE	16
รูปที่ 2.9 องค์ประกอบของเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี	17
รูปที่ 2.10 หลักการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค label (isotope) LC-MS	18
รูปที่ 2.11 หลักการทำงานของเทคนิค MALDI-TOF MS	19
รูปที่ 2.12 หลักการ RuBisCO	21
รูปที่ 2.13 การตรึง CO <sub>2</sub>	21
รูปที่ 2.14 การตรึง CO <sub>2</sub>	22
รูปที่ 2.15 การทำงานของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer	25
รูปที่ 2.16 แผ่นกรอง HEPA	27
รูปที่ 2.17 การเปรียบเทียบน้ำหนักโปรตีนด้วย SDS-PAGE	29
รูปที่ 2.18 รูปแบบการร่อนโปรตีนของ Jerusalem artichoke ( <i>Helianthus tuberosus</i> L)	30
รูปที่ 2.19 Native PAGE ของเอนไซม์เบต้า-กาแลคทิเดสบริสุทธ์ที่ได้จากไอโซเลท B1.2	31
รูปที่ 2.20 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน	32
รูปที่ 4.1 สีของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03	47
รูปที่ 4.2 สีของสาหร่ายสายพันธุ์ <i>Bumilleriopsis peterseniana</i>	48
รูปที่ 4.3 สีของสาหร่ายสายพันธุ์ KS01	49
รูปที่ 4.4 สีของสาหร่ายสายพันธุ์ <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	50
รูปที่ 4.5 ผลการแยกโปรตีนที่แสดงออกในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ ของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03	58
รูปที่ 4.6 ผลการแยกโปรตีนที่แสดงออกในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ ของสาหร่ายสายพันธุ์ <i>Bumilleriopsis peterseniana</i>	60
รูปที่ 4.7 ผลการแยกโปรตีนที่แสดงออกในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ ของสาหร่ายสายพันธุ์ KS01	62
รูปที่ 4.8 ผลการแยกโปรตีนที่แสดงออกในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ ของสาหร่ายสายพันธุ์ <i>Tetraspora</i> sp. CU2551	64
รูปที่ ก.1 ผลการแยกโปรตีนที่แสดงออกในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ ของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03	74

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
รูปที่ ก.2	ผลการวิเคราะห์แบนด์ที่ 1 KS03-B01	76
รูปที่ ก.3	ผลการวิเคราะห์แบนด์ที่ 1 KS03-B01	77
รูปที่ ก.4	ผลการวิเคราะห์แบนด์ที่ 2 KS03-B02	78
รูปที่ ก.5	ผลการวิเคราะห์แบนด์ที่ 3 KS03-B03	79



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่	หน้า
แผนภูมิที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ ในอาหารขาดธาตุอาหารต่างๆ	51
แผนภูมิที่ 4.2 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของแบนด์สเปกตรัมของแบนด์โปรตีน KS03-B01, KS03-B02, KS03-B03	59
แผนภูมิที่ 4.3 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของแบนด์สเปกตรัมของแบนด์โปรตีน Bu-B01, Bu-B02, Bu-B03, Bu-B04, Bu-B05, Bu-B06	61
แผนภูมิที่ 4.4 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของแบนด์สเปกตรัมของแบนด์โปรตีน KS01-B01, KS01-B02	63
แผนภูมิที่ 4.5 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของแบนด์สเปกตรัมของแบนด์โปรตีน Tetra-B01, Tetra-B02, Tetra-B03, Tetra-B04	65
แผนภูมิที่ ก.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายกับสูตรอาหาร TAP (-) ต่างๆ	73



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในระยะ 15 ปีที่ผ่านมา มีความนิยมศึกษาถึงการนำสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) มาเลี้ยงเพื่อผลิตในเชิงการค้าซึ่งพื้นฐานของการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กนี้ เป็นการใช้การสังเคราะห์แสงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายให้มีจำนวนมาก แล้วนำมาใช้เป็นแหล่งสารอาหาร แหล่งสารเคมี และพลังงาน สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจัดเป็นทรัพยากรชีวภาพ (bioresource) ที่มีความสำคัญมากทางเศรษฐกิจ เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณให้ได้จำนวนมากตามความต้องการ และเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการใช้เป็นวัตถุดิบในทางการเกษตรและทางอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารเสริมสุขภาพสำหรับคน อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมการผลิตเคมีภัณฑ์ เป็นต้น

ภายในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กมีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย อาทิ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ซึ่งสามารถสกัดออกมาจากเซลล์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยในแง่ของการศึกษาเรื่องการสกัดโปรตีนในสาหร่ายนั้น ได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่าแบนด์โปรตีนที่แสดงออกมาจะแตกต่างกันตามสภาวะการขาดธาตุอาหารต่างๆ เพราะการขาดธาตุอาหารแต่ละชนิดจะส่งผลต่อเซลล์ของสาหร่ายในรูปแบบที่ต่างกัน คือ การขาดธาตุอาหารหลักอาจทำให้เซลล์ไม่สามารถสังเคราะห์แสงและตายได้ การขาดธาตุอาหารรองอาจทำให้เซลล์บางส่วนชะงักการเติบโต และการขาดธาตุอาหารเสริมอาจไม่ส่งผลกระทบต่อวงจรชีวิต เนื่องจากไม่ใช่ธาตุอาหารที่เซลล์สาหร่ายต้องการมากนัก

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่เจริญเติบโตได้ง่ายและรวดเร็วมาเลี้ยงในสภาวะการขาดธาตุอาหารต่างๆ เนื่องจากธาตุอาหารอาจเป็นปัจจัยที่กำหนดการแสดงออกของแบนด์โปรตีน แล้วจึงทำการสกัดโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ แล้วตรวจสอบการแสดงออกของแบนด์และเปรียบเทียบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ใด ในสูตรอาหารใด ที่ให้ชนิดของโปรตีนที่แตกต่าง เพื่อให้ทราบถึงผลของการขาดธาตุอาหารในสภาวะที่กำหนด

### 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาโปรตีนที่แสดงออกในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ จากสาหร่าย 4 สายพันธุ์
2. เพื่อระบุโปรตีนเครื่องหมายที่เป็นตัวบอกความแตกต่างในแต่ละสภาวะการขาดธาตุอาหารของสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์

### 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. เลี้ยงสาหร่ายทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ KS03, *Bumilleriopsis peterseniana*, KS01 และ *Tetraspora* sp. CU2551
2. เลี้ยงสาหร่ายในอาหาร 11 สูตร ได้แก่ อาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP), อาหาร TAP ที่ขาดแคลเซียม (TAP-Ca), อาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N), อาหาร TAP ที่ขาดแมกนีเซียม (TAP-Mg), อาหาร TAP ที่ขาดกำมะถัน (TAP-S), อาหาร TAP ที่ขาดฟอสฟอรัส (TAP-P), อาหาร TAP ที่ขาดเหล็ก (TAP-Fe), อาหาร TAP ที่ขาดแมงกานีส (TAP-Mn), อาหาร TAP ที่ขาดสังกะสี (TAP-Zn) และอาหาร TAP ที่ขาดทองแดง (TAP-Cu)
3. การสกัดโปรตีนจากสาหร่ายด้วยวิธีการให้ความร้อนสลับกับการใช้แรงเฉือน
4. วิเคราะห์โปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)
5. นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาสรุปผลว่าอาหารทั้ง 11 สูตร มีผลต่อโปรตีนในสาหร่ายอย่างไร

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงโปรตีนโปรไฟล์ที่แสดงออกในอาหารที่ขาดธาตุอาหารต่างๆ จากสาหร่าย 4 สายพันธุ์
2. ได้องค์ความรู้พื้นฐานทางด้านโปรตีนเครื่องหมายเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นในการศึกษาเชิงลึก ระดับ Proteomic ต่อไป

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 สาหร่าย (Algae)

สาหร่ายเป็นชื่อเรียกสิ่งมีชีวิตหลายชนิดในอาณาจักรโปรติสตา มีลักษณะคล้ายพืช แต่ไม่มีราก ลำต้น และใบที่แท้จริง มีทั้งแบบเซลล์เดี่ยวและแบบที่ประกอบกันหลายเซลล์ขึ้นไป โดยการจำแนกสายพันธุ์ของสาหร่ายนั้นสามารถแบ่งได้ตามรูปร่างลักษณะภายนอก สีที่ปรากฏและรูปแบบการสืบพันธุ์

#### 2.1.1 สาหร่ายสีเขียว (ลัดดา, 2544)

สาหร่ายสีเขียวจะมีคลอโรพลาสต์ที่ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ a และ b สารสีประกอบได้แก่ carotene (เบต้า-แคโรทีน) ส่วน xanthophyll ได้แก่ lutein, diatoxanthin และ neoxanthin สารสีรวมอยู่ในคลอโรพลาสต์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน และมีมากกว่า 1 อัน สาหร่ายสีเขียวมีหรือไม่มีผนังเซลล์ ถ้าไม่มีก็จะมีเยื่อหุ้มเซลล์ pellicle, periplast หรือเป็นแบบ scale หนวด (flagella) มีจำนวน 1, 2, 4, 8, 16 เส้น ลักษณะของหนวดมีหลายแบบ เช่น แบบ acronematic, pantonematic หรือแบบมีเกล็ดอยู่บนหนวด จุดตั้งต้นของหนวดอยู่ที่ apical cell หรือ subapical cell ความยาวอาจเท่ากันหรือไม่เท่ากันก็ได้ มีอาหารสะสม (starch) ได้แก่ true starch หรือ paramylon (แป้งที่พบในพืชชั้นสูง) อยู่ในไซโตพลาสต์หรือคลอโรพลาสต์ รูปร่างของเซลล์มีหลายแบบ เช่น กลม รี กระสวย อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ โคลนีบางชนิดเป็นเส้นสาย filament บางกลุ่มมี gullet อยู่ที่ด้านบนสุดของเซลล์ เช่น *Euglenoids*

#### 2.1.2 การจำแนกหมวดหมู่

Christensen (1962, 1966) จำแนกหมวดหมู่ของสาหร่ายสีเขียว ตามรูปร่างลักษณะของเซลล์ได้ 3 Class ได้แก่ Class Chlorophyceae, Class Prasinophyceae และ Class Euglenophyceae ดังนี้

##### 2.1.2.1. Class Chlorophyceae สาหร่ายสีเขียว (green algae)

###### 1. ลักษณะ

สารสีสำหรับการสังเคราะห์แสงประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ a และ b ส่วน carotene ได้แก่ แอลฟา-แคโรทีน, เบต้า-แคโรทีน และแกมมา-แคโรทีน ส่วน xanthophyll ได้แก่ lutein, violaxanthin และ neoxanthin สารสีจะอยู่ในคลอโรพลาสต์ซึ่งมีหลายแบบ เช่น cup-shape (รูปถ้วย), girdle-shape (รูปเกือกม้า), reticulate (เป็นตาข่าย), spiral (ขดเป็นเกลียว), stellate (แฉกรูปดาว) และ band-shape (เป็นแถบ) ผนังเซลล์ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น ชั้นในเป็นพวกเซลลูโลส ชั้นนอกเป็นพวกเพคตินบางชนิด เช่น *Volvox* เป็นโคลนีไม่มีเซลลูโลสแต่เพคติน *Desmids* สามารถผลิตสารเมือก (mucilaginous substances) มาห่อหุ้มเซลล์ หนวดพบเฉพาะพวกที่เคลื่อนไหวได้มีจำนวน 1, 2, 4, 8 เส้น หรือเป็นวงรอบเซลล์ มีลักษณะคล้ายแส้ (acronematic) ถ้ามีหนวดมากกว่า 2 เส้น ความยาวหนวดจะเท่ากัน ตำแหน่งของหนวดมี 2 ตำแหน่ง คือ apical และ

subapical cell อาหารสะสมส่วนใหญ่คือแป้ง amylose และ amylopectin สะสมอยู่ใน pyrenoid ซึ่งอยู่บนคลอโรพลาสต์ที่เคลื่อนจะสะสมอาหารอยู่ในรูปน้ำมันและกลีเซอรอล

## 2. รูปร่างลักษณะ

สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างหลายแบบ มีทั้งเซลล์เดี่ยว (unicell), โคลนี (colony) และเส้นสาย (filament) พวกที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคลนีมีทั้งที่เคลื่อนไหวได้และไม่ได้ พวกที่เป็นเส้นสายมีทั้งที่แตกแขนงและไม่แตกแขนง สาหร่ายสีเขียวมีนิวเคลียส 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 พวกที่มีหนวดจะมีออร์แกนเนลล์ที่มีสี เรียกว่าตา (eye spot or stigma) ทำหน้าที่รับแสงแล้วส่งไปยังหนวด

## 3. วัฏจักรชีวิต (Life cycle)

วัฏจักรชีวิตมี 2 แบบคือ แบบแฮพลอนติก (haplontic type) การลดจำนวนโครโมโซมเกิดในระยะไซโกตแบ่งตัวเพื่อสร้างสปอร์ พบใน Order Volvocales และแบบดิพลอนติก (diplontic type) การลดจำนวนโครโมโซมเกิดในระยะสร้างแกมีต พบในบางสกุลของ Order Chlorococcales

## 4. การสืบพันธุ์

การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวมีทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ กล่าวคือ แบบอาศัยเพศโดยการรวมกันของแกมีต ซึ่งมีทั้งแบบ isogamy, anisogamy และ oogamy ส่วนแบบไม่อาศัยเพศมีทั้งการแบ่งเซลล์, สร้างสปอร์ และสร้าง akinete

### 2.1.2.2. Class Prasinophyceae หรือเรียกว่า “Prasinophytes”

เป็นสาหร่ายที่มีขนาดเล็กมาก 1-50 ไมโครเมตร เดิมรวมอยู่ใน Order Volvocales, Class Chlorophyceae แต่มีผู้ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จึงพบความแตกต่างจึงแยกออกมาจัดตั้งเป็นคลาสใหม่คือ Class Prasinophyceae ซึ่งมีความแตกต่างคือ เซลล์และหนวดมีเกล็ดหุ้ม แต่มีขนาดเล็กมากและอัดกันแน่น (Dodge, 1973)

เซลล์มีรูปร่างเป็นรูปสี่เหลี่ยมหรือแบนข้าง compressed หรือแบนเล็กน้อยจากบนลงล่างผนังเซลล์ส่วนใหญ่เซลล์มีเกล็ดหุ้มซึ่ง ประกอบด้วยสารอินทรีย์ บางชนิดก็ไม่มีหนวด มีหนวด 1, 2, 4, 6 และ 8 เส้น บนหนวดมีขนแข็งและหนา นอกจากนี้หนวดยังมีเกล็ดขนาดเล็กปกคลุมคลอโรพลาสต์มีรูปร่างเป็นแผ่นจำนวน 1-2 แผ่น หรือเป็นเม็ดกลมๆ จำนวนมาก จุดตาส่วนใหญ่มีจุดตาและอยู่บน chloroplast มี ejectosome เป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่ป้องกันตัวพบในสกุล *Pyramimonas*

### 2.1.2.3. Class Euglenophyceae ยูกลีโนอัย (euglenoids)

ยูกลีโนอัยมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ว่ายน้ำเป็นอิสระมีชื่อสามัญคือ euglenoids เซลล์มีสีเขียวสดบางชนิดไม่มีสีจัดเป็นพวก saprophytic และ holozoic form (กินสิ่งเน่าเปื่อยหรือตะกอนเป็นอาหาร) พบทั่วไปในน้ำจืด ทำให้เกิดการบูมของน้ำได้

#### 1. ลักษณะ

ชนิดที่มีสี (colored form) พวกที่มีสารสีประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ a และ b แคโรทีนได้แก่ เบต้า-แคโรทีน ส่วน xanthophylls ได้แก่ lutein, neoxanthin และ astaxanthin ไม่มีผนังเซลล์แต่มีเยื่อหุ้มเซลล์ (plasmalemma) ซึ่งมี pellicle ประกอบด้วยแผ่นโปรตีนแบนๆ จำนวนหลายแผ่นต่อกันเป็นแถว บางชนิดมี lorica หุ้ม พวกที่ว่ายน้ำเป็นอิสระมีหนวด 2 เส้นหรือมากกว่าหนวดเป็นแบบ

pantonomic ความยาวไม่เท่ากันและอยู่ที่ apical cell เคลื่อนที่แบบ euglenoid movement อาหารสะสมเป็นพวงแป้ง (paramylon) colored form แป้งจะไม่ทำให้เกิดสีดำเมื่อทดสอบกับหมึกอินเดียน colorless form เป็นเม็ดแป้งลอยอยู่ใน cytoplasm

## 2.2 การเลี้ยงสาหร่าย

ระยะเวลาของการเลี้ยงแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

### 1. การเลี้ยงระยะยาว (Long term culture)

เพื่อเก็บหัวเชื้อสาหร่าย (stock culture) ปัจจัยที่สำคัญคือรูปแบบของอาหารคือ อาหารวุ้น (nutrient agar) ข้อเสียของอาหารวุ้นคือการเลี้ยงต้องเลี้ยงแบบปลอดเชื้อ (axenic culture) อาหารที่ใช้ได้นอกจากน้ำคือสารละลายที่เตรียมจากดิน (soil - water medium) ปัจจัยอื่นอุณหภูมิและความเข้มของแสง

### 2. การเลี้ยงระยะสั้น (Short term culture)

เป็นการเลี้ยงที่ใช้ศึกษาในห้องเรียนเป็นครั้งคราวหรือใช้ในอุตสาหกรรมในระยะสั้นใช้อาหารแตกต่างกันตามความเหมาะสมรูปแบบของการเพาะเลี้ยงแบ่งตามความบริสุทธิ์ได้ 3 ประเภท ดังนี้

- การเลี้ยงสาหร่ายแบบยูนิอัลกัล (Unialgal culture) เป็นการเลี้ยงชนิดเดียวไม่มีชนิดอื่นปนอาจมีแบคทีเรียหรือโพรโตซัวอยู่ด้วย
- การเลี้ยงสาหร่ายแบบปลอดเชื้อ (Axenic culture) เป็นการเลี้ยงชนิดเดียวหรือหลายชนิดต้องไม่มีแบคทีเรียปน
- การเลี้ยงสาหร่ายแบบบริสุทธิ์ (Pure culture) เป็นการเลี้ยงชนิดเดียวเท่านั้นไม่มีสิ่งมีชีวิตอื่นใดปนเลย

#### 2.2.1 อาหารสำหรับการเลี้ยงสาหร่าย

##### 2.2.1.1 ธาตุอาหาร

ชนิดของแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายซึ่งเป็นพืชชั้นต่ำนั้น เป็นชนิดเดียวกันกับแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืชชั้นสูง โดยแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามปริมาณของแร่ธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการ แร่ธาตุอาหารแต่ละกลุ่มมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชเท่าๆ กันในสาหร่ายก็น่าจะเป็นเช่นนั้น แร่ธาตุอาหารทั้ง 2 กลุ่ม ได้แก่

1. แร่ธาตุที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณมาก (macronutrients หรือ major elements) เป็นแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลซึ่งเป็นโครงสร้างของสาหร่าย ดังนั้นจึงเป็นแร่ธาตุที่ต้องการเป็นปริมาณมาก ได้แก่ ธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน ไฮโดรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และโบแทสเซียม แหล่งของธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ได้มาจากคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และก๊าซออกซิเจน ตามลำดับ ทั้งคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสารหลักภายในเซลล์สาหร่าย

2. แร่ธาตุที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณน้อย (micronutrients หรือ minor elements) ต้องการเป็นปริมาณมิลลิกรัมต่อลิตรหรือต่ำกว่านี้ แร่ธาตุเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของโมเลกุลที่สำคัญ เช่น growth factors หรือเอนไซม์ หรือเป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์ แร่ธาตุเหล่านี้มีอยู่ 7 ชนิด ได้แก่ คลอรีน เหล็ก แมงกานีส โบรอน สังกะสี ทองแดง และโมลิบดีนัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.2.1.2 อาหาร

การเลี้ยงสาหร่าย อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่ายมี 2 ชนิดคืออาหารเหลว อาหารแข็งหรืออาหารวุ้นเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนหรือผลิตเป็นอุตสาหกรรม สาหร่ายมีหลายชนิดผู้เลี้ยงจะต้องศึกษารายละเอียดเพื่อจะได้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงสาหร่าย

1. อาหารเหลว (Liquid media: broth)

2. อาหารแข็งหรืออาหารวุ้น (Solid or agar media) ทำโดยเตรียมอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงก่อนแล้วเติมวุ้นลงไป 0.5% วุ้นที่ใช้เป็นวุ้นที่บริสุทธิ์เรียกว่า (Bacto-agar) การแยกเชื้อสาหร่ายควรเตรียมวุ้นให้แข็งหรือถ้าต้องการทำอาหารแบบเอียง(Slant agar)เพิ่มพื้นที่ในหลอดใส่วุ้นประมาณ 1-1.5% วุ้นที่มีคุณภาพดี Bacto-agar อาหารวุ้นที่เตรียมจะใส่ขวดกลมและแบนราวครึ่งหนึ่งภาชนะ

### 2.2.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย

การเจริญเติบโตของสาหร่ายจะทำให้ทราบอัตราการเติบโตหรือ “Growth rate” ของเซลล์สาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงซึ่งมีความสำคัญต่อการตรวจสอบประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงสาหร่ายตลอดจนระบบการจัดการเพาะเลี้ยงให้ได้ผลผลิตของสาหร่ายสูงสุดทั้งนี้การเจริญเติบโตของสาหร่ายมีลักษณะกราฟโค้งรูปตัว “S” (sigmoid curve) ซึ่งเรียกว่าเส้นโค้งการเติบโต (growth curve) โดยเส้นกราฟหรือเส้นโค้งการเจริญเติบโตแบ่งออกได้ 5 ระยะ ดังนี้

1. ระยะปรับตัว (Lag phase or inductional phase)

เป็นเพียงระยะเวลาสั้นๆ ที่สาหร่ายจะมีการปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ ยังไม่มีการเพิ่มจำนวน โดยเซลล์จะมีการปรับทางสรีรวิทยาต่างๆให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม

2. ระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล (Exponential phase)

เป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ ความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นแบบ Exponential

3. ระยะเฉื่อย (Retardation phase or phase of declining relative growth)

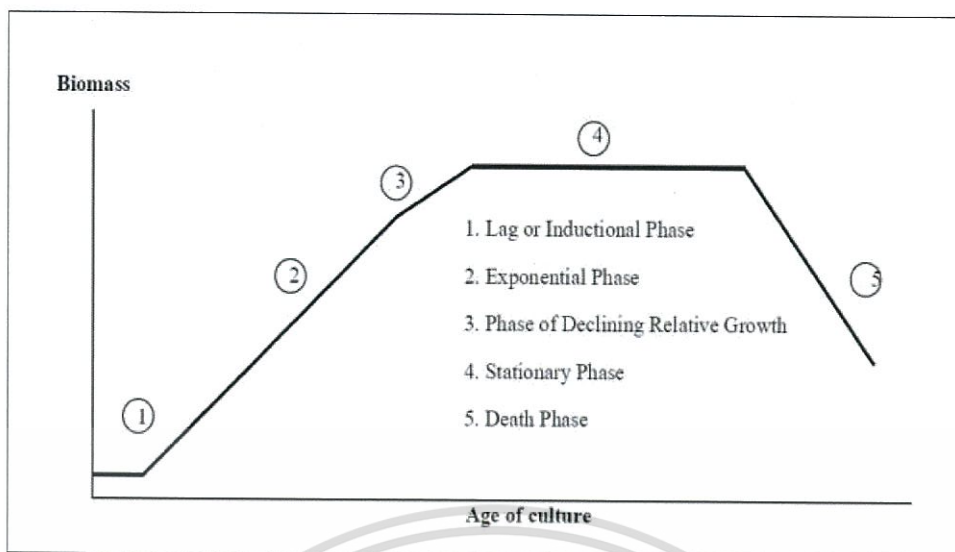
เป็นระยะที่เซลล์แบ่งตัวช้าลง เนื่องจากปัจจัยทางกายภาพและเคมีที่ใช้ในการเจริญเติบโตลดลงหรือมีการเปลี่ยนแปลง เช่น สารอาหาร แสง และค่าพีเอช (pH) เป็นต้น

4. ระยะคงที่ (Stationary phase)

เป็นระยะที่มีจำนวนเซลล์สูงสุดและคงที่ไม่มีเพิ่มจำนวนเซลล์อีก โดยมีอัตราการแบ่งเซลล์เท่ากับอัตราการตาย เนื่องจากเป็นช่วงที่สารอาหารถูกใช้ไปจนเกือบหมดไม่เพียงพอต่อจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น

5. ระยะตาย (Death phase) เป็นระยะที่เซลล์มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

ความหนาแน่นของเซลล์และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลง เนื่องจากสารอาหารหมดไปและสภาวะต่างๆขาดแคลนไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์



รูปที่ 2.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย ที่มา: ลัดดา (2543)

### 2.2.3 ปัจจัยในการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อสาหร่าย คือ แสงสว่าง สารอาหาร การไหลของกระแส น้ำ อุณหภูมิ และคู่แข่งการเจริญเติบโต (รวมถึงสาหร่ายต่างพันธุ์) เราจะมาพูดถึงความสำคัญของแต่ละปัจจัยกัน

1. แสง (light) ความเข้ม ความยาวคลื่น และความถี่ของแสง มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยความสามารถในการดูดซับแสงในช่วงความยาวคลื่นสูงสุดของสาหร่าย (680 nm หรือ 700 nm) จะแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของสาหร่ายแต่ละชนิด เช่น *Chlorella* จะมีความสามารถดูดซับแสงสีแดงและสีเหลือง ตามลำดับโดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจะใช้แสงสว่างจากธรรมชาติ เนื่องจากสเปกตรัมของแสงธรรมชาติมีประโยชน์ต่อสาหร่ายมากกว่าแสงประดิษฐ์ (เช่น แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์) อย่างไรก็ตาม แสงจากธรรมชาติควบคุมได้ยาก อาจแรงเกินไปในวันที่แดดจ้า หรือน้อยเกินไปในวันที่มีฝนตก ดังนั้นในการศึกษาวิจัยจะใช้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ควบคุมไปกับแสงจากธรรมชาติ เพื่อเร่งปริมาณผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็ก

2. ธาตุอาหาร (nutrients) ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้มีอัตราการเติบโตที่เหมาะสมต้องใช้อาหารที่ประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นในปริมาณเพียงพอ โดยทั่วไปธาตุอาหารหลักของสาหร่าย ได้แก่ คาร์บอน (C), ไนโตรเจน (N), ฟอสฟอรัส (P), ซัลเฟอร์ (S), โพแทสเซียม (K) และซิลิคอน (Si สำหรับไดอะตอม) นอกจากนั้นเป็นเกลือแร่อื่นๆ เช่น โคบอลต์ (Co), โมลิบดีนัม (Mo), แมงกานีส (Mn) และวิตามินชนิดต่างๆ เช่น บี12 เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไปแหล่งของคาร์บอนมาจากอากาศ นอกจากสาหร่ายบางชนิด เช่น *Spirulina* ที่สามารถใช้ไบคาร์บอเนตที่ค่าความเป็นกรด่างสูงๆ ได้ และการใช้แหล่งสารอินทรีย์คาร์บอน เช่น กลูโคส หรืออะซิเตต (acetate) จะสามารถเร่งผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายได้ดี แต่เป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงให้สูงขึ้น (de la Noue, J. and de Pauw, N. 1988: 729) ส่วนไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, ซัลเฟอร์ และโพแทสเซียม ได้จากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงทั้งนี้ธาตุอาหารที่มีผลต่ออัตราการเติบโตและการผลิตไขมันของสาหร่ายขนาดเล็กคือ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ดังนั้น สัดส่วนของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส จึงถูกใช้เป็นปัจจัยสำคัญใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยง โดยหากสัดส่วนระหว่างธาตุตั้งกล่าวสูงเกินไป แสดงว่าปริมาณของฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยเกินไป และในทางตรงกันข้ามหากสัดส่วนมีค่าต่ำเกินไป ควรเพิ่มปริมาณของไนโตรเจนในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่าไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญธาตุหนึ่งสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยปริมาณของไนโตรเจนมีผลต่อการสะสมไขมันของสาหร่าย ซึ่งโดยปกติจะใช้เกลือแอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย (urea) เป็นต้นเป็นแหล่งของไนโตรเจน แต่อัตราการดูดซึมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์จะแตกต่างกัน ดังนี้ แอมโมเนีย > ยูเรีย > ไนเตรต > ไนไตรท์ (Junying, Junfeng and Baoning, 2013: 83)

3. การไหลเวียนของกระแส (flow) มีผลในทางเดียวกันกับธาตุอาหาร กล่าวคือที่ที่มีการไหลเวียนของกระแสน้ำน้อย จะเกิดพื้นที่ที่มีการสะสมอาหารมาก และสาหร่ายจะเจริญเติบโตและใช้คาร์บอนไดออกไซด์กับธาตุอาหารอย่างรวดเร็ว ต่อจากนั้นจะหยุดขบวนการสังเคราะห์แสงและตายลง สาหร่ายขนาดใหญ่หลายชนิด ต้องการการไหลเวียนกระแสน้ำค่อนข้างมากเพื่อให้มีการไหลเวียนของธาตุอาหารมากพอ จึงพบว่ามันเติบโตอยู่ในน้ำที่มีการเคลื่อนที่ตลอด ถ้ามันไปเติบโตในที่ๆ มีการไหลเวียนกระแสน้ำน้อยเมื่อไหร่ ก็จะถูกสาหร่ายเส้นผมขึ้นมาบดบัง

4. อุณหภูมิ (temperature) สาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์จะสามารถทนอุณหภูมิได้ในช่วงที่แตกต่างกันโดยสาหร่ายน้ำจืด เช่น *Chlorella* และ *Scenedesmus* มีความสามารถในการปรับตัวได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 5-35°C แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-30°C

5. คู่แข่งการเจริญเติบโต (Growing Competitors) ต้องควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสาหร่ายและจุลินทรีย์ชนิดอื่น

#### 2.2.4 การแยกเชื้อสาหร่าย

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายถ้าผู้เลี้ยงต้องการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบางชนิดแต่เกิดกรณีไม่มีหัวเชื้อสาหร่ายชนิดนั้นผู้เพาะเลี้ยงจำเป็นต้องทำการเก็บสาหร่ายจากแหล่งธรรมชาติและคัดแยกเชื้อสาหร่ายที่ต้องการออกจากสาหร่ายชนิดอื่นหรือแบคทีเรียที่ปะปนอยู่และที่สำคัญเชื้อสาหร่ายที่แยกได้จะต้องอยู่ในสภาพบริสุทธิ์ (axenic culture) เพื่อนำสาหร่ายนั้นเป็นหัวเชื้อในการเพาะเลี้ยงต่อไป ซึ่งเทคนิคการคัดแยกเชื้อสาหร่ายและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์มีหลายวิธีการที่จะเลือกเทคนิคใดนั้นก็ขึ้นอยู่กับชนิดขนาดรูปร่างของสาหร่ายและสิ่งที่สำคัญก็คืออุปกรณ์ทุกอย่างต้องปราศจากเชื้อ (sterile)

วิธีการคัดแยกเชื้อสาหร่าย (Isolation method) แบ่งออกเป็น 3 วิธีดังนี้

1. Enrichment method: วิธีนี้ทำให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมเฉพาะสาหร่ายชนิดที่ต้องการ เช่นการเตรียมอาหารที่เหมาะสมสำหรับสาหร่ายชนิดที่ต้องการศึกษาซึ่งจะทำให้สาหร่ายชนิดอื่นไม่เจริญหรือเจริญได้น้อย

2. Manipulative method: วิธีการแยกสาหร่ายชนิดที่ต้องการออกจากสาหร่ายชนิดอื่นๆ โดยวิธีการหรือวิธีการทางฟิสิกส์เช่นการปั่นการใช้ปิเปตการเขี่ยเชื้อบนอาหารวุ้น เป็นต้น

3. Antibiotic method: วิธีใช้ยาปฏิชีวนะฆ่าสาหร่ายหรือสิ่งมีชีวิตอื่นที่เราไม่ต้องการซึ่งยาปฏิชีวนะที่นิยม คือ

- เพนนิซิลินฆ่าแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้ดีโดยไปห้ามการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคน (ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของพวกแบคทีเรียแกรมบวก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

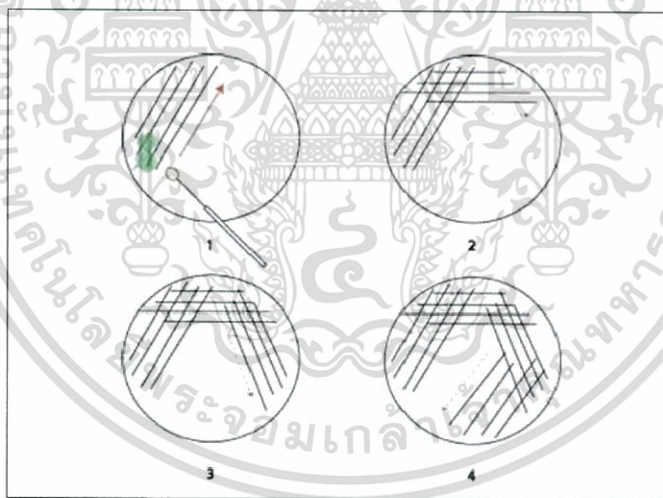
- สเตอริไลซ์หม้อแช่แบคทีเรียชนิดแกรมลบได้ดี โดยไปห้ามการทำงานของไรโบโซมชนิด 70S ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์โปรตีนขึ้น
- คลอแรมเฟนิคอลล่าแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยไปห้ามการทำงานของไรโบโซมชนิด70S ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์โปรตีนเช่นเดียวกัน

### วิธีการแยกเชื้อสาหร่าย

1. หยดน้ำตัวอย่างที่มีสาหร่ายที่ต้องการแยกในงานเพาะเชื้อที่มีอาหารร่วน 1-2 หยดบริเวณใกล้ขอบจานเพาะเชื้อ

2. นำปลายห่วงเชี่ยเชื่อมเปลวไฟแล้วแตะที่หยดน้ำลากเส้นขนานออกไปสัก 3-4 เส้นโดยลากเส้นบนอาหารร่วนเป็นรูปห้าเหลี่ยมเมื่อลากห่วงเชี่ยเชื่อมมาสุดแต่ละมุมของรูปห้าเหลี่ยมนี้ต้องเผาห่วงเชี่ยเชื่อมซ้ำทุกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อและให้ใช้เซลล์ที่ปลายสุดของการลากครั้งสุดท้ายเป็นเชื้อสำหรับการลากเส้นต่อไป (ภาพที่ 2.3)

3. ปิดฝาจานเพาะเชื้อพลิกเอาก้นจานเพาะเชื้ออยู่ข้างบนรินน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปในงานเล็กน้อยเพื่อป้องกันไม่ให้อาหารร่วนแห้งจากนั้นนำไปวางที่มีแสงสว่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 1-2 อาทิตย์วิธีนี้จำนวนเซลล์สาหร่ายที่อยู่บนเส้นที่ลากจะลดน้อยลงทุกทีฉะนั้นเมื่อทำการเลี้ยงสาหร่ายประมาณ 1-2 อาทิตย์มีกลุ่มเซลล์สาหร่าย (colony) ขึ้นมาโดยจะมีช่องว่างห่างกันมากในบริเวณเส้นที่ลากทำยๆจนสามารถเก็บเซลล์เพียงเซลล์เดียวจากจานเพาะเชื้อได้

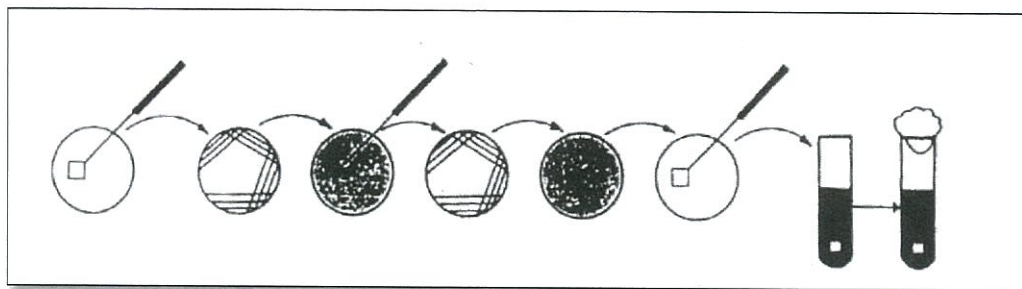


รูปที่ 2.2 ลักษณะการลากเส้นบนอาหารร่วน ที่มา: ลัดดา (2543)

4. เชี่ยเซลล์สาหร่ายเดี่ยวๆมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ห่วงเชี่ยเชื่อมเผาไฟแล้วเชี่ยเซลล์สาหร่ายบางส่วนของโคโลนีไปทำ wet mount

5. ถ้าเซลล์สาหร่ายที่เชี่ยมาตรวจเป็นชนิดเดียวกัน (บริสุทธิ์) ให้ถ่ายเชื้อสาหร่าย (subculture) ลงในอาหารร่วนชุดใหม่โดยให้ทำซ้ำ 2 อีกครั้งในอาหารร่วนจานใหม่การถ่ายเชื้อสาหร่ายในครั้งที่ 2 นี้จะช่วยให้ได้สาหร่ายที่บริสุทธิ์ขึ้นจนอยู่ในสภาพ axenic culture แต่ถ้าเชื้อไม่บริสุทธิ์ให้ทำซ้ำ 2-4 ซ้ำอีกครั้งหรือจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

6. ให้ถ่ายเชื้อสาหร่ายที่บริสุทธิ์ลงในหลอดแก้วที่มีอาหารวุ้นเอียง (slant) และหลอดแก้วที่มีอาหารเหลว (broth) สำหรับเก็บไว้เป็น stock culture ต่อไป



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการคัดแยกเชื้อบนอาหารวุ้น ที่มา: ลัดดา (2543)

### 2.3 สาหร่าย *Bumilleriopsis peterseniana*

สาหร่ายสายพันธุ์ *Bumilleriopsis peterseniana* จัดเป็นสาหร่ายน้ำจืด ชื่อนี้เป็นที่ได้รับการยอมรับในปัจจุบันตามหลักการ taxonomically

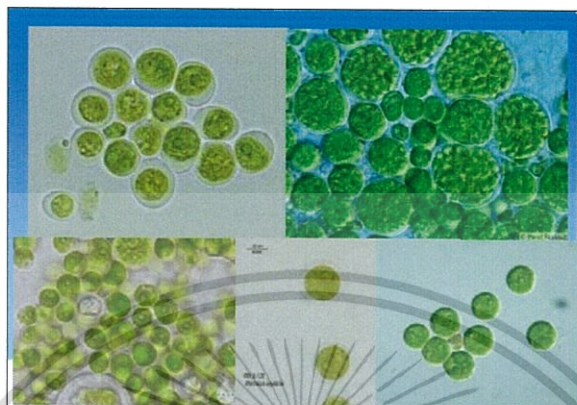


รูปที่ 2.4 เซลล์สาหร่าย *Bumilleriopsis peterseniana* ที่มา: David John 2012.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 จัดเป็นสาหร่ายน้ำจืดโดยสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 จะมีโคลนนี้อยู่ในเมือก มีการจัดเรียงเซลล์อย่างสม่ำเสมอบริเวณโดยรอบ เมทริกซ์รูปร่างเซลล์ มีลักษณะทรงกลมหรือวงรี มีเซลล์ย่อยขนาดเล็ก 2-4 เซลล์



รูปที่ 2.5 เซลล์สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ที่มา: เชิดศักดิ์ 2554

## 2.5 การขาดธาตุอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

- คาร์บอน

คาร์บอนทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของพืช เช่น แป้ง และเซลลูโลสพืชได้รับคาร์บอนมาจากการสังเคราะห์แสงโดยรับคาร์บอนไดออกไซด์มาจากอากาศ และส่วนหนึ่งก็ถูกแปลงเป็นคาร์โบไฮเดรตสำหรับสะสมพลังงาน

- ไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นส่วนสำคัญในการสร้างน้ำตาลและการเติบโตของพืช พืชได้รับไฮโดรเจนส่วนใหญ่จากน้ำ

- ออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นส่วนสำคัญสำหรับกระบวนการหายใจ สร้างสารให้พลังงาน ATP จากการใช้ น้ำตาลที่ได้มาจากระบวนการสังเคราะห์แสง พืชสร้างออกซิเจนขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์แสง เพื่อที่จะสร้างน้ำตาล แต่พืชก็ใช้ออกซิเจนในการกระบวนการหายใจเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็น ATP

- ฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นส่วนสำคัญในระบบพลังงานของพืช เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ ATP การขาดฟอสฟอรัสในพืช จะแสดงให้เห็นจากการที่ใบพืชมีสีเขียวเข้มจัด ถ้าขาดรุนแรงใบจะมิดรูปปร่าง และแสดงอาการตายเฉพาะส่วน

- โปแตสเซียม

โปแตสเซียมมีบทบาทในการควบคุมการเปิดปิดของรูใบสโตมา (Stoma) ดังนั้นโปแตสเซียมจึงช่วยลดการคายน้ำจากใบและเพิ่มความต้านทานสภาพแล้ง-สภาพร้อน - สภาพหนาวให้กับพืชได้ การขาดโปแตสเซียมอาจทำให้เกิดการตายเฉพาะส่วนหรือเกิดการเหลืองระหว่างเส้นใบ

(interveinalchlorosis) โปแตสเซียมสามารถละลายน้ำได้ดี จึงทำให้อาจโดยชะล้างออกไปจากดิน โดยเฉพาะพื้นที่ลักษณะเป็นหินหรือทราย

- ไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโปรตีนทุกชนิดการขาดไนโตรเจนส่วนใหญ่แล้วจะแสดงออกมาโดยการชะงักการเติบโตของพืช การเติบโตช้า หรือว่าแสดงอาการใบเหลือง (chlorosis) ทั่วไปแล้วไนโตรเจนจะถูกดูดซึมเข้าทางดินในรูปของไนเตรต ( $\text{NO}_3$ ) ในแง่การเจริญเติบโตของสาหร่าย ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและน้ำหนักแห้งของสาหร่าย มีหน้าที่เกี่ยวกับเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ การขาดไนโตรเจนในสาหร่าย ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และอาร์เอ็นเอ (RNA) ลดลง แต่จะมีคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น (Hosakul, 1972; Denesi, 2002)

- กำมะถัน

กำมะถันเป็นส่วนประกอบโครงสร้างของกรดอะมิโนและวิตามินหลายชนิด จำเป็นต่อการกระบวนการสร้างคลอโรพลาสต์

- แคลเซียม

แคลเซียมทำหน้าที่ในการควบคุมการเคลื่อนย้ายของสารอาหารต่างๆเข้าสู่พืช และยังทำหน้าที่เกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์พืชหลายชนิดการขาดแคลเซียมมีผลทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต

- แมกนีเซียม

แมกนีเซียมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของคลอโรฟิลล์ และก็มีความสำคัญในกระบวนการสร้างATPโดยทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (enzyme cofactor) การขาดแมกนีเซียมอาจทำให้เกิดอาการเหลืองระหว่างเส้นใบ (interveinalchlorosis)

- เหล็ก

เหล็กมีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชและทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์อีกด้วยการขาดเหล็กอาจทำให้เกิดอาการเหลืองตามเส้นใบ และการตายเฉพาะส่วน

- ทองแดง

ทองแดงมีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสงการขาดทองแดงทำให้พืชแสดงอาการเหลือง (chlorosis)

- แมงกานีส

แมงกานีสมีความสำคัญในการสร้างคลอโรพลาสต์การขาดแมงกานีสทำให้พืชมีสีผิดเพี้ยน เช่น การมีจุดต่างบนใบ

- โซเดียม

โซเดียมเกี่ยวข้องข้องกับการสร้าง phosphoenolpyruvate ของพืชที่เป็น CAM (Crassulaceanacid metabolism plant) และ C4 (C4 carbon fixation plant)

- สังกะสี

สังกะสีเป็นส่วนสำคัญสำหรับเอนไซม์หลายชนิดและเป็นส่วนสำคัญในกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม (DNA transcription) การขาดสังกะสีโดยทั่วไปแล้วจะทำให้การเติบโตของใบชะงัก

- คลอรีน

คลอรีนมีความสำคัญในกระบวนการออสโมซิส (osmosis) การรักษาสมดุลของประจุ และยังทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสงด้วย

## 2.6 Gel electrophoresis of protein

การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis of protein) เป็นการตรวจหาขนาดของโปรตีน (molecular weight) polyacrylamide gel เกิดจากปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกันของ acrylamide monomer จนได้เป็นสายโซ่ยาวและเชื่อมกันเป็นโครงข่ายด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent bond) ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ (bi-functional compound) เช่น N,N'-methylene bis-acrylamide ย่อว่า bis-acrylamide ปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้ได้โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ซึ่งมีขนาดแตกต่างกันตามขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการแยก ดังนั้นระหว่างการแยกบน polyacrylamide gel ด้วยกระแสไฟฟ้าโมเลกุลโปรตีนจะถูกคัดกรองด้วยตะแกรงสามมิติ (sieving effect) จึงทำให้โมเลกุลขนาดใหญ่เคลื่อนที่ช้ากว่าโปรตีนขนาดเล็ก และการแยกโปรตีนที่ทำงานได้ตามธรรมชาติ (native protein) ด้วยกระแสไฟฟ้าบน polyacrylamide gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ (non-dissociating buffer หรือ non-denaturing buffer) เช่น Tris-HCl นั้น ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุและขนาดของโปรตีนความสามารถในการคัดกรองของการแยกด้วยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับว่าขนาดของรูพรุนของเจลมีค่าใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีนที่เคลื่อนที่ไปบนเจลมากน้อยเพียงใด รูพรุนของ polyacrylamide gel จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของ acrylamide ในของผสมเจล (หากความเข้มข้นของ acrylamide เพิ่มขึ้น ขนาดของรูพรุนจะเล็กลง) และสัดส่วนของตัวเชื่อมโครงข่าย bis-acrylamide ที่ใช้ด้วย ในทางปฏิบัติสัดส่วนของตัวเชื่อมโครงข่ายจะมีค่าคงที่และประสิทธิภาพของรูพรุนจะเปลี่ยนแปลงไปตามการเลือกใช้ความเข้มข้นของหน่วยเดี่ยวๆ ของ acrylamide การแยกโปรตีนส่วนใหญ่ใช้เจลที่มีความเข้มข้นของ acrylamide อยู่ในช่วงร้อยละ 5-15 ซึ่งเจลที่มีร้อยละของ acrylamide ต่ำจะให้ขนาดรูพรุนใหญ่ที่สุดซึ่งเหมาะสำหรับแยกโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ให้เป็นแถบด้วยกระแสไฟฟ้าและการเพิ่มความเข้มข้นของ acrylamide จะช่วยแยกโปรตีนที่มีขนาดเล็กได้ดีขึ้น

หลักการทั่วไปของการแยกโปรตีนโดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส คือโปรตีนที่มีประจุจะถูกบังคับให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้ามการเคลื่อนที่นี้จะถูกต้านโดยปฏิกิริยาระหว่างสารกับร่างแหเจลซึ่งทำหน้าที่เป็น molecular sieve ดังนั้นการเคลื่อนที่ของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง และประจุสุทธิของโปรตีน การแยกโปรตีนด้วยโพลีอะคริลาไมด์มี 2 ระบบ คือ

1. ระบบที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ (non-denaturing gel หรือ native gel electrophoresis) วิธีนี้โปรตีนอยู่ในสภาพธรรมชาติซึ่งสามารถนำโปรตีนที่แยกได้นี้ไปตรวจสอบหาแอกติวิตีได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของรูปร่าง ขนาด หรือประจุของโปรตีนได้ คือโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันอาจเคลื่อนที่ได้เท่ากันในระบบนี้ ดังนั้นระบบนี้จึงเหมาะสำหรับใช้แยกหรือจำแนกโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากกันแต่ไม่เหมาะสำหรับใช้ตรวจหรือยืนยันความบริสุทธิ์หรือหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

2. ระบบที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ (denature systems) โปรตีนที่แยกได้ไม่สามารถนำมาทดสอบหาแอกติวิตีได้ แต่สามารถบอกขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนต่างกันได้ ระบบนี้จึงนำมาใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์และขนาดของโปรตีน รวมทั้งสามารถนำไปตรวจหาคุณสมบัติของโปรตีน

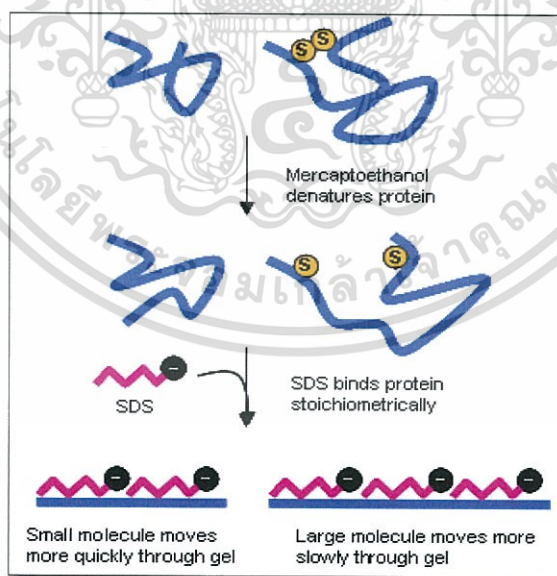
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางอิมมูโนวิทยาได้โดยวิธีการทำ western blot การแยกโปรตีนในระบบนี้ได้แก่วิธี SDS-PAGE ซึ่ง SDS เป็นสาร detergent ทำให้โปรตีนเสียสภาพ นอกจากนี้ยังมีสาร acid-urea, triton-acid-urea เป็นต้น การทำอิเล็กโตรโฟรีซิสมีทั้งแบบ one-dimension และ two-dimension

## 2.7 Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเพปไทด์สายเดี่ยวและดูความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยอาศัยการเชื่อมต่อกันของ acrylamide monomer จนได้สายโซ่ยาวประกอบกันเป็นแผ่นเจล โดยมี TEMED เป็น catalyst และมี ammonium persulfate เป็น initiator เมื่อใช้คู่กับเทคนิคทาง gel filtration chromatography ก็จะทำให้ทราบว่าโปรตีนนั้นๆ ประกอบด้วยหน่วยย่อยกี่หน่วย

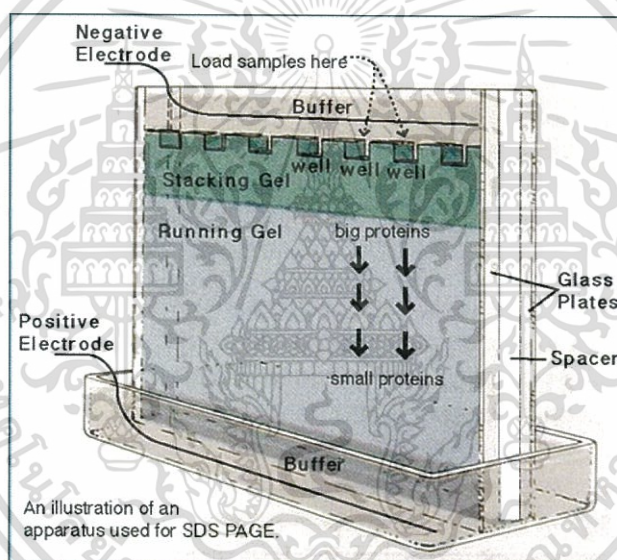
หลักการของ SDS-PAGE คือ SDS ซึ่งเป็น detergent ที่มีประจุลบไปเกาะกับโปรตีนอย่างแน่นหนาทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ นอกจากนี้ SDS ยังทำให้โปรตีนเสียสภาพเปลี่ยนสภาพจากทรงกลม (globular) ไปอยู่ในสภาพที่เหยียดตรง โปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยหลายหน่วยเกาะกันอยู่ก็จะแยกออกเป็นแต่ละหน่วยย่อย ดังนั้นการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีนทุกตัวในกรณีนี้จึงเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างในน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว โดยจะเป็นการเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวกในอัตราส่วนผกผันกับค่า  $\log$  ของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งหมายความว่า จะสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้ จากระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว นอกจากนี้การปรากฏของแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวใน SDS-PAGE ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีน



รูปที่ 2.6 แสดงการเข้าจับของ SDS กับโปรตีน ซึ่งจะทำให้โปรตีนมีรูปร่างเป็นเส้นเหยียด และมีประจุลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทำ SDS-PAGE มีความแตกต่างกันบ้างในแต่ละวิธี เช่น วิธีของ Weber และ Osborne เป็นแบบ continuous polyacrylamide gel electrophoresis ใช้ phosphate buffer ส่วนวิธีของ Laemmli ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากและทำในรูปของ slab gel เป็นแบบ discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis ใช้ 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 สำหรับ concentrate stacking gel buffer, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 สำหรับ concentrated resolving gel buffer หรือ concentrated separating gel buffer และ 0.025 M Tris, 0.192 M Glycine, 0.1% w/v SDS, pH 8.3 สำหรับ electrode buffer วิธีของ discontinuous gel electrophoresis เป็นวิธีที่ gel buffer และ electrode buffer จะเกิดการรวมตัวกันและช่วยในการทำให้ตัวอย่างที่แยกในระหว่างการเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้ารวมตัวอัดแน่นและเข้มข้น นอกจากนี้ stacking gel ที่ %T ต่ำจะช่วยในการรวมตัวอัดแน่นกันของตัวอย่าง ส่วน separating gel สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงค่า %T ตามความต้องการขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีน และยังสามารถใช้แบบ gradient ได้จาก %T ต่ำ (ด้านบน) ไปสู่ %T สูง (ด้านล่าง) ของเจลได้ เพื่อให้การแยกตัวอย่างที่มีความแตกต่างของขนาดได้ดียิ่งขึ้น

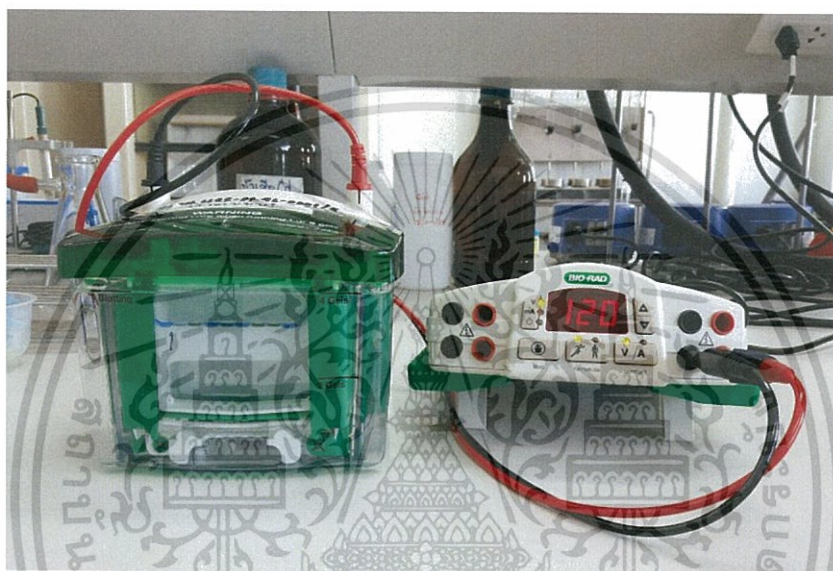


รูปที่ 2.7 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แบบ discontinuous gel

สำหรับการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE นั้น ของผสมโปรตีนจะถูกทำให้เสียสภาพโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2-5 นาทีในสารละลายที่มี SDS มากเกินพอและมีสารประเภทไทออล (thiol) เป็นองค์ประกอบ เช่น 2-mercaptoethanol เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) ในโปรตีน ภายใต้ภาวะดังกล่าวนี้โปรตีนส่วนใหญ่จะเกาะกับ SDS ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักที่คงที่ (1.4 กรัมของ SDS ต่อพอลิเพปไทด์ 1 กรัม) จากนั้นนำของผสมโปรตีนแต่ละตัวอย่างใส่ลงบนเจลทรงกระบอกแต่ละแท่งหรือแต่ละช่องบนเจลแผ่น และนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งทั้งเจลและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแยกมี SDS เป็นองค์ประกอบอยู่ โปรตีนเทียบเคียงจะให้ผลในลักษณะเดียวกับเจลช่องอื่นๆ โดยโปรตีนจะเคลื่อนที่ไปตามน้ำหนักโมเลกุลของตัวเอง ภายหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ตำแหน่งของแถบโปรตีนที่แยกออกจากกันจะปรากฏขึ้นเมื่อย้อมด้วยสี เช่น Coomassie Blue หรือสีสารประกอบของเงิน (silver stain) การแยกด้วยวิธีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SDS-PAGE SDS จะจับโปรตีนในอัตราส่วนโดยน้ำหนักหนักที่คงที่ตลอดทั้งเจล (กล่าวคือ โปรตีนที่มีขนาดใหญ่มี SDS เกาะอยู่มาก) ทำให้โปรตีนทุกชนิดมีค่าความหนาแน่นของประจุน้ำหนักโปรตีนเท่ากัน การแยกโปรตีนด้วยวิธีนี้จึงอาศัยการแยกโดยขนาดเพียงอย่างเดียว โดยไม่มีจำนวนประจุมาเกี่ยวข้อง และเนื่องจากระยะทางที่เคลื่อนที่ไปของสายพอลิเพปไทด์บนเจลมีความสัมพันธ์โดยตรงกับขนาดของพอลิเพปไทด์เท่านั้น การแยกโปรตีนที่เราสนใจบนเจลบนี้ทำได้โดยเทียบน้ำหนักโมเลกุลระหว่างโปรตีนตัวอย่างกับโปรตีนเทียบเคียง ในกรณีที่เรามั่นใจว่าน้ำหนักของโปรตีนที่เราต้องการแตกต่างจากโปรตีนอื่นๆ อย่างชัดเจน เราสามารถแยกโปรตีนบนเจลเพื่อนำไปศึกษาองค์ประกอบได้ (โดยไม่ต้องเทียบกับโปรตีนเทียบเคียงที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว)



รูปที่ 2.8 เครื่อง SDS-PAGE

## 2.8 โปรตีนมาตรฐาน

โปรตีนมาตรฐาน (protein marker/protein ladder) คือการนำเอาโปรตีนบริสุทธิ์ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนมาผสมรวมกัน เพื่อใช้ในการบอกน้ำหนักโมเลกุลและติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่สนใจ โดยตัวอย่างของโปรตีนมาตรฐานมีดังนี้

**2.8.1 แอ็คคูโปรตีน ดีเทคเทเบิล (AccuProtein Detectable)** เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้อย่างกว้างขวาง น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 19.7 kDa ไปจนถึง 114.6 kDa โดยเกิดจากการผสมกันระหว่างโปรตีนมาร์คเกอร์ที่ไม่ติดสี (unstained protein marker) กับโปรตีนมาร์คเกอร์ที่ติดสี (prestained protein marker) โดยแบนด์โปรตีนที่ติดสีนั้นมีอยู่แบนด์เดียวคือโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 24.3 kDa ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจึงเหมาะสมสำหรับงานวิจัยที่ต้องติดตามการเคลื่อนที่ของแบนด์โปรตีนระหว่างการรัน ทั้งนี้หลังจากรัน SDS-PAGE เสร็จแล้ว หากนำเจลไปย้อมสี Coomassie หรือย้อม Silver ก็จะทำให้เห็นโปรตีนทุกตัวในผลิตภัณฑ์

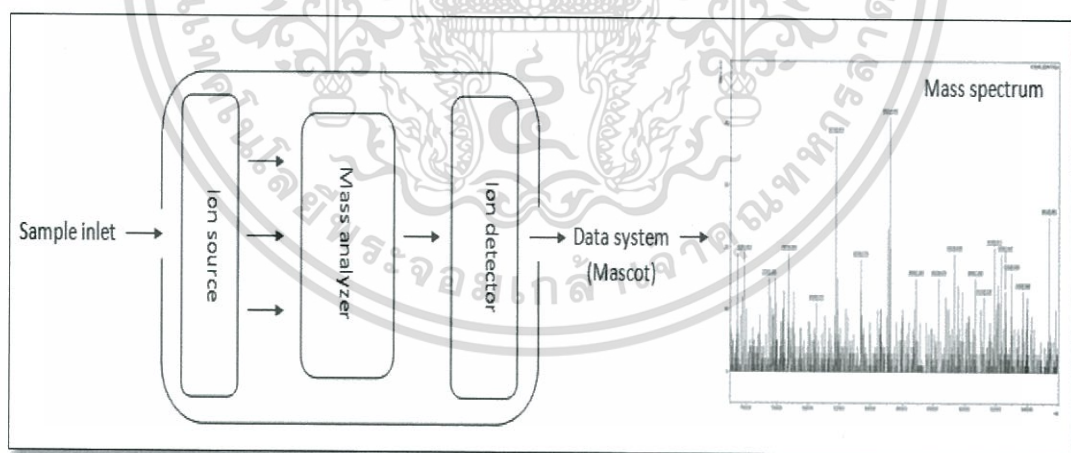
**2.8.2 แอ็คคูโปรตีน พรีสแตน (AccuProtein Prestained)** เป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนมาร์คเกอร์ที่ใช้อย่างกว้างขวาง น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 19.7 kDa ไปจนถึง 114.6 kDa ซึ่งโปรตีนทุกตัวในผลิตภัณฑ์นี้เป็นโปรตีนที่ย้อมติดสีมาแล้วเหมาะสำหรับการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนทุกชนิด ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนที่ต้องการติดตามการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำ SDS-PAGE ขณะรัน SDS-PAGE สามารถเห็นสีย้อมที่ติดอยู่บนโปรตีนอย่างชัดเจน และสามารถนำไปใช้ต่อในการทดลอง Western Blot ได้อีกด้วย

## 2.9 แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry; MS)

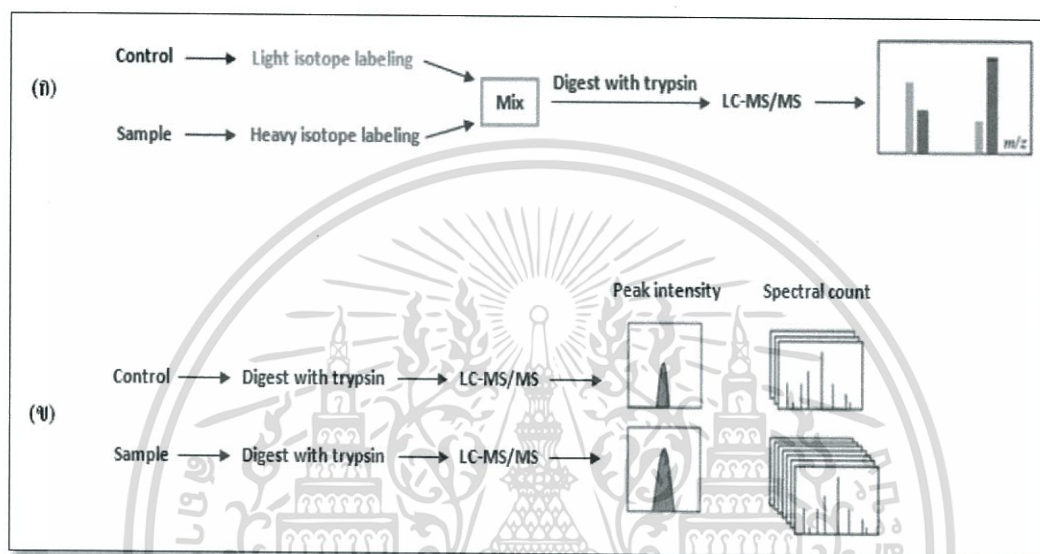
แมสสเปกโตรเมทรีเป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีนสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณเช่นการระบุชนิดและขนาดโปรตีนการทำนายลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน และการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในสภาพที่แตกต่างกันเป็นต้นโดยอาศัยหลักการตรวจวัดมวลต่อประจุ (mass to charge ratio;  $m/z$ ) ที่จำเพาะของตัวอย่างโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ถูกทำให้เกิดประจุโดยสารตัวอย่างถูกฉีดเข้าช่องเติมสารตัวอย่างเข้าเครื่อง (sample inlet) แล้วทำให้แตกตัวเป็นประจุในส่วนผลิตไอออน (ion source) ประจุที่เกิดขึ้นจะผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) เพื่อแปลงเป็นสัญญาณที่ส่วนตรวจวัด (ion detector) แล้วส่งสัญญาณไปยังส่วนประมวลผล (data system) ซึ่งถูกควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ที่เชื่อมโยงกับฐานข้อมูลโปรตีน (รูปที่ 2.9) เทคนิคนี้จัดเป็นเทคนิคขั้นสูงและมีความไวในการตรวจวิเคราะห์ในระดับเฟมโตโมล (femtomole) สามารถทำการศึกษาซ้ำได้ (high reproducibility) สามารถแยกโปรตีนได้ดี (high resolution) และได้ครวละจำนวนมาก (high throughput) จึงเป็นที่สนใจสำหรับการประยุกต์ใช้ในงานวิจัยอย่างแพร่หลาย สำหรับเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีที่นิยมใช้ในงานวิจัยปัจจุบันมี 2 เทคนิคคือ liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) และ matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ดังนี้



รูปที่ 2.9 องค์ประกอบของเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีเปปไทด์ตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่เครื่องตัวอย่างจะเกิด ionization แล้ว ions จะถูกคัดเลือกและตรวจจับด้วยเครื่อง mass spectrometer จากนั้นจะอ่านค่าตาม mass/charge ( $m/z$ ) ข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม mascot (modified from Aebersold R, 2003)

### 2.9.1 เทคนิค Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS)

LC-MS คือการแยกโปรตีนที่อยู่ในสถานะของเหลวด้วยวิธี liquid chromatography และมีการเกิด ion source แบบ electrospray ionization (ESI) ซึ่งสามารถระบุชนิดของโปรตีนด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรีโดยมวลสารจะถูกตรวจวัดในส่วน mass analyzer นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ยังสามารถเปรียบเทียบในเชิงปริมาณได้จึงมีประโยชน์ในด้านการเปรียบเทียบการแสดงออกโปรตีนในสถานะที่แตกต่างกัน LC-MS เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพความไวและความจำเพาะสูงปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาโปรตีนได้ใน 2 รูปแบบคือ label technique และ label free technique



รูปที่ 2.10 หลักการวิเคราะห์ที่โปรตีนด้วยเทคนิค label (isotope) LC-MS (ก) เปปไทด์ของตัวอย่างที่ต่างกันจะถูกตรึงด้วย isotope ที่ต่างกันแล้วถูกผสมเข้าด้วยกันเพื่อทำการวิเคราะห์ในคราวเดียวกัน ส่วน label free LC-MS (ข) เปปไทด์ของตัวอย่างที่ต่างกันจะถูกทำการวิเคราะห์แยกกันด้วยเครื่อง mass spectrometer และผลที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ (Modified from Zhu W, 2010)

ก. Label (isotope) LC-MS การติดฉลากด้วย stable isotope กับโปรตีนซึ่งทำให้ง่ายต่อการระบุชนิดของโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันใน 2 ตัวอย่างขึ้นไปโดยนำตัวอย่างควบคุมมาติดฉลากด้วย stable isotope ชนิดเบา (light) ส่วนตัวอย่างศึกษา (test sample) ติดฉลากกับ isotope ชนิดหนัก (heavy) แล้วนำตัวอย่างทั้งสองมาผสมกันทำการย่อยตัวอย่างผสมด้วยเอนไซม์ทริปซินแล้วจึงวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS เนื่องจากตัวอย่างทั้งสองชนิดถูกติดฉลากด้วย isotope ต่างชนิดกันจึงสามารถเปรียบเทียบผลการแสดงออกของโปรตีนในแต่ละสถานะได้ (รูปที่ 2.9ก) แต่มีข้อจำกัดคือราคาแพงและการติดฉลากดังกล่าวอาจไม่ครอบคลุมถึงตัวอย่างโปรตีนทั้งหมด

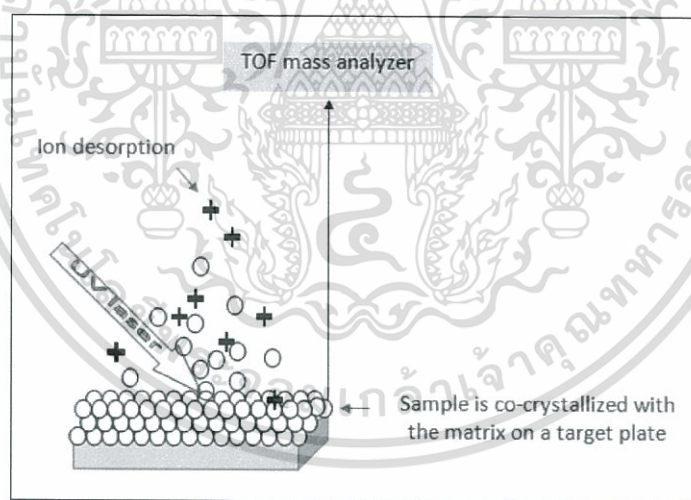
ข. Label free LC-MS การเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกัน 2 ตัวอย่างขึ้นไปแต่ไม่ติดฉลากโปรตีนด้วย stable isotope โดยนำตัวอย่างศึกษากับตัวอย่างควบคุมมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินแล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS อย่างไรก็ตามก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS ตัวอย่างทั้งสองจะไม่นำมาผสมกันหากแต่จะวิเคราะห์แยกกันผลการวิเคราะห์ที่ได้จะถูกนำมา

เปรียบเทียบความแตกต่างของ peptide signal intensities ณ เวลาเดียวกันในทั้งสองตัวอย่าง (รูปที่ 2.9ข) แต่ข้อจำกัดคือจำเป็นต้องใช้ software ที่จำเพาะต่อการวิเคราะห์ซึ่งมีราคาแพง

### 2.9.2 เทคนิค Matrix assisted laser desorption time - of - flight - mass spectrometry (MALDI-TOFMS)

MALDI-TOF MS คือการทำให้สารตัวอย่างแตกตัวเป็นไอออนก่อนการวิเคราะห์โดยผสมสารตัวอย่างกับสารแมทริกซ์ (matrix) ได้แก่ Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) เป็นต้น สารดังกล่าวมีส่วนประกอบของกรดหรือด่างจะทำให้ตัวอย่างมีประจุจากนั้นสารผสมจะถูกนำไปหยดลงบนแผ่นโลหะ

(MALDI plate) ซึ่งจะทำให้ส่วนผสมระเหยกลายเป็นผลึกเมื่อสารแมทริกซ์ถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์จะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการถ่ายทอดพลังงานจากแสงเลเซอร์ส่งไปยังโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีประจุและแตกตัวเป็นไอออนทำให้โปรตีนหรือเปปไทด์สามารถเคลื่อนที่ได้และวิเคราะห์มวลสารด้วย mass analyzer ชนิด time-of-flight (TOF) ซึ่งโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีมวลน้อยจะสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีมวลมากจึงเดินทางไปยังตัวรับ (detector) ได้เร็วกว่าทำให้สามารถคำนวณระยะเวลาที่ตัวอย่างเคลื่อนที่และบอกขนาดมวลสารได้ (รูปที่ 2.11) เทคนิคนี้มีขั้นตอนที่สะดวกและรวดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิค LC-MS แต่ถูกจำกัดด้วยปริมาณของตัวอย่างในการศึกษา นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่อยู่ในสถานะของแข็งได้เช่นโคโลนีของเชื้อและชิ้นเนื้อเป็นต้น ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางการแพทย์ได้หลากหลาย



รูปที่ 2.11 หลักการทำงานของเทคนิค MALDI-TOF MS เปปไทด์ตัวอย่างจะถูกผสมกับ matrix ที่เหมาะสมแล้วตรึงบน mass plate ที่จำเพาะจากนั้นแสงเลเซอร์จะกระตุ้นให้เกิด ions เพื่อส่งไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometer (Modified from Aebersold R, 2003)

การศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีที่มีประสิทธิภาพนั้น ประกอบด้วยกระบวนการหลายขั้นตอน นอกจากการเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่ดีแล้วขั้นตอนการแยกโปรตีนก่อนการตรวจวิเคราะห์ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากเช่นกันซึ่งมี 2 วิธีหลักที่นิยมใช้ในงานวิจัยคือ วิธี gel based และวิธี gel free โดยความแตกต่างระหว่าง 2 วิธีมีรายละเอียดดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Gel based เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวิเคราะห์โปรตีนรวมอาศัยการแยกโปรตีนเบื้องต้นด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสเช่น 2D-PAGE ซึ่งโปรตีนจะถูกแยกตามขนาดและค่า isoelectric point (pI) เป็นต้นจากนั้นทำการย่อยโปรตีนแล้วเลือกตัดจุดโปรตีนที่ต้องการออกจากเจลไปทำการศึกษาโดยโปรตีนที่ตัดแยกได้จะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ได้เป็นสายเปปไทด์สั้นๆแล้ววิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรีวิธีนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างโปรตีนที่มีความซับซ้อนสูง (high complexity) และตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนมากซึ่งจำเป็นต้องแยกโปรตีนด้วยเจลก่อนการวิเคราะห์เสมอ

2. Gel free เป็นทางเลือกหนึ่งของการวิเคราะห์โปรตีนโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการแยกโปรตีนด้วยเจลก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรีซึ่งมีข้อดีคือลดขั้นตอนและระยะเวลาได้ค่อนข้างมากสามารถนำตัวอย่างที่อยู่ในสถานะของเหลวมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินได้เป็นสายเปปไทด์แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรีได้ทันทีโดยมากนิยมวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) ซึ่งมีการแยกสายเปปไทด์ด้วยเทคนิค liquid chromatography ก่อนการวิเคราะห์

การประยุกต์ใช้เทคนิคแมสสเปกโทรเมตรีในงานวิจัยทางการแพทย์

การระบุชนิดและขนาดโปรตีน (protein identification) แบ่งเป็น 3 วิธีหลักดังนี้

### 1. Peptide mass fingerprints (PMF)

ตัวอย่างโปรตีนถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินโดยโปรตีนจะถูกตัดให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อเอนไซม์ของโปรตีนแต่ละชนิดเรียกลักษณะนี้ว่า peptide mass fingerprint (PMF) ดังนั้นขนาดเปปไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรีจึงมีความจำเพาะในโปรตีนแต่ละชนิดเมื่อนำข้อมูลที่ได้เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน (protein database) จึงสามารถระบุชนิดโปรตีนได้

### 2. MS/MS ion search

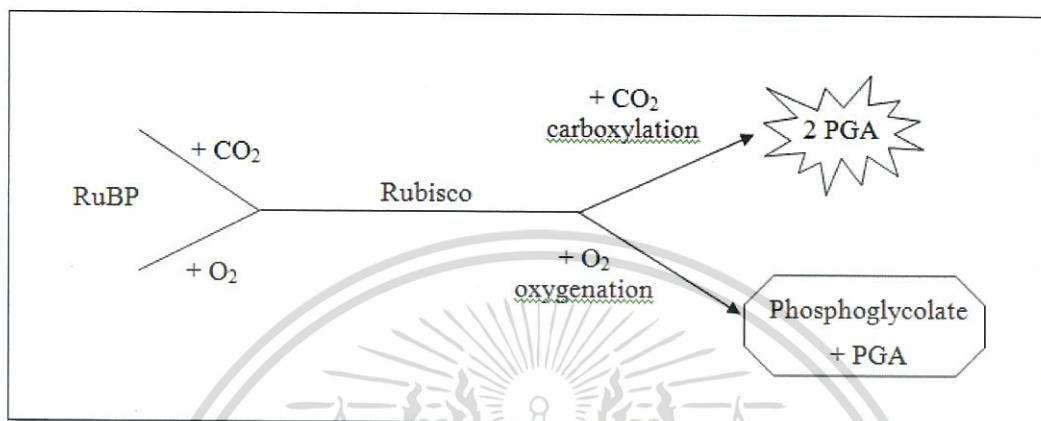
การระบุชนิดโปรตีนด้วยวิธีนี้โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรีซ้ำ 2 ครั้ง (MS/MS) การวิเคราะห์ครั้งแรกสามารถบอกขนาดมวลของสายเปปไทด์ทั้งหมดและทำการแตกตัวเปปไทด์แต่ละสายด้วยการวิเคราะห์ครั้งที่สองซึ่งจะทำให้ทราบขนาดมวลของเปปไทด์แต่ละสายแล้วนำข้อมูลทั้งหมดเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนจึงสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ถูกต้องและจำเพาะมากกว่าเมื่อเทียบกับวิธี PMF

### 3. De novo peptide sequencing

เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับโปรตีนที่ยังไม่ทราบลำดับกรดอะมิโนหรือยังไม่มีในฐานข้อมูลโปรตีนซึ่งจะสามารถบอกองค์ประกอบของโปรตีนได้จากเปปไทด์ขนาดต่างๆกันและยังทำนายชนิดกรดอะมิโนในสายเปปไทด์แต่ละสายได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ MS/MS ข้อมูลทั้งหมดถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเฉพาะเช่นโปรแกรม PepNovo

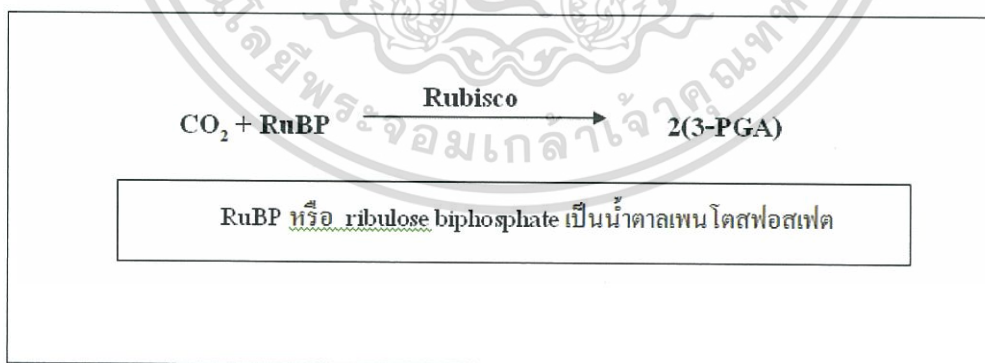
## 2.10 เอนไซม์ Rubisco

เอนไซม์ Rubisco เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อนขนาดใหญ่ ซึ่งจัดว่ามีความสำคัญยิ่งและมีปริมาณถึง 50% ของโปรตีนทั้งหมดในใบ การสังเคราะห์ Rubisco และกิจกรรมของเอนไซม์นี้ถูกควบคุมโดยแสง เอนไซม์ Rubisco ทำหน้าที่คะตะไลต์ได้ทั้งการรวมตัวระหว่าง  $\text{CO}_2$  และ RuBP และ  $\text{O}_2$  กับ RuBP



รูปที่ 2.12 หลักการ Rubisco ที่มา: พรพิมล

ในการสังเคราะห์ด้วยแสงพืชใช้  $\text{CO}_2$  จากบรรยากาศซึ่งมีอยู่ 350-365 ppm หรือ 0.035-0.0365% ในขณะที่  $\text{O}_2$  ในบรรยากาศมีสูงถึง 21% ดังนั้นในสภาพแสงแดดจัด แห้งแล้ง ปากใบเปิด ย่อมมีผลให้ปริมาณ  $\text{CO}_2$  ภายในใบลดลง เอนไซม์ Rubisco จะคะตะไลต์ปฏิกิริยาระหว่าง RuBP กับ  $\text{O}_2$  ได้ดีกว่าการตรึง  $\text{CO}_2$  ก๊าซ  $\text{CO}_2$  แพร่ผ่านปากใบเข้าไปในเมมเบรนของคลอโรพลาสต์ไปสู่สโตรมาซึ่งเป็นที่เกิดการตรึง  $\text{CO}_2$  โดยเอนไซม์ RuBP carboxylase/oxygenase (Rubisco)

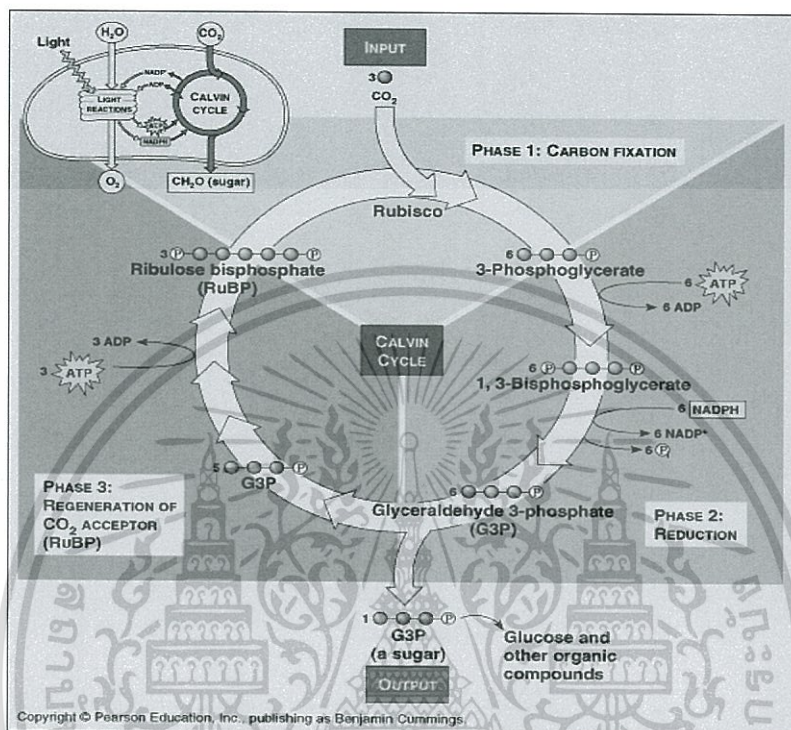


รูปที่ 2.13 การตรึง  $\text{CO}_2$  ที่มา: พรพิมล

ช่วงการเกิดรีดักชันแต่ละโมเลกุลของ 3-PGA ถูกเปลี่ยนเป็น G-3-P หรือ PGAL ซึ่งเป็นน้ำตาลไตรออสฟอสเฟต โดยเกิดจากสองปฏิกิริยา ปฏิกิริยาแรกเป็นการเติมหมู่ฟอสเฟตจาก ATP (ที่ได้จากปฏิกิริยาแสง) ให้แก่คาร์บอนอะตอมที่ 1 ของ 3-PGA ได้ผลผลิตเป็น 1,3-bisphosphoglycerate (1,3-bisPGA) จากนั้นเป็นการรีดิวซ์หมู่คาร์บอกซิล ( $-\text{COOH}$ ) ให้เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมู่อัลดีไฮด์ (-CHO) โดยใช้ไฮดรอกซิลอิเล็กตรอน 1 คู่ จาก NADPH (จากปฏิกิริยาแสง) ผลผลิตจากปฏิกิริยารีดักชันนี้เป็น glyceraldehydes 3-phosphate (G3P) ซึ่งเป็นน้ำตาลไตรออส (triose) ช่วงการสร้าง RuBP ขึ้นมาใหม่ เพื่อเป็นสารตัวรับ  $\text{CO}_2$  เป็นช่วงที่มีปฏิกิริยาหลายขั้นตอนเพื่อเปลี่ยนคาร์บอนที่อยู่ใน G3P จำนวน 5 โมเลกุล ให้กลายเป็น RuBP จำนวน 3 โมเลกุล ซึ่งต้องใช้พลังงานจาก ATP



รูปที่ 2.14 การตรึง  $\text{CO}_2$  ที่มา: พรพิมล

## 2.11 เทคนิคการวิเคราะห์โดยเครื่องถ่ายภาพเจล Molecular Imager GelDoc™ EZ

### 1. หลักการของเครื่องถ่ายภาพเจล Molecular Imager Gel Doc™ EZ

Gel Doc™ EZ System เป็นเครื่องมือการถ่ายภาพเจลที่มีขนาดกะทัดรัดและอัตโนมัติที่ออกแบบมาเพื่อมอบภาพที่มีคุณภาพและผลการวิเคราะห์ที่มีคุณภาพเพียงแคกดปุ่ม ระบบ Gel Doc EZ ให้ความยืดหยุ่นที่เหนือชั้นด้วยการใช้ถาดเฉพาะ 4 แบบ ดังนี้

- 1.1 ถาด UV สำหรับการย้อมสี ethidium bromide ของเจลดีเอ็นเอและการฉายแสง
- 1.2 ถาดสีขาสำหรับ Coomassie, ทองแดง, เงินและคราบสังกะสี
- 1.3 ถาดสีฟ้าสำหรับการใช้กรดนิวคลีอิกที่มีย้อมด้วยเทคนิค SYBR®
- 1.4 ถาดปลอดภัยสำหรับภาพที่ปราศจากคราบด้วยเจลปลอดภัย Bio-Rad

โปรแกรม Image Lab™ ที่ใช้งานร่วมกับระบบการถ่ายภาพ Gel Doc™ EZ Gel มีคุณสมบัติ เช่น การจับภาพอัตโนมัติการวิเคราะห์อัตโนมัติการตั้งค่าของผู้ใช้และคุณสมบัติอื่นๆ ทำให้การถ่ายภาพและการวิเคราะห์ภาพทำได้ง่ายอย่างไม่น่าเชื่อ

### 2. ส่วนประกอบของเครื่องถ่ายภาพเจล Molecular Imager Gel Doc™ EZ

2.1 เป็นชุดอุปกรณ์สำหรับใช้ในการบันทึก วิเคราะห์ข้อมูล และพิมพ์ภาพสารชีวโมเลกุล (molecular) จากแผ่นเจลในงาน Colorimetric, Fluorescence

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2.2 ชุดอุปกรณ์ประกอบด้วยกล้องบันทึกภาพ แหล่งกำเนิดแสง ตูมิต และโปรแกรมวิเคราะห์
- 2.3 มีพื้นที่ถ่ายภาพ ขนาด 15 x 11.2 เซนติเมตร
- 2.4 มีแหล่งกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร
- 2.5 กล้องบันทึกภาพเป็นกล้อง CCD (Charge-coupled device) ชนิด 12 bit มีค่าความละเอียดของภาพ (image resolution) 4 megapixels มีขนาด pixel 4.6x4.6  $\mu\text{m}$  และมีค่า Linear dynamic range เท่ากับ 3 orders
- 2.6 มีระบบปรับปริมาณแสงและความคมชัดของภาพอัตโนมัติ (auto exposure and auto focus)
- 2.7 มีถาด (tray) เพื่อรองรับงานที่ต้องใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตได้
- 2.8 ตัวคัดกรองแสง (filter) สามารถรองรับสีย้อม Ethidium bromide, SYBR® Green, SYBR® Safe, SYBR® Gold, GelGreen, GelRed, Fast Blast™, SYPRO Ruby, Flamingo™, Oriole™, CY3, rhodamine, green fluorescent protein, Hoechst, Krypton, silver stain, copper stain, zinc stain, Coomassie Brilliant Blue, Coomassie Fluor Orange ได้
- 2.9 ตัวเครื่องมีขนาด 27(W) x44(L) x38(H) เซนติเมตร
- 2.10 สามารถติดตั้งโดยเชื่อมต่อเครื่องกับคอมพิวเตอร์ด้วยสาย USB เพียงสายเดียว
- 2.11 โปรแกรม ImageLab® สามารถถ่ายภาพ วิเคราะห์ภาพ และรายงานผลได้อย่างอัตโนมัติ ด้วยการกดปุ่มสั่งงานเพียงครั้งเดียว เมื่อบันทึกเป็น protocol ไว้ล่วงหน้า และ protocol ที่ตั้งค่าไว้สามารถแก้ไข บันทึกซ้ำ และใช้ซ้ำได้
- 2.12 มีคำสั่งเก็บภาพขณะปัจจุบัน (Snapshot)
- 2.13 สามารถบันทึกภาพในรูปแบบของไฟล์ TIFF, JPG, BMP, PNG และ SCN
- 2.14 สามารถหา Band และ Lane แบบอัตโนมัติหรือ manual เพื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งโมเลกุลของตัวอย่างแถบ DNA และโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานได้
- 2.15 มี Volume tool สำหรับคำนวณความเข้มข้นของแถบสารพันธุกรรมตัวอย่าง (Concentration Analysis)
- 2.16 สามารถแสดงผลความเข้มของการวัดในลักษณะของภาพสามมิติ (3 Dimensional view) และสามารถปรับเปลี่ยนมุมมองของภาพได้รอบด้าน รวมทั้งสามารถปรับเปลี่ยนการแสดงผลของภาพได้
- 2.17 โปรแกรม ImageLab® ไม่มีการลือครหัสสามารถติดตั้งได้ไม่จำกัดจำนวนเครื่องและจำนวนครั้ง
- 2.18 โปรแกรม ImageLab® สามารถติดตั้งได้ทั้งระบบปฏิบัติการ Windows และ Mac
- 2.19 มีอุปกรณ์ประกอบเครื่องดังนี้
  - 2.19.1 เครื่องคอมพิวเตอร์ จำนวน 1 เครื่อง
  - 2.19.2 เครื่องปริ้นเตอร์ จำนวน 1 เครื่อง
  - 2.19.3 เครื่อง UPS ขนาด 1.0 KVA จำนวน 1 เครื่อง
- 2.20 มีคู่มือประกอบการใช้งาน
- 2.21 มีใบรับรองแสดงการเป็นตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย
- 2.22 รับประกันคุณภาพของเครื่องมือเป็นเวลา 1 ปี
- 2.23 เป็นผลิตภัณฑ์ของ BIO-RAD Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. คุณสมบัติและคุณประโยชน์ของระบบ Gel Doc™ EZ

3.1 ใช้งานง่าย นักวิจัยที่ไม่คุ้นเคยกับระบบการถ่ายภาพ Gel Doc™ EZ สามารถเรียนรู้การใช้งานได้อย่างรวดเร็วและง่ายดายเนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้ตัวกรองเลนส์หรือไฟด้วยตนเอง สร้างโปรโตคอลเริ่มต้นหนึ่งครั้งจากนั้นใช้ปุ่มสี่เหลี่ยมที่ด้านหน้าของเครื่องเพื่อถ่ายภาพเจลและตั้งค่าการวิเคราะห์ภาพเป็นครั้งคราว

3.2 รูปภาพที่มีคุณภาพและการวิเคราะห์ข้อมูลเต็มรูปแบบ ทำความสะอาดอย่างลงตัวพร้อมสำหรับการพิมพ์ที่พร้อมทั้งลดฟิสิกส์เซลล์เมื่อถ่ายภาพหรือซูมภาพ รับผลการวิเคราะห์รวมถึงน้ำหนักโมเลกุลสัมพัทธ์ การหาปริมาณของแต่ละแถบรายงานผลเป็น Excel ไฟล์ PDF และอื่นๆ ภายในไม่กี่นาที

3.3 ประหยัดเวลาและพื้นที่ ได้ผลเร็วขึ้นโดยไม่ต้องใช้เวลาในการทำขั้นตอนต่างๆ ในการรวมภาพและประหยัดเนื้อที่อันมีค่าโดยใช้ระบบขนาดกะทัดรัดนี้

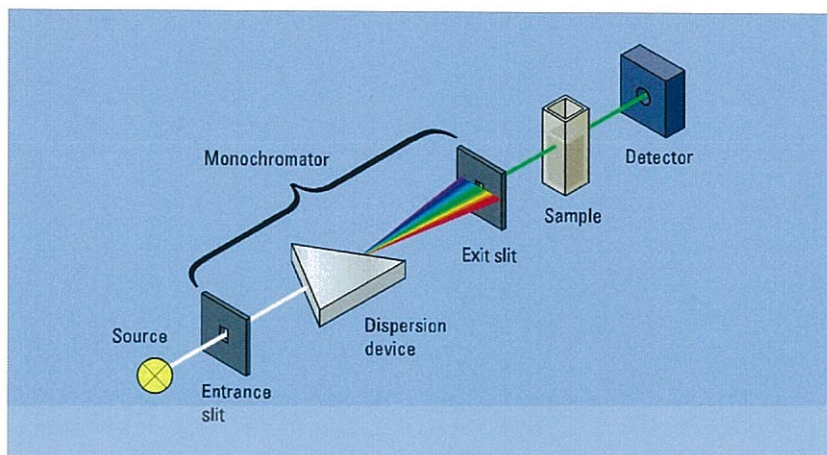
3.4 การออกแบบและตัวเลือกที่มีความยืดหยุ่น ใช้สถานที่เฉพาะเจาะจงสำหรับการใช้งานภาพต่างๆ ของเจล ภาชนะที่กำหนดไว้อย่างชัดเจนและมีรหัสสีช่วยขจัดความสับสน ได้เฉพาะสิ่งที่คุณต้องการ และปรับตามความต้องการในการวิจัยที่เปลี่ยนแปลง

3.5 เทคโนโลยีปราศจากคราบ รวมการย้อมสี Coomassie 2 ชม. ของคุณให้เป็น 5 นาที ในขั้นตอน stain and image ด้วยระบบภาพเจลปราศจากคราบ Bio-Rad เจลปลอดคราบเป็นการกำจัดคราบ ซึ่งช่วยให้คุณตรวจสอบผลการตรวจวัดผลทางไฟฟ้าได้ก่อนที่จะมีการดูดซับน้ำ เจล "สีเดียว" เหล่านี้ให้ความไวเท่ากันหรือดีกว่าการย้อมสี Coomassie และขจัดปัญหาการกำจัดขยะอินทรีย์

## 2.12 เทคนิคการวิเคราะห์โดยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

### 1. หลักการทำงานของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในวิเคราะห์สารโดยอาศัยหลักการดูดกลืนรังสีของสารที่อยู่ในช่วง Ultra violet (UV) และ Visible (VIS) ความยาวคลื่นประมาณ 190-1000 nm ส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน หรือสารอนินทรีย์ ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สารแต่ละชนิดจะดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกันและปริมาณการดูดกลืนรังสีก็ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารนั้น การดูดกลืนแสงของสารต่างๆ เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร จึงสามารถวิเคราะห์ได้ในเชิงคุณภาพและปริมาณ เป็นเทคนิคที่ให้สภาพไวที่ดีและใช้กันอย่างแพร่หลาย ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และค่าความยาวคลื่น (Wavelength) ซึ่งเรียกว่า Spectrum



รูปที่ 2.15 การทำงานของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

## 2. ส่วนประกอบของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

2.1 Light source แหล่งกำเนิดรังสีเป็นส่วนที่ให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการออกมาอย่างต่อเนื่องและคงที่รวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอ หลอดกำเนิดรังสีมีหลายชนิดตามความยาวคลื่นรังสีที่เปล่งออกมา เช่น ช่วง UV จะใช้หลอด H<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> lamp ให้ความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 160-380 nm และช่วง visible ใช้หลอด Tungsten/halogen ให้ความยาวคลื่นในช่วง 240-2,500 nm เป็นต้น

2.2 Monochromator เป็นส่วนที่ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสงซึ่งเป็นพอลิโครเมติกให้เป็นแสงโมโนโครเมติกซึ่งเป็นแถบแสงแคบๆ หรือมีความยาวคลื่นเดียวใช้ฟิลเตอร์ปริซึมหรือเกรตติง

2.3 Cell sample เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง บางครั้งอาจเรียกว่า Cuvettes ที่ใช้กันทั่วไปได้แก่เซลล์ที่ทำด้วยแก้วจะใช้ได้เฉพาะช่วง visible เพราะแก้วจะดูดกลืนรังสีในช่วงยูวีได้ เซลล์ที่ทำด้วยซิลิกาและควอร์ตซ์ซึ่งใช้ได้ทั้งช่วง UV และ Visible

2.4 Detector ทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้า เครื่องวัดรังสีมีหลายชนิดที่นิยม ได้แก่ Photomultiplier tube และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด Silicon diode detector

## 2.13 เทคนิคการใช้เครื่อง Laminar Flow Clean Bench (ตู้ลามินาร์)

### 1. หลักการทำงานเบื้องต้นของเครื่อง Laminar Flow Clean Bench

การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (inactivation) โดยสารเคมีหรือกระบวนการแปรรูปทางอาหารโดยไม่ใช้ความร้อนอาจมีความหมายแตกต่างกัน การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยสารเคมี เช่น คลอรีนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นหมายถึงการทำลายจุลินทรีย์โดยการทำลายโครงสร้างระดับเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ เช่น เมตาบอลิซึม (metabolism) และการสังเคราะห์ทางชีววิทยา (biosynthesis) ในขณะที่การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยรังสียูวี (กระบวนการแปรรูปทางอาหารโดยไม่ใช้ความร้อน) นั้นไม่ได้เป็นการทำลายโครงสร้างระดับเซลล์ของจุลินทรีย์เพียงแต่เป็นการป้องกันการแพร่พันธุ์ของจุลินทรีย์ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ รังสียูวี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยทำลายกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของ DNA ส่งผลให้ DNA ไม่สามารถเกิดกระบวนการจำลองตัวเองได้ (DNA replication) กรดนิวคลีอิกสามารถดูดซับรังสียูวีที่มีความยาวคลื่นในช่วง 200-310 nm รังสียูวีสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยขัดขวางการทำงานของ DNA และ RNA รังสียูวีสามารถสร้างพันธะ pyrimidine dimer ระหว่าง กรดอะมิโนไทมีน (thymine) และกรดอะมิโนไซโตซีน (cytosine) ที่อยู่ติดกันของสาย DNA หรือ RNA เดียวกัน dimers นี้สามารถป้องกันกระบวนการจำลองตัวเองของ DNA หรือ RNA ส่งผลให้เกิดการยับยั้งขึ้นหรือป้องกันการติดเชื้อจุลินทรีย์ แม้ว่าจะเกิดความเสียหายที่กรดนิวคลีอิก กระบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์ยังคงดำเนินต่อไป เนื่องจากเอนไซม์ภายในเซลล์ จุลินทรีย์สามารถซ่อมแซมตัวเองจากความเสียหายที่เกิดขึ้นได้ เป็นผลให้จุลินทรีย์สามารถฟื้นตัวได้ หลังจากการผ่านการฉายรังสียูวี ดังนั้นการใช้รังสียูวีในการฆ่าเชื้อจึงจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของรังสียูวี ในปริมาณที่มากพอ โดยปริมาณความเข้มข้นของรังสียูวีที่ใช้ในการฆ่าเชื่อนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์

1.1 จุดประสงค์คือการสร้างสภาวะอากาศปลอดเชื้อ (Clean Particle-Free Air) ภายในพื้นที่ทำงานของเครื่องและป้องกันโอกาสการเกิด Cross Contamination จากสิ่งปนเปื้อนภายนอก

1.2 อากาศสกปรก (Contaminated Air) ภายในห้องที่ใช้งานถูกดูดผ่านเข้าไปในตู้ลามินาร์ โดยไม่ผ่านพื้นที่ทำงานภายในเครื่อง

1.3 อากาศสกปรก (Contaminated Air) วิ่งผ่านแผ่นกรอง HEPA Filter ถูกกรองกลายเป็นอากาศสะอาด (Clean Particle-Free Air) และถูกส่งผ่านมายังบริเวณพื้นที่ทำงานภายในเครื่อง

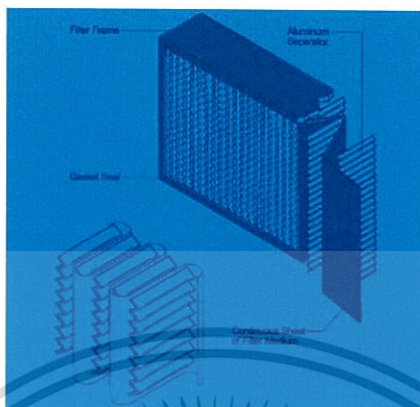
1.4 อากาศสะอาดในบริเวณพื้นที่ทำงาน จะเคลื่อนที่ผ่านงานที่เรากำลังทำและถูกพัดออกมาทางด้านหน้าของเครื่องในที่สุด

## 2. ส่วนประกอบของเครื่อง Laminar Flow Clean Bench

2.1 แผ่นกรอง HEPA Filter (รูป 2.16) ย่อมาจาก "High Efficiency Particulate Air" Filter ถือเป็นหัวใจหลักของตู้ปลอดเชื้อทุกประเภท เพราะเป็นส่วนประกอบของตู้ที่ทำให้อากาศที่ไหลเวียนภายในหรือไหลเวียนออกจากตู้เป็นอากาศที่ปลอดเชื้อหรือเป็น Laminar Air flow หน้าทีของแผ่นกรองนี้คือการกรองสิ่งปนเปื้อนเชื้อโรค และฝุ่นละอองที่อยู่ในอากาศ แต่ไม่สามารถกรองก๊าซหรือสารระเหย (VOCs) ได้ๆ ทั้งสิ้นแผ่นกรอง HEPA มีลักษณะเป็นตัวกรองแบบแห้งที่สามารถถอดเปลี่ยนได้มีโครงสร้างทำมาจากเส้นใยของโพรเซสซิลิเกตแล้วหลอมเป็นแผ่นบางจนคล้ายกระดาษและแม้ว่าแผ่นกรอง HEPA จะมีลักษณะเป็นแผ่นบางแต่ก็ยังคงสามารถสร้างรูปแบบให้มีลักษณะเป็นโครงสร้าง 3 มิติเชิงซ้อนที่สามารถดักอนุภาคต่างๆได้แผ่นกรอง HEPA จะมีการพับเป็นชั้นจำนวนมากเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับดักจับโดยมี Aluminum separator ซึ่งมีลักษณะคล้ายลูกฟูกอยู่ระหว่างชั้นของแผ่นกรองเพื่อให้อากาศสามารถแทรกซึมเข้าไปถึงส่วนของรอยจีบได้ สำหรับในตู้ปลอดเชื้อแผ่นกรอง HEPA จะทำหน้าที่กรองอากาศที่ออกจากตู้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมและกรองอากาศที่จะไหลเวียนผ่านเข้ามาในตู้ซึ่งแผ่นกรองสามารถดักจับฝุ่นละอองขนาดเล็กและจุลินทรีย์ได้โดยที่อากาศสามารถผ่านได้อย่างอิสระ

2.2 Mechanisms หลักของ HEPA Filter ประกอบไปด้วย Impaction, Interception และ Diffusion แผ่นกรอง HEPA Filter มีความสามารถในการกรองอนุภาคต่างๆ ได้เล็กถึงขนาด 0.3 ไมครอน (หากเป็นชนิดที่มีประสิทธิภาพ 99.99% จะหมายความว่าทุกๆ 10,000 รูเล็ก จะมี 1 รูใหญ่ที่อนุภาคขนาด 0.3 ไมครอนสามารถหลุดลอดออกไปได้)

2.3 ประสิทธิภาพการกรองของ HEPA Filter มีหลายระดับ ส่วนมากจะอยู่ในช่วง 99.95%-99.99% ที่ขนาดอนุภาค 0.3 ไมครอนโดยทั่วไปงานที่เกี่ยวข้องกับห้องแล็บและเภสัชกรรมจะใช้ HEPA Filter ประสิทธิภาพ 99.99% ที่ขนาด 0.3 ไมครอนเป็นหลัก



รูปที่ 2.16 แผ่นกรอง HEPA

### 3. วิธีการใช้งานตู้ Laminar Flow Clean Bench

หัวใจหลักของการกรองอากาศสะอาดเพื่อป้องกันงานภายในพื้นที่ทำงานคือแผ่นกรอง HEPA Filter

3.1 Laminar Flow Clean Bench หรือ "ตู้ลามินาร์" เหมาะสำหรับการใช้งานร่วมกับสารหรือเชื้อที่ไม่เป็นอันตรายเท่านั้น (Non-Hazardous Agents/Microbial)

3.2 Laminar Flow Clean Bench หรือ "ตู้ลามินาร์" ทำหน้าที่ป้องกันงาน (Product Protection) เท่านั้น แต่ไม่ป้องกันผู้ปฏิบัติงาน (Personnel Protection) และสิ่งแวดล้อม (Environment Protection) ใดๆ ทั้งสิ้น

3.3 Laminar Flow Clean Bench หรือ "ตู้ลามินาร์" แตกต่างจากตู้ดูดควัน (Fume Hood) และไม่สามารถนำมาใช้งานแทนกันได้ ผู้ปฏิบัติงานจะได้รับอันตรายจากสารเคมีต่างๆ หากมีการนำเครื่องนี้ไปใช้แทนตู้ดูดควัน

#### 3.4 รังสีอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet Radiation: UV)

รังสียูวีถูกจัดเป็นส่วนหนึ่งของสนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นในช่วง 100-400 nm โดยทั่วไปรังสียูวีสามารถแบ่งประเภทออกได้ 4 ประเภทตามความยาวคลื่นคือรังสียูวีเอ (UV-A), รังสียูวีบี (UV-B), รังสียูวีซี (UV-C) และรังสียูวีสูญญากาศ (vacuum-UV)

3.4.1 รังสียูวีเอซึ่งมีช่วงความยาวคลื่น 315-400 nm เป็นรังสีที่มีผลต่อการเปลี่ยนสีของผิวหนังของคน

3.4.2 รังสียูวีบีซึ่งมีช่วงความยาวคลื่น 280-315 nm เป็นรังสีที่มีผลต่อการไหม้และการเป็นมะเร็งผิวหนังของคน

3.4.3 รังสียูวีซี ซึ่งมีช่วงความยาวคลื่น 200-280 nm เป็นรังสีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 รังสียูวีสุญญากาศ ซึ่งมีช่วงความยาวคลื่น 100-200 nm เป็นรังสีที่สามารถถูกดูดซับได้ด้วยวัตถุเกือบทุกชนิด โดยรังสียูวีสุญญากาศจำเป็นต้องเคลื่อนที่ในสภาวะสุญญากาศเท่านั้น

รังสียูวีจากแสงแดดจากดวงอาทิตย์เป็นรังสีที่มีความยาวคลื่นมากกว่า 300 นาโนเมตร เนื่องจากความสามารถในการดูดซับของชั้นโอโซนที่สามารถดูดซับรังสียูวีที่มีความยาวคลื่นต่างๆ

## 2.14 เทคนิคการใช้เครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)

### 1. หลักการทำงานของเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากซึ่งสามารถฆ่าเชื้อได้โดยอาศัยความร้อนจากไอน้ำเดือดภายใต้ความดัน ซึ่งเมื่อต้มให้เดือดจะกลายเป็นไออัดแน่นอยู่ภายในมีอุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ตามปกติถ้าวัตถุอยู่ภายในสภาพนี้นาน 10-15 นาที จะปราศจากสิ่งมีชีวิตทุกอย่าง (sterile) เครื่องมือนี้ใช้กันมากในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และฆ่าเชื้อจากจานอาหาร หลอดทดลอง ตลอดจนใช้ทำให้เครื่องมือเครื่องใช้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์

### 2. ส่วนประกอบของเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ

ลักษณะของเครื่องเป็นภาชนะโลหะรูปสี่เหลี่ยมหรือรูปทรงกระบอกมีฝาปิดที่แข็งแรง ภายในมีช่องว่างสำหรับบรรจุสิ่งของที่ต้องการฆ่าเชื้อในลักษณะเช่นเดียวกับการนึ่ง ด้านล่างมีช่องว่างสำหรับบรรจุน้ำ

## 2.15 เทคนิคการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง

### 1. หลักการทำงานของเครื่องปั่นเหวี่ยง

เป็นเครื่องมือใช้แยกตัวอย่างของเหลวออกจากของแข็งอนุภาคขนาดเล็กหรือใช้เพื่อแยกของเหลวหลายชนิดที่มีความถ่วงจำเพาะต่างกันให้เกิดการแยกชั้น โดยอาศัยหลักการเร่งให้อนุภาคตกตะกอนเร็วขึ้น ภายใต้สนามของแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง แรงนอนกันของอนุภาคจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับแรงหนีศูนย์กลาง ทำให้อนุภาคนอนกันด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ภายใต้สนามแรงหนีศูนย์กลางอนุภาคจะตกตะกอนด้วยอัตราเร็วที่ไม่เท่ากัน การปั่นแยกตะกอน จึงต้องใช้เวลาานพอเพียงที่อนุภาคขนาดเล็กจะนอนกันหมด จะแบ่งเป็น 2 ส่วน คือส่วนตะกอน (pellet) และส่วนของเหลว

### 2. ส่วนประกอบของเครื่องปั่นเหวี่ยง

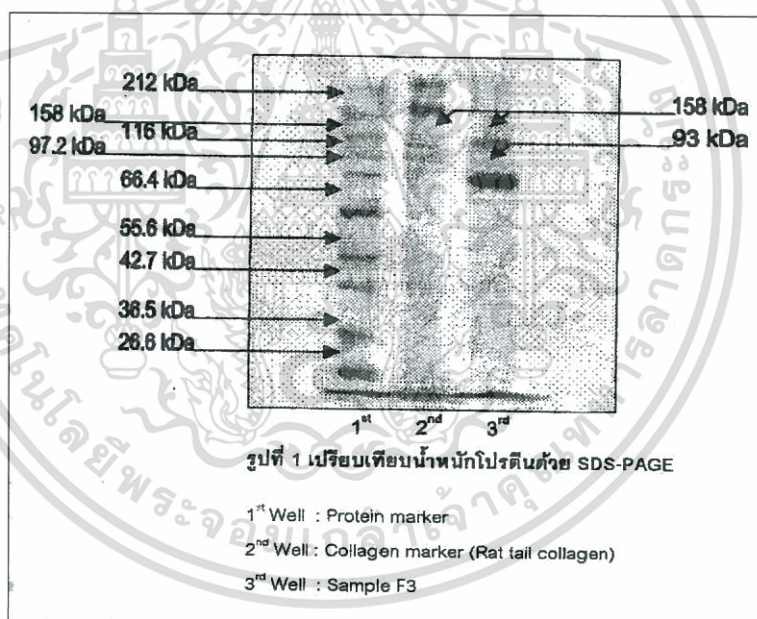
2.1 ความจุของอุปกรณ์โรเตอร์ 8x50 มิลลิลิตร, 4 microplate หรือ 30 คอลัมน์สำหรับบริการวิจัยที่ต้องการ

2.2 Auto-Lock rotor exchange เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นในการใช้งาน โดยเปลี่ยนจากหลอด 50 มิลลิลิตร ไปเป็น microplate ไปจนถึง microtubes ได้อย่างง่ายดาย

## 2.16 งานที่เกี่ยวข้อง

### 1. การสกัดโปรตีนคอลลาเจนจากหอยเชอร์รี่เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของโปรตีนคอลลาเจนที่ได้จากวัว

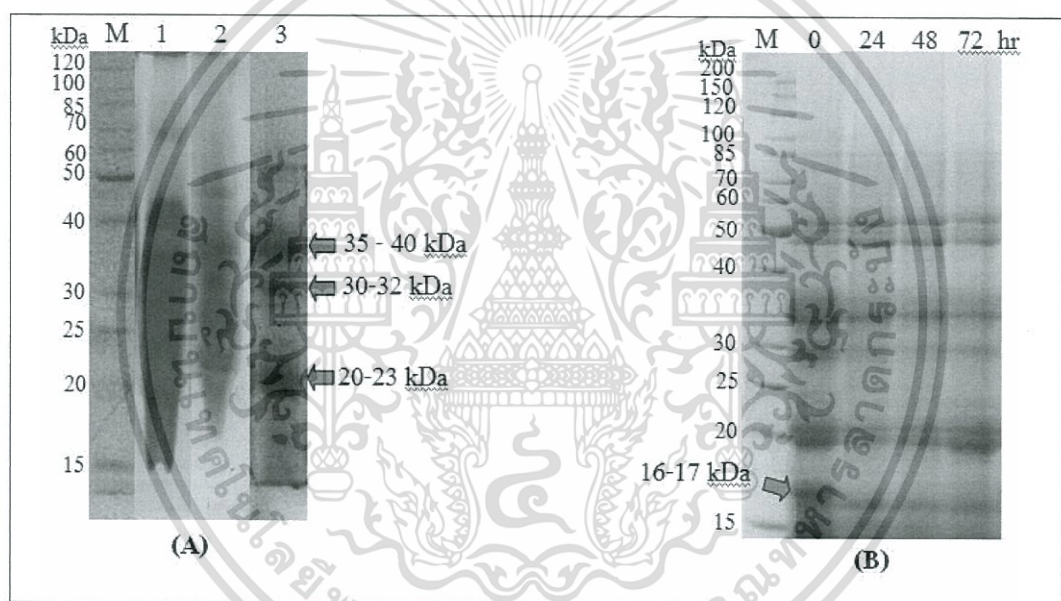
เกศทิพย์อีศรางกูรณอยุธยา: การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเป็นทางเลือกของการใช้โปรตีนคอลลาเจนจากวัวซึ่งเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตคอลลาเจนซึ่งปัญหาคือมีราคาแพงเนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศและปัญหาระบาดของโรคคว่ำบาโครงสร้างโปรตีนคอลลาเจนมีลักษณะเป็นเส้นใยร่างแหซึ่งพบในเนื้อเยื่อประสานทำหน้าที่เป็นโครงสร้างใต้ชั้นผิวหนังเพื่อให้ผิวหนังยึดติดกันและช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นให้ผิวหนังการสกัดโปรตีนคอลลาเจนโดยใช้ Acetic acid ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืนตรวจสอบด้วยวิธี SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis ได้ค่าน้ำหนักโปรตีนประมาณ 158 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับค่าน้ำหนักโปรตีนคอลลาเจนจากหางหนูที่นำมาเปรียบเทียบกับวิเคราะห์กรดอะมิโน Glycine, Proline, Hydroxyproline ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของคอลลาเจนด้วยวิธี High Performance Liquid chromatography ได้ค่าใกล้เคียงกับกรดอะมิโนของหางหนูเช่นกันผลที่ได้แสดงว่าหอยเชอร์รี่มีโปรตีนที่คาดว่าจะจะเป็นโปรตีนคอลลาเจนที่น่าจะนำมาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของโปรตีนคอลลาเจนที่ได้จากวัวซึ่งเป็นขั้นตอนที่จะต้องทำการวิจัยต่อไป



รูปที่ 2.17 การเปรียบเทียบน้ำหนักโปรตีนด้วย SDS-PAGE

## 2. การสกัดและการวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนจากเมล็ดแก่นตะวัน

ปริยาพวงสำลีหวังสมนึก(2552): งานวิจัยนี้เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแก่นตะวัน 3 วิธีซึ่งมีขั้นตอนและสารละลายที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford assay และแยกโปรตีนที่สกัดได้ด้วยเทคนิค Sodium Dodesyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าสารละลายที่ใช้ในการสกัดที่ประกอบด้วย 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 20 mM DTT จากนั้นตกตะกอนด้วย Trichloroacetic acid และ Bmercaptoethanol ความเข้มข้น 10 และ 0.07 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เป็นการสกัดที่ให้โปรตีนที่มีทั้งคุณภาพดีที่สุดในได้ปริมาณโปรตีน  $20.8 \pm 0.27$  มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเมล็ด 1 กรัม หลังการย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 พบแถบโปรตีนสะสมในเมล็ดแก่นตะวันที่มีขนาดประมาณ 20-23 kDa, 30-32 kDa และ 35-40 kDa เมื่อนำวิธีการดังกล่าวมาศึกษาการแสดงออกของยีนในเมล็ดแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบแถบโปรตีนที่แตกต่างกัน



รูปที่ 2.18รูปแบบการรันโปรตีนของJerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*L.)

(A) คือ โหลดโปรตีนปริมาณ 10 กรัม ลงใน Mini Protean III apparatus (Bio-Rad)

(B) คือ โหลดโปรตีนปริมาณ 40 กรัม ลงใน V20-CDC apparatus (Sci-Plas)

**Well 1** คือ การสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย Extraction buffer ที่ประกอบด้วย 1.5 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 2% SDS

**Well 2** คือ การสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย Extraction buffer ที่ประกอบด้วย 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 20 mM DTT

**Well 3** คือ การสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย Extraction buffer ที่ประกอบด้วย เช่นเดียวกับวิธีที่ 2 แต่ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย Trichloroacetic acid และ B-mercaptoethanol

### 3. การทำบริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสจากเชื้อ B1.2

**สมยศ โอศิริพันธุ์ (2553):** การศึกษาเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสซึ่งผลิตภายในเซลล์จุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ B1.2 ที่คัดแยกได้จากโป่งน้ำร้อนท่าปาย จังหวัดแม่ฮ่องสอน ประเทศไทย การศึกษาและระบุชนิดสายพันธุ์เชื้อประกอบด้วย การย้อมสีแกรม การย้อมสีเอนโดสปอร์ การทดสอบ Catalase พบว่าจุลินทรีย์ B1.2 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีเอนโดสปอร์ และการระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยวิธี 16s rDNA sequencing (Partial length) พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Anoxybacillus kistanbolinensis* และ *Anoxybacillus flavithermus* มากที่สุด เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสซึ่งผลิตภายในเซลล์จุลินทรีย์ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการ DEAE ion-exchange และ Affinity chromatography ถูกทำให้เข้มข้นโดยวิธี Ultrafiltration พบว่าคุณสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์มี Specific activity เท่ากับ 1.1 U/mg protein มีความบริสุทธิ์ประมาณ 3.79 เท่า และ Recovery 86.4% น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์หาได้โดยวิธี Native-PAGE และ SDS-PAGE คือ 215 และ 75 kDa ตามลำดับ สอดคล้องกับวิธี Gel chromatography คือ 215 kDa เอนไซม์บริสุทธิ์ทำงานได้ดีที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 60°C เสถียรที่อุณหภูมิ 40-60 °C และที่พีเอช 6.0-10.0 ค่า  $K_m$  และ  $V_m$  ที่หาได้คือ 13.32 mM และ  $4.93 \times 10^{-3} \text{ mmolL}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ตามลำดับ เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสซึ่งผลิตภายในเซลล์จุลินทรีย์ถูกยับยั้งโดยไอออนของ  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  สาร EDTA และการผลิต Glucose และ Galactose โดยเอนไซม์เมื่อเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นสามารถนำไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมการผลิตอาหารและนมได้

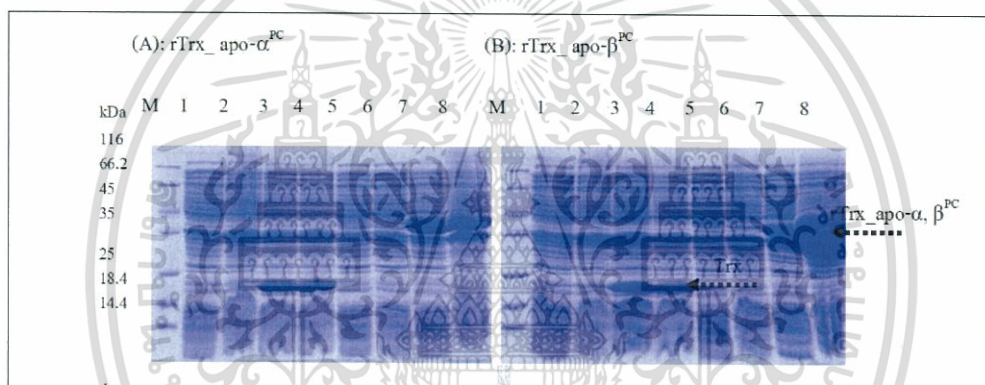


**รูปที่ 2.19** Native PAGE ของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสบริสุทธิ์ที่ได้จากไอโซเลท B1.2 โดยแถวที่ 1 เป็นโปรตีนบอกขนาด แถวที่ 2 และ 5 เป็นเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสแบบหยาบ แถวที่ 3 และ 6 เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสที่ผ่าน DEAE sepharose chromatography และแถวที่ 4 และ 7 เป็นเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสที่ผ่าน Affinity column แถวที่ 1-4 เป็นการย้อมเจลโดยใช้สารละลายย้อมโปรตีน Coomassie Brilliant blue R-250 แถวที่ 5-7 เป็นการย้อมสารเรืองแสง 4-Methylumbelliferyl เบต้า-ดี-กาแลคโตไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย

มารินาเกตุทัต-คาร์นส์ (2555): งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณลักษณะของยีนส์ไฟโคไซยานินของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในระดับโมเลกุลโดยการโคลนยีนส์ไฟโคไซยานินของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaena siamensis* TISTR8012 ซึ่งเริ่มจากการสร้างนิวคลีโอไทด์สายสั้นจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 7 สายพันธุ์ได้แก่ *Ana. variabilis* ATCC 29413, *Arthrospiraplantensis*, *Spirulina maxima*, *Ana. kisseleviana*, *Ana. lemmermannii*, *Ana. flosaquae* และ *Ana. planktonica* จากนั้นทำการโคลนแอลฟาและบีตา-ไฟโคไซยานินยีนส์โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ถ่ายโอนเข้าสู่โคลนนิ่งเวกเตอร์แล้วถ่ายโอนเข้าสู่เวกเตอร์เพื่อการแสดงออกของโปรตีนเมื่อได้โปรตีนแอลฟา-และบีตา-ไฟโคไซยานินจึงทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้โคมบอลด์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีแล้วนำโปรตีนที่บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS scavenging ผลการทดลองที่ได้นำเสนอโดยค่า IC50 เปรียบเทียบกับวิตามินอีสังเคราะห์โดยวิตามินอีสังเคราะห์โปรตีนแอลฟาและโปรตีนบีตา-ไฟโคไซยานินที่ทำบริสุทธิ์มีค่า IC50 0.4, 13.8 และ 18.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 2.20 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน

(A): rTrx\_apo- $\alpha$ PC และ(B): rTrx\_apo- $\beta$ PC ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ด้วยวิธี SDS-PAGE M: Protein standard (Fermentas); 1-2: ส่วนที่ละลาย (soluble fraction) และส่วนที่ไม่ละลาย (insoluble fraction) ของตัวอย่างเซลล์ที่มีเวกเตอร์เปล่า (ไม่มีชิ้นยีนส์) และไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IPTG; 3-4 ตามลำดับ: ส่วนที่ละลายและส่วนที่ไม่ละลายของตัวอย่างเซลล์ที่มีเวกเตอร์เปล่า (ไม่มีชิ้นยีนส์) และถูกกระตุ้นด้วย IPTG ตามลำดับ; 5-6: ส่วนที่ละลายและส่วนที่ไม่ละลายของตัวอย่างเซลล์ที่มีเวกเตอร์ที่มีชิ้นยีนส์และไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IPTG ตามลำดับ; 7-8: ส่วนที่ละลายและส่วนที่ไม่ละลายของตัวอย่างเซลล์ที่มีเวกเตอร์ที่มีชิ้นยีนส์และถูกกระตุ้นด้วย IPTG ตามลำดับ

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

##### 3.1.1 เครื่องมือ

1. เครื่องเขย่าแบบใช้แสง (Illumination orbital shaker)
2. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance) ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น ML 204/01 ชนิด New Classic MF
3. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น JSAC-60
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refridgerated Centrifuge) ยี่ห้อ Thermo-Scientific รุ่น Heraeus-Megafuge 8R
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter)
6. ชุดกรองสารสูญญากาศ (Glass Vacuum Filter Holder)
7. ตู้ดูดควัน (HOOD) ยี่ห้อ FLEXLAB รุ่น FH5-11/FB
8. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet) ยี่ห้อ Astec รุ่น Astecair 3000E
9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Spectrophotometer)
10. Vortex Mixer ยี่ห้อ ThermoFisher Scientific
11. เครื่อง sds-page ยี่ห้อ Bio-Rad
12. เครื่อง Molecular Imager ยี่ห้อ Bio-Rad
13. หม้อต้ม
14. ตู้อบ

##### 3.1.2 อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
2. เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม (Loop)
3. คีมคีบ (Forceps)
4. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish)
5. ช้อนตักสารพลาสติก (Plastic Spatula)
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
7. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
8. ปิเปตทิป (Pipette Tips)
9. ไมโครปิเปต (Micropipettes)
10. หลอดเซนติฟิวพลาสติก (Centrifuge Tube)
11. หลอดไมโครเซนติฟิว (Micro Centrifuge Tube)
12. คิวเวตพลาสติก (Cuvette)
13. คัตเตอร์ (Cutter)
14. กระดาษกรอง (Filter paper)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. หลอดหยดสาร (Dropper)
16. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
17. โฟมลอยน้ำสำหรับต้ม

### 3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่ายสูตรอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP), อาหาร TAP ที่ขาดแคลเซียม (TAP-Ca), อาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N), อาหาร TAP ที่ขาดแมกนีเซียม (TAP-Mg), อาหาร TAP ที่ขาดกำมะถัน (TAP-S), อาหาร TAP ที่ขาดฟอสฟอรัส (TAP-P), อาหาร TAP ที่ขาดเหล็ก (TAP-Fe), อาหาร TAP ที่ขาดแมงกานีส (TAP-Mn), อาหาร TAP ที่ขาดสังกะสี (TAP-Zn) และ อาหาร TAP ที่ขาดทองแดง (TAP-Cu)

1. กรดบอริก ( $H_3BO_3$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
2. กรดแอซิติกหรือกรดน้ำส้ม (Glacial acetic acid) ยี่ห้อ Duksan เกรดวิเคราะห์
3. โคบอลต์คลอไรด์ ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
5. คอปเปอร์คลอไรด์ ( $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
6. คอปเปอร์ซัลเฟต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
7. ซิงค์คลอไรด์ ( $ZnCl_2$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
8. ซิงค์ซัลเฟต ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
9. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
10. ผงวุ้น (Agar)
11. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
12. เฟอรัสซัลเฟต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
13. เฟอริกคลอไรด์ ( $FeCl_3 \cdot 4H_2O$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
14. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
15. แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
16. แมงกานีสคลอไรด์ ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
17. แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
18. Tris (base)
19. แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต  $[(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O]$  ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
20. เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมซอลต์ไดไฮเดรต ( $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
21. โซเดียมฟอสเฟตไดเบสิกไดไฮเดรต ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์
22. โซเดียมฟอสเฟตโมนोเบสิก ( $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรดวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

23. โซเดียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ยี่ห้อ lobachemie เกรตวิเคาระห์

### 3.2.2 สารเคมีสำหรับเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

1. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
2. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ( $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ )
3. แอมโมเนียมเพอซัลเฟต [ $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ]
4. 40% อะคริลาไมด์บิส ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$ )
5. เตตระเมทิลเอทิลีนไดเอมีน (TEMED)
6. ไอโซโพรพานอล ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ )
7. กลีเซอรอล ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ )
8. บรอมฟินอลบลู ( $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ )
9. ปีตาเมอแคบิโตเอทานอล ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ )
10. ไกลซีน ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ )
11. คอแมสซีบลูอาร์ (Coomassie Blue-R 250)
12. เมทานอล ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )

### 3.3 วิธีการเตรียมสารเคมี

3.3.1 สารละลายสต็อกที่ 1 Tris ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ซึ่ง Tris 24.20 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.3.2 สารละลายสต็อกที่ 2  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ซึ่ง  $\text{NH}_4\text{Cl}$  3.75 กรัม,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 กรัม และ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกริมาตร 250 มิลลิลิตร

3.3.3 สารละลายสต็อกที่ 3  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  และ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ซึ่ง  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.88 กรัม และ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.44 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.3.4 สารละลายสต็อกที่ 4  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  และ  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ซึ่ง  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5000 กรัม,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2200 กรัม,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.1140 กรัม,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0500 กรัม,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0500 กรัม,  $\text{CoCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0160 กรัม,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0160 กรัม และ  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0077 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.3.5 สารละลายสต็อกที่ 5  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{NaCl}$  ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ซึ่ง  $\text{NH}_4\text{Cl}$  3.75 กรัม,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 กรัม และ  $\text{NaCl}$  0.1990 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกริมาตร 250 มิลลิลิตร

3.3.6 สารละลายสต็อกที่ 6  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ซึ่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.95 กรัม และ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.37 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.3.7 สารละลายสต็อกที่ 7  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ซึ่ง  $\text{NaCl}$  2.48 กรัม,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 กรัม และ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3.3.8 สารละลายสต็อกที่ 8  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ซึ่ง  $\text{NH}_4\text{Cl}$  3.75 กรัม,  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.58 กรัม และ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3.3.9 สารละลายสต็อกที่ 9  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ซึ่ง  $\text{NH}_4\text{Cl}$  3.75 กรัม,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.83 กรัม และ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3.3.10 สารละลายสต็อกที่ 10  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  และ  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ซึ่ง  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5000 กรัม,  $\text{ZnCl}_2$  0.1042 กรัม,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.1140 กรัม,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0500 กรัม,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0357 กรัม,  $\text{CoCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0160 กรัม,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0109 กรัม และ  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0077 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.3.11 สารละลายสต็อกที่ 11  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  และ  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ซึ่ง  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5000 กรัม,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2200 กรัม,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.1140 กรัม,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0500 กรัม,  $\text{CoCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0160 กรัม,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0160 กรัม และ  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0077 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.3.12 สารละลายสต็อกที่ 12  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  และ  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ซึ่ง  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5000 กรัม,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2200 กรัม,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.1140 กรัม,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0500 กรัม,  $\text{CoCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0160 กรัม,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0160 กรัม และ  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0077 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตร

**3.3.13 สารละลายสต็อกที่ 13**  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  และ  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ซึ่ง  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5000 กรัม,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.1140 กรัม,  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0500 กรัม,  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0500 กรัม,  $\text{CoCl}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0160 กรัม,  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0160 กรัม และ  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0077 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตร

**3.3.14 สารละลายสต็อกที่ 14**  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  และ  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ซึ่ง  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5000 กรัม,  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2200 กรัม,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.1140 กรัม,  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0500 กรัม,  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0500 กรัม,  $\text{CoCl}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0160 กรัม และ  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0077 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตร

### 3.3.15 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP)

ปิเปตสารละลายสต็อกที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (conc.) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

### 3.3.16 สารละลาย Tris-Acetate-Calcium (TAP-Ca)

ปิเปตสารละลายสต็อกที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 5 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (conc.) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

### 3.3.17 สารละลาย Tris-Acetate-Potassium (TAP-K)

ปิเปตสารละลายสต็อกที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (conc.) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

### 3.3.18 สารละลาย Tris-Acetate-Nitrogen (TAP-N)

ปิเปตสารละลายสต็อกที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 7 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (conc.) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

### 3.3.19 สารละลาย Tris-Acetate-Magnesium (TAP-Mg)

ปิเปตสารละลายสต็อกที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 8 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (conc.) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

### 3.3.20 สารละลาย Tris-Acetate-Sulfur (TAP-S)

ปิเปตสารละลายสต็อกที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 9 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (conc.) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

### 3.3.21 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphorus (TAP-P)

ปิเปตสารละลายสต็อกที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (conc.) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

### 3.3.22 สารละลาย Tris-Acetate-Ferric (TAP-Fe)

ปิเปตสารละลายสต็อกที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 11 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (conc.) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

### 3.3.23 สารละลาย Tris-Acetate-Manganese (TAP-Mn)

ปิเปตสารละลายสต็อกที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 12 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (conc.) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

### 3.3.24 สารละลาย Tris-Acetate-Zinc (TAP-Zn)

ปิเปตสารละลายสต็อกที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 13 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (conc.) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

### 3.3.25 สารละลาย Tris-Acetate-Copper (TAP-Cu)

ปิเปตสารละลายสต็อกที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, สารละลายสต็อกที่ 14 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (conc.) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

### 3.3.26 สารละลาย 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

ละลาย Tris 18.17 กรัม ในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร แล้วปรับให้มีค่า pH 8.8 ด้วย HCl 1N จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 100 มิลลิลิตร

### 3.3.27 สารละลาย 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

ละลาย Tris 6.06 กรัม ในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร แล้วปรับให้มีค่า pH 6.8 ด้วย HCl 1N จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 100 มิลลิลิตร

### 3.3.28 สารละลาย 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)

ละลาย Sodium Dodecyl Sulfate 10 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร 100 มิลลิลิตร

### 3.3.29 สารละลาย 10% APS (Ammonium Persulfate)

ละลาย Ammonium Persulfate 200 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

### 3.3.30 การเตรียม Stacking gel และ Separating gel

ตารางที่ 3.1 การเตรียม Stacking gel และ Separating gel ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร

สารเคมี	Stacking gel	Separating gel
40% Acrylamide/Bis	0.5 มิลลิลิตร	3 มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.26 มิลลิลิตร	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	2.5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.18 มิลลิลิตร	4.35 มิลลิลิตร
10% SDS	50 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
10% APS	25 ไมโครลิตร	50 ไมโครลิตร
TEMED	5 ไมโครลิตร	5 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	5 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร

### 3.3.31 สารละลาย 50% Isopropanol

ผสม Isopropanol 20 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

3.3.32 สารละลาย Loading Buffer (Loading Dye) อัตราส่วน 5X ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

1 : 4  
Loading Buffer 10 ไมโครลิตร : น้ำสหาร่ายตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.2 การเตรียมสารละลาย Loading Buffer (Loading Dye) อัตราส่วน 5X ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

สารเคมี	ปริมาณ
10% SDS	500 มิลลิกรัม
20% Glycerol	1 มิลลิลิตร
0.05% Bromophenolblue	2.5 มิลลิกรัม
10 mM B-mercaptoethanol	3.56 ไมโครลิตร
0.2 Tris-HCl pH 6.8	2 มิลลิลิตร

### 3.3.33 สารละลาย Running Buffer อัตราส่วน 1X ปริมาตร 1 ลิตร

1	:	4
Running Buffer 200 มิลลิลิตร	:	น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร

### ตารางที่ 3.3 การเตรียมสารละลาย Running Buffer อัตราส่วน 1X ปริมาตร 1 ลิตร

สารเคมี	ปริมาณ
125 mM Tris	15.13 กรัม
200 mM Glycine	75.07 กรัม
0.5 (w/v) SDS	5 กรัม

### 3.3.34 การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน Ovalbumin

ผสม Ovalbumin 100 ไมโครลิตร และ Loading Dye 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60–70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

### 3.3.35 การเตรียมน้ำยาย้อมสี

แบ่งจากน้ำยาล้างสี 100 มิลลิลิตร ผสมกับ Coomassie Blue-R250 0.1 กรัม รอให้สีละลายแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

### 3.3.36 การเตรียมน้ำยาล้างสี (Destaining solution)

ผสม Methanol 500 มิลลิลิตร กับ Acetic acid 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

## 3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

### 3.4.1 เพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ KS03, *Bumilleriopsis peterseniana*, *Tetraspora* sp.CU2551 และ KS01

#### 1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

##### 1.1 อาหารเหลว

นำอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ปริมาตร 1 ลิตร ใส่ขวด Duran ขนาด 1 ลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

##### 1.2 อาหารวุ้น

นำอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมผงวุ้น (Agar Agar Bacto) ปริมาณ 3 กรัม จากนั้นนำเข้าเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารวุ้นเย็นลงจนถึงอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส นำไปเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish) แล้วรอให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 15 นาที ทอสอบความแข็งตัวโดยการคว่ำจานเลี้ยงเชื้อถ้าอาหารวุ้นไหลลงมาแสดงว่าเตรียมอาหารวุ้นผิด ให้ทำการเตรียมใหม่ (ทำในตู้ Laminar Flow Cabinet เพื่อความปลอดภัย)

### 1.3 อาหารขาดธาตุต่างๆ TAP (-)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดธาตุอาหารทั้ง 11 สูตร ได้แก่ อาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP), อาหาร TAP ที่ขาดแคลเซียม (TAP-Ca), อาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N), อาหาร TAP ที่ขาดแมกนีเซียม (TAP-Mg), อาหาร TAP ที่ขาดกำมะถัน (TAP-S), อาหาร TAP ที่ขาดฟอสฟอรัส (TAP-P), อาหาร TAP ที่ขาดเหล็ก (TAP-Fe) , อาหาร TAP ที่ขาดแมงกานีส (TAP-Mn), อาหาร TAP ที่ขาดสังกะสี (TAP-Zn) และอาหาร TAP ที่ขาดทองแดง (TAP-Cu) ปริมาตร 1 ลิตร ใส่ขวด Duran ขนาด 1 ลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 2. การเพิ่มปริมาณสาหร่าย

นำเอาเข็มเขี่ยเชื้อปลายกลมไปลงไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ให้เป็นสีแดงแล้วรอให้เย็นลง จากนั้นจุ่มน้ำสาหร่ายที่เป็น starter นำมาขีดลงจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Tris-Acetate-Phosphate (TAP) 1 สายพันธุ์ต่อ 1 จาน โดยในการทดลองนี้ได้ดำเนินการเลี้ยงสาหร่าย 4 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 2 จาน เขียนชื่อสายพันธุ์และวันที่ทำการเลี้ยงให้ชัดเจนเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิภายใต้ความเข้มแสง 1,500 LUX อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-5 วัน เมื่อโคโลนีของสาหร่ายปรากฏบนจานเลี้ยงเชื้อตามรอยที่ได้ขีดไปแล้วนั้นให้นำจานเลี้ยงเชื้อไปเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อชะลออายุการเจริญเติบโตของสาหร่าย จากนั้นเทอาหารเหลว Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 8 ขวด นำเข็มเขี่ยเชื้อปลายกลมไปลงไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ให้เป็นสีแดงแล้วรอให้เย็นลง ขูดโคโลนีของสาหร่ายในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 โคโลนี ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวอยู่ (1 ขวดต่อ 1 จาน) ปิดฝาขวดด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขียนชื่อสายพันธุ์และวันที่ทำการเลี้ยงให้ชัดเจน จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องเขย่าแบบใช้แสง (Illumination orbital shaker) ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 LUX อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน (ทำในตู้ Laminar Flow Cabinet เพื่อความปลอดภัย)

เมื่อสาหร่ายเริ่มเพิ่มจำนวนแล้วจะสังเกตเห็นได้ว่าอาหารเหลวเปลี่ยนจากสีใสเป็นสีเขียวให้นำออกจากเครื่องเขย่าแบบใช้แสงเพื่อทำการเปลี่ยนภาชนะในขั้นตอนต่อไปโดยนำจุกสำลีออกแล้วลงไฟที่บริเวณปากขวดรูปชมพู่เพื่อฆ่าเชื้อด้วยความร้อน แล้วจึงเทน้ำสาหร่ายใส่หลอดเซนติฟิวขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วปิดฝาให้สนิท เขียนชื่อสายพันธุ์และวันที่ทำการเลี้ยงให้ชัดเจน ต่อมาให้นำไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที โดยที่สาหร่ายสายพันธุ์เดียวกันต้องนำไปชั่งน้ำหนักเฉลี่ยเพื่อให้เกิดความสมดุลขณะนำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นจะได้ส่วนของเหลว (สีใส) และกลุ่มก้อนสาหร่ายที่ติดอยู่บริเวณด้านล่างของหลอดเซนติฟิวให้เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำการล้างเซลล์สาหร่ายโดยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่เครื่องเซนติฟิวที่ความเร็ว 4,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำ 3 รอบ เมื่อปั่นเหวี่ยงรอบสุดท้ายให้เทส่วนใสออก แล้วนำเซลล์สาหร่ายที่ได้ไปแช่ตู้เย็นที่ความเย็น 4 องศาเซลเซียส (ทำในตู้ Laminar Flow Cabinet เพื่อความปลอดภัย)

### 3. เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 11 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซนติฟิวที่เก็บเซลล์ของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ แล้วเขย่าให้สาหร่ายละลายน้ำ จากนั้นเปิดน้ำสาหร่ายมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว TAP และอาหารเลี้ยงเชื้อ 11 สูตร ได้แก่ อาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP), อาหาร TAP ที่ขาดแคลเซียม (TAP-Ca), อาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N), อาหาร TAP ที่ขาดแมกนีเซียม (TAP-Mg), อาหาร TAP ที่ขาดกำมะถัน (TAP-S), อาหาร TAP ที่ขาดฟอสฟอรัส (TAP-P), อาหาร TAP ที่ขาดเหล็ก (TAP-Fe), อาหาร TAP ที่ขาดแมงกานีส (TAP-Mn), อาหาร TAP ที่ขาดสังกะสี (TAP-Zn) และอาหาร TAP ที่ขาดทองแดง (TAP-Cu) ปิดฝาขวดด้วยจุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขียนชื่อสายพันธุ์และวันที่ทำการเลี้ยงให้ชัดเจน จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องเขย่าแบบใช้แสง (Illumination orbital shaker) ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 LUX อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 วัน (ทำในตู้ Laminar Flow Cabinet เพื่อความปลอดภัย)

### 4. หาค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย

นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจากข้อที่ 3. มาวัดค่าความหนาแน่นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Spectrophotometer) แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณโดยใช้สมการ  $Y=2.2938x$  ซึ่งเป็นสมการการเปลี่ยนค่าความหนาแน่นไปเป็นน้ำหนักแห้งของสาหร่าย แทนค่า Y ด้วยค่าที่ได้จากการวัดการดูดกลืนแสง แล้วแก้สมการเพื่อหา x ซึ่งเป็นน้ำหนักแห้งของสาหร่าย มีหน่วย mg/mL จากนั้นคูณด้วยปริมาตรสาหร่ายทั้งหมดหลังจากเลี้ยงในอาหารขาดธาตุอาหารแต่ละสูตร จะได้น้ำหนักแห้งของสาหร่ายทั้งหมด

#### 3.4.2 การทำลายผนังเซลล์สาหร่ายเพื่อสกัดโปรตีน

นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจากข้อที่ 3. มาทำการเปลี่ยนสถานะโดยนำจุกสำลีออกแล้วลนไฟที่บริเวณปากขวดรูปชมพู่เพื่อฆ่าเชื้อด้วยความร้อน แล้วจึงเทน้ำสาหร่ายใส่หลอดเซนติฟิวขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปิดฝาให้สนิทเขียนชื่อสายพันธุ์และวันที่ทำการเลี้ยงให้ชัดเจน ต่อมาให้นำไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้ส่วนของเหลว (สีใส) และกลุ่มก้อนสาหร่ายที่ติดอยู่บริเวณด้านล่างของหลอดเซนติฟิว ให้เทส่วนใสทิ้งทั้งหมด (ทำในตู้ Laminar Flow Cabinet เพื่อความปลอดภัย)

เติม Loading dye ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทำการเปลี่ยนสถานะอีกครั้งโดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายทั้งหมดมาใส่ในหลอดเซนติฟิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขียนชื่อสายพันธุ์และวันที่ทำการเลี้ยงให้ชัดเจน เติม Glass bead ประมาณ 2 หัวไม้ขีด แล้วทำการต้มเพื่อแตกเซลล์ที่ความร้อน 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาวางบนเครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดเฉพาะสารละลายส่วนใสมาเก็บไว้ในหลอดเซนติฟิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ต่อไป

### 3.4.3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีการ Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE)

#### 1. เตรียมอุปกรณ์

เมื่อประกอบอุปกรณ์ SDS-PAGE แล้ว ให้เติม Separating gel ลงในช่องว่างของ gel sandwich โดยใช้หลอดหยดเติมสารละลายอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้ Separating gel แข็งตัว เมื่อเติมได้ประมาณ  $\frac{3}{4}$  ของส่วนของกระจก ปิดด้านบนบนเจลด้วย 50% Isopropanol ให้เต็ม เพื่อปิดหน้า Separating gel ไม่ให้เกิดออกซิเจนเข้ามาทำปฏิกิริยาได้ จากนั้นรอนจนกระทั่งเจลแข็ง (polymerization) ประมาณ 30-45 นาที

เมื่อเจลแข็งให้เท 50% Isopropanol ออก โดยซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองหรือทิชชู จากนั้นหยอด stacking gel ลงในพื้นที่ที่เหลือแล้วนำ comb มาใส่ระหว่างช่องว่างของกระจก รอนจน stacking gel แข็งตัวประมาณ 20 นาที เมื่อ stacking gel แข็งตัวแล้ว ดึง comb ออกจาก stacking gel แล้วถอดออกจาก dual gel caster นำไปประกอบเข้ากับ gasket ใน chamber โดยหนีบด้วย spring clamp เมื่อประกอบ gel sandwich กับ gasket เรียบร้อยแล้วเท Running buffer ให้ท่วมเจลตามมาตรวัดที่กำหนด

#### 2. การโหลดโปรตีนมาตรฐานและน้ำโปรตีนที่ได้จากการทำลายผนังเซลล์ของสาหร่าย

ใช้ไมโครปิเปตดูด Running buffer ใน well ชั้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง เพื่อเป็นการทำความสะอาด well ต่อมาให้ดำเนินการโหลดโปรตีนมาตรฐานและน้ำโปรตีนที่ได้จากการทำลายผนังเซลล์ของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ตามอัตราส่วนการผสมลงใน well หลังจากโหลดตัวอย่างโปรตีนเรียบร้อยแล้วให้ปิดฝา (safety lid) ให้แน่น จากนั้นต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ power supply ให้ถูกต้อง ตั้งค่าความต่างศักย์ (voltage) 120 V. ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

#### 3. เตรียมเจลก่อนเข้าโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ

เมื่อโปรตีนมาตรฐานและน้ำโปรตีนเคลื่อนตัวลงมาจากจุดแผ่นเจลแล้วให้ปิดเครื่อง power supply แล้วนำแผ่นเจลออกมา ใช้ spacer เป็นตัวดันกระจกออกจากกัน ตัดส่วน stacking gel ออกและค่อยๆ ลอก separating gel ออกมาควรถู้น้ำกลั่นหล่อลื่นตลอดเวลาเพื่อป้องกันเจลขาด นำเจลที่ได้ใส่ลงในกล่องพลาสติกเหนียวย้อมสีให้ท่วมเจลทั้งไว้ข้ามคืน แล้วจึงเทน้ำย้อมสีเก็บใส่ขวดสีชาเช่นเดิม จากนั้นล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เพื่อให้สีส่วนเกินออกและดำเนินการล้างเจลด้วย detaining solution เเทให้ท่วมเจลเช่นกัน แล้วเขย่าเบาๆ ทำซ้ำจนเริ่มเห็นแบนด์โปรตีนติดสีขึ้นมาและพื้นหลังเจลดิตสีอ่อนน้อยที่สุด (แผ่นเจลจะใส)

#### 4. วิเคราะห์โดยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ

นำเจลของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ไปเข้าโปรแกรมวิเคราะห์ภาพโดยเครื่อง Molecular Imager เพื่อตรวจสอบแบนด์โปรตีนที่แตกต่างจากสูตรอาหารอื่นๆ โดยปรับสีให้เกิดความคมชัดเพื่อให้ง่ายต่อการสังเกต ต่อมาดำเนินการวัดค่าความเข้มข้นของแบนด์นั้นๆ ตั้งค่าแบนด์ Control ให้มีค่าเป็น 1 แล้วเปรียบเทียบกับความเข้มข้นกับแบนด์ที่สนใจ บันทึกผลและเก็บไฟล์ไว้ใช้ต่อไป

#### 3.4.4 การวิเคราะห์แบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหารด้วยเครื่อง LC- MS/MS

ดำเนินการส่งตรวจที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยกลางด้านชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มีวิธีการดังต่อไปนี้

##### 1. เตรียมแบนด์โปรตีน

1.1 เมื่อได้แบนด์โปรตีนที่สนใจ ให้ดำเนินการตัดเจลเพื่อทำการส่งตรวจโดยวางเจลไว้บนแผ่นพลาสติกสีขาว ล้างคัตเตอร์และปากคีบด้วยน้ำยาล้างจานให้สะอาดและเช็ดด้วย Ethanol 95% เพื่อกำจัดคราบไขมันตกค้าง แล้วใช้คัตเตอร์กรีดบนแบนด์โปรตีนซ้ำๆ ใช้ปากคีบคีบแบนด์โปรตีนที่ตัดแล้วใส่หลอดไมโครเซนติพิว

1.2 เติม Ammonium bicarbonate 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วเขย่า 10 นาที หลังจากนั้นให้เทของเหลวทิ้งทั้งหมด

1.3 เติม Ammonium bicarbonate 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ Acetonitrile LC-MS CHROMASOLV ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วเขย่า 10 นาที หลังจากนั้นให้เทของเหลวทิ้งทั้งหมด

1.4 เติม Acetonitrile LC-MS CHROMASOLV ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วเขย่า 10 นาที หลังจากนั้นให้เทของเหลวทิ้งทั้งหมด

1.5 ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 และ 3 อีกครั้ง

1.6 เติม DL-Dithiothreitol 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน Ammonium bicarbonate 20 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 45 นาที หลังจากนั้นให้เทของเหลวทิ้งทั้งหมด

1.7 เติม Iodoacetamide 55 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน Ammonium bicarbonate 20 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มมืดที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นให้เทของเหลวทิ้งทั้งหมด

1.8 เติม Ammonium bicarbonate 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ Acetonitrile LC-MS CHROMASOLV ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วเขย่า 10 นาที หลังจากนั้นให้เทของเหลวทิ้งทั้งหมด

1.9 เติม Acetonitrile LC-MS CHROMASOLV ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วเขย่า 10 นาที หลังจากนั้นให้เทของเหลวทิ้งทั้งหมด แล้วทำให้ชิ้นเจลแห้งเป็นเวลา 5 นาที

1.10 เติมสารละลาย Enzyme Trypsin ที่เพิ่งเตรียมใหม่ท่วมเจล แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที แล้วเทสารละลายส่วนเกินทิ้ง

1.11 เติม Ammonium bicarbonate 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร แล้วบ่มข้ามคืน (มากกว่า 16 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.12 เติม Ammonium bicarbonate 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วเขย่า 10 นาที เก็บของเหลวทั้งหมดใส่หลอดไมโครเซนติฟิว

1.13 เติม 1% Formic acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใน 50% Ammonium bicarbonate แล้วเขย่าอย่างรวดเร็ว 10 นาที เก็บของเหลวทั้งหมดใส่หลอดไมโครเซนติฟิว

1.14 เติม 1% Formic acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใน 85% Ammonium bicarbonate แล้วเขย่าอย่างรวดเร็ว 10 นาที เก็บของเหลวทั้งหมดใส่หลอดไมโครเซนติฟิว

1.15 ทำให้ตัวอย่างแห้งโดยใช้เครื่องระเหยตัวทำละลาย

1.16 ทำให้ตกตะกอนด้วย 0.1% Formic acid ปริมาตร 40 ไมโครลิตรใน 2% Acetonitrile LC-MS CHROMASOLV

1.17 บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

## 2. วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

ตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์ด้วย Nano-liquid chromatography โดยเครื่อง Mass spectrometer และ ESI Nano-sprayer โดยอาศัยหลักการตรวจวัดมวลต่อประจุ mass to charge ratio ;  $m/z$  ที่เป็นค่าจำเพาะของตัวอย่างโปรตีนที่ถูกทำให้เกิดประจุโดยเครื่องไหลอัดโน้มิตจะทำการไหลตสารตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงใน EASY-column ที่มีความยาว 10 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 75 ไมโครเมตร ขนาดอนุภาค 3 ไมโครเมตร ใช้อัตราการไหล 300 นอร์มอลลิตร/นาที โดยมี Phase A คือ น้ำและ 0.1% Formic acid Phase B คือ acetonitrile และ 0.1% Formic acid ใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน สารตัวอย่างจะแตกตัวเป็นประจุในส่วนผลิตไอออน ประจุที่เกิดขึ้นจะผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวลเพื่อแปลงเป็นสัญญาณที่ส่วนตรวจวัดไอออนแล้วส่งสัญญาณไปยังส่วนประมวลผล ซึ่งถูกควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ที่เชื่อมโยงกับฐานข้อมูลโปรตีนในโปรแกรม Mascot (modified from Aebersold R, 2003)

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

โครงการพิเศษนี้ทำการศึกษาการผลิตโปรตีนของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหารแยกโปรตีนด้วยวิธีการ Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE) เมื่อได้แบนด์โปรตีนที่สนใจจึงดำเนินการวัดความเข้มข้นของแบนด์โปรตีนนั้นๆ และตรวจสอบชนิดของโปรตีนด้วยวิธี Liquid Chromatograph Mass Spectrometer (LC-MS) เพื่อเปรียบเทียบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ใด ในสูตรอาหารใด ที่ให้ชนิดของโปรตีนที่แตกต่าง เพื่อให้ทราบถึงผลของการขาดธาตุอาหารในสภาวะที่กำหนด ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ ดังนี้

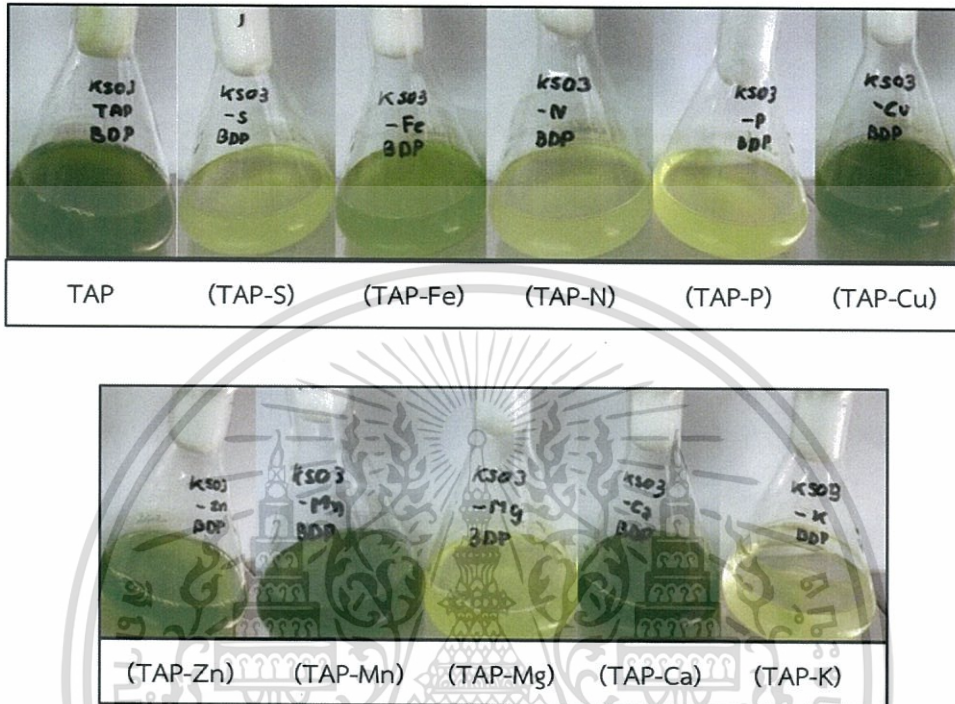
#### 4.1 ผลการวิจัย

##### 4.1.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตทางกายภาพของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03, *Bumilleriopsis peterseniana*, KS01 และ *Tetrasporasp.CU2551*

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 11 สูตร ได้แก่ Tris-Acetate-Phosphate (TAP), TAP ที่ขาดแคลเซียม (TAP-Ca), TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N), TAP ที่ขาดแมกนีเซียม (TAP-Mg), TAP ที่ขาดกำมะถัน (TAP-S), TAP ที่ขาดฟอสฟอรัส (TAP-P), TAP ที่ขาดเหล็ก (TAP-Fe) , TAP ที่ขาดแมงกานีส (TAP-Mn), TAP ที่ขาดสังกะสี (TAP-Zn), TAP ที่ขาดทองแดง (TAP-Cu) โดยใช้เครื่องเขย่าแบบใช้แสง (Illumination orbital shaker) ภายใต้อุณหภูมิ 1,500 LUX อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 วัน ซึ่งสีของสาหร่าย KS03, *Bumilleriopsis peterseniana*, KS01 และ *Tetraspora sp. CU2551* ได้เปลี่ยนไปตามสภาวะอาหารสูตรทั้ง 11 สูตร ดังแสดงในรูป 4.1-4.4 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะอาหารสมบูรณ์ Tris-Acetate-Phosphate (TAP) กับสภาวะขาดธาตุอาหารของสาหร่ายแต่ละชนิด โดยแบ่งตามความเข้มข้นของสีของแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนี้

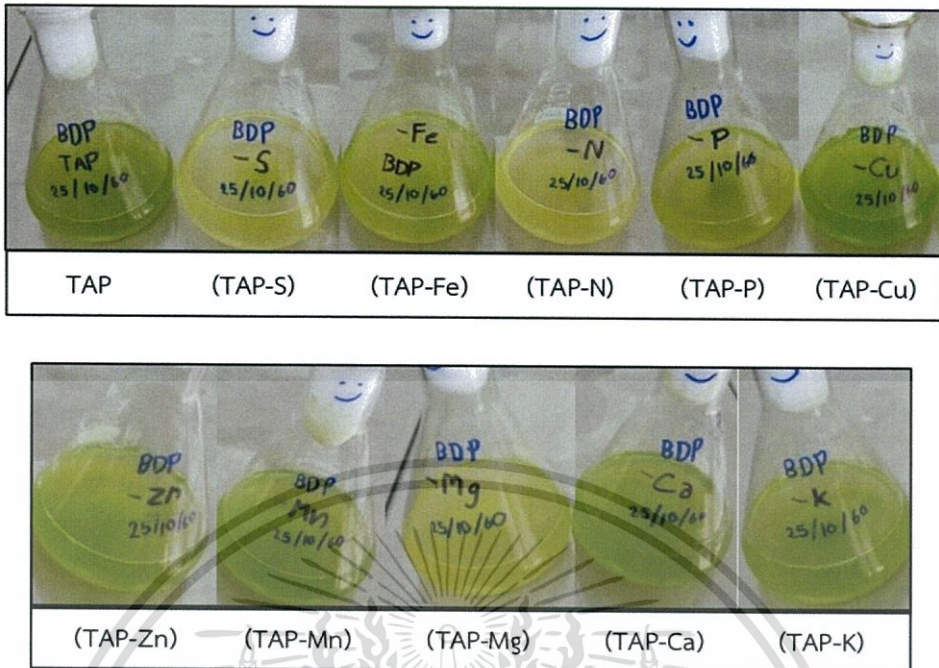
#### สาหร่ายสายพันธุ์ KS03



รูปที่ 4.1 สีของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03

- สาหร่ายในสภาวะขาดธาตุอาหารที่มีสีอ่อนลงค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับในสภาวะปกติ ได้แก่ TAP-S, TAP-N, TAP-P, TAP-Mg และ TAP-K
- สาหร่ายในสภาวะขาดธาตุอาหารที่มีสีอ่อนลงปานกลางเมื่อเทียบกับในสภาวะปกติ ได้แก่ TAP-Fe
- สาหร่ายในสภาวะขาดธาตุอาหารที่มีสีใกล้เคียงกับในสภาวะปกติ ได้แก่ TAP-Cu, TAP-Ca, TAP-Mn และ TAP-Zn

สาหร่ายสายพันธุ์ *Bumilleriopsis peterseniana*

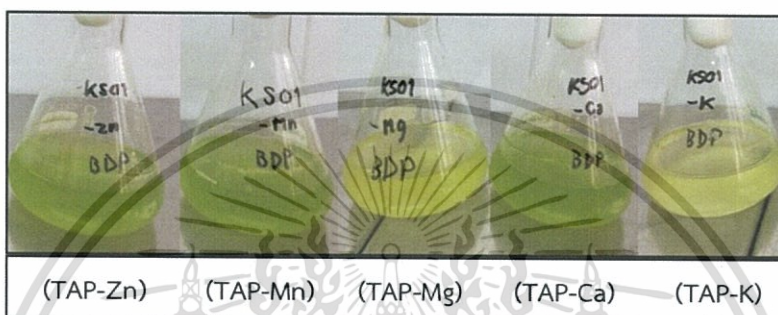
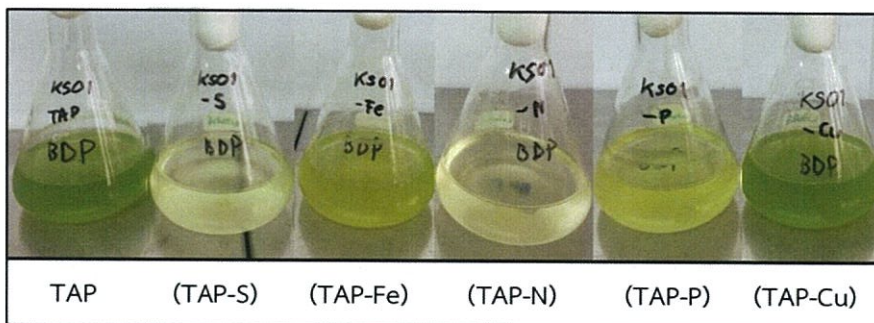


รูปที่ 4.2 สีของสาหร่ายสายพันธุ์ *Bumilleriopsis peterseniana*

- สาหร่ายในสภาวะขาดธาตุอาหารที่มีสีอ่อนลงปานกลางเมื่อเทียบกับในสภาวะปกติ ได้แก่ TAP-S, TAP-N และ TAP-Mg
- สาหร่ายในสภาวะขาดธาตุอาหารที่มีสีใกล้เคียงกับในสภาวะปกติ ได้แก่ TAP-Fe, TAP-P, TAP-Cu, TAP-Zn, TAP-Mn, TAP-Ca, และ TAP-K

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### สาหร่ายสายพันธุ์ KS01

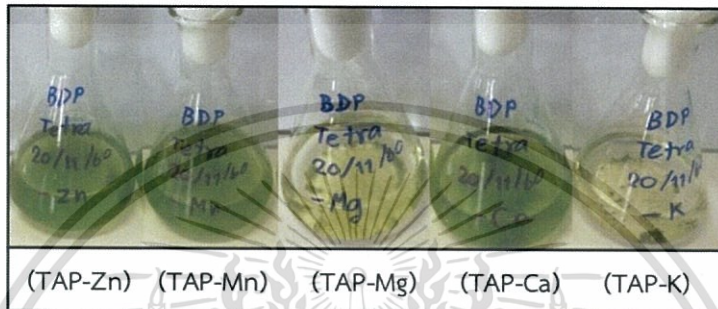
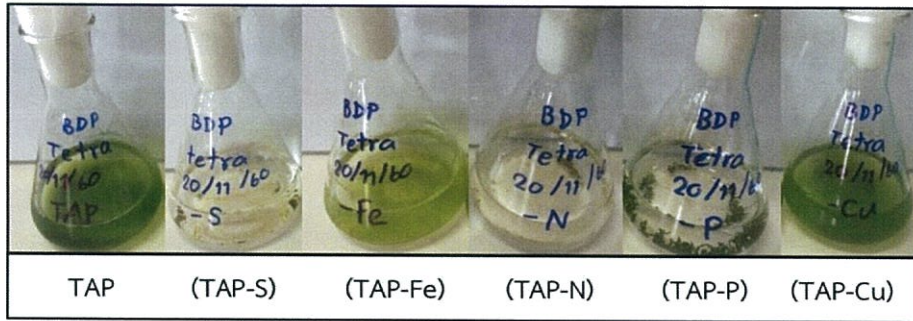


รูปที่ 4.3 สีของสาหร่ายสายพันธุ์ KS01

- สาหร่ายในสภาวะขาดธาตุอาหารที่มีสีอ่อนลงค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับในสภาวะปกติ ได้แก่ TAP-S, TAP-N, TAP-P, TAP-Mg และ TAP-K
- สาหร่ายในสภาวะขาดธาตุอาหารที่มีสีอ่อนลงปานกลางเมื่อเทียบกับในสภาวะปกติ ได้แก่ TAP-Fe, TAP-Zn, TAP-Mn และ TAP-Ca
- สาหร่ายในสภาวะขาดธาตุอาหารที่มีสีใกล้เคียงกับในสภาวะปกติ ได้แก่ TAP-Cu

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetrasporasp.CU2551*



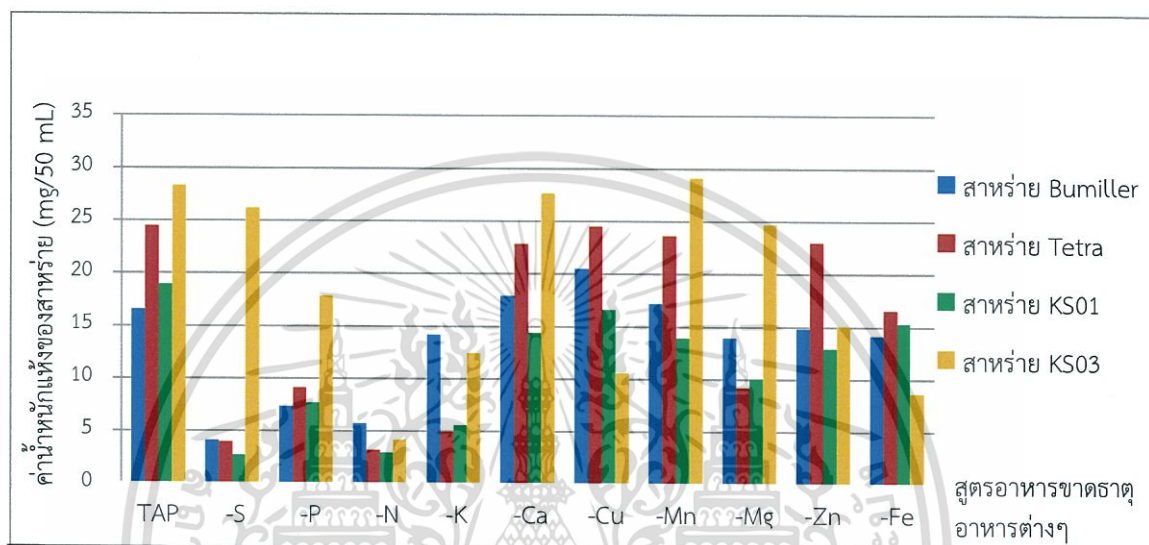
รูปที่ 4.4 สีของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetrasporasp.CU2551*

- สาหร่ายในสภาวะขาดธาตุอาหารที่มีสีอ่อนลงค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับในสภาวะปกติ ได้แก่ TAP-S, TAP-N, TAP-P, TAP-Mg และ TAP-K
- สาหร่ายในสภาวะขาดธาตุอาหารที่มีสีอ่อนลงปานกลางเมื่อเทียบกับในสภาวะปกติ ได้แก่ TAP-Fe
- สาหร่ายในสภาวะขาดธาตุอาหารที่มีสีใกล้เคียงกับในสภาวะปกติ ได้แก่ TAP-Cu, TAP-Zn, TAP-Mn และ TAP-Ca

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.2 ผลการศึกษาค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03, *Bumilleriopsis peterseniana*, KS01 และ *Tetrasporasp.CU2551*

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 11 สูตร ได้ทำการวัดค่าความหนาแน่นของเซลล์ ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยนำค่าความหนาแน่นมาหารด้วย 2.2938 ซึ่ง ( $Y=2.2938x$ ) เป็นสมการการเปลี่ยนค่าความหนาแน่นของเซลล์เป็นน้ำหนักแห้งของสาหร่าย) แล้วคูณด้วยปริมาตรของสาหร่ายชนิดนั้นๆ โดยค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายจะเปลี่ยนไปตามสภาวะอาหารสูตรทั้ง 11 สูตร แสดงดังในแผนภูมิที่ 4.1



แผนภูมิที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ในอาหารขาดธาตุอาหารต่างๆ

## 1. สายพันธุ์ KS03

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03

สูตรอาหาร	สาหร่าย KS03		
	ปริมาตรของ สาหร่าย (ml)	ค่า OD ของสาหร่าย	น้ำหนักเซลล์แห้งของ สาหร่าย (mg/50 ml)
TAP	49	1.324	28.2832
-S	44	1.3619	26.1242
-P	39	1.0489	17.8338
-N	41	0.2316	4.1397
-K	45	0.632	12.3986
-Ca	47	1.3468	27.596
-Cu	44	0.5502	10.554
-Mn	50	1.3348	29.0958
-Mg	43	1.3155	24.6606
-Zn	43	0.8042	15.0757
-Fe	49	0.4055	8.6623

จากตารางที่ 4.1 เมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายในสูตรอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) กับสูตรอาหารขาดธาตุอาหาร 11 สูตร พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายเป็นดังนี้

- น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายที่มีค่ามากกว่า TAP ได้แก่ TAP-Mn
- น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายที่มีค่าน้อยกว่า TAP ได้แก่ ทุกสูตรอาหารที่เหลือ

## 2. สายพันธุ์ *Bumilleriopsis peterseniana*

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสายพันธุ์ *Bumilleriopsis peterseniana*

สูตรอาหาร	สาหร่าย <i>Bumilleriopsis peterseniana</i>		
	ปริมาณของ สาหร่าย (ml)	ค่า OD ของสาหร่าย	น้ำหนักเซลล์แห้งของ สาหร่าย (mg/50 ml)
TAP	44	0.9465	18.1559
-S	46	0.2052	4.1151
-P	45	0.3727	7.3117
-N	45	0.2905	5.6991
-K	46	0.7071	14.1802
-Ca	49	0.8369	17.8778
-Cu	48	0.978	20.4656
-Mn	43	0.9147	17.1471
-Mg	41	0.7804	13.9491
-Zn	40	0.8489	14.8034
-Fe	40	0.8107	14.1372

จากตารางที่ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายในสูตรอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) กับสูตรอาหารขาดธาตุอาหาร 11 สูตร พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายเป็นดังนี้

- น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายที่มีค่ามากกว่า TAP ได้แก่ TAP-Cu
- น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายที่มีค่าน้อยกว่า TAP ได้แก่ ทุกสูตรอาหารที่เหลือ

### 3. สายพันธุ์ KS01

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสายพันธุ์ KS01

สูตรอาหาร	สาหร่าย KS01		
	ปริมาตรของ สาหร่าย (ml)	ค่า OD ของ สาหร่าย	น้ำหนักเซลล์แห้งของ สาหร่าย (mg/50 ml)
TAP	45	0.9631	18.8942
-S	46	0.134	2.6872
-P	50	0.3516	7.6641
-N	44	0.1532	2.9387
-K	47	0.2728	5.5897
-Ca	48	0.6856	14.3468
-Cu	50	0.7592	16.5489
-Mn	44	0.724	13.8879
-Mg	49	0.4681	9.9995
-Zn	44	0.6731	12.9115
-Fe	46	0.7631	15.3033

จากตารางที่ 4.3 เมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายในสูตรอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) กับสูตรอาหารขาดธาตุอาหาร 11 สูตร พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายเป็นดังนี้

- น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายที่มีค่าน้อยกว่า TAP ได้แก่ ทุกสูตรอาหาร

4. สายพันธุ์ *Tetrasporasp.CU2551*ตารางที่ 4.4 แสดงค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetrasporasp.CU2551*

สูตรอาหาร	สาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551		
	ปริมาตรของ สาหร่าย (ml)	ค่า OD ของสาหร่าย	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย (mg/50 ml)
TAP	47	1.1927	24.438
-S	47	0.1936	3.9669
-P	44	0.4747	9.1058
-N	44	0.1666	3.1957
-K	44	0.2571	4.9317
-Ca	46	1.1389	22.8396
-Cu	46	1.2215	24.496
-Mn	48	1.1286	23.6171
-Mg	50	0.4209	9.1747
-Zn	49	1.0757	22.979
-Fe	46	0.8238	16.5205

จากตารางที่ 4.4 เมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายในสูตรอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) กับสูตรอาหารขาดธาตุอาหาร 11 สูตร พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายเป็นดังนี้

- น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายที่มีค่ามากกว่า TAP ได้แก่ TAP-Cu
- น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายที่มีค่าน้อยกว่า TAP ได้แก่ TAP ทุกสูตรอาหารที่เหลือ

เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะอาหารสมบูรณ์ Tris-Acetate-Phosphate (TAP) กับสภาวะขาดธาตุอาหารของสาหร่ายแต่ละชนิด โดยแบ่งตามธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งอย่างมีนัยสำคัญ ดังนี้

**ธาตุอาหารหลัก (Primary Macronutrients)** จะมีการเปลี่ยนแปลงที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน เพราะว่าธาตุอาหารหลักเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์พืช ไม่สามารถขาดได้

1. TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N)

สาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ มีน้ำหนักแห้งลดลงค่อนข้างมาก เนื่องจากธาตุไนโตรเจนมีหน้าที่เกี่ยวกับเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ การขาดไนโตรเจนในสาหร่าย ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและอาร์เอ็นเอ (RNA) ลดลง

2. TAP ที่ขาดฟอสฟอรัส (TAP-P)

สาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ มีน้ำหนักแห้งลดลงค่อนข้างมาก เนื่องจากธาตุฟอสฟอรัสเป็นส่วนสำคัญในระบบ พลังงานของพืชเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ ATP การขาดธาตุฟอสฟอรัสจะแสดงอาการตายเฉพาะส่วน

3. TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K)

สาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ มีน้ำหนักแห้งลดลงค่อนข้างมาก เนื่องจากธาตุโพแทสเซียมอาจทำให้เกิดการตายเฉพาะส่วน

**ธาตุอาหารรอง (Secondary Macronutrients)** จะมีการเปลี่ยนแปลงที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน ยกเว้นในสภาวะที่ขาดธาตุแคลเซียม

1. TAP ที่ขาดกำมะถัน (TAP-S)

สาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ มีน้ำหนักแห้งลดลงค่อนข้างมาก เนื่องจากธาตุกำมะถันเป็นส่วนประกอบ โครงสร้างของกรดอะมิโนและไวตามีนหลายชนิด และจำเป็นในการกระบวนการสร้างคลอโรพลาสต์

2. TAP ที่ขาดแมกนีเซียม (TAP-Mg)

สาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ มีน้ำหนักแห้งลดลงปานกลาง เนื่องจากธาตุแมกนีเซียมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของคลอโรฟิลล์และมีความสำคัญในกระบวนการสร้าง ATP โดยทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (enzyme cofactor)

3. TAP ที่ขาดแคลเซียม (TAP-Ca)

สาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ มีน้ำหนักแห้งลดลงเล็กน้อย เนื่องจากธาตุแคลเซียมทำหน้าที่ในการควบคุมการเคลื่อนย้ายของสารอาหารต่างๆ และยังทำหน้าที่เกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์ การขาดธาตุแคลเซียม มีผลทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต

ธาตุอาหารเสริม (Micronutrients) จะมีการเปลี่ยนแปลงที่สามารถสังเกตได้ไม่ชัดเจนเช่นกัน เพราะว่าธาตุอาหารเสริมเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์พืชเพียงเล็กน้อย หากขาดธาตุอาหารเหล่านี้เซลล์พืชจะยังดำรงชีวิตอยู่ได้ ดังนั้นสีของสาหร่ายจะไม่แตกต่างจากสาหร่ายในสภาวะอาหารสมบูรณ์

1. TAP ที่ขาดเหล็ก (TAP-Fe)

สาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ มีน้ำหนักแห้งลดลงปานกลาง เนื่องจากธาตุเหล็กมีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสงของเซลล์พืชและทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์อีกด้วยการขาดธาตุเหล็กอาจทำให้เกิดการตายเฉพาะส่วน

2. TAP ที่ขาดแมงกานีส (TAP-Mn)

สาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ มีน้ำหนักแห้งลดลงเล็กน้อย เนื่องจากธาตุแมงกานีสเป็นส่วนที่มีความสำคัญในการสร้างคลอโรพลาสต์ การขาดแมงกานีสทำให้พืชมีสีผิดเพี้ยน เช่น การมีจุดต่างบนใบ

3. TAP ที่ขาดสังกะสี (TAP-Zn)

สาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ มีน้ำหนักแห้งลดลงเล็กน้อย เนื่องจากธาตุสังกะสีเป็นส่วนสำคัญสำหรับเอนไซม์หลายชนิดและเป็นส่วนสำคัญในกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม (DNA transcription) การขาดธาตุสังกะสี โดยทั่วไปแล้วจะทำให้การเติบโตของใบชะงัก

4. TAP ที่ขาดทองแดง (TAP-Cu)

สาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ มีน้ำหนักแห้งลดลงเล็กน้อย เนื่องจากธาตุทองแดงเป็นส่วนที่มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง การขาดทองแดงทำให้พืชแสดงอาการเหลือง (chlorosis)

**หมายเหตุ** การศึกษาทางกายภาพนี้เป็นเพียงการคาดการณ์และเปรียบเทียบเท่านั้น เนื่องจากสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะเจาะ ซึ่งจะต้องทำการศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมต่อไป

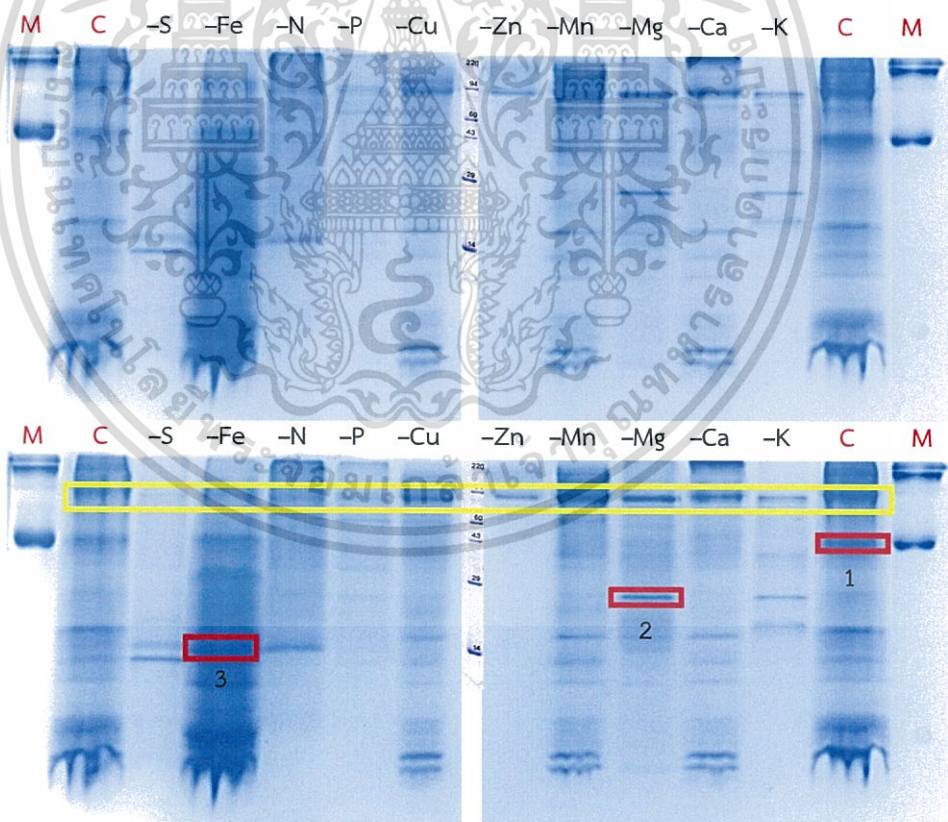
#### 4.1.3 ค่าความเข้มข้นแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหารของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์

เมื่อได้สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารขาดธาตุอาหารแต่ละสูตรแล้ว นำสาหร่ายมาแตกเซลล์เพื่อสกัดโปรตีนจากสาหร่าย ซึ่งใช้วิธีการให้ความร้อนสลับกับการใช้แรงเฉือน แล้วเก็บส่วนใสมาวิเคราะห์แยกโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ด้วยวิธี SDS-PAGE ใน 12% acrylamide คักดีไฟฟ้า 120 โวลต์. เป็นเวลาประมาณ 60 นาที แล้วทำการย้อมสีแผ่นเจล จากนั้นนำเข้าเครื่องถ่ายภาพเจล เพื่อหาความเข้มข้นแบนด์โปรตีน โดยใช้แบนด์ที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมเป็นแบนด์อ้างอิง ให้คิดเป็น 100% และ lane M (Marker) เป็นโปรตีนมาตรฐานเพื่อใช้ในการบอกน้ำหนักโมเลกุลและติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่สนใจ ได้ผลการแยก ดังนี้

##### 1. สาหร่ายสายพันธุ์ KS03

เลือกแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในกรอบสี่เหลี่ยมสีแดง โดยพิจารณาถึงการแสดงออกที่แตกต่างจาก lane C (TAP) โดยอาจมีความเข้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงที่เห็นได้ชัดดังนี้

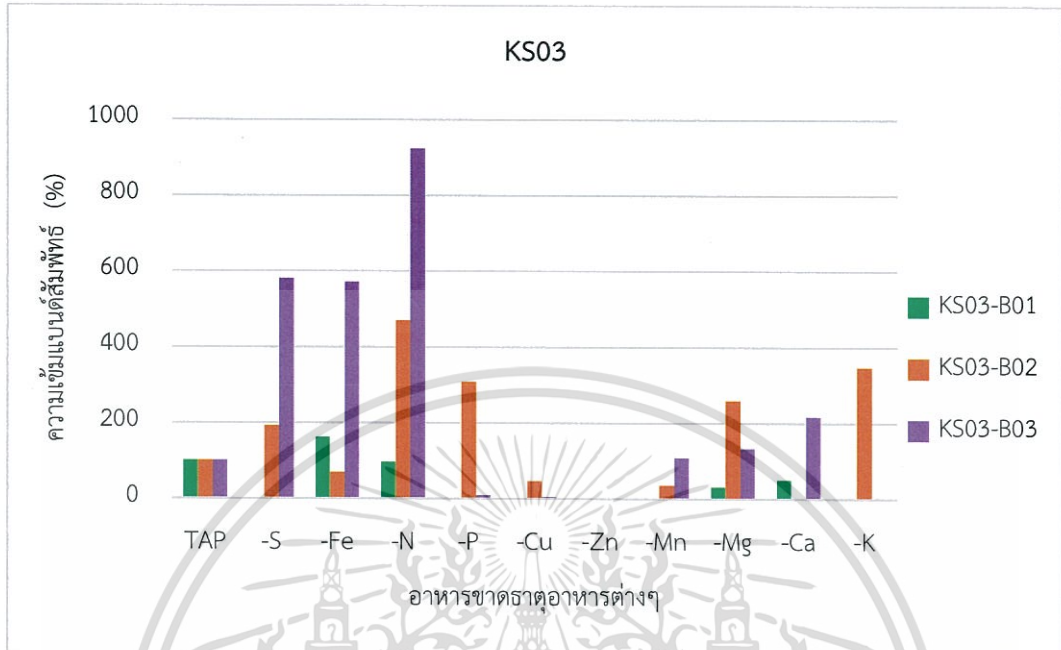
- KS03-B01 อยู่ใน lane TAP-C
- KS03-B02 อยู่ใน lane TAP-Mg
- KS03-B03 อยู่ใน lane TAP-Fe



รูปที่ 4.5 ผลการแยกโปรตีนที่แสดงออกในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ ของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีแต่ละแบนด์มาเปรียบเทียบความเข้มแต่ละสูตรอาหาร ได้ผลดังแสดงในแผนภูมิที่ 1



แผนภูมิที่ 4.2 เปรียบเทียบค่าความเข้มแบนด์สัมพันธ์ของแบนด์โปรตีน KS03-B01, KS03-B02, KS03-B03

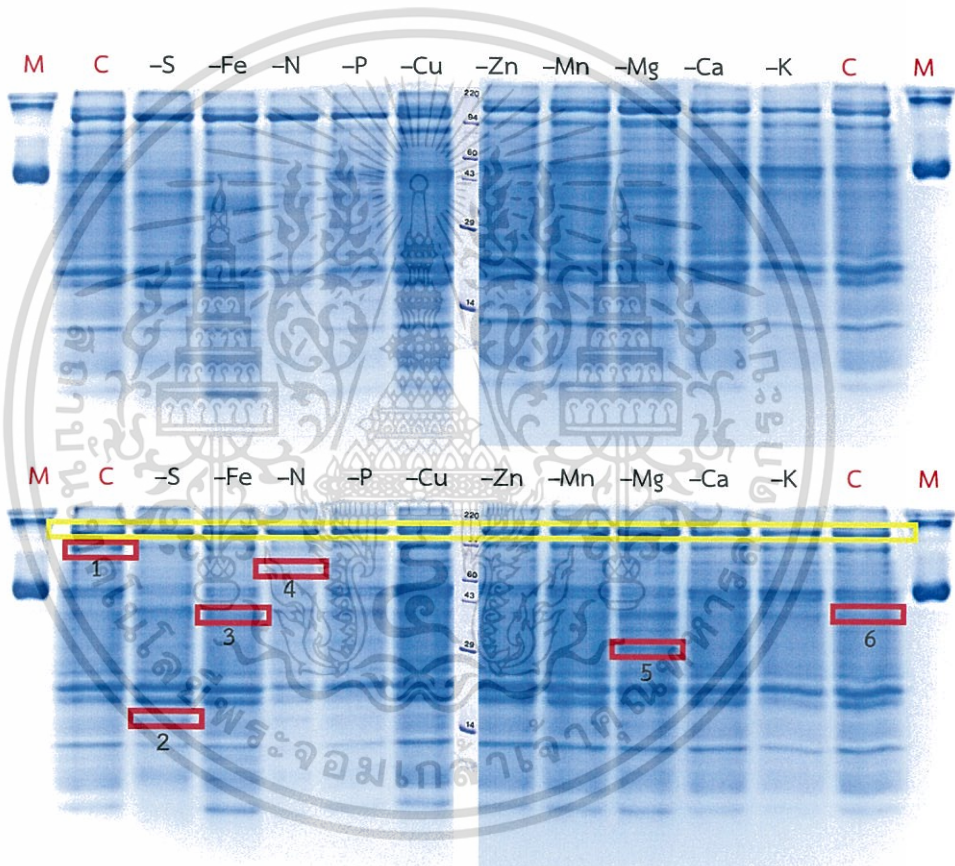
- แบนด์ที่ 1  
KS03-B01 อยู่ใน TAP-C เมื่อดูจากกราฟ TAP-Fe มีความเข้มของโปรตีนมากที่สุด
- แบนด์ที่ 2  
KS03-B02 อยู่ใน TAP-Mg เมื่อดูจากกราฟ TAP-N มีความเข้มของโปรตีนมากที่สุด
- แบนด์ที่ 3  
KS03-B03 อยู่ใน TAP-Fe เมื่อดูจากกราฟ TAP-N มีความเข้มของโปรตีนมากที่สุด

## 2. สาหร่ายสายพันธุ์ *Bumilleriopsis peterseniana*

เลือกแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในกรอบสี่เหลี่ยมสีแดง โดยพิจารณาถึงการแสดงออกที่แตกต่างจาก lane C (TAP) โดยอาจมีความเข้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงที่เห็นได้ชัดดังนี้

Bu-B01 อยู่ใน lane TAP-C

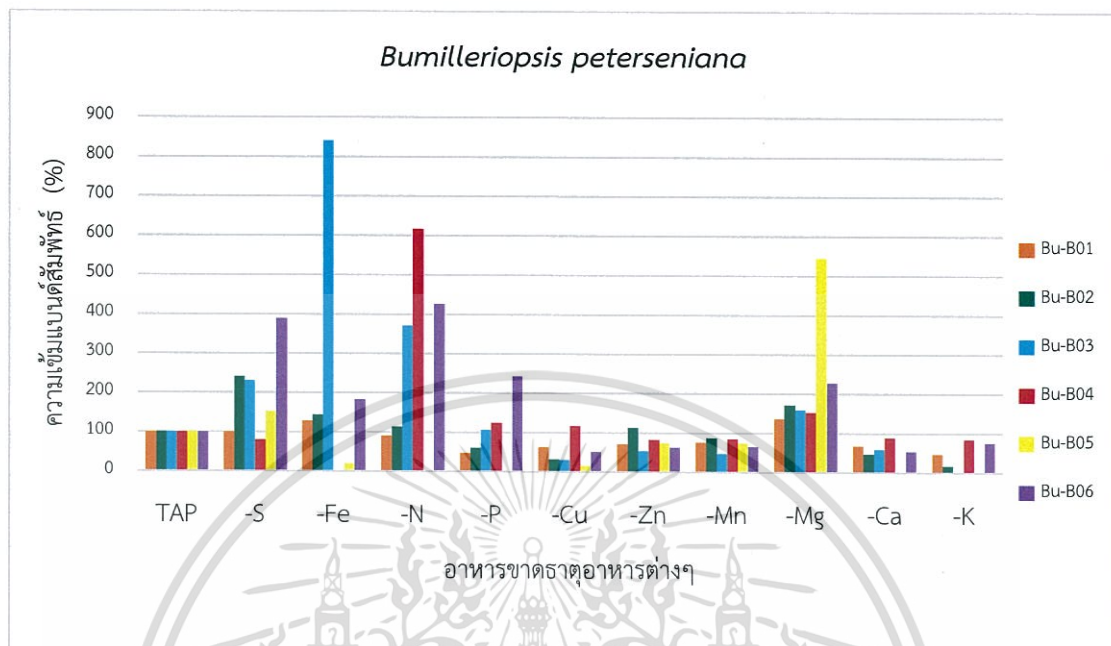
- Bu-B02 อยู่ใน lane TAP-S
- Bu-B03 อยู่ใน lane TAP-Fe
- Bu-B04 อยู่ใน lane TAP-N
- Bu-B05 อยู่ใน lane TAP-Mg
- Bu-B06 อยู่ใน lane TAP-C



รูปที่ 4.6 ผลการแยกโปรตีนที่แสดงออกในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ ของสาหร่ายสายพันธุ์ *Bumilleriopsis peterseniana*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีแต่ละแบนด์มาเปรียบเทียบความเข้มข้นแต่ละสูตรอาหาร ได้ผลดังแสดงในแผนภูมิที่ 2



แผนภูมิที่ 4.3 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นแบนด์สัมพันธ์ของแบนด์โปรตีนBu-B01, Bu-B02, Bu-B03, Bu-B04, Bu-B05, Bu-B06

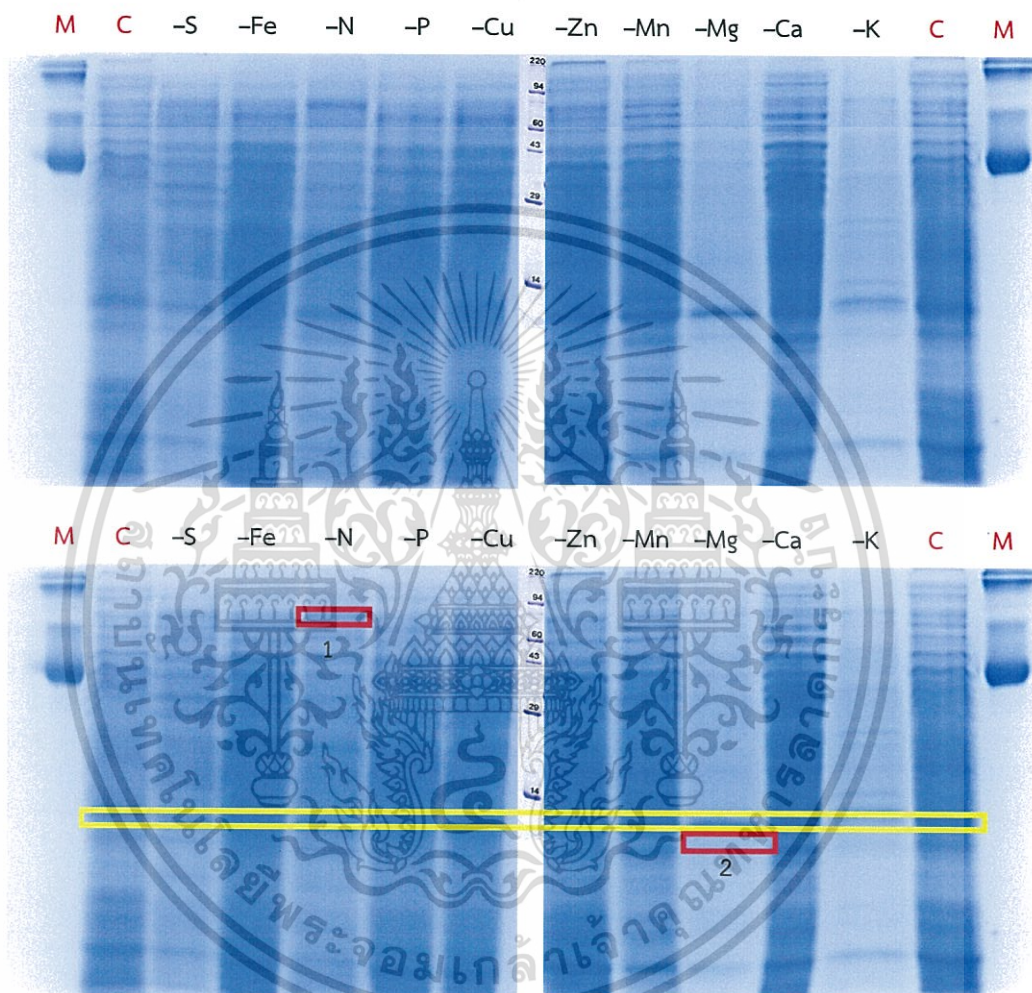
- แบนด์ที่ 1  
Bu-B01 อยู่ใน TAP-C เมื่อดูจากกราฟ TAP-Mg มีความเข้มข้นของโปรตีนมากที่สุด
- แบนด์ที่ 2  
Bu-B02 อยู่ใน TAP-S และมีความเข้มข้นของโปรตีนมากที่สุดเมื่อดูจากกราฟ
- แบนด์ที่ 3  
Bu-B03 อยู่ใน TAP-Fe และมีความเข้มข้นของโปรตีนมากที่สุดเมื่อดูจากกราฟ
- แบนด์ที่ 4  
Bu-B04 อยู่ใน TAP-N และมีความเข้มข้นของโปรตีนมากที่สุดเมื่อดูจากกราฟ
- แบนด์ที่ 5  
Bu-B05 อยู่ใน TAP-Mn และมีความเข้มข้นของโปรตีนมากที่สุดเมื่อดูจากกราฟ
- แบนด์ที่ 6  
Bu-B06 อยู่ใน TAP-C เมื่อดูจากกราฟ TAP-N มีความเข้มข้นของโปรตีนมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. สาหร่ายสายพันธุ์ KS01

เลือกแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในกรอบสี่เหลี่ยมสีแดง โดยพิจารณาถึงการแสดงออกที่แตกต่างจาก lane C (TAP) โดยอาจมีความเข้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงที่เห็นได้ชัดดังนี้

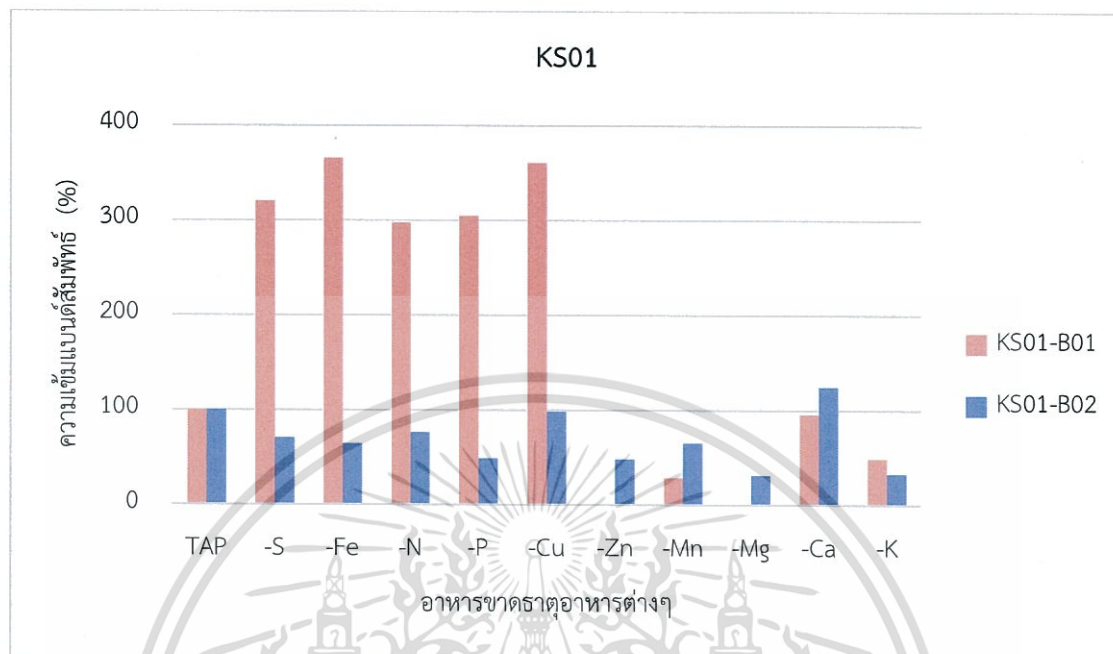
- KS01-B01 อยู่ใน lane TAP-N
- KS01-B02 อยู่ใน lane TAP-Mg



รูปที่ 4.7 ผลการแยกโปรตีนที่แสดงออกในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ ของสาหร่ายสายพันธุ์ KS01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีแต่ละแบนด์มาเปรียบเทียบความเข้มแต่ละสูตรอาหาร ได้ผลดังแสดงในแผนภูมิที่ 3



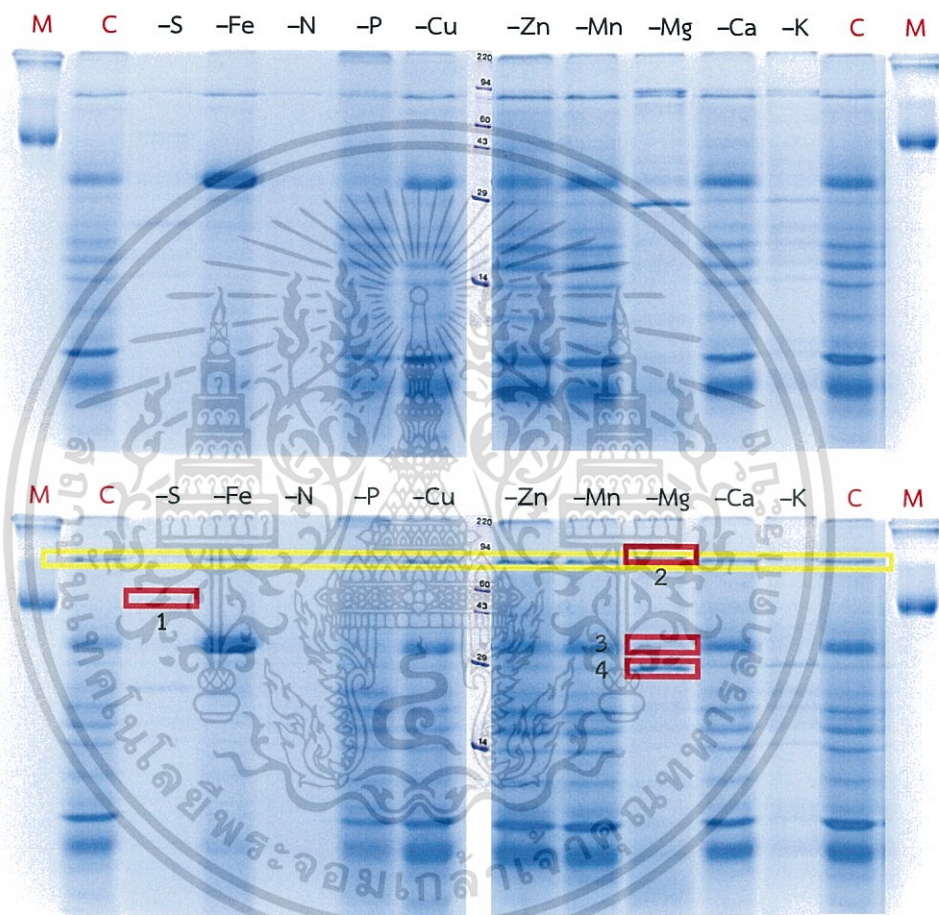
แผนภูมิที่ 4.4 เปรียบเทียบค่าความเข้มแบนด์สัมพันธ์ของแบนด์โปรตีน KS01-B01, KS01-B02

- แบนด์ที่ 1  
KS01-B01 อยู่ใน TAP-N เมื่อดูจากกราฟ TAP-Fe มีความเข้มของโปรตีนมากที่สุด
- แบนด์ที่ 2  
KS01-B02 อยู่ใน TAP-Mg เมื่อดูจากกราฟ TAP-Ca มีความเข้มของโปรตีนมากที่สุด

#### 4. สายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551

เลือกแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในกรอบสี่เหลี่ยมสีแดง โดยพิจารณาถึงการแสดงออกที่แตกต่างจาก lane C (TAP) โดยอาจมีความเข้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงที่เห็นได้ชัดดังนี้

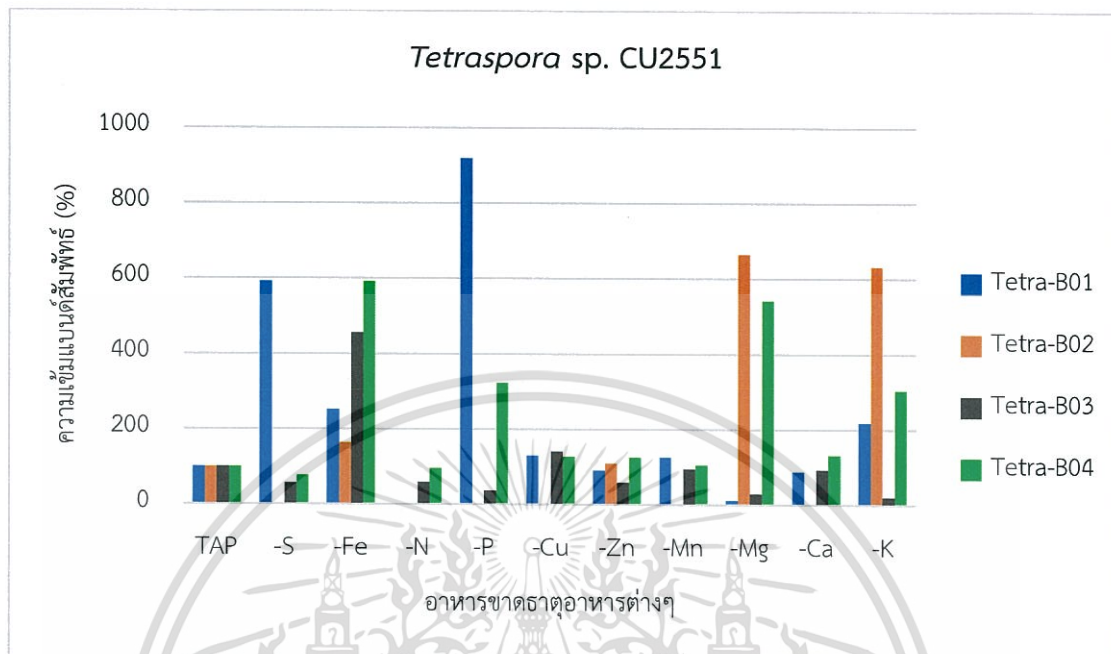
- Tetra-B01 อยู่ใน lane TAP-S
- Tetra-B02 อยู่ใน lane TAP-Mg
- Tetra-B03 อยู่ใน lane TAP-Mg
- Tetra-B04 อยู่ใน lane TAP-Mg



รูปที่ 4.8 ผลการแยกโปรตีนที่แสดงออกในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ ของสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีแต่ละแบนด์มาเปรียบเทียบความเข้มข้นต่อสารอาหาร ได้ผลดังแสดงในแผนภูมิที่ 4



แผนภูมิที่ 4.5 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นแบนด์สัมพันธ์ของแบนด์โปรตีน Tetra-B01, Tetra-B02, Tetra-B03, Tetra-B04

- แบนด์ที่ 1  
Tetra-B01 อยู่ใน TAP-S เมื่อดูจากกราฟ TAP-P มีความเข้มข้นของโปรตีนมากที่สุด
- แบนด์ที่ 2  
Tetra-B02 อยู่ใน TAP-Mg และมีความเข้มข้นของโปรตีนมากที่สุดเมื่อดูจากกราฟ
- แบนด์ที่ 3  
Tetra-B03 อยู่ใน TAP-Mg เมื่อดูจากกราฟ TAP-Fe มีความเข้มข้นของโปรตีนมากที่สุด
- แบนด์ที่ 4  
Tetra-B04 อยู่ใน TAP-Mg เมื่อดูจากกราฟ TAP-Fe มีความเข้มข้นของโปรตีนมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 ผลการส่งตรวจจากการนำแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหารของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03 จำนวน 3 แบนด์ ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยกลางด้านชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

- KS03-B01 คือ เอนไซม์ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco)

แบนด์ KS03-B01 แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหารสมบูรณ์ Tris-Acetate-Phosphate (TAP) มีค่าความเข้มแบนด์ 100% แต่ในสภาวะ TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K) แบนด์ของเอนไซม์ Rubisco มีค่าความเข้ม 0% จึงเป็นที่น่าสนใจว่าทำไมในสภาวะ TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K) จึงไม่ปรากฏเอนไซม์ Rubisco ซึ่งอธิบายได้ดังนี้

เอนไซม์ Rubisco เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (carboxylation) ในเซลล์พืช ซึ่งผลผลิตของปฏิกิริยานี้จะทำให้ได้น้ำตาลเป็นอาหารสะสมของพืช โดยที่ธาตุโพแทสเซียมเป็นธาตุที่ช่วยสร้างอาหารให้กับเซลล์พืช ซึ่งจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ เช่น การสังเคราะห์แสง การหายใจ การสังเคราะห์แป้ง และโปรตีน ส่งเสริมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลจากใบไปสู่ผล ซึ่งเมื่อเซลล์ของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03 ไม่ได้รับธาตุโพแทสเซียม จึงไม่มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างอาหารสะสมภายในเซลล์ ไม่เกิดการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ส่งผลให้ไม่มีเอนไซม์ Rubisco

จากผลรายงานที่ได้ทำการส่งตรวจจะพบรายชื่อโปรตีนต่างๆ ที่ค้นพบในแบนด์ที่ได้ส่งตรวจทางเราจึงสรุปได้ว่าชนิดของโปรตีนที่เป็นไปได้ที่สุดในแบนด์ KS03-B1 คือ เอนไซม์ Rubisco

- KS03-B02 คือ UNKNOWN

แบนด์ KS03-B02 แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหารแมกนีเซียม (TAP-Mg) มีความเข้มแบนด์ 259% เมื่อเทียบกับในสภาวะขาดธาตุอาหารสมบูรณ์ (TAP) 100% ซึ่งยังไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ จึงตั้งชื่อว่า UNKNOWN

- KS03-B03 คือ UNKNOWN

แบนด์ KS03-B03 แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหารเหล็ก (TAP-Fe) มีความเข้มแบนด์ 571% เมื่อเทียบกับในสภาวะขาดธาตุอาหารสมบูรณ์ (TAP) 100% ซึ่งตรวจพบโปรตีนหลายชนิด เนื่องจากอาจตัดแบนด์ที่มีขนาดกว้างเกินไป ทำให้โปรตีนปะปนกันเป็นผลให้ยังไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ จึงตั้งชื่อว่า UNKNOWN

## 4.2 วิจารณ์ผล

4.2.1 ในการวิเคราะห์แบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหารของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03 จำนวน 3 แบนด์ ด้วยเทคนิค Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยกลางด้านชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น แบนด์ KS03-B02 และแบนด์ KS03-B03 ไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ เนื่องจากในระหว่างที่ตัดเจลโปรตีนเพื่อนำไปส่งตรวจ มีการตัดแบนด์กว้างเกินไป ส่งผลให้มีโปรตีนหลายตัวปะปนกัน จึงไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้

4.2.2 ในการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 11 สูตรได้เกิดการปนเปื้อนของสิ่งมีชีวิตอื่นลงไปสาหร่าย ทำให้เกิดตะกอนสะสมในระหว่างเพาะเลี้ยง จึงไม่สามารถเปรียบเทียบธาตุอาหารที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง รวมถึงค่าความเข้มข้นของแบนด์โปรตีนได้ เนื่องจากอาจมีโปรตีนของเซลล์สิ่งมีชีวิตอื่นสะสม เป็นผลให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน

4.2.3 ในการทดลองค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03, *Bumilleriopsis peterseniana*, KS01 และ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 11 สูตร พบว่าในสายพันธุ์ KS03 ค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน TAP ที่ขาดแมงกานีส (TAP-Mn) มีค่ามากกว่าค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน Tris-Acetate-Phosphate (TAP) และในสายพันธุ์ *Bumilleriopsis peterseniana* ค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน TAP ที่ขาดทองแดง (TAP-Cu) มีค่ามากกว่าค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายใน Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ซึ่งไม่เป็นไปตามทฤษฎีสาหร่ายที่ได้ควรมีปริมาณน้อยลงเนื่องจากขาดธาตุอาหารเหล่านี้ แต่เนื่องจากธาตุแมงกานีสและธาตุทองแดงเป็นธาตุอาหารรอง (Secondary Micronutrients) จึงจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์พืชเพียงเล็กน้อย หากขาดธาตุอาหารเหล่านี้เซลล์พืชจะยังคงดำรงชีวิตอยู่ได้ตั้งนั้นสีของสาหร่ายจึงไม่แตกต่างจากสาหร่ายในสภาวะอาหารสมบูรณ์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

1. เทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) แบบ discontinuous gel สามารถแยกขนาดของโปรตีนจากสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ โดยไม่มีจำนวนประจุมาเกี่ยวข้อง เนื่องจากระยะทางที่เคลื่อนที่ของสายพอลิเพปไทด์บนเจลมีความสัมพันธ์โดยตรงกับขนาดของพอลิเพปไทด์ เมื่อมั่นใจว่าน้ำหนักของแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหารนั้นแตกต่างจากโปรตีนอื่นๆ อย่างชัดเจน จะสามารถแยกโปรตีนบนเจลเพื่อนำไปศึกษาองค์ประกอบได้

2. จากการวิจัยเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลและดูความบริสุทธิ์ของโปรตีนจากสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ KS03, *Bumilleriopsis peterseniana*, KS01 และ *Tetraspora* sp. CU2551 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารทั้ง 11 สูตร ได้แก่ Tris-Acetate-Phosphate (TAP), TAP ที่ขาดแคลเซียม (TAP-Ca), TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N), TAP ที่ขาดแมกนีเซียม (TAP-Mg), TAP ที่ขาดกำมะถัน (TAP-S), TAP ที่ขาดฟอสฟอรัส (TAP-P), TAP ที่ขาดเหล็ก (TAP-Fe), TAP ที่ขาดแมงกานีส (TAP-Mn), TAP ที่ขาดสังกะสี (TAP-Zn) และ TAP ที่ขาดทองแดง (TAP-Cu) เมื่อนำไปทำลายผนังเซลล์ด้วยวิธีเชิงกล คือ การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีและการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลและดูความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) แบบ discontinuous gel ผลการวิจัยพบว่าแต่ละสายพันธุ์มีแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหาร ดังนี้

- สาหร่ายสายพันธุ์ KS03 มีจำนวน 3 แบนด์
- สาหร่ายสายพันธุ์ *Bumilleriopsis peterseniana* มีจำนวน 6 แบนด์
- สาหร่ายสายพันธุ์ KS01 มีจำนวน 2 แบนด์
- สาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 มีจำนวน 4 แบนด์

3. จากการนำแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหาร ของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03 จำนวน 3 แบนด์ ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยกลางด้านชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

KS03 B01 คือ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco)

KS03 B02 คือ UNKNOWN

KS03 B03 คือ UNKNOWN

ในขณะที่สาหร่ายสายพันธุ์ *Bumilleriopsis peterseniana*, KS01 และ *Tetraspora* sp. CU2551 ยังไม่สามารถระบุชื่อได้ในการศึกษาในครั้งนี้

4. ค่าความเข้มข้นของแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหาร เมื่อเปรียบเทียบสภาวะอาหารสมบูรณ์ของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03 ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้
- KS03-B01 ค่าความเข้มข้นของแบนด์ เท่ากับ 100% ใน Tris-Acetate-Phosphate (TAP)
- KS03-B02 ค่าความเข้มข้นของแบนด์ เท่ากับ 259% ใน TAP ที่ขาดแมกนีเซียม (TAP-Mg)
- KS03-B03 ค่าความเข้มข้นของแบนด์ เท่ากับ 571% ใน TAP ที่ขาดเหล็ก (TAP-Fe)

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

### 5.2.1 ปัญหาและอุปสรรค

1. ระยะเวลาและงบประมาณในการทำโครงการมีจำกัด
2. ควรมีการหาปริมาณโปรตีนในแต่ละแบนด์ที่เหมาะสม เพื่อให้ง่ายต่อการหาแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะต่างๆ รวมไปถึงง่ายต่อการคำนวณหาความเข้มข้นด้วยโปรแกรม Image lab 3.0

### 5.2.2 แนวทางการพัฒนา

1. สามารถใช้สาหร่ายสายพันธุ์อื่นในการวิเคราะห์ เพื่อความหลากหลายมากยิ่งขึ้น
2. สามารถทำการศึกษาและนำแบนด์โปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อเพื่อหาชนิดโปรตีนที่เกิดขึ้นในสาหร่ายเหล่านี้ได้



## เอกสารอ้างอิง

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. **สาหร่าย**. [Online]. (เข้าถึงเมื่อ 20 พฤศจิกายน 2560). Available: <http://th.wikipedia.org/wiki/สาหร่าย>

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. **สาหร่ายสีเขียว**. [Online]. (เข้าถึงเมื่อ 20 พฤศจิกายน 2560). Available: <http://th.wikipedia.org/wiki/สาหร่ายสีเขียว>

ภาสกร สกุลศิลปกร. **สาหร่ายสีเขียว**. [Online]. (เข้าถึงเมื่อ 20 พฤศจิกายน 2560). Available: <https://www.eduzones.com/knowledge-2-5-28773.html>

หน่วยบริการวิชาการ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย**. [Online]. (เข้าถึงเมื่อ 20 พฤศจิกายน 2560). Available: [http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/index.php?action=main&id=9&os\\_c\\_id=4&Category=](http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/index.php?action=main&id=9&os_c_id=4&Category=)

สุมาลี ดุลยอนุกิจ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. **แร่ธาตุอาหาร**. [Online]. (เข้าถึงเมื่อ 20 พฤศจิกายน 2560). Available: <https://web.ku.ac.th/nk40/nk/data/11/fact4.htm>

นางสาวเกศทิพย์ อิศรางกูร ณ อยุธยา. **การสกัดโปรตีนคอลลาเจนจากหอยเชอร์รี่ เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของโปรตีนคอลลาเจนที่ได้จากวัว**. ม.6 โรงเรียนพิบูลวิทยาลัย. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ปรียา พวงสำลีหวังสมนึก, อภิญญา พรหมวิโย, พิณีจ หวังสมนึก, สนั่น จอกลอย และอรันตพัฒน์นัย. **การสกัดและการวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนจากเมล็ดแก่นตะวัน**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Bio-Rad Laboratories, Inc. **Gel Doc™ EZ Gel Documentation System**. [Online]. (เข้าถึงเมื่อ 21 พฤศจิกายน 2560). Available: [http://www.bio-rad.com/en-th/product/gel-doc-ez-gel-documentation-system?WT.knsh\\_id=9dc2df8a-cea4-4b18-9150-74cd01098dc5&WT.mc\\_id=aw-pqd-AP-geldocez\\_brand\\_gold&WT.srch=1](http://www.bio-rad.com/en-th/product/gel-doc-ez-gel-documentation-system?WT.knsh_id=9dc2df8a-cea4-4b18-9150-74cd01098dc5&WT.mc_id=aw-pqd-AP-geldocez_brand_gold&WT.srch=1)

กิติพงศ์ อัครกุล, รังสิยวีร์: **เทคโนโลยีใหม่สำหรับอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ Ultraviolet Radiation: An Emerging Technology for Juice Industry**

ณิชน ธรรมรักษ์. **อุปกรณ์และเครื่องมือพื้นฐานทางจุลชีววิทยา**. [Online]. (เข้าถึงเมื่อ 22 พฤศจิกายน 2560). Available: <http://www.e-managev1.mju.ac.th/acticleDetail.aspx?qid=337&>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รองศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์. (2555). การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย (Cloning and Expression of Phycocyanin from Cyanobacteria). สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนาร

รศ.ดร. พรพิมล สุริยภัทร. การสังเคราะห์ด้วยแสง. เอกสารประกอบการสอน รายวิชา สรีรวิทยาของพืช (1202 320).

ศิริพร (ภัทรกิจกำจร) ปรงวิทยา, วชิรญา กลิ่นทอง, มนทิรา จะนนท์, ธนกร ปรงวิทยา. (2554). เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์เพื่องานวิจัยทางการแพทย์. สารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. ธาตุอาหารสำหรับพืช. [Online]. (เข้าถึงเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2560). Available: <http://th.wikipedia.org/wiki/ธาตุอาหารสำหรับพืช>

อ.พจน์ อินทรนนท์. ธาตุอาหารสำคัญเพื่อการเจริญเติบโตสำหรับพืช. [Online]. (เข้าถึงเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2560). Available: <https://www.srscorporation.net/content/5388/ธาตุอาหารสำคัญเพื่อการเจริญเติบโตสำหรับพืช>

Anon BigBoss . จุลชีววิทยา. (2556). [Online]. (เข้าถึงเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2560). Available: <http://anonmicrobiology.blogspot.com/2013/07/>

นุชนาถ แซ่มซ้อย. สาหร่ายขนาดเล็ก:การเพาะเลี้ยงและการนำไปใช้ (Microalgae:Cultivation and Utilization). (2557). วารสาร มจร. วิชาการ (ฉบับที่ 34), (สืบค้นเมื่อ 25 พฤศจิกายน 2560), จาก <file:///C:/Users/kmitl/Downloads/เลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อใช้ประโยชน์.pdf>

# ภาคผนวก

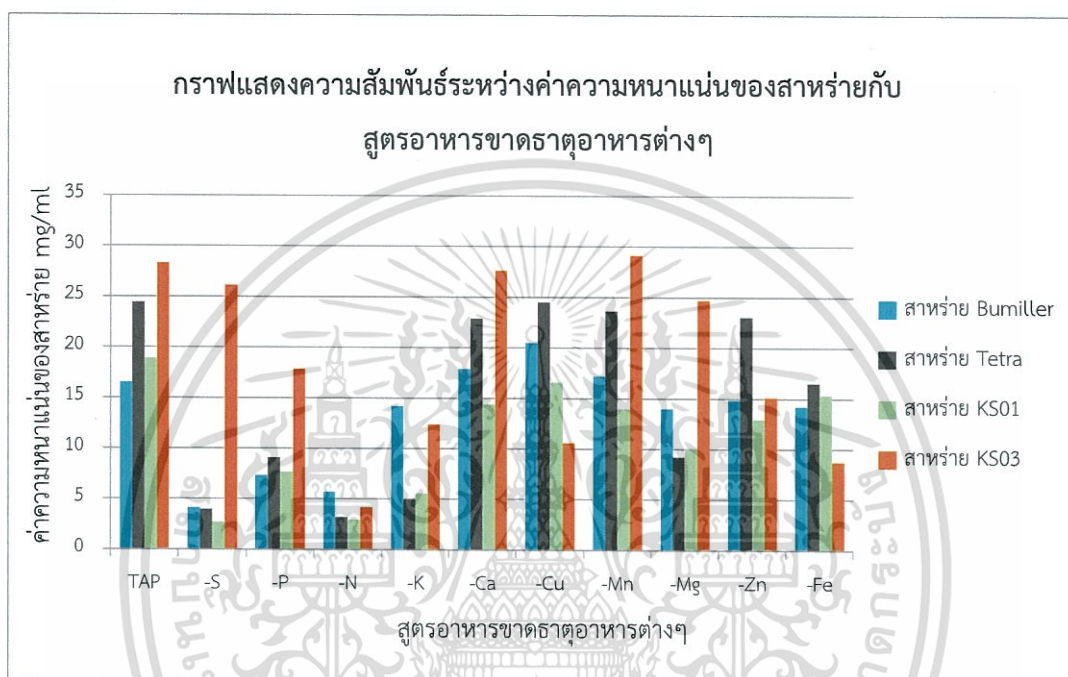


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### 1ก. วิธีการคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่าย

นำสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร จะได้ค่าความหนาแน่นของสาหร่าย จากนั้นนำค่าความหนาแน่นของสาหร่ายที่ได้ไปแทนในสมการเพื่อหาค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่าย



แผนภูมิที่ ก.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนาแน่นของสาหร่ายกับสูตรอาหารขาดธาตุอาหารต่างๆ

### วิธีการคำนวณ

จากสมการ  $y = 2.2938x$

โดยที่  $y$  คือ ค่าความหนาแน่นของสาหร่ายที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

$X$  คือ ค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่าย (mg/mL)

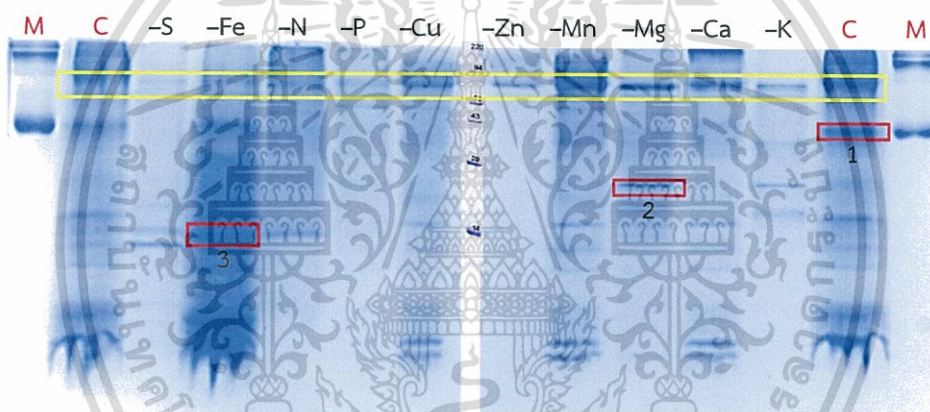
$$\begin{aligned}
 \text{ค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่าย} &= \frac{\text{ค่าความหนาแน่นของสาหร่าย}}{2.2938} \times \text{ปริมาตรของสาหร่ายทั้งหมด} \\
 &= \frac{0.9465}{2.2938} \times 44 \\
 &= 18.1559 \text{ mg/mL}
 \end{aligned}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2ก. วิธีการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของแบนด์โปรตีนที่ได้จากการเลี้ยงในสูตรอาหาร TAP (-) ต่างๆ

นำเจลที่ได้จากการรัน SDS-PAGE มาสแกนความเข้มของแบนด์โปรตีนด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล Molecular Imager Gel Doc<sup>TM</sup> EZ เพื่อหาความเข้มแบนด์โปรตีน โดยใช้แบนด์ที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยม (ดังรูป ก.1) เป็นแบนด์อ้างอิง (คิดเป็น 100%) และ lane M (Marker) เป็นโปรตีนมาตรฐานเพื่อใช้ในการบอกน้ำหนักโมเลกุลและติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่สนใจ นำแบนด์ความเข้มของโปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหาร ในกรอบสีแดงที่ 1, 2 และ 3 ไปเปรียบเทียบกับแบนด์ reference เพื่อเปรียบเทียบความเข้มของแบนด์ว่ามีค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลงจากแบนด์ reference ก็เปอร์เซ็นต์

เมื่อทราบแล้วว่าแบนด์ความเข้มของโปรตีนที่แสดงออกได้ดีมีค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลงจากแบนด์ reference เป็นกี่เปอร์เซ็นต์ นำค่าที่ได้ไปคำนวณเปรียบเทียบกับสหายในสูตรอาหาร TAP (control) เพื่อดูความแตกต่างของโปรตีนในสภาวะการขาดธาตุอาหารมีผลต่อโปรตีนในสหายหรือไม่ อย่างไร



รูปที่ ก.1 ผลการแยกโปรตีนที่แสดงออกในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ ของสหายสายพันธุ์ KS03

## วิธีการคำนวณ

แบนด์ความเข้มข้นของโปรตีนในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ เมื่อเทียบกับอาหารปกติ (control)

ยกตัวอย่าง	แถบโปรตีนแบนที่ 1					
เจลที่ 1	lane C (control)	มีค่า	1.02	คิดเป็น	100%	
	ตั้งนั้น	lane -S	มีค่า	$\frac{0}{1.02} \times 100$	=	0%
		lane -Fe	มีค่า	$\frac{1.65}{1.02} \times 100$	=	161.8%
		lane -N	มีค่า	$\frac{0.98}{1.02} \times 100$	=	96.1%
		lane -P	มีค่า	$\frac{0}{1.02} \times 100$	=	0%
		lane -Cu	มีค่า	$\frac{0}{1.02} \times 100$	=	0%
		เจลที่ 2	lane C (control)	มีค่า	0.76	คิดเป็น
ตั้งนั้น	lane -Zn		มีค่า	$\frac{0}{0.76} \times 100$	=	0%
	lane -Mn		มีค่า	$\frac{0}{0.76} \times 100$	=	0%
	lane -Mg		มีค่า	$\frac{0.24}{0.76} \times 100$	=	31.6%
	lane -Ca		มีค่า	$\frac{0.38}{0.76} \times 100$	=	50%
	lane -K		มีค่า	$\frac{0}{0.76} \times 100$	=	0%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3ก. ผลการส่งตรวจจากการนำแบนด์โปรตีนที่แสดงออกได้ดีในสภาวะขาดธาตุอาหารของสาหร่ายสายพันธุ์ KS03 จำนวน 3 แบนด์ ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยกลางด้านชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

- แบนด์ที่ 1 KS03-B01

11/22/2017

Peptide Summary Report (KS03-B01)

## MASCOT Search Results

User	tonkia
Email	tonkia_ks@hotmail.com
Search title	KS03-B01
MS data file	KS03-B01_F7_01_2017.mgf
Database	NCBIprot 2017024 (135744157 sequences; 49805139192 residues)
Taxonomy	Viridiplantae (Green Plants) (5469903 sequences)
Timestamp	22 Nov 2017 at 02:44:42 GMT
Protein hits	<p><b>Q07922.1</b> RecName: Full=Rubulose biphosphate carboxylase large chain; Short=RubisCO large subunit; Flags: Precursor ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (chloroplast) [Oocystis solitaria]</p> <p><b>YP_009103468.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (chloroplast) [Ettlia pseudoalveolaris]</p> <p><b>YP_002409259.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (chloroplast) [Monosigma sp. OK2-1]</p> <p><b>ACQ09581.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (chloroplast) [Chlamydomonas nivalis]</p> <p><b>AI020060.1</b> ATP synthase CF1 alpha subunit (chloroplast) [Chlorella sorokiniana]</p> <p><b>Q9N08.1</b> RecName: Full=ATP synthase subunit beta, chloroplastic; AltName: Full=ATP synthase F1 sector subunit beta ATP synthase beta subunit, partial (chloroplast) [Enterosora sprucei]</p> <p><b>AGS4860.1</b> ATP synthase beta subunit, partial (chloroplast) [Cyananthus incanus subsp. incanus]</p> <p><b>AGL95059.1</b> ATP synthase beta chain, partial (chloroplast) [Ctenoptercella lasiocarpus]</p> <p><b>AGS4848.1</b> ATP synthase beta subunit, partial (chloroplast) [Myrtilopsis sp. MJB-2012]</p> <p><b>AGS41175.1</b> ATP synthase beta subunit, partial (chloroplast) [Spathelia terminaloides]</p> <p><b>SM8459.1</b> ATP synthase beta subunit, partial (chloroplast) [Turdinus colardensis]</p> <p><b>YP_009256746.1</b> large subunit of Rubisco (chloroplast) [Ectocarpus fibriatus]</p> <p><b>AA02569.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (chloroplast) [Lythrum hyssopifolia]</p> <p><b>AGU09286.1</b> ATP synthase beta chain, partial (chloroplast) [Diplazium latifrons]</p> <p><b>ATV3578.1</b> ATP synthase beta subunit, partial (chloroplast) [Solienostoma sphaerocephum]</p> <p><b>AAW5138.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Elaeocroton bahamensis]</p> <p><b>ABY9019.1</b> ATP synthase beta chain, partial (chloroplast) [Selvinia natans]</p> <p><b>CAAB3029.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Psychotria petersii]</p> <p><b>Q07208.1</b> RecName: Full=Rubulose biphosphate carboxylase large chain; Short=RubisCO large subunit ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (plastid) [Chlorochytrium lemnae]</p> <p><b>CCG9503.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (chloroplast) [Scaevola taccada]</p> <p><b>AA03524.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Coccidia rudis]</p> <p><b>AAQ0498.1</b> ATP synthase beta subunit, partial (chloroplast) [Haplochloris noronhai]</p> <p><b>BAW03461.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Berberis calamcaua]</p> <p><b>MEY7712.1</b> ATP synthase beta subunit, partial (chloroplast) [Colera Imperfectae]</p> <p><b>ABK3511.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Guatteria pudica]</p> <p><b>ABW5270.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Arctostaphylos uva-ursi]</p> <p><b>MY26135.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (chloroplast) [Ludwigia peruviana]</p> <p><b>AA02567.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Parkinsonia peruviana]</p> <p><b>AAV4409.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Parkinsonia monogyna]</p> <p><b>AAV19206.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Tetraselmis marina]</p> <p><b>AA09721.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Parkinsonia florida]</p> <p><b>AAV54113.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Klebsormidium disse]</p> <p><b>ABU72760.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Hella subia]</p> <p><b>AGS4258.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Polystichopsis chas]</p> <p><b>ABU11725.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Dioscorea caucasica]</p> <p><b>ABU11657.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Goniochalamus macro]</p> <p><b>ABU17112.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Cyperus clandestinus]</p> <p><b>AFW03557.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Pogonatum cirratum]</p> <p><b>AAW03558.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Hypnodendron vitifera]</p> <p><b>AGS4429.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Hypopterygium sordidum]</p> <p><b>AFY18285.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (chloroplast) [Hordeum stenostachys]</p> <p><b>ANR27981.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Parkinsonia micropt]</p> <p><b>AFW09171.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Roseingamiaella aust]</p> <p><b>AFW44381.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Goniochalamus tamii]</p> <p><b>ANR03529.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Craigaia yunnanensis]</p> <p><b>AGS4272.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Selaginella repandi]</p> <p><b>AGS4165.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Ulvva procerus]</p> <p><b>ABU13984.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Schroederia setigera]</p> <p><b>ARE45005.1</b> ATP synthase CF1 subunit alpha (chloroplast) [Ostreobium sp. HW05007b]</p> <p><b>ABU2473.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Ulvva sp. MELT A027]</p> <p><b>ABU11883.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Tetrademus obliquus]</p> <p><b>AAQ04070.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Orthilla secunda]</p> <p><b>ABR80414.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Garovaglia binsteac]</p> <p><b>AGS4889.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Selaginella sellowii]</p> <p><b>YP_009104925.1</b> CF1 alpha subunit of ATP synthase (chloroplast) [Syzygium hardwii]</p> <p><b>AGS4825.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Selaginella mossopii]</p> <p><b>ABX76524.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Didymoglossum tahiti]</p> <p><b>ACB88675.1</b> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [Dichilus gracilis]</p> <p><b>ALU89164.1</b> ATP, partial (chloroplast) [Hydrolea corymbosa]</p> <p><b>ARW0099.1</b> ATP synthase CF1 alpha chain (chloroplast) [Trentepohlia annulata]</p> <p><b>YP_001019097.1</b> CF1 alpha subunit of ATP synthase [Chlorokybus atromphiticus]</p>

### Mascot Score Histogram

Ions score is  $-10 * \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
Individual ions scores > 53 indicate identity or extensive homology (p<0.05).  
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

[http://www.matrixscience.com/cgi/master\\_results.pl?file=%2Fdata%2F20171122%2FF7m12Yah.dat&group\\_family=0&REPTYPE=peptide\\_sig&threshold=0...](http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=%2Fdata%2F20171122%2FF7m12Yah.dat&group_family=0&REPTYPE=peptide_sig&threshold=0...) 1/195

## รูปที่ ก.2 ผลการวิเคราะห์แบนด์ที่ 1 KS03-B01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



- แบนด์ที่ 2 KS03-B02

11/22/2017

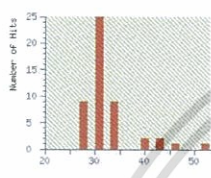
Peptide Summary Report (KS03-B02)

**MASCOT** SCIENCE **Mascot Search Results**

User : tonkla  
 Email : tonkla\_ins@hotmail.com  
 Search title : KS03-B02  
 MS data file : KS03-B02\_E8\_01\_2018.mgf  
 Database : NCBIprot 20171024 (135744157 sequences; 49805139192 residues)  
 Taxonomy : Viridiplantae (Green Plants) (5469903 sequences)  
 Timestamp : 22 Nov 2017 at 02:45:00 GMT  
 Protein hits : [XP\\_009843566.1](#) hypothetical protein CHLNCDRAFT\_59812 [Chlorella variabilis]

**Mascot Score Histogram**

Ions score is  $-10 \times \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 53 indicate identity or extensive homology (p < 0.05). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



**Peptide Summary Report**

Format As: Peptide Summary Help

Significance threshold p < 0.05 Max. number of hits: AUTO

Standard scoring:  Mascot scoring  MvdPIT scoring  Display non-significant matches  Show sub-sets: 0

Show pop-ups:  Suppress pop-ups:  Sort unassigned: Decreasing Score  Require bolded:

Preferred taxonomy: All entries

Select All  Select None  Search Selected  Error tolerant

1. [XP\\_009843566.1](#) Mass: 35292 Score: 74 Matches: 2 (0) Sequences: 2 (0)  
 hypothetical protein CHLNCDRAFT\_59812 [Chlorella variabilis]  
 Check to include this hit in an error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Mass	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 30	586.3300	1170.6434	1170.6972	-0.0570	9	42	0.086	1	R.VLGVITLDPVTR.A
<input checked="" type="checkbox"/> 31	632.3430	1262.6734	1262.7347	-0.0592	0	22	95	6	U.K.GADVWILPAQVPR.K

Peptide matches not assigned to protein hits: (no details means no match)

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Mass	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 11	642.7880	1283.5614	1283.5703	-0.0089	1	51	0.11	1	FEHQDVEEK + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 16	428.7310	855.4074	855.3066	-0.0191	0	47	0.21	1	IATVLPDK
<input checked="" type="checkbox"/> 25	574.2890	1146.5634	1146.6768	-0.1126	0	42	0.99	1	IYVDFPEIQR
<input checked="" type="checkbox"/> 35	597.7930	1193.4914	1193.4949	-0.0034	0	42	0.89	1	AFDDGADAAAR
<input checked="" type="checkbox"/> 21	471.2000	940.4014	940.4073	-0.0058	1	39	1.5	1	RHFDEK + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 15	421.7420	841.4694	841.4770	-0.0075	1	39	1.8	1	VDRSLPR
<input checked="" type="checkbox"/> 12	723.3760	1444.7374	1444.7497	-0.0122	1	36	3.5	1	FLYHQDILKAR + Oxidation (MF)
<input checked="" type="checkbox"/> 18	723.3790	1444.7434	1444.7959	-0.0525	1	35	4.2	1	TSKDLKAVAGDALK
<input checked="" type="checkbox"/> 55	897.0830	1793.7314	1793.9015	-0.1501	1	35	3.7	1	SHLSGHALLESKQETK
<input checked="" type="checkbox"/> 33	596.6110	1191.6074	1191.6248	-0.0173	1	34	5.7	1	LHPDKTTFR
<input checked="" type="checkbox"/> 53	517.9140	1550.7207	1550.7246	-0.0044	1	34	5.3	1	DDSAQLTEQKAK
<input checked="" type="checkbox"/> 19	634.8470	1307.6794	1307.6404	0.0390	1	33	7.7	1	GRVLEDDGK + Oxidation (MF)
<input checked="" type="checkbox"/> 17	429.7460	857.4774	857.5003	-0.0308	1	32	8.7	1	VHLASARR
<input checked="" type="checkbox"/> 54	598.9240	1793.7507	1793.8690	-0.1188	1	31	7.8	1	STRSSHGSIASQSPR + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 71	744.0470	2229.1192	2229.0193	0.0999	1	30	11	1	DVDGLVHRVLSHQDGTGR + Oxidation (MF)
<input checked="" type="checkbox"/> 10	467.7560	933.4974	933.5647	-0.0673	1	29	20	1	IYVDFYKAK
<input checked="" type="checkbox"/> 17	604.3080	1206.6014	1206.6357	-0.0342	0	29	19	1	AGYALSVGSLR
<input checked="" type="checkbox"/> 52	500.5670	1498.6792	1498.7740	-0.0948	1	28	23	1	DEETLVPRASQR
<input checked="" type="checkbox"/> 24	572.2880	1142.5614	1142.5356	0.0258	1	27	30	1	KQVYQADR
<input checked="" type="checkbox"/> 51	578.2470	1731.7192	1731.9169	-0.1977	1	27	22	1	SSAMQIVVGDPIR + 2 Oxidation (MF)
<input checked="" type="checkbox"/> 56	776.3740	1550.7334	1550.8378	-0.1044	0	25	36	1	VGSIFIVLVSQK + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 22	521.7450	1041.4754	1041.6295	-0.1540	1	23	62	1	DVAISRIR

[http://www.matrixscience.com/cgi/master\\_results.pl?file=%2Fdata%2F20171122%2FFFTmzYae.dat&group\\_family=0&REPTYPE=peptide&sigthreshold=0.05...](http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=%2Fdata%2F20171122%2FFFTmzYae.dat&group_family=0&REPTYPE=peptide&sigthreshold=0.05...) 1/2

รูปที่ ก.4 ผลการวิเคราะห์แบนด์ที่ 2 KS03-B02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- แบนด์ที่ 3 KS03-B03

1/22/2017

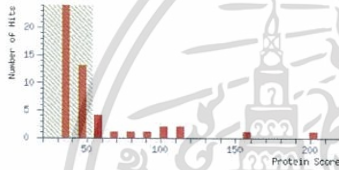
Peptide Summary Report (KS03-B03)

**MASCOT Search Results**

User : tonkla  
 Email : tonkla\_ins@hotmail.com  
 Search title : KS03-B03  
 MS data file : KS03-B03\_E9\_01\_2019.mgf  
 Database : NCBIprot 20171024 (135744137 sequences; 49805139192 residues)  
 Taxonomy : Viridiplantae (Green Plants) (5469903 sequences)  
 Timestamp : 22 Nov 2017 at 02:46:40 GMT  
 Protein hits :  
 XP\_005650961.1 chlorophyll a/b-binding protein [Coccomyxa subellipsoidea C-169]  
 XP\_005843949.1 hypothetical protein CHLNCDRAFT\_59790 [Chlorella variabilis]  
 XP\_005843977.1 hypothetical protein CHLNCDRAFT\_59796 [Chlorella variabilis]  
 XP\_005843532.1 hypothetical protein CHLNCDRAFT\_33026 [Chlorella variabilis]  
 XP\_005846356.1 hypothetical protein CHLNCDRAFT\_59709 [Chlorella variabilis]  
 A5I70748.1 CF1 alpha subunit of ATP synthase, partial (plastid) [uncultured Trebouxiophyceae]  
 XP\_005846257.1 hypothetical protein CHLNCDRAFT\_56227 [Chlorella variabilis]  
 XP\_005843893.1 hypothetical protein CHLNCDRAFT\_32923 [Chlorella variabilis]  
 XP\_009367914.1 CF1 alpha subunit of ATP synthase (chloroplast) [Chaetomietichia basiliensis]  
 XP\_011401583.1 60S ribosomal protein L19-2 [Auxenochlorella protochaeoides]  
 ADE76179.1 unknown [Picea sitchensis]  
 ABK22602.1 unknown [Picea sitchensis]

**Mascot Score Histogram**

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 53 indicate identity or extensive homology (p<0.05). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



**Peptide Summary Report**

Format As: Peptide Summary | Help

Significance threshold p < 0.05 | Max. number of hits: AUTO

Standard scoring: MudPIT scoring | Display non-significant matches:  | Show sub-sets: 0

Show pop-ups:  Suppress pop-ups | Sort unassigned: Decreasing Score | Require bolded:

Preferred taxonomy: All entries

Select All | Select None | Search Selected | Error tolerant

1. **XP\_005650961.1** | Mass: 26020 | Score: 201 | Matches: 7(3) | Sequences: 3(1) | eMPI: 0.14  
 chlorophyll a/b-binding protein [Coccomyxa subellipsoidea C-169]  
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Hr(expt)	Hr(calc)	Delta Mass	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 34	483.7530	965.4914	965.5294	-0.0380	0	42	0.93	1	R.EIEVIHAR.W
<input checked="" type="checkbox"/> 35	483.7550	965.4954	965.5294	-0.0340	0	(36)	3.8	1	R.EIEVIHAR.W
<input checked="" type="checkbox"/> 71	429.2230	1284.6472	1284.6938	-0.0467	1	36	3.4	1	R.YREIIVHAR.W
<input checked="" type="checkbox"/> 72	643.3320	1284.6494	1284.6938	-0.0444	1	(33)	7	1	R.YREIIVHAR.W
<input checked="" type="checkbox"/> 142	820.3370	2457.9892	2458.0714	-0.0822	0	(65)	0.0013	1	U.K.GEFPDYQNDYAGLSADPETFAR.Y
<input checked="" type="checkbox"/> 143	1230.0040	2457.9934	2458.0714	-0.0779	0	123	1.5e-05	1	U.K.GEFPDYQNDYAGLSADPETFAR.Y
<input checked="" type="checkbox"/> 144	820.3398	2457.9952	2458.0714	-0.0762	0	(96)	1.2e-06	1	U.K.GEFPDYQNDYAGLSADPETFAR.Y

2. **XP\_005843949.1** | Mass: 26685 | Score: 162 | Matches: 5(1) | Sequences: 3(1) | eMPI: 0.14  
 hypothetical protein CHLNCDRAFT\_59790 [Chlorella variabilis]  
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Hr(expt)	Hr(calc)	Delta Mass	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input type="checkbox"/> 34	483.7530	965.4914	965.5294	-0.0380	0	42	0.93	1	R.EIEVIHAR.W
<input type="checkbox"/> 35	483.7550	965.4954	965.5294	-0.0340	0	(36)	3.8	1	R.EIEVIHAR.W
<input type="checkbox"/> 71	429.2230	1284.6472	1284.6938	-0.0467	1	36	3.4	1	R.YREIIVHAR.W
<input type="checkbox"/> 72	643.3320	1284.6494	1284.6938	-0.0444	1	(33)	7	1	R.YREIIVHAR.W
<input checked="" type="checkbox"/> 141	815.6670	2444.9792	2444.0557	-0.0765	0	83	2.2e-05	1	U.K.GEFPDYQNDYAGLSADPETFAR.Y

http://www.matrixscience.com/cgi/master\_results.pl?file=%2Fdata%2F20171122%2F2FTmzYnT.dat&group\_family=0&REPTYPE=peptide&sigthreshold=0.05... 1/6

รูปที่ ก.5 ผลการวิเคราะห์แบนด์ที่ 3 KS03-B03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้