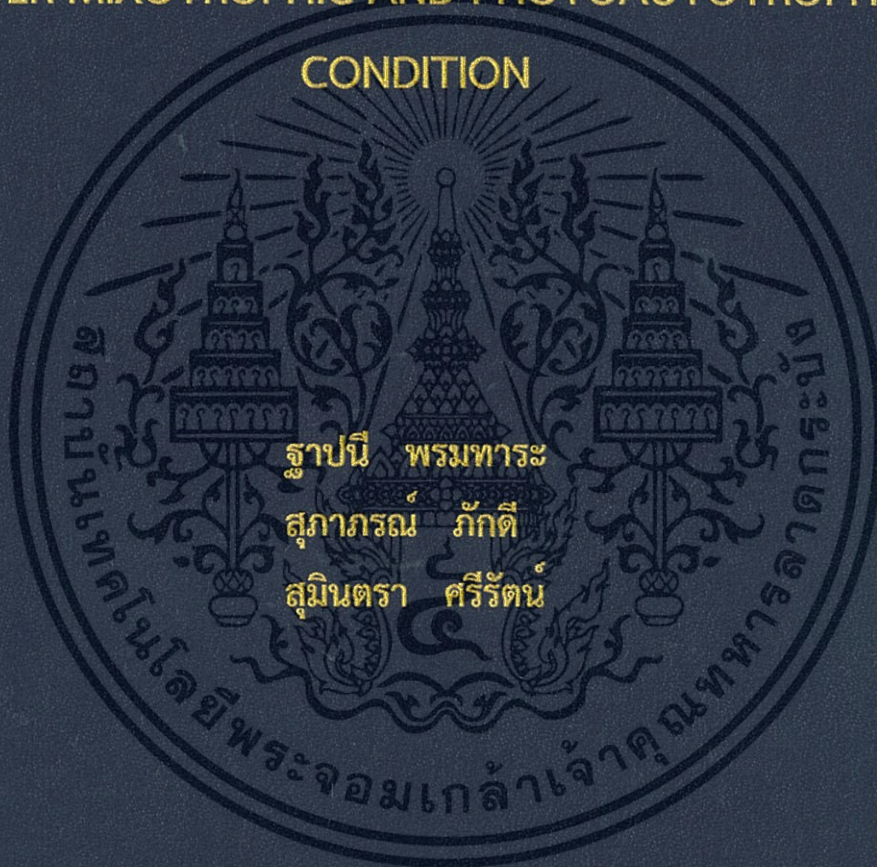


ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ภายใต้สภาวะмикโซโทรฟิก และ โฟโตออโตโทรฟิก

STUDY ON *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* GROWTH
UNDER MIXOTROPHIC AND PHOTOAUTOTROPHIC
CONDITION



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ภายใต้สภาวะмикโซโทรฟิก และ โฟโตออโตโทรฟิก

STUDY ON *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* GROWTH UNDER MIXOTROPHIC AND PHOTOAUTOTROPHIC CONDITION



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุฬชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* GROWTH
UNDER MIXOTROPHIC AND PHOTOAUTOTROPHIC
CONDITION



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ภายใต้สภาวะмикโซโทรฟิก และโฟโตออโตโทรฟิก
Study on *Chlamydomonas reinhardtii* growth under mixotrophic and photoautotrophic condition

ชื่อนักศึกษา

นางสาว ฐาปนี พรหมทาระ รหัสนักศึกษา 55051265
นางสาว สุภาภรณ์ ภัคดี รหัสนักศึกษา 55051417
นางสาว สุมินตรา ศรีรัตน์ รหัสนักศึกษา 55051418

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา

ชีววิทยา




ปีการศึกษา

2558

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ประจำปี
การศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ. วีน่า ชูโชติ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร. ดวงกมล เรือนงาม กรรมการ	
ดร. วิภาวี เดชดีศักดิ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ภายใต้สภาวะмикโซโทรฟิก และ โฟโตออโตโทรฟิก Study on <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Growth under Mixotrophic and Photoautotrophic Condition
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ฐาปนี พรหมทาระ รหัสนักศึกษา 55051265 นางสาว สุภาภรณ์ ภัคดี รหัสนักศึกษา 55051417 นางสาว สุมินตรา ศรีรัตน์ รหัสนักศึกษา 55051418
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์

บทคัดย่อ

สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นสาหร่ายแม่แบบที่มีคุณค่าทางด้านงานวิจัย ทั้งการศึกษาทางด้านกระบวนการสังเคราะห์แสง เมแทบอลิซึมต่างๆ และ ด้านทางโมเลกุลาร์ เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยเหล่านี้ได้นำเอาเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ หรือ กระบวนการทำงานของสาหร่ายเพื่อประโยชน์ทางด้านเศรษฐกิจ เช่น หายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตลิพิดในสาหร่ายสำหรับผลิตไบโอดีเซล งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับยีน *FBP1* เพื่อดูผลการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตของ *C. reinhardtii* หลังจากได้ทำการทรานสฟอร์มเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *FBP1* เข้าไปในสาหร่าย สาหร่ายที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ สายพันธุ์พื้นเมือง (CC125), สายพันธุ์ที่เพิ่มยีน *FBP1* ปกติ (Overexpression *FBP1* หรือ CpF1) และ สายพันธุ์ที่เพิ่มยีน *FBP1* ที่ถูกลดปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox-insensitive *FBP1* หรือ ReCpF23, ReCpF41, ReCpF42) จากนั้นยังทำการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ในอาหาร 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะмикโซโทรฟิกใช้อาหาร High Salt Acetate (HSA) และ สภาวะโฟโตออโตโทรฟิกใช้อาหาร High Salt (HS) จากการนับเซลล์ของสาหร่ายสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเลี้ยงในสภาวะмикโซโทรฟิก พบว่า สายพันธุ์ CpF1 มีอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง 1.6 เท่า และมีการสะสมเซลล์ในระยะ stationary มากกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง 1 เท่า ในขณะที่สายพันธุ์ ReCpF41 และ ReCpF42 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองในระยะ log และ stationary ประมาณ 1.2 และ 1.3 เท่า ตามลำดับ และเมื่อนำอัตราการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ ReCpF23, ReCpF41 และ CpF1 มาเปรียบเทียบกับ พบว่า ReCpF23 และ ReCpF41 มีการเจริญเติบโตในระยะ log และ stationary สูงกว่า CpF1 ประมาณ 1.9 และ 1.2 เท่า ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีอะซิเตท เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตทในสภาวะโฟโตออโตโทฟิกันนั้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่า สาหร่ายสายพันธุ์พื้นเมือง, CpF1, และ ReCpF42 ที่เลี้ยงในสภาวะมิกโซโทฟิกันนั้นมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่าการเลี้ยงในสภาวะโฟโตออโตโทฟิกันประมาณ 4.8, 3.5 และ 5.7 เท่า ในช่วงระยะ log ตามลำดับ และประมาณ 2.3, 2.5, และ 2.5 เท่า ในช่วงระยะ stationary ตามลำดับ จากการทดลองครั้งนี้ ทำให้ทราบว่า การเปลี่ยนแปลงของอัตราการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นหรือลดลงนั้น อาจส่งผลมาจากยีน *FBP1* ส่วนหนึ่ง แต่อะซิเตทซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมนั้นมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นของสาหร่าย *C. reinhardtii*

คำสำคัญ : สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii*, ยีน *FBP1*, โฟโตออโตโทฟิกัน, มิกโซโทฟิกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study on <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Growth under Mixotrophic and Photoautotrophic Condition		
Students	Miss Thapanee Promtara	Student ID 55051265	
	Miss Supaporn Pakdee	Student ID 55051417	
	Miss Sumintra Srirat	Student ID 55051418	
Degree	Bachelor of Science (Microbiology)		
Department	Industrial Microbiology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2015		
Advisor	Dr. Wipawee Dejtsakdi		

Abstract

Chlamydomonas reinhardtii is a great microalgal model in several research areas such as photosynthesis, metabolism and molecular study etc. These researches are using biotechnology application to study or improve *Chlamydomonas* strain or its metabolism for economic benefits such as finding a gene involving in lipid metabolism for biodiesel production. In this study, we worked from a previous study that was related to *FBP1* gene in order to see a *FBP1* effect on *C. reinhardtii* growth after *FBP1* gene overexpression. There were three categories of *Chlamydomonas* strains 1) Wild type strain (CC125), 2) Overexpressed *FBP1* strain (CpF1) and 3) Redox-insensitive *FBP1* strains (ReCpF23, ReCpF41 and ReCpF42). In addition, we were analyzing growth of each *Chlamydomonas* strain under mixotrophic (High Salt Acetate medium) and photoautotrophic (High Salt medium) condition. From cell counting, we found that CpF1 showed approximately 1.6-fold of growth and 1-fold of cell accumulation higher than wild type in log and stationary phase, respectively. Whereas ReCpF23 and ReCpF41 showed an increase of growth in log and stationary phase approximately 1.2- and 1.3-fold, respectively, compared with wild type. We then compared ReCpF23, ReCpF41 and CpF1 and found that ReCpF23 and ReCpF41 had enhancing growth in log and stationary phase higher

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

than CpF1 approximately 1.9- and 1.2-fold, respectively. However, all strains did not show any significantly growth changed in photoautotrophic condition. Moreover, we found that *C. reinhardtii* strain CC125, CpF1 and ReCpF42 growing under mixotrophic exhibited higher growth than those ones growing under photoautotrophic approximately 4.8-, 3.5- and 5.7-fold in log phase, respectively and 2.3-, 2.5-, and 2.5-fold in stationary phase, respectively. This study suggested that changing of *Chlamydomonas* growth positively or negatively might be affected by *FBP1* gene but acetate, an extra carbon source, had an effect on enhancing of *C. reinhardtii* growth definitely.

Keywords : *Chlamydomonas reinhardtii* , *FBP1* gene , photoautotrophic, mixotrophic



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้ เสร็จสิ้นสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. วิภาวี เดชดีศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่ได้ช่วยเหลือและชี้แนะแนวทางในการศึกษาวิจัย ข้อเสนอแนะและข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย ทั้งแก้ไขปัญหาดังกล่าว และเสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา รวมทั้งตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้หลายรอบมาก ให้มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้น

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงการพิเศษ คือ ผศ. วีนา ซูโชติ ประธานกรรมการ และ ผศ.ดร.ดวงกมล เรืองงาม กรรมการ ที่คอยให้คำแนะนำให้คำปรึกษา และเสนอแนะแนวทางแก้ปัญหาต่างๆ รวมทั้งตรวจแก้โครงการพิเศษฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการประจำภาควิชาชีววิทยา เจ้าหน้าที่ดูแลตึก ตลอดจนแม่บ้านที่ให้ความร่วมมือ และอำนวยความสะดวก ในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ได้ให้โอกาสในการศึกษา สนับสนุนในทุกๆด้าน และให้กำลังใจเสมอมา และ ขอขอบคุณ พี่ๆ ที่ให้กำลังใจและคำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ฐานี พรหมทาระ
สุภาภรณ์ ภัคดี
สุมินตรา ศรีรัตน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 สาหร่าย (Algae).....	3
2.1.1 ความหมายของสาหร่าย.....	3
2.1.2 ประเภทของสาหร่าย.....	3
2.1.2.1 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue green algae, BGA)	3
2.1.2.2 สาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta)	4
2.1.2.3 สาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta)	4
2.1.2.4 สาหร่ายสีแดง (Rhodophyta)	5
2.1.3 ความสำคัญของสาหร่าย.....	6
2.1.4 ประโยชน์ของสาหร่าย.....	6
2.1.4.1 ใช้เป็นอาหารมนุษย์.....	6
2.1.4.2 ใช้เป็นอาหารสัตว์.....	7
2.1.4.3 ใช้ในการกำจัดน้ำเสีย.....	7
2.1.4.4 ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ.....	7
2.1.4.5 ใช้ในอุตสาหกรรมอื่น.....	7
2.1.5 สาหร่ายที่ใช้ในงานวิจัย คือ <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8
2.1.6 วงจรชีวิต <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	9
2.1.7 บทบาทและความสำคัญ.....	10
2.1.8 การเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2 สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	12
2.2.1 สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic).....	12
2.2.2 สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิก (Heterotrophic).....	12
2.2.3 สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิก (Mixotrophic).....	12
2.2.4 สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก (Photoheterotrophic)	12
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	13
2.3.1 ปัจจัยทางกายภาพ.....	13
2.3.2 ปัจจัยทางเคมี.....	13
2.4 ธาตุอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	13
2.5 ยีน <i>FBP1</i> (Fructose-1,6-bisphosphatase).....	14
2.6 การสังเคราะห์แสง.....	14
2.6.1 ปฏิกิริยาใช้แสง (Light reaction).....	15
2.6.2 ปฏิกิริยาไม่ใช้แสง (Dark reaction).....	16
2.7 ปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox).....	17
2.8 ซิสเทอีน (Cysteine).....	18
2.9 ซีรีน (Serine).....	18
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	21
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	21
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	21
3.3 อุปกรณ์.....	21
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	22
3.4.1 การเตรียมอาหาร.....	22
3.4.2.1 TAP medium (Tris-Acetate-Phosphate).....	22
3.4.2.2 อาหาร HSA (High salt acetate medium).....	23
3.4.2.3 อาหาร HS (High salt medium).....	23
3.4.2 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์	23
3.4.3 การวัดอัตราการเจริญเติบโต.....	23
3.4.4.1 การปรับสภาพเชื้อ.....	23
3.4.4.2 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i>	24
3.4.4 วิเคราะห์และบันทึกอัตราการเจริญเติบโต.....	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	25
4.1 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> ระหว่างสายพันธุ์ พื้นเมือง (CC125) กับสายพันธุ์ที่ Overexpression <i>FBP1</i> (CpF1).....	25
4.1.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร HSA (High salt acetate medium).....	25
4.1.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร HS (High salt medium).....	26
4.2 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> ระหว่างสายพันธุ์ พื้นเมือง (CC125) กับสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive <i>FBP1</i> (ReCpF23, ReCpF41, ReCpF42).....	27
4.2.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร HSA (High salt acetate medium).....	27
4.2.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร HS (High salt medium).....	28
4.3 เปรียบเทียบผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> ระหว่างสายพันธุ์ Overexpression <i>FBP1</i> (CpF1) กับสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive <i>FBP1</i> (ReCpF42).....	28
4.3.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร HSA (High salt acetate medium).....	28
4.3.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร HS (High salt medium).....	29
4.4 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> แต่ละกลุ่มภายใต้ภาวะ โฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic) และ มิกโซโทรฟิก (Mixotrophic).....	30
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	32
เอกสารอ้างอิง.....	33
ภาคผนวก ก.....	38
ภาคผนวก ข.....	40
ภาคผนวก ค.....	42

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	การเตรียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ II และ สารละลาย A สำหรับอาหาร TAP.....	22
3.2	การเตรียม ฟอสเฟส บัฟเฟอร์ II และ สารละลาย A สำหรับ อาหาร HS.....	23
ค-1	ปริมาณเซลล์สะสมของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร HS และ HSA.....	42



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน.....	3
2.2	สาหร่ายสีเขียว.....	4
2.3	สาหร่าย <i>Laminaria saccharina</i>	5
2.4	สาหร่ายสีแดง.....	5
2.5	การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	8
2.6	ลักษณะของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i>	9
2.7	ภาพถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ <i>C. reinhardtii</i>	9
2.8	<i>Chlamydomonas</i> life cycle.....	10
2.9	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	11
2.10	แสดงการย่อย fructose 1,6-bisphosphatase เป็น fructose 6-bisphosphatase...	14
2.11	การสังเคราะห์ด้วยแสงภายในคลอโรพลาสต์.....	15
2.12	แผนภาพแสดงการถ่ายเทอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง.....	16
2.13	วัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle).....	17
2.14	สมการการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์.....	17
2.15	โครงสร้างซิสเทอีน.....	18
2.16	โครงสร้างซีรีน.....	18
4.1	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> ระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง (CC125) และสายพันธุ์ที่ Overexpression <i>FBP1</i> (CpF1) ภายใต้สภาวะมิกโซโทฟิก (ในอาหาร HSA)	26
4.2	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> ระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง (CC125) กับสายพันธุ์ที่ Overexpression <i>FBP1</i> (CpF1) ภายใต้สภาวะโพโตออโตโทฟิก (ในอาหาร HS).....	26
4.3	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> ระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง (CC125) และสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive <i>FBP1</i> (ReCpF23, ReCpF41, ReCpF42) ภายใต้สภาวะมิกโซโทฟิก (ใน อาหาร HSA).....	27
4.4	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> ระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง (CC125) และสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive <i>FBP1</i> (ReCpF23, ReCpF41, ReCpF42) ภายใต้สภาวะโพโตออโตโทฟิก (ในอาหาร HS).....	28
4.5	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> ระหว่างสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive <i>FBP1</i> (ReCpF42) และสายพันธุ์ที่ Overexpression <i>FBP1</i> (CpF1) ภายใต้สภาวะมิกโซโทฟิก (ในอาหาร HSA).....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.6 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> ระหว่างสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive <i>FBP1</i> (ReCpF42) กับสายพันธุ์ที่ Overexpression <i>FBP1</i> (CpF1) ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (ในอาหาร HS).....	29 30
4.7 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> CC125 ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (photoautotrophic) และ มิกโซโทรฟิก (mixotrophic)	30
4.8 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> CpF1 ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (photoautotrophic) และ มิกโซโทรฟิก (mixotrophic).....	30
4.9 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> ReCpF42 ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (photoautotrophic) และ มิกโซโทรฟิก (mixotrophic).....	31
ข-1 ช่องนับตัวอย่างฮีมาไซโตมิเตอร์.....	40
ค-1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ CC125 ในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะมิกโซโทรฟิก.....	42
ค-2 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ CC125 ในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก.....	43
ค-3 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ CpF1 ในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะมิกโซโทรฟิก.....	43
ค-4 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ CpF1 ในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก.....	44
ค-5 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ ReCpF23 ในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะมิกโซโทรฟิก.....	44
ค-6 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ ReCpF23 ในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก.....	45
ค-7 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ ReCpF41 ในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะมิกโซโทรฟิก.....	45
ค-8 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ ReCpF41 ในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก.....	46
ค-9 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ ReCpF42 ในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะมิกโซโทรฟิก.....	46
ค-10 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> สายพันธุ์ ReCpF42 ในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก.....	47

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในสภาพปัจจุบันทั่วโลกกำลังเผชิญปัญหาน้ำมันเชื้อเพลิงเบนซินที่ใช้มีราคาสูงขึ้น นักวิจัยจึงได้มีการคิดค้นพลังงานทางเลือกใหม่เพื่อใช้ทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงเดิมที่กลั่นจากฟอสซิล ซึ่งพบว่า มีพืชอาหารกลุ่มหนึ่ง เช่น ปาล์ม เมล็ดทานตะวัน ถั่วเหลือง ฯลฯ ที่จัดเป็นพืชน้ำมัน มาใช้เป็นวัตถุดิบ ในการผลิตพลังงานทดแทนที่เรียกว่า ไบโอดีเซล แต่ทั้งนี้ก็ทำให้เกิดปัญหาการแย่งพืชอาหารของมนุษย์ จึงต้องแสวงหาแหล่งวัตถุดิบอื่นที่สามารถนำมาทดแทนพืชอาหารได้ พบว่ามีแหล่งวัตถุดิบชนิดหนึ่งซึ่งเป็นทรัพยากรที่ใช้แล้วไม่หมดไป มีศักยภาพในด้านการผลิตน้ำมัน และการเพิ่มขึ้นของชีวมวลอย่างรวดเร็ว นั่นคือ ชีวมวลจากสาหร่ายขนาดเล็ก พบมากทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม (ยุวดี, 2553) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสารอาหารที่มีราคาถูก เพราะเลี้ยงได้ง่ายในพื้นที่ขนาดใหญ่และขนาดเล็ก มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงสูง เมื่อเปรียบเทียบกับพืชอาหารอื่นๆ นอกจากนี้สาหร่ายขนาดเล็กยังมีประโยชน์อีกมาก เช่น ใช้ผลิตอาหารเพื่อการบริโภค ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว ในตระกูล *Chlorella*, *Scenedesmus* สาหร่ายสีเขียวก่อนน้ำเงินในตระกูล *Spirulina* เป็นต้น ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย เช่นสาหร่ายในกลุ่ม *Caulerpa* และบทบาทที่สำคัญอย่างหนึ่งของสาหร่ายขนาดเล็ก คือ มีศักยภาพในการผลิตน้ำมันได้ปริมาณสูงสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดไบโอดีเซล ได้แก่ สาหร่ายในกลุ่ม *Botryococcus* sp. , *Chlorella* sp. เป็นต้น (Noue and Pauw, 1988) แต่ทั้งนี้ยังไม่ถูกพัฒนาเท่าที่ควร ในยุคแรกสาหร่ายที่ใช้เป็นแม่แบบ คือ *Chlamydomonas reinhardtii* ที่ได้มีการศึกษามาช้านานทั้งทางด้านยีนที่เกี่ยวข้อง การผลิตลิปิด การปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม กระบวนการสังเคราะห์แสง และ เมตาบอลิซึมต่างๆ เป็นต้น (ยุวดี, 2553) ทำให้ง่ายต่อการที่จะนำมาใช้ศึกษาต่อยอด

ในปัจจุบันมีการศึกษาวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่ายหลากหลายวิธี เพื่อใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพเพื่อเป็นวัตถุดิบของการผลิตไบโอดีเซล เช่น การปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี (chemical mutagen) และ การตัดต่อยีนบางตัวที่เกี่ยวข้องกับสาหร่ายโดยกระบวนการผลิตกรดไขมันในสาหร่าย

จากวิธีการปรับปรุงสาหร่ายเบื้องต้นที่กล่าวมา มียีนตัวหนึ่งซึ่งใช้ศึกษาในพืชและส่งผลต่อการเจริญเติบโตและชีวมวลของพืช ได้มีการรายงานไว้ว่า เมื่อเพิ่มยีน *FBP1* ในพืชใบยาสูบ ส่งผลทำให้พืชมีการเจริญเติบโต การสังเคราะห์แสงและชีวมวลที่เพิ่มขึ้น ประมาณ 1.3 – 1.5 เท่า เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง (Tamoi et al., 2006)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการศึกษาค้นคว้าโดยใช้สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 สายพันธุ์พื้นเมือง CC125, กลุ่มที่ 2 สายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีน *FBP1* เข้าไป (Overexpression *FBP1*) ได้แก่สายพันธุ์ CpF1 และกลุ่มที่ 3 สายพันธุ์ที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *FBP1* ที่ดัดแปลงกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) เป็น ซีรีน (Serine) เพื่อลดปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox-insensitive *FBP1*) ได้แก่สายพันธุ์ ReCpF23 , ReCpF41 และ ReCpF42 โดยนำมาใช้ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 3 กลุ่ม เพื่อดูว่ายีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FBP1 มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 3 กลุ่มหรือไม่ นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic) และ มิกโซโทรฟิก (Mixotrophic) ของสาหร่ายแต่ละกลุ่ม

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษามลการดัดแปลงยีน *FBP1* โดยการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii*

1.1) เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง และ Overexpression *FBP1*

1.2) เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง และ Redox-insensitive *FBP1*

1.3) เปรียบเทียบระหว่าง Overexpression *FBP1* และ Redox-insensitive *FBP1*

2) เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* แต่ละกลุ่มในสภาวะการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะ คือ โฟโตออโตโทรฟิก และ มิกโซโทรฟิก

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. reinhardtii* ทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ สายพันธุ์พื้นเมือง CC125, สายพันธุ์ที่ Overexpression *FBP1* และสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive *FBP1* และทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่าง 3 สายพันธุ์ เพื่อหาว่ายีน *FBP1* มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *C. reinhardtii* อย่างไร หลังจากนั้นทำการศึกษาปัจจัยเรื่องสภาวะอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะ คือ ใส่อะซิเตท (มิกโซโทรฟิก) และ ไม่ใส่อะซิเตท (โฟโตออโตโทรฟิก) ว่ามีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* อย่างไร โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ในอาหารทั้งสองชนิด และเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทำให้ทราบว่า การดัดแปลงยีน *FBP1* มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* อย่างไร

2) ทำให้ทราบถึงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงระหว่าง โฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic) และ มิกโซโทรฟิก (Mixotrophic)

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่าย (Algae)

2.1.1 ความหมายของสาหร่าย

สาหร่าย (algae) เป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีทั้งขนาดใหญ่ และขนาดเล็กสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าและไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตา ต้องดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ (ยุวดี, 2553) สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้หลายรูปแบบ เช่น กระจายอยู่ตามแหล่งน้ำจืด, น้ำเค็ม, หิน สามารถเป็นแพลงก์ตอนลอยอยู่ในน้ำ หรือยึดเกาะกับวัสดุอื่น ๆ มีคลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) ใช้ในการสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างอาหาร มีความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ที่ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว หรือหลายเซลล์ ไม่มีราก ลำต้น และใบที่แท้จริง ส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายพืช และบางกลุ่มมีโครงสร้างเซลล์คล้ายแบคทีเรีย

2.1.2 ประเภทของสาหร่าย

2.1.2.1 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue green algae, BGA)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “ไซยาโนแบคทีเรีย” (cyanobacteria) ซึ่งเป็นชื่อเรียกพื้นฐานที่สุดของสาหร่ายกลุ่มนี้ ยกตัวอย่างสาหร่ายในกลุ่มนี้เช่น *Nostoc* และ *Calothrix* สาหร่ายเหล่านี้มีสีเขียวแกมน้ำเงิน ดำรงชีวิตแบบเซลล์เดียว (single-celled) หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (colony) ภายในเซลล์ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ เอ บี และ ไฟโคบิลิน (phycobilin) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นโพรคาริโอติก (prokaryotic) เซลล์เหมือนกับแบคทีเรีย ดังนั้นจึงถึงพิจารณาให้อยู่ระหว่างแบคทีเรียและพืช ชื่อเรียก “ไซยาโนแบคทีเรีย” (cyanobacteria) จึงเป็นอีกชื่อหนึ่งของสาหร่ายกลุ่มนี้เนื่องจากสาหร่ายกลุ่มนี้ไม่มีออร์แกเนลล์เฉพาะภายในเซลล์ กระบวนการสังเคราะห์แสงจึงเกิดขึ้นโดยตรงผ่านไซโทพลาซึม (พิพัตน์ และวณัฐรินทร์, 2557)



รูปที่ 2.1 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

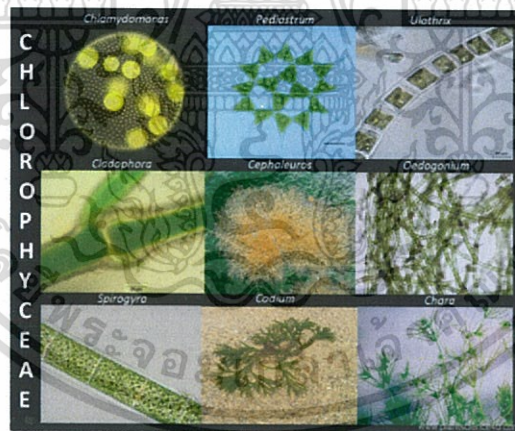
ที่มา: <http://www.hfmagazineonline.com/cyanobacteria-worlds-smallest-oldest->

เอกสารนี้เป็น [eyeball](#) /สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.2 สาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta)

สาหร่ายสีเขียว (chlorophyta) เป็นกลุ่มสาหร่ายที่มีขนาดใหญ่ มีหลากหลายรูปร่าง ทั้งเซลล์เดี่ยว (unicell) โคลนี (colony) และเส้นสาย (filament) เซลล์มีทั้งเคลื่อนที่ได้และไม่ได้ ภายในคลอโรพลาสต์มีคลอโรฟิลล์เอและบีเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบสารจำพวกแคโรทีน (carotene) และส่วนแซนโทฟิล (xanthophyll) แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสอยู่ 1 อัน มีผนังเซลล์ ประกอบด้วยเซลลูโลสซึ่งถูกสะสมในรูปของแป้ง ส่วนใหญ่พบสาหร่ายชนิดนี้อยู่บริเวณแหล่งน้ำจืด ประมาณร้อยละ 10 ของสาหร่ายทั้งหมด มีบางสปีชีส์ ที่อยู่ในน้ำเค็มและบางชนิดก็อยู่บนบก (terrestrial) ตามดินหรือหินที่ชุ่มชื้น และตามเปลือกต้นไม้ใหญ่ (ลัดดา, 2544)

การสืบพันธุ์ มีทั้งแบบไม่อาศัยเพศและไม่อาศัยเพศทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ แบบอาศัยเพศจะมีการรวมกันของแกมีต ซึ่งมีทั้งแบบ ไอโซแกมีต อะนีโซแกมีต และ โอโอแกมีต ส่วนแบบไม่อาศัยเพศ มีการแบ่งเซลล์สร้างสปอร์ และสร้างอะคินิท (ลัดดา, 2544) ยกตัวอย่างได้แก่ สาหร่าย *Chlamydomonas* ซึ่งจัดเป็นสาหร่ายที่เก่าแก่ รูปร่างทั่วไปเป็นเซลล์เดี่ยวกลมๆ มีผนังเซลล์ ภายในเซลล์มีคลอโรพลาสต์ใหญ่รูปกล้วย ซึ่งมีไพเรโนอิด (pyrenoid) เป็นแหล่งเก็บสะสมแป้ง (starch) นอกจากนี้ยังมีอายสปอต (eye spot) สีแดง มีนิวเคลียส (nucleus) ที่กลางเซลล์ 1 อัน และมีคอนแทร็กไทล์แวคิวโอล 2 อัน การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะมีการสร้างสปอร์ 2 - 3 อันในเซลล์ สปอร์นี้ว่ายน้ำโดยอาศัยแฟลกเจลลา (ยุวดี, 2553)



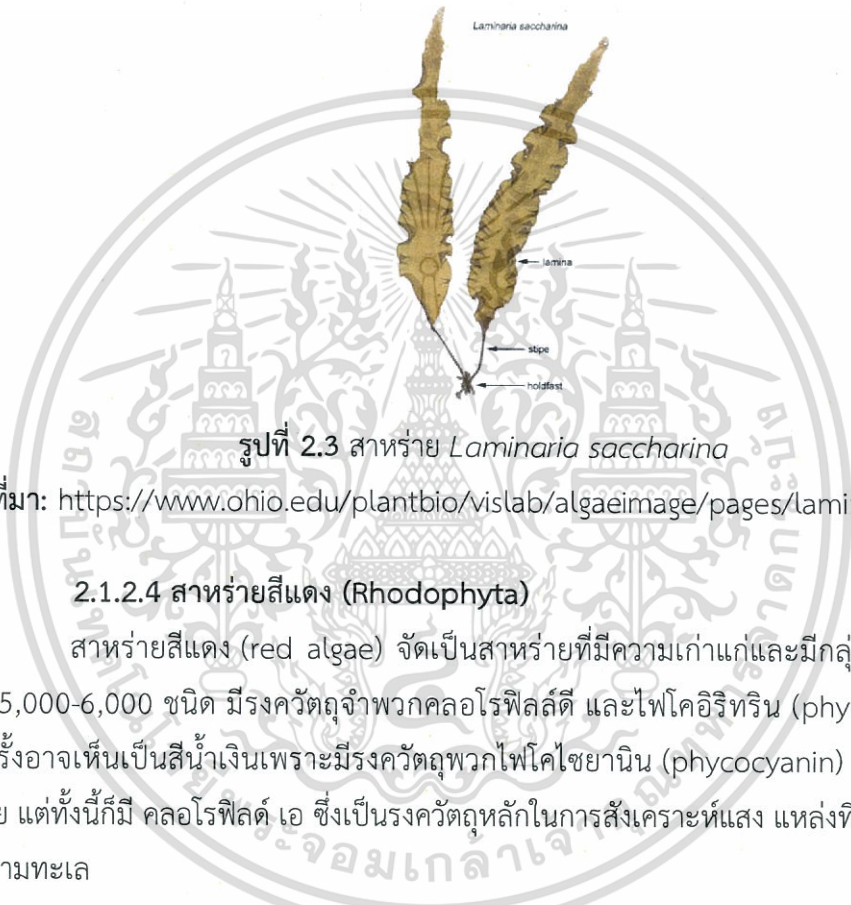
รูปที่ 2.2 สาหร่ายสีเขียว

ที่มา: <http://www.examplesof.net/2014/04/example-of-green-algae-chlorophyta.html#.V4iV19w71h4>

2.1.2.3 สาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta)

สาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) หรือ sea weed เป็นสาหร่ายที่มีสารฟูโคแซนทีน (fucoxanthin) มีคลอโรฟิลล์เอ และ ซี พบในบริเวณชายฝั่งทะเลที่มีอากาศเย็น มีผนังเซลล์เป็นสารจำพวกเซลลูโลสและกรดอัลจินิก มีลักษณะหลายเซลล์ พวกที่มีขนาดใหญ่ เรียกว่า เคลป์ (kelp) ซึ่งมีความยาว 60-70 เมตร มีลักษณะการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ โดยมีวงชีวิตแบบ เอกสาร์เป็นเอกสาร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สลับ (alternation of generation) คล้ายกับพืช ยกตัวอย่างเช่น *Laminaria* sp. ส่วนมากสาหร่ายกลุ่มนี้ปรับตัวได้ดีในน้ำทะเลคล้ายคลึงกับสาหร่ายสีแดง สาหร่ายสีน้ำตาลเป็นสาหร่ายที่มีความซับซ้อนมากที่สุดซึ่งในบางชนิดสามารถปรับตัวอาศัยอยู่ในทะเล และมหาสมุทรที่มีความลึกมาก สาหร่ายสีน้ำตาลขนาดใหญ่ (giant kelp) พบได้ที่พื้นท้องทะเลอยู่ในลำดับ laminariales และเป็นสาหร่ายชนิดเดียวที่มีเนื้อของสาหร่ายแตกต่างจากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิดอื่น (พิพัตน์ และวณัฐรินทร์, 2557) และสาหร่ายสีน้ำตาล มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมดังนั้นจึงถูกใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพต่อการประเมินการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมยกตัวอย่างเช่น สาหร่ายน้ำจืด *Euglena* และ *Chlorella* ถูกใช้ในการชี้วัดระดับมลภาวะทางน้ำ (Sandhyarani, 2011)



2.1.2.4 สาหร่ายสีแดง (Rhodophyta)

สาหร่ายสีแดง (red algae) จัดเป็นสาหร่ายที่มีความเก่าแก่และมีกลุ่มขนาดใหญ่ ประมาณ 5,000-6,000 ชนิด มีรงควัตถุจำพวกคลอโรฟิลล์ดี และไฟโคอีริทริน (phycoerythrin) หรือบางครั้งอาจเห็นเป็นสีน้ำเงินเพราะมีรงควัตถุพวกไฟโคไซยานิน (phycocyanin) รวมอยู่ในพลาสมิดด้วย แต่ทั้งนี้ก็มี คลอโรฟิลล์ เอ ซึ่งเป็นรงควัตถุหลักในการสังเคราะห์แสง แหล่งที่อยู่ส่วนใหญ่จะพบอยู่ตามทะเล



รูปที่ 2.4 สาหร่ายสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ที่: <http://www.thaibio.com> ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ความสำคัญของสาหร่าย

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิต มีบทบาทสำคัญคือ การสังเคราะห์ด้วยแสง โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์แล้วปลดปล่อยออกซิเจน จัดเป็น “ผู้ผลิตเบื้องต้น” (primary producer) ของห่วงโซ่อาหาร การสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายเป็นการเพิ่มออกซิเจนละลายน้ำซึ่งเป็นประโยชน์ต่อจุลินทรีย์กลุ่มอื่นที่จะนำออกซิเจนไปใช้ใน กระบวนการย่อยสลายสารต่างๆ นอกจากบทบาทด้านนิเวศวิทยา (ecological function and ecological service) แล้ว สาหร่ายยังมีศักยภาพการใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ อีกมาก ได้แก่ ด้านการเกษตร เช่น ปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) วัสดุปรับปรุงดิน (soil conditioner) อาหารสัตว์ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (ส่งเสริม/ยับยั้ง) สารควบคุมศัตรูพืช (pesticides) ด้านพลังงาน เช่น น้ำมันเชื้อเพลิงและน้ำมันหล่อลื่น และด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การบำบัดน้ำเสีย และการลดโลกร้อนโดยการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

สาหร่ายขนาดเล็กถือเป็นอีกแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจโดยเฉพาะการนำผลิตภัณฑ์ของสาหร่ายไปใช้แปรรูปเป็นพลังงานเชื้อเพลิง เรียกว่า ไบโอดีเซล เนื่องจากสาหร่ายสามารถเพิ่มจำนวนชีวมวลได้อย่างรวดเร็ว (Foidl et al., 1996) และสามารถเจริญเติบโตได้ตลอดทั้งปี จึงทำให้เกิดการศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีการเพิ่มการเจริญเติบโตของสาหร่ายเพื่อให้ได้ชีวมวลเพิ่มขึ้นซึ่งทำให้เป็นที่นิยมใช้ในงานวิจัยยกตัวอย่างเช่นสาหร่ายขนาดเล็กทำให้ไม่ต้องใช้พื้นที่มากในการเพาะเลี้ยงหรือเจริญเติบโตได้เร็วและมีวัฏจักรชีวิตสั้นทำให้อุ่นเวลาในการถ่ายถอดลักษณะจากรุ่นหนึ่งสู่อีกรุ่นหนึ่งและที่สำคัญในขณะนี้ก็มีฐานข้อมูลลำดับเบสจีโนมที่สามารถเข้าไปใช้ตรวจสอบหา ยีนที่สนใจซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

2.1.4 ประโยชน์ของสาหร่าย

2.1.4.1 ใช้เป็นอาหารมนุษย์

มนุษย์รู้จักนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์เป็นเวลานานกว่า 400 ปี ส่วนใหญ่นำมาใช้ประกอบอาหารประเทศที่นิยมบริโภคสาหร่าย ได้แก่ ญี่ปุ่น จีน เกาหลี ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย ไทย อินเดียออสเตรเลียนิวซีแลนด์ เป็นต้น ชาวจีน ญี่ปุ่น ใช้สาหร่ายสีน้ำตาล (*Laminaria*) และสาหร่ายสีแดง (*Porphyra*) หรือที่เรียกว่า จีฉ่าย มาทำอาหารพวกแกงจืด ญี่ปุ่นผสม *Chlorella* sp. ลงในชา ชุป น้ำผลไม้ บะหมี่ และไอศกรีม สาหร่ายที่สามารถใช้เป็นอาหารได้มีมากกว่า 100 ชนิด (นวรรตน์, 2551) สำหรับประเทศไทยสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่ที่สามารถนำมาทำเป็นอาหารได้มี 3 ชนิด คือ สาหร่ายเตาหรือเทาน้ำ สาหร่ายโก และสาหร่ายลอนหรือไซ่หิน ดอกหิน หรือองลอน (ยุวดี, 2554) คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด มีโปรตีนอยู่ในระดับสูงใกล้เคียงกับปลาน้ำจืด มีวิตามินหลายชนิดโดยเฉพาะวิตามินบี มีเกลือแร่ที่สำคัญหลายตัว โดยเฉพาะแคลเซียมในสาหร่ายลอน และซีลีเนียมในสาหร่ายไก่อซึ่งเป็นสารป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ ในสาหร่ายเตาพบสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมา คือ สาหร่ายโก และสาหร่ายลอนตามลำดับสาหร่ายไก่อที่ควรนำมาใช้ประโยชน์มี 2 จินัส คือ *Cladophora* sp. และ *Microspora* sp. ส่วนสาหร่ายลอนมีเพียง 1 จินัส คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nostochopsis sp. (ยุวตี, 2551) และสาหร่ายเกลียวทอง ซึ่งเป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน ในรูปของอาหารเสริมสุขภาพ เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นคือ มีปริมาณโปรตีนสูงถึง 60% และเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็น มีวิตามิน เกลือแร่ และสารให้สีธรรมชาติ จำนวนมาก นอกจากนี้สาหร่ายเกลียวทองยังมีเซลล์ขนาดใหญ่ สามารถเก็บเกี่ยวได้ง่าย ผนังเซลล์บาง จึงถูกย่อยและดูดซึมได้เร็วกว่าสาหร่ายสีเขียวซึ่งมีผนังเซลล์หนา

2.1.4.2 ใช้เป็นอาหารสัตว์

สาหร่ายสามารถนำไปเลี้ยงสัตว์ เช่น หมู และสัตว์ปีกได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังเป็นอาหารที่จำเป็นอย่างยิ่งต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อนที่กินพืชเป็นอาหาร เช่น ปลา, กุ้งและแพลงตอนสัตว์ เช่น ไรแดง และไรน้ำเค็ม ในประเทศญี่ปุ่นใช้สาหร่ายเกลียวทองเลี้ยงปลาไหล ปลาเทร้า กุ้ง ปลาคาร์พัสเป็นต้น (ไปรมา, 2546) ผลงานวิจัย เช่น การเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. จากน้ำทิ้งแหล่งชุมชนเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ การศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาหร่าย *Chlorella* sp. (K3) เป็นต้น

2.1.4.3 ใช้ในการกำจัดน้ำเสีย

การใช้สาหร่ายในการกำจัดน้ำเสียร่วมกับแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียจะทำการย่อยสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ ที่มีอยู่ให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ เช่น แอมโมเนียม, ไนเตรต, คาร์บอนไดออกไซด์ และเกลือแร่ต่าง ๆ ในสภาพที่มีอากาศ (aerobic) หรือไม่มีอากาศ (anaerobic) จากนั้นสาหร่ายจะใช้สารประกอบเหล่านี้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ เช่น สาหร่าย *Caulerpa*

2.1.4.4 ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (Blue green algae) รู้จักกันแพร่หลายในแง่ของการใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ จากการวิจัยของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในน้ำขุ่นบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศให้เป็นสารประกอบไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียม ทำให้ข้าวเจริญเติบโต ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. พันธุ์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พบในประเทศและให้ผลผลิตดี มีชื่อว่า *Anabaena siamensis*

2.1.4.5 ใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ

สาหร่ายสีแดงพวก *Gelidium*, *Gracilaria* สามารถนำไปสกัดทำเป็นวุ้น เพื่อเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ปัจจุบันห้องปฏิบัติการสาหร่ายนอกจากจะพัฒนากรรมวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นแหล่งอาหารโปรตีนแล้ว ยังได้นำสายพันธุ์สาหร่ายที่มีศักยภาพที่สามารถผลิตในทางการค้า เช่น *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Haematococcus* มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตสารอาหารหรือสารเคมีที่มีมูลค่าสูง รวมทั้งวิธีการสกัด

2.1.5 สาหร่ายที่ใช้ในงานวิจัย คือ *Chlamydomonas reinhardtii*

เมื่อจำแนกสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ตามหลักอนุกรมวิธาน พบว่า

C. reinhardtii จัดอยู่ใน

Kingdom: Plantae

Phylum: Chlorophyta

Class: Chlorophyceae

Order: Chlamydomonadales

Family: Chlamydomonadaceae

Genus: *Chlamydomonas*

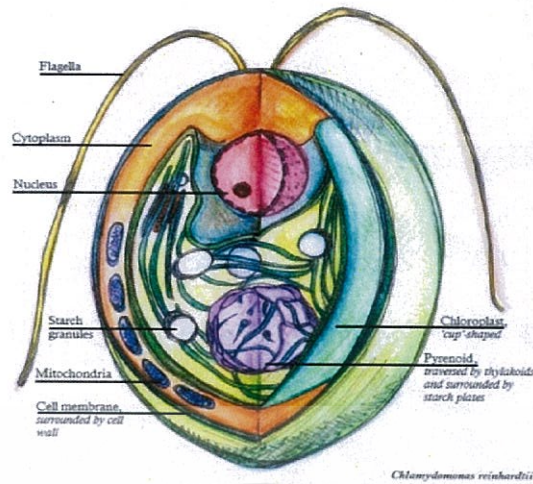
Species: *C. reinhardtii*



รูปที่ 2.5 การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา

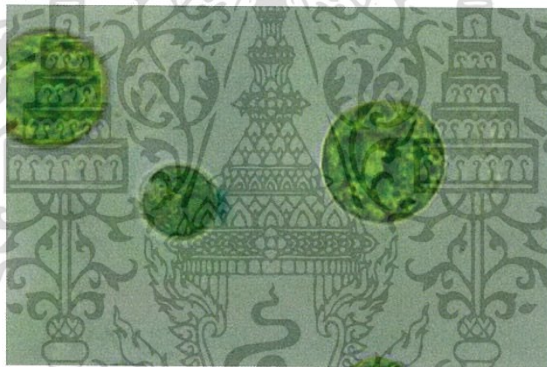
ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Chlamydomonas_reinhardtii

ลักษณะของสาหร่าย *C. reinhardtii* เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดยาวประมาณ 10 ไมครอนและกว้างประมาณ 3 ไมครอนมีแฟลกเจลลา 2 สายทางด้านหน้าสำหรับการเคลื่อนที่ภายในเซลล์มีคลอโรพลาสต์ขนาดใหญ่หนึ่งอันซึ่งกินเนื้อที่ประมาณ 40% ของเซลล์ (Rochaix, 1995) และมี อายสปอต (eyespot) อยู่ที่ขอบด้านหนึ่งของคลอโรพลาสต์ทำหน้าที่ช่วยรับแสงและทำให้เซลล์รับรู้ว่าจะเคลื่อนที่ไปยังทิศทางใด สาหร่ายชนิดนี้สามารถเลี้ยงได้ง่ายในห้องปฏิบัติการทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง สามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียว หรือ ใช้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์ ในรูปของอะซิเตทในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีแสง หรือ ไม่ต้องมีแสง



รูปที่ 2.6 ลักษณะของสาหร่าย *C. reinhardtii*

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Chlamydomonas_reinhardtii



รูปที่ 2.7 ภาพถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ *C. reinhardtii*

ที่มา: https://kingdomprotista00.files.wordpress.com/2014/12/10846818_1066358840045770_532004600_n-e1417544896324.jpg

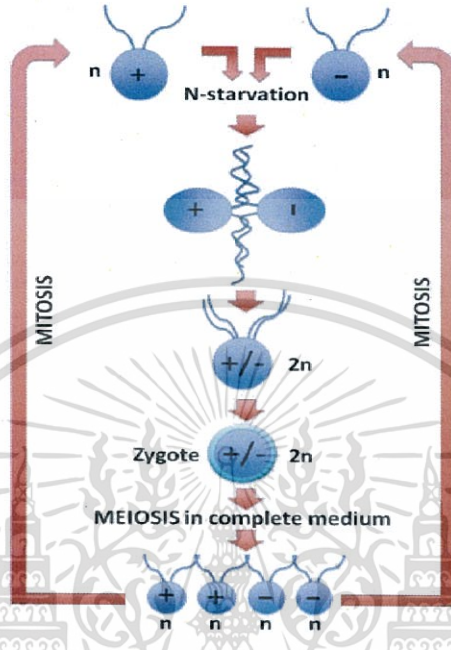
2.1.6 วงจรชีวิต *Chlamydomonas reinhardtii*

วัฏจักรชีวิตของสาหร่าย *C. reinhardtii* เริ่มจากเซลล์ในสภาพแฮพลอยด์ซึ่งจะแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสทุกๆ 8 ชั่วโมงถ้ามีอะซิเตทในอาหาร หรือประมาณ 10-12 ชั่วโมงถ้าไม่มีคาร์บอนจากอาหารแต่เมื่อสภาวะการเจริญไม่เหมาะสม เช่นเมื่อมีการขาดธาตุไนโตรเจนเซลล์จะเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนให้เซลล์กลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) โดยแต่ละเซลล์จะมีการสร้าง mating ring ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนแอกติน (actin) อยู่ได้เยื่อหุ้มเซลล์หลังจากนั้นจะหลั่ง อะกลูทินิน ซึ่งเป็นสารจำพวกไกลโคโปรตีนเพื่อกระตุ้นการจับกันของแฟลกเจลลาระหว่างเซลล์ที่มี mating type ตรงข้ามกันโดยเริ่มจากการใช้ปลายของแฟลกเจลลามาแตะกันจนกระทั่งแฟลกเจลลาของทั้งสองเซลล์สานเข้าด้วยกันทั้งสายทำให้เซลล์ทั้งสองเข้ามาอยู่ชิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่โดยโครงการวิจัยของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันและหลังเอนไซม์อัลโทไลซิน เพื่อย่อยผนังเซลล์ทำให้เซลล์ทั้งสองสามารถรวมตัวกันกลายเป็นเซลล์เดียวที่มีแฟลกเจลลา 4 สายเมื่อแฟลกเจลลาสลายไปเซลล์จะสร้างผนังเซลล์ที่มีความหนาเพื่อปกป้องไซโกตซึ่งอยู่ในรูปดิพลอยด์เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมไซโกตจะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเกิดเป็นเซลล์แฮพลอยด์ 4 เซลล์ซึ่งจะแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสต่อไป (Harris, 2001)



รูปที่ 2.8 *Chlamydomonas* life cycle

ที่มา: อัญชลี (2011)

2.1.7 บทบาทและความสำคัญ

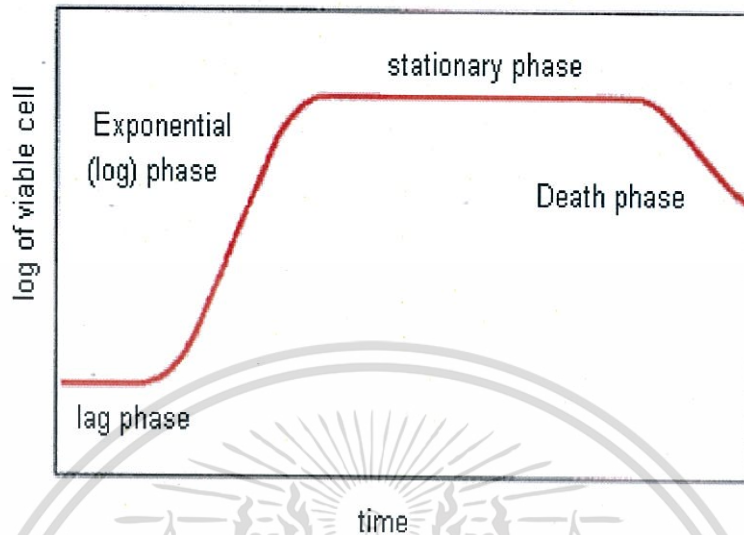
สาหร่าย *C. reinhardtii* เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบอีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในงานวิจัยหลายๆ ด้านมาเป็นเวลานาน ไม่ว่าจะเป็นงานวิจัยที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แสง ด้านการสร้างคลอโรพลาสต์ การส่งสัญญาณ การปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม กลไกการทำงานของแฟลกเจลลา การซ่อมแซมดีเอ็นเอและวงจรชีวิต จึงเป็นที่นิยมใช้ในงานวิจัยมากขึ้นจากการเริ่มโครงการหาลำดับเบสโดยexpressed sequence tag (EST) ในประเทศญี่ปุ่น (Asamizu et al., 1999; 2000) และในสหรัฐอเมริกา (Shrager et al., 2003) ซึ่งทำให้เกิดการสร้างฐานข้อมูลที่ทำให้ การศึกษาทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลง่ายขึ้น และนำไปสู่การหาลำดับเบสทั้งจีโนมในค.ศ. 2007 (Merchant et al., 2007)

2.1.8 การเจริญเติบโตของสาหร่าย

การวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย จะทำให้ทราบอัตราการเติบโต หรือ “Growth rate” ของเซลล์สาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีความสำคัญต่อการตรวจสอบประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงของสาหร่ายซึ่งอัตราการเจริญเติบโตจะมีลักษณะกราฟโค้งรูปตัว “ S ” (sigmoid curve)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งเรียกว่า เส้นโค้งการเจริญเติบโต (growth curve) โดยเส้นกราฟหรือเส้นโค้งการเจริญเติบโตแบ่งออกได้ 4 ระยะ



รูปที่ 2.9 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ที่มา : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1543/generation-time>

1) ระยะปรับตัว (Lag phase) เป็นระยะที่สาหร่ายเริ่มมีการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อม ระยะนี้สาหร่ายยังคงไม่มีการเพิ่มจำนวนความยาวของระยะ lag phase จะยาวนานเพียงใดขึ้นกับสภาพแวดล้อมและชนิดของเชื้อ

2) ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) เป็นระยะที่สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนเซลล์และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงเช่น ความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร ความเข้มข้น อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น

3) ระยะคงที่ (Stationary phase) เป็นระยะที่สาหร่ายมีการเจริญเติบโตคงที่ซึ่งหมายถึงมีการเจริญเติบโตเท่ากับอัตราการตาย เนื่องจากปริมาณธาตุลดลงอย่างรวดเร็ว และเกิดสารพิษจากขบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) หรือการสลายตัวของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

4) ระยะการตาย (Death phase) เป็นระยะที่สาหร่ายมีการหยุดการเจริญเติบโต และมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากขาดอาหารหมด และสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและมีของเสียเกิดขึ้นปริมาณมากทำให้เซลล์สาหร่ายจะเริ่มตายและจะตายเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (ผกาวิดี และคณะ, 2552)

2.2 สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

สภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายมีผลต่อการเจริญและองค์ประกอบทางชีวเคมีภายในเซลล์ของสาหร่าย โดยทั่วไปแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท ได้แก่ โฟโตออโตโทรฟิก เฮเทอโรโทรฟิก มิกโซโทรฟิก และ โฟโตเฮเทอโรโทรฟิก

2.2.1 สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic)

เป็นการเพาะเลี้ยงโดยใช้แสง เช่น แสงอาทิตย์ เป็นแหล่งพลังงาน ใช้คาร์บอนอนินทรีย์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นแหล่งคาร์บอน การเพาะเลี้ยงแบบนี้มีข้อดีคือการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของสาหร่าย และยังมีปัญหาเรื่องการปนเปื้อนน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงแบบอื่นๆ

2.2.2 สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิก (Heterotrophic)

เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงเพื่อการเจริญเติบโต ใช้สารคาร์บอนอินทรีย์เป็นทั้งแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน การเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะดังกล่าวจะช่วยแก้ปัญหาในเรื่องของปริมาณแสงที่อาจมีจำกัดเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะออโตโทรฟิกซึ่งจะส่งผลกระทบต่อความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ (ยูวดี และคณะ, 2554)

2.2.3 สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิก (Mixotrophic)

การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ มิกโซโทรฟิก สาหร่ายจะมีการสังเคราะห์แสงโดยใช้ทั้งคาร์บอนอินทรีย์และคาร์บอนอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสาหร่ายจะสามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในสภาวะที่เป็นโฟโตออโตโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก การเพาะเลี้ยงแบบนี้จะมีข้อดีหลายประการคือ อัตราการผลิตชีวมวลสูงสามารถเพาะเลี้ยงได้ดีภายใต้ความเข้มข้นของเซลล์สูงๆ และสามารถรักษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตได้ง่าย แต่การเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิก ยังมีข้อจำกัดคือเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิก โดยเฉพาะหากมีการขยายการเพาะเลี้ยงในขนาดที่ใหญ่ขึ้น และการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะ มิกโซโทรฟิกยังไม่เป็นที่แพร่หลายเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะโฟโตออโตโทรฟิกและ เฮเทอโรโทรฟิก

2.2.4 สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก (Photoheterotrophic)

การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก สาหร่ายจะใช้แสงเมื่อมีการใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นในการเพาะเลี้ยง จึงต้องใช้ทั้งแสงและน้ำตาลในเวลาเดียวกัน ข้อแตกต่างระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิก และโฟโตเฮเทอโรโทรฟิกคือสภาวะมิกโซโทรฟิก จะสามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน ขณะที่โฟโตเฮเทอโรโทรฟิกจะใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเช่นนี้ ยังมีการรายงานน้อยมาก (ยูวดี และคณะ, 2554)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายมีหลายปัจจัย โดยจะแบ่งเป็น 2 ปัจจัยใหญ่ๆ คือ ปัจจัยทางกายภาพ และปัจจัยทางเคมี

2.3.1 ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ แสงสว่าง ความเข้มและความถี่ของแสงมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายซึ่งสาหร่าย *C. reinhardtii* มีความสามารถในการดูดซับแสงในช่วงความยาวคลื่นสูงสุดของสาหร่าย 400 - 700 nm โดยส่วนใหญ่ในการทดลองเลี้ยงสาหร่ายมักใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ในการให้แสงแก่สาหร่ายเพราะมีอุณหภูมิในการให้แสงน้อยกว่าหลอดไฟประเภทอื่นๆ และมีความถี่ของแสงสม่ำเสมอ นอกจากแสงแล้วยังมีอุณหภูมิโดย อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ปกติ จะอยู่ที่ 20 - 25 องศาเซลเซียส (See, 1975)

2.3.2 ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ธาตุอาหาร ซึ่งแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามปริมาณของแร่ธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการ คือ แร่ธาตุที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณมาก ได้แก่ ธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน ไฮโดรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และ โพแทสเซียม ส่วนอีกกลุ่มคือแร่ธาตุที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณน้อย คือต้องการเป็นปริมาณมิลลิกรัมต่อลิตร หรือ ต่ำกว่านี้ แร่ธาตุเหล่านี้มีอยู่ 7 ชนิด ได้แก่ คลอรีน เหล็ก แมงกานีส โบรอน สังกะสี ทองแดง และโมลิบดีนัม ทั้งนี้แร่ธาตุอาหารแต่ละกลุ่ม มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตเท่าๆกัน (สุมาลี, 2548)

2.4 ธาตุอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii*

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กกำลังได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสาหร่ายเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีอัตราการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว เลี้ยงได้ในพื้นที่ที่จำกัดและมีต้นทุนในการผลิตต่ำ จึงเป็นข้อดีต่อการนำไปใช้ สาหร่ายสามารถผลิตสารที่มีประโยชน์ต่างๆมากมาย เช่น ในด้านอุตสาหกรรม สาหร่ายสามารถนำมาสกัดเป็นสารเคมี อาหารสัตว์น้ำ อาหารคน เป็นต้น ซึ่งการที่อุตสาหกรรมหรือห้องปฏิบัติการจะต้องการผลิตภัณฑ์ที่สาหร่ายผลิตขึ้นในปริมาณที่มาก จึงจำเป็นจะต้องทราบว่าสาหร่ายชนิดที่ทำการเพาะเลี้ยงมีความต้องการธาตุอาหารแต่ละชนิดมากน้อยเพียงใด ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่าย

ธาตุอาหาร (nutrients) ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แร่ธาตุที่สาหร่ายต้องการในปริมาณมาก (major element) ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ และ โพแทสเซียม แร่ธาตุที่สาหร่ายต้องการในปริมาณน้อย (Minor element) ได้แก่ คลอรีน เหล็ก โคบอลต์ แมงกานีส โบรอนและ วิตามินชนิดต่างๆเช่น บี12 เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไปแหล่งของคาร์บอนมาจากอากาศและการใช้แหล่งสารอินทรีย์คาร์บอน เช่น กลูโคส หรือ อะซิเตท (acetate) สาหร่ายจะสามารถมีอัตราการเจริญได้ดี แต่เป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงขึ้น (Noe, and Pauw, 1988) ส่วนไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ และโพแทสเซียม ได้จากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

ธาตุโพแทสเซียมจะช่วยให้เซลล์สาหร่ายดูดน้ำได้ดี มีบทบาทในการขนส่งและน้ำตาลไปยังส่วนอื่นๆของเซลล์ได้มากขึ้นทำให้เซลล์สาหร่ายแข็งแรง โดยจะดูดธาตุโพแทสเซียมไปใช้ในรูปโพแทสเซียมไอออน (K^+) ถ้าขาดธาตุอาหารชนิดนี้จะทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ช้า ให้ผลผลิตต่ำ

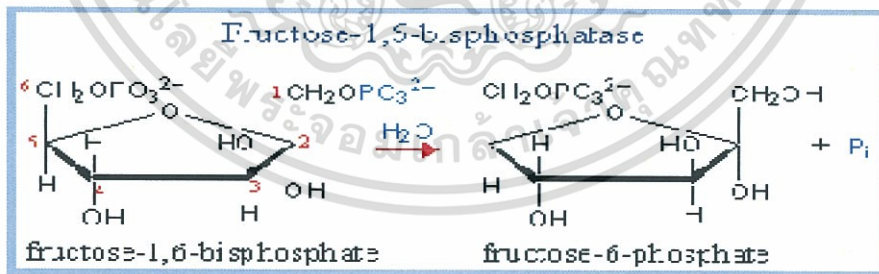
ธาตุฟอสฟอรัส ทำหน้าที่ช่วยขนส่งน้ำตาลภายในเซลล์ โดยจะอยู่ในรูปของ ฟอสเฟตไอออน ($H_2PO_4^-$) และ (HPO_4^{2-}) ถ้าขาดธาตุอาหารชนิดนี้จะทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ช้ากว่าปกติ แต่ถ้าได้รับมากเกินไปก็จะไม่เกิดผลเสียต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย (ชนิดา, 2543)

ธาตุไนโตรเจน ทำหน้าที่ช่วยทำให้สาหร่ายสร้างโปรตีนได้อย่างเพียงพอ ช่วยทำให้เซลล์มีสีเขียวเข้ม โดยจะใช้ในรูปของแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) และไนเตรทไอออน (NO_3^-)

ถ้ากล่าวถึงสาหร่าย *C. reinhardtii* ตัวอย่างสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยทั่วไป คือ สูตร TAP-Medium (Tris-Acetate-Phosphate) เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและรักษาสภาพเซลล์ของสาหร่าย *C. reinhardtii* และสูตร Sueoka's high saltmedium

2.5 ยีน *FBP1* (Fructose-1,6-bisphosphatase 1)

ยีน *FBP1* แปลงรหัสได้ เป็นเอนไซม์ FBPase ที่กระตุ้นให้เกิดการย่อย fructose 1,6-bisphosphate เป็น fructose 6-phosphate โดยใช้เอนไซม์ ย่อย fructose 1,6-bisphosphatase ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กลูโคสหรือกระบวนการสังเคราะห์แสงในวัฏจักรคัลวิน ในคลอโรพลาสต์ โดยเอนไซม์จะถูกควบคุมด้วยกระบวนการรีดออกซ์



รูปที่ 2.10 แสดงการย่อย fructose 1,6-bisphosphate เป็น fructose 6-phosphate

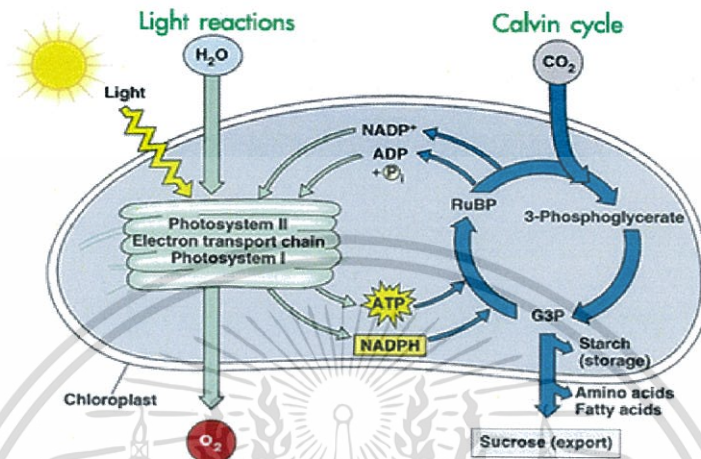
ที่มา: http://plantphys.info/plant_physiology/calvincycle.shtml

2.6 การสังเคราะห์แสง (Photosynthesis)

การสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) เป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญอย่างหนึ่ง ที่พืชและสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนพลังงานแสงให้มาอยู่ในรูปของพลังงานเคมีที่อยู่ในโมเลกุลของสารอินทรีย์ที่สร้างขึ้น พลังงานที่อยู่ในโมเลกุลสารอินทรีย์นี้ ถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานในการดำรงชีวิตของพืชและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์เพื่อการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้โดยไม่ขออนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิ่งมีชีวิตทั้งหลายบนโลก กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงนี้อาจถือได้ว่าเป็นเพียงกระบวนการเดียวของพืชและสิ่งมีชีวิตที่สามารถดึงพลังงานจากดวงอาทิตย์ให้เข้ามาหมุนเวียนในโลกดังสมการ

$$6 \text{ CO}_2 + 12 \text{ H}_2\text{O} \text{ -----} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$$


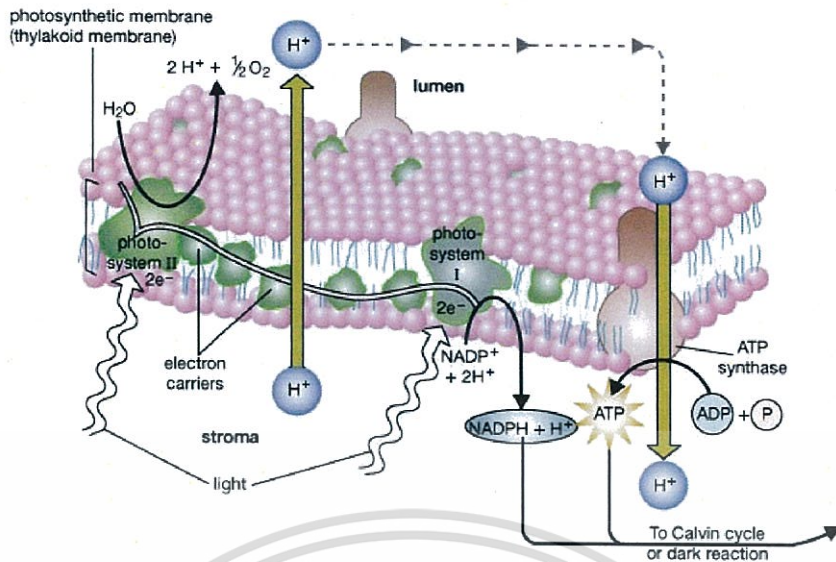
รูปที่ 2.11 การสังเคราะห์ด้วยแสงภายในคลอโรพลาสต์

ที่มา: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/photosynthesisexam/deck/10560120>

การสังเคราะห์ด้วยแสงแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ซึ่งเกิดต่อเนื่องกันในคลอโรพลาสต์

2.6.1 ปฏิกิริยาใช้แสง (Light reaction)

ปฏิกิริยาใช้แสง (light reaction) เป็นปฏิกิริยาที่ต้องใช้พลังงานแสงผลักดันให้เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากน้ำไปยัง NADP^+ ได้ NADPH และ ATP โดยในพืชชั้นสูงประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์กลุ่มของรงควัตถุมี 2 ชนิดด้วยกัน แต่ละชนิดมีความสามารถรับพลังงานแสงในช่วงคลื่นที่แตกต่างกัน กลุ่มของรงควัตถุที่รับพลังงานแสงในช่วงคลื่น 700 นาโนเมตร เรียกรงควัตถุกลุ่มนี้ว่า ระบบแสง I (photosystem I) หรือ P 700 ส่วนกลุ่มของรงควัตถุที่รับพลังงานแสงในช่วงคลื่น 680 นาโนเมตร เรียกว่า ระบบแสง II (photosystem II) ระบบแสงทั้งสองนี้จะทำงานพร้อมๆ กัน หรือในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกันมากและอยู่ภายในเยื่อไทลาคอยด์



รูปที่ 2.12 แผนภาพแสดงการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง

ที่มา: <http://www.myfirstbrain.com/thaidata/viewimage.aspx?id=1638671>

2.6.2 ปฏิกิริยาไม่ใช้แสง (Dark reaction)

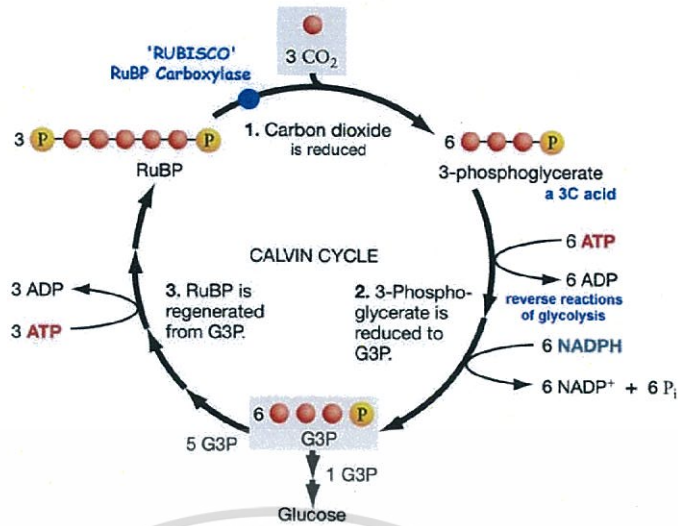
ปฏิกิริยาที่ไม่ใช้แสง (dark reaction) หรือวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) เป็นกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อสร้างสารอินทรีย์ ซึ่งต้องใช้สาร ATP และ NADPH ที่ได้จากปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสงมาสังเคราะห์น้ำตาล กระบวนการนี้เกิดขึ้นบริเวณสโตรมา ซึ่งอยู่ภายนอกไทลาคอยด์แต่อยู่ในคลอโรพลาสต์ซึ่งวัฏจักรคัลวินแบ่งเป็นขั้นตอนสำคัญๆ 3 ขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยาขั้นที่ 1 เริ่มจากสารตั้งต้นคือ RuBP ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม และหมู่ฟอสเฟต 2 หมู่ RuBP จะรวมตัวกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้เป็นสารประกอบใหม่ที่มีคาร์บอน 6 อะตอม สารที่เกิดขึ้นใหม่นี้เป็นสารที่ไม่อยู่ตัวจะสลายไปเป็น PGA 2 โมเลกุล ซึ่ง 1 โมเลกุลของ PGA จะมีคาร์บอนอยู่ 3 อะตอม และหมู่ฟอสเฟต 1 หมู่ ดังนั้น ถ้าเริ่มต้นจาก RuBP 6 โมเลกุล รวมตัวกับคาร์บอนไดออกไซด์ 6 โมเลกุลจะได้ PGA 12 โมเลกุล

ปฏิกิริยาขั้นที่ 2 จะมีการเปลี่ยนแปลงจาก PGA จนได้ PGAL โดยได้รับไฮโดรเจนจาก $\text{NADPH} + \text{H}^+$ และพลังงานจากการสลายตัวของ ATP ที่ได้จากปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง PGAL เป็นสารที่มีคาร์บอน 3 อะตอม และฟอสเฟต 1 หมู่ ดังนั้น PGA 12 โมเลกุล จะเปลี่ยนเป็น PGAL 12 โมเลกุล

ปฏิกิริยาขั้นที่ 3 PGAL ที่เกิดขึ้น 12 โมเลกุลนั้นจะเปลี่ยนแปลงต่อไปโดย 10 โมเลกุลของ PGAL จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น RuBP 6 โมเลกุล ในการเปลี่ยนแปลงนี้ต้องใช้พลังงานจากการสลายตัวของ ATP 6 โมเลกุล ที่ได้จากปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสงและใช้ฟอสเฟตที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวนี้อีก 2 หมู่ จึงเหลือหมู่ฟอสเฟตที่ได้จากการสลายตัวของ ATP เพียง 4 หมู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

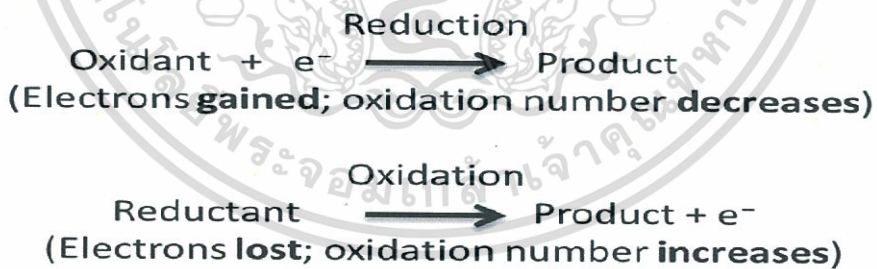


รูปที่ 2.13 วิถีจักรคาร์ลวิน (Calvin cycle)

ที่มา: https://learning.uonbi.ac.ke/courses/SBT306/scorm Packages/ path_2/ calvin_cycle_c3_pathway.html

2.7 ปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox)

ปฏิกิริยารีดอกซ์เป็นปฏิกิริยาเกี่ยวกับการรับส่งอิเล็กตรอน แบ่งได้เป็น 2 ปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นปฏิกิริยาที่เสียอิเล็กตรอน และปฏิกิริยารีดักชันเป็นปฏิกิริยาที่รับอิเล็กตรอน ดังรูปที่ 13

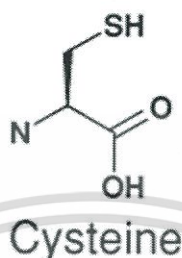


รูปที่ 2.14 สมการการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์

ที่มา: http://www.wikipremed.com/image.php?img=021400_68zzzz194550_Redox_reaction_68.jpg&image_id=194550

2.8 ซิสเทอีน (Cysteine)

เป็นกรดอะมิโนที่เป็นกลาง มีหมู่ R ที่มีขั้ว (polar) จึงชอบน้ำ (hydrophilic) ซิสเทอีน 2 โมเลกุลรวมตัวกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (S-S : disulfide bond) เป็นโมเลกุลของซิสทีน (cystine) และการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ของซิสทีนในสายโพลีเปปไทด์ทำให้เกิดโครงสร้างลำดับที่ 3 (tertiary structure) ของโปรตีน (protein) มีรหัสพันธุกรรม คือ UGU, UGC

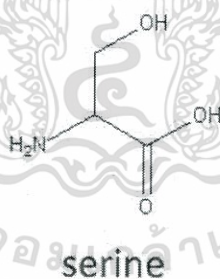


รูปที่ 2.15 โครงสร้าง ซิสเทอีน

ที่มา : <http://thuoctrinam.vn/hieu-qua-cua-l-cystein-trong-thuoc-tri-nam.shtml>

2.9 ซีรีน (Serine)

ซีรีน (serine) เป็น กรดอะมิโน (amino acid) ที่มีขั้วแต่ไม่มีประจุ (polar, uncharged) เป็นกรดอะมิโนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เพราะ หมู่ R มี หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, OH) สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ดี มีรหัสพันธุกรรม คือ UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC



รูปที่ 2.16 โครงสร้างซีรีน

ที่มา: http://www.smallscalechemistry.colostate.edu/labtop/soft_machines/buiding_enzyme/aa.html

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Tamoi et al. (2006) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับยีน *FBP1* ที่แปลรหัสได้เป็นเอนไซม์ Fructose-1,6-bisphosphatase ที่ได้มาจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงในคลอโรพลาสต์ของพืช ในพืชชั้นสูงพบว่าเมื่อมีการใส่ยีน *FBP1* เพิ่มเข้าเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปพืชยาสูบ ทำให้พืชยาสูบสามารถสังเคราะห์แสงได้มากขึ้นและส่งผลทำให้พืชยาสูบมีอัตราการเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น จากการรายงานผลงานวิจัยเบื้องต้นพบว่า พืชมีอัตราการเจริญเติบโตของรากและใบ เพิ่มขึ้น ประมาณ 1.3 - 1.5 เท่า เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง

เบญจมาศ (2011) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Botryococcus TRG* ในสภาวะที่มีการสังเคราะห์แสงเพียงอย่างเดียว (โฟโตออโตโทรฟิก) สภาวะที่มีการให้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์แต่ไม่ให้แสง (เฮเทอโรโทรฟิก) และสภาวะที่มีการสังเคราะห์แสงร่วมกับการให้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์ (มิกโซโทรฟิก) โดยใช้กลูโคสและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ TRG สามารถใช้กลูโคสและกากน้ำตาลในการเจริญเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะที่มีการสังเคราะห์แสงร่วมกับการให้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์ โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำมันสูงสุดที่ 245 มิลลิกรัมต่อลิตร และร้อยละ 37.4 ตามลำดับ เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

สงกานต์ (2535) ได้นำ *Chlorella* sp. B.K.1 เลี้ยงในอาหารสูตร Beijerinck ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยง 5 แบบ คือสภาวะ ออโตโทรฟิก ที่ความเข้มแสง 3,500 และ 1,750 ลักซ์ สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ มิกโซโทรฟิก ที่ความเข้มแสง 3500 และ 1750 ลักซ์ และสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ เฮเทอโรโทรฟิก ในที่มีด โดยผันแปรแหล่งคาร์บอน คือ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก โดยทำการวัดการเจริญและผลผลิต พบว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ มิกโซโทรฟิก ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ ภายใต้การให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตรา 60 มล./นาที่ และกรดอะซิติกเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ให้การเจริญและผลผลิตที่ดีที่สุด โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.032/ชม. ปริมาณโปรตีน เท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) และผลผลิตเท่ากับ 6.87 ไมโครกรัม/มล./ชม.

Jesse et al. (2014) ได้ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *C. reinhardtii* ภายใต้อาหารที่ปราศจากอะซิเตท เมื่อเลี้ยงร่วมกับไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. ผลการทดลองพบว่า อัตราการเจริญเติบโตของสายพันธุ์พื้นเมือง และการดัดแปลงพันธุกรรมของเชื้อ *C. reinhardtii* ที่มีอะซิเตท มีการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตในอาหารที่ไม่มี อะซิเตท ซึ่งมีการเจริญเพียงเล็กน้อย

Scarsella et al. (2010) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง 3 แบบ คือ มิกโซโทรฟิก ออโตโทรฟิก และ เฮเทอโรโทรฟิก พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบ มิกโซโทรฟิก ให้ผลดีว่าการเพาะเลี้ยงแบบ ออโตโทรฟิก และ เฮเทอโรโทรฟิก โดยสาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่า และมี lipid content ประมาณ 16.6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบ มิกโซโทรฟิก ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบ เฮเทอโรโทรฟิก และ ออโตโทรฟิก มี lipid content ประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์ และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Heredia-Arroyo et al., 2011) ซึ่งได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chlorella vulgaris เพื่อสะสมไขมันโดยเปรียบเทียบการใช้สารต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยงแบบ ออโตโทฟิก เฮเทอโรโทฟิก และ มิกโซโทฟิก พบว่าชีวมวลของสาหร่ายดังกล่าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ มิกโซโทฟิก จะมีปริมาณมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบอื่นๆ และพบว่าการใช้อะซิเตท เป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้สาหร่ายมีการเจริญดีกว่าการใช้กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงาน

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

สำหรับ *Chlamydomonas reinhardtii* สามกลุ่มที่ใช้ในการทดลอง คือ สายพันธุ์พื้นเมือง (CC125), สายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีน *FBP1* (Overexpression *FBP1*) (CpF1) และสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีน *FBP1* ที่ดัดแปลงกรดอะมิโนซีทเทอีนเป็นซีรีนเพื่อลดปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox-insensitive *FBP1*) (ReCpF23 ,ReCpF41 และ ReCpF42) ในสภาวะเจริญบนอาหารแข็ง โดยได้รับการอนุเคราะห์ชื่อมาจาก ดร. วิภาวี เตชดีศักดิ์

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหาร TAP medium (Tris-Acetate-Phosphate) และอาหาร HS (Sueoka's high salt medium)

3.2.1 สารละลายเกลือ (solution A)

- แอมโมเนียมคลอไรด์ (Ammonium Chloride)
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต (Magnesium Sulfate Heptahydrate)
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (Calcium Chloride Dihydrate)

3.2.2 ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ II (Phosphate Buffer II)

- ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (Dipotassium Phosphate)
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium Dihydrogen Phosphate)

3.2.3 Hutner's trace elements

3.2.4 โซเดียมอะซิเตทแอนไฮไดรอส (Sodium Acetate Anhydrous)

3.2.5 กรดกลูตาซีอะซิดิก (Acetic Acid)

3.2.6 ยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน (Ampicillin)

3.3 อุปกรณ์

- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Clean Bench)
- หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
- ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
- เครื่องเขย่า (Incubator shaker)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
- ตู้เย็น
- เตาไมโครเวฟ (Microwave)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อุปกรณ์วัดปริมาตร (ออโตปิเปต, กระจบอกตวง, ขวดปรับปริมาตร)
- เครื่องแก้ว (ฟลาสก์, บีกเกอร์, ขวดดูแลน, ปิเปต, เพลท)
- ปิเปต ทิป (Pipette tips)
- หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube)
- อุปกรณ์ตรวจนับจำนวนเซลล์ (Hemocytometer)
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.4.1 สภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ทำการทดลองโดยนำสาหร่าย *C. reinhardtii* 3 กลุ่ม ได้แก่ สายพันธุ์พื้นเมือง (CC125) สายพันธุ์ Overexpression *FBP1* (CpF1) และสายพันธุ์ Redox-insensitive *FBP1* (ReCpF23 ReCpF41 และ ReCpF42) มาเลี้ยงในอาหารสูตร HSA (high salt acetate medium) และ HS (high salt medium) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงในสภาวะที่มีการใช้แสงฟลูออเรสเซนต์อย่างต่อเนื่อง ที่ความเข้มแสง 2044 ลักซ์ อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm

3.4.2 การเตรียมอาหาร

3.4.2.1 TAP medium (Tris-Acetate-Phosphate)

- ทำ stock solution :

ตารางที่ 3.1 การเตรียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ II และ สารละลาย A สำหรับ อาหาร TAP

ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ II (ปรับปริมาตรในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)	สารละลาย A (ปรับปริมาตรในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร)
- ไดโทแทสเซียมฟอสเฟต 10.8 กรัม	- แอมโมเนียมคลอไรด์ 20 กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5.6 กรัม	- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 5 กรัม
	- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต 2.5 กรัม

ที่มา: Gorman, D.S. & Levine, R.P. (1965)

- ผสมอาหาร 1 โมล ทริส เบส 20 มิลลิลิตร
- บัฟเฟอร์ ฟอสเฟต II 1 มิลลิลิตร
- สารละลาย A 10 มิลลิลิตร
- โซเดียมอะซิเตทแอนไฮดรัส 1 มิลลิลิตร
- กรดกลูตาเมต 1 มิลลิลิตร
- ปรับปริมาตรสุดท้ายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ที่ pH 7
- ผสมผงวุ้น (agar) ลงไป 1.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เป็นอาหารแข็ง
- ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้ระยะเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.2 อาหาร HSA (high salt acetate medium)

- ทำ stock solution :

ตารางที่ 3.2 การเตรียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ II และ สารละลาย A สำหรับ อาหาร HS

ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ II (ปรับปริมาตรในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)	สารละลาย A (ปรับปริมาตรในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)
- ไดโทแทสเซียมฟอสเฟต 28 กรัม - โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 14.4 กรัม	- แอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัม - แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.4 กรัม - แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต 0.2 กรัม

ที่มา: Sueoka (1960)

- ผสมอาหาร ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ II 5 มิลลิลิตร
- สารละลาย A 5 มิลลิลิตร
- Hutner's trace elements 1 มิลลิลิตร
- โซเดียมอะซิเตทแอนไฮไดรส์ 1.2 กรัม
- ปรับปริมาตรสุดท้ายในน้ำกลั่น 1 ลิตร
- ผสมผงวุ้น (agar) ลงไป 1.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เป็นอาหารแข็ง
- ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัติโนมัติที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้ระยะเวลา 15 นาที

3.4.2.3 อาหาร HS (Sueoka's high salt medium)

- เตรียมเหมือน อาหาร HSA แต่จะไม่ใส่ โซเดียมอะซิเตทแอนไฮไดรส์ ($C_2H_3NaO_2$) ลงไปในอาหาร

3.4.3 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

ทำได้โดยการ subculture cell โดยใช้ลูปเชี่ยเซลล์จากจานเพาะเลี้ยงที่มีเชื้อบริสุทธิ์อยู่ ลงบนอาหารแข็ง TAP (TAP medium agar) เลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสว่าง ตลอดเวลาควรทำการ subculture cell เสมอๆ ทุก 7-14 วันเพื่อความสดของเซลล์สำหรับ

3.4.4 การวัดอัตราการเจริญเติบโต

3.4.4.1 การปรับสภาพเชื้อ

ทำการปรับสภาพเชื้อเมื่อเปลี่ยนชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากอาหารแข็ง TAP มาเลี้ยงในอาหารเหลว HS (high salt medium) และ HSA (high salt acetate medium) โดยใช้ลูปเชี่ยเชื้อ *C. reinhardtii* จากจานเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว HS และ HSA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่า ตลอดเวลา 3-4 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อจากฟลาสก์ที่ปรับสภาพขั้นแรก ลงในฟลาสก์อาหารเหลว HS และ HSA อีกครั้ง แล้วทำการเลี้ยงที่สภาวะแบบเดิมประมาณ 3-4 วัน เพื่อใช้เป็นสต็อกเชื้อ

3.4.4.2 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii*

เริ่มเลี้ยงเชื้อชั่วโมงที่ 0 โดยถ่ายเชื้อจาก สต็อกเชื้อ ลงในอาหารเหลว HS และ HSA ซึ่งจะ ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นประมาณ 5×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วสูมตัวอย่างเชื้อมา 20 ไมโครลิตร ลงใน หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ปิดฝาให้สนิท นำไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เซลล์สาหร่ายจะหยุดเคลื่อนไหวแล้วจึงนำไปนับเซลล์ จากนั้น สูมตัวอย่างเชื้อ จาก หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ 20 ไมโครลิตร หยดลงในช่องใส่ ตัวอย่าง (load port) บน ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) ที่มีกระจกปิดสไลด์ เซลล์สาหร่ายจะกระจายไปทั่วสไลด์รอให้เซลล์นิ่งประมาณ 1 นาที แล้วจึงเริ่มนับจำนวนเซลล์ โดยให้เก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง ในกรณีที่มีปริมาณเซลล์สาหร่าย จำนวนมากให้ทำการเจือจางเซลล์ก่อน และให้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.5 วิเคราะห์และบันทึกอัตราการเจริญเติบโต

นำค่าที่ได้จากการนับปริมาณเซลล์สะสมทั้งสามซ้ำของแต่ละเชื้อมาหาค่าเฉลี่ย แล้วนำไป วิเคราะห์หาค่าความคาดเคลื่อน จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาค่าถดถอย (Regression Analysis) ในแต่ละช่วงเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตแต่ละสายพันธุ์



บทที่ 4

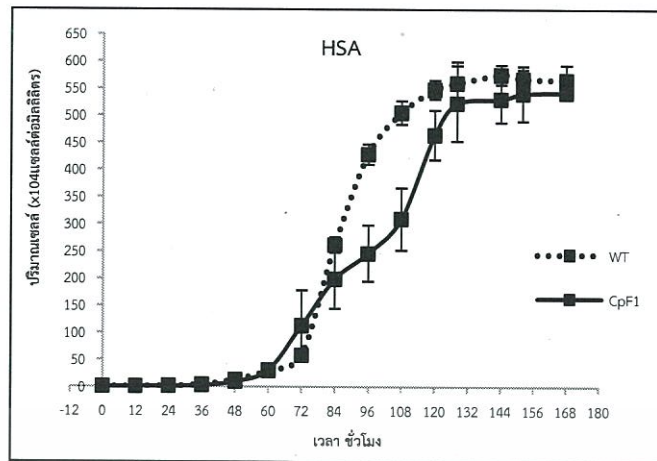
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* ระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง (CC125) กับสายพันธุ์ที่ Overexpression *FBP1* (CpF1)

4.1.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร HSA (High salt acetate medium)

ผลการทดลองพบว่าในช่วงระยะ lag phase สาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันแต่สาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CpF1 จะเข้าสู่ระยะ log phase ได้เร็วกว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ (CC125) คือ ในช่วงเวลาที่ 60 และ 72 ตามลำดับ แต่ในช่วงระยะ log phase การเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC125 มีอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงกว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CpF1 ประมาณ 1.6 เท่า ไปจนเข้าสู่ระยะ stationary phase พร้อมกันในช่วงเวลาที่ 120 (ดังรูปที่ 4.1) โดยในช่วงระยะ stationary phase นั้นสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC125 มีปริมาณการสะสมของเซลล์มากกว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CpF1 ประมาณ 1 เท่า

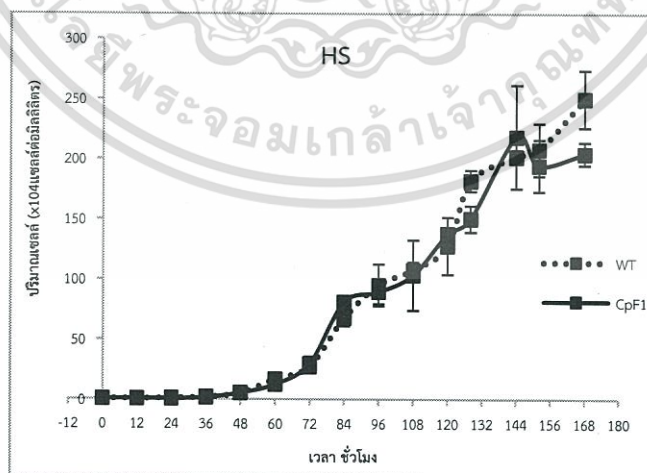
โดยจากผลการทดลอง ชี้ให้เห็นว่า การเพิ่มการแสดงออกของยีน *FBP1* นั้น อาจจะมีผลทำให้สาหร่าย *C. reinhardtii* เจริญเติบโตได้ช้าลง ซึ่งสอดคล้องกับ Wipawee and Stephen M. (2016) ได้รายงานว่าการเพิ่มโปรตีน FBPase ใน *C. reinhardtii* ส่งผลกระทบบ้างทำให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลลดลงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมืองที่ไม่ได้เพิ่ม FBPase เข้าไป ซึ่งให้ผลที่ได้แตกต่างกับงานวิจัยของ Tamoi et al. (2006) โดยได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับยีน *FBP1* ที่ได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงในคลอโรพลาสต์ของพืช ในพืชชั้นสูงพบว่าเมื่อมีการใส่ยีน *FBP1* เพิ่มเข้าไปพืชใบยาสูบ ทำให้พืชใบยาสูบสามารถสังเคราะห์แสงได้มากขึ้นและส่งผลทำให้พืชใบยาสูบมีอัตราการเจริญเติบโตของรากและใบเพิ่มขึ้นประมาณ 1.3 - 1.5 เท่า เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ทั้งนี้อาจจะเป็นผลมาจากพืชชั้นสูงและสาหร่ายมีกระบวนการเมตาบอลิซึมและการเจริญเติบโตที่ต่างกัน ผลที่ได้จากการเพิ่มการแสดงออกของยีนจึงต่างกัน



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* ระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง(CC125) และสายพันธุ์ที่ Overexpression *FBP1* (CpF1) ภายใต้สภาวะมิกโซโทฟิก (ในอาหาร HSA)

4.1.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร HS (High salt medium)

จากการทดลอง พบว่าสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ทั้งในระยะ lag phase ที่มีปริมาณเซลล์สะสมใกล้เคียงกัน และสามารถเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ log phase ได้พร้อมกันในช่วงเวลาที่ 48 เป็นต้นไป (ดังรูปที่ 4.2) โดยผลการทดลองจากการเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร HS พบว่า ยีน *FBP1* อาจจะ หรือ ไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* อย่างชัดเจนดังเช่นผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. reinhardtii* ในอาหาร HSA ซึ่งเป็นไปได้ว่า ผลการเจริญเติบโตต่างกันที่เกิดขึ้นนั้นมาจากยีน *FBP1* และการใส่อะซิเตทที่แตกต่างกันในอาหารสองชนิด



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* ระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง (CC125) กับสายพันธุ์ที่ Overexpression *FBP1* (CpF1) ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทฟิก (ในอาหาร HS)

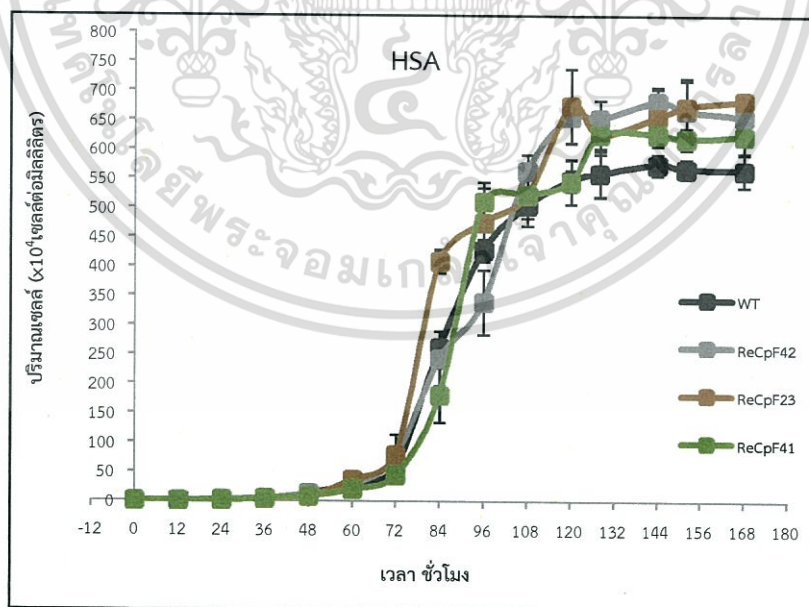
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* ระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง (CC125) กับสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive *FBP1* (ReCpF23, ReCpF41 และ ReCpF42)

4.2.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร HSA (High salt acetate medium)

จากการทดลอง พบว่าในช่วงระยะ lag phase สาหร่ายทั้งสองกลุ่มสายพันธุ์ มีแนวโน้มการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน และสามารถเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ log phase ได้พร้อมกันในช่วงเวลาที่ 72 แต่พบว่าที่ระยะ log phase ชั่วโมงที่ 72 - 96 สาหร่ายทั้งสองกลุ่มเริ่มมีการเจริญเติบโตต่างกัน โดยกลุ่มสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive *FBP1* (ReCpF23 และ ReCpF41) มีแนวโน้มเจริญเติบโตได้มากกว่าสาหร่ายสายพันธุ์พื้นเมือง (CC125) (ประมาณ 1.2 และ 1.3 เท่า ตามลำดับ) ส่วนในระยะ stationary phase ตั้งแต่ในช่วงเวลาที่ 108 เป็นต้นไป พบว่ากลุ่มสายพันธุ์ Redox-insensitive *FBP1* มีการสะสมปริมาณเซลล์ที่มากกว่า กลุ่มสายพันธุ์พื้นเมือง CC125 ประมาณ 1.1 เท่า

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การดัดแปลงยีน *FBP1* โดยลดปฏิกิริยารีดอกซ์ ซึ่งส่งผลให้ยีน *FBP1* ทำงานได้เพิ่มมากขึ้น แต่ไม่ส่งผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* เปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจน มีเพียงบางช่วงเวลาเท่านั้นที่เห็นการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น (ชั่วโมงที่ 72 - 96) ซึ่งเป็นไปได้ว่า สาหร่ายไม่ได้มีความจำเป็นต้องใช้โปรตีน *FBPase* ในปริมาณที่สูง ต่อการเพิ่มกระบวนการเจริญเติบโต อีกทั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง (Calvin cycle) ยังเกิดขึ้นในช่วงกลางวันเท่านั้น และเป็นไปได้ว่ายีน *FBP1* ไม่ได้เกี่ยวข้องต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมอื่นๆ

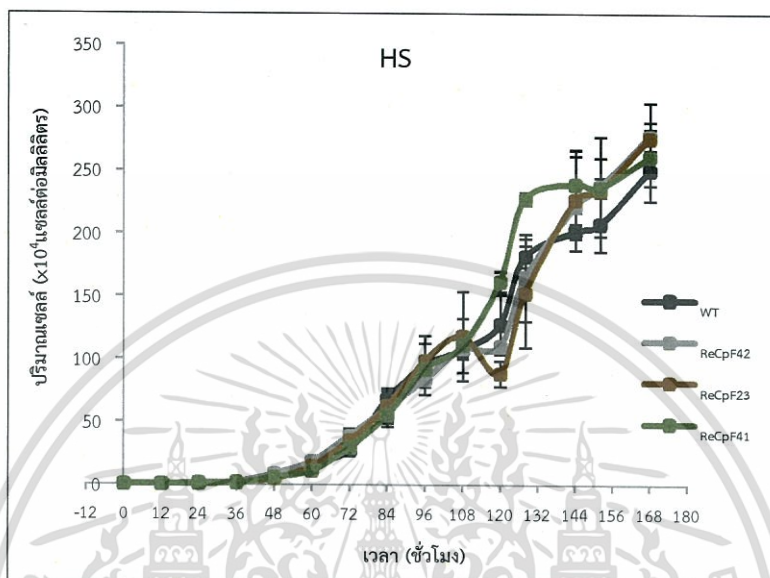


รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* ระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง (CC125) และสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive *FBP1* (ReCpF23, ReCpF41 และ ReCpF42) ภายใต้สภาวะ มิกโซโทฟิก (ในอาหาร HSA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร HS (High salt medium)

จากการทดลอง พบว่า สายร้ายทั้งสองกลุ่มมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ทั้งสามช่วงระยะของการเจริญเติบโต (ดังแสดงในรูป 4.4) ผลการทดลองนี้สนับสนุนว่ายีน *FBP1* ที่ถูกดัดปฏิกิริยารีดอกซ์ไม่ได้ส่งผลที่ดีต่อการเจริญเติบโตของสายร้าย *C. reinhardtii* แต่อย่างไร

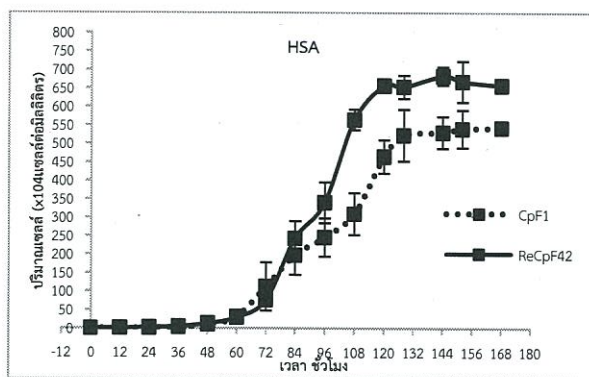


รูปที่ 4.4 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสายร้าย *C. reinhardtii* ระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง(CC125) และสายพันธุ์ที่ Redox- insensitive *FBP1* (ReCpF23, ReCpF41 และ ReCpF42) ภายใต้สภาวะโพโตออโตโทรฟิก (ในอาหาร HS)

4.3 เปรียบเทียบผลการเจริญเติบโตของสายร้าย *C. reinhardtii* ระหว่างสายพันธุ์ Overexpression *FBP1* (CpF1) กับสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive *FBP1* (ReCpF42)

4.3.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร HSA (High salt acetate medium)

จากการทดลองพบว่า ในช่วงระยะ lag phase สายร้ายทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้มการเจริญเติบโตต่างกันประมาณ 1 เท่า และสามารถเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ log phase ได้พร้อมกันในช่วงเวลาที่ 72 แต่หลังจากนั้นในระยะ log phase พบว่าสายร้าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ ReCpF42 มีแนวโน้มเจริญเติบโตได้มากกว่า สายร้าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CpF1 ประมาณ 1.9 เท่า ไปจนถึงช่วงระยะ stationary phase มีปริมาณเซลล์สะสมมากกว่า ประมาณ 1.2 เท่า

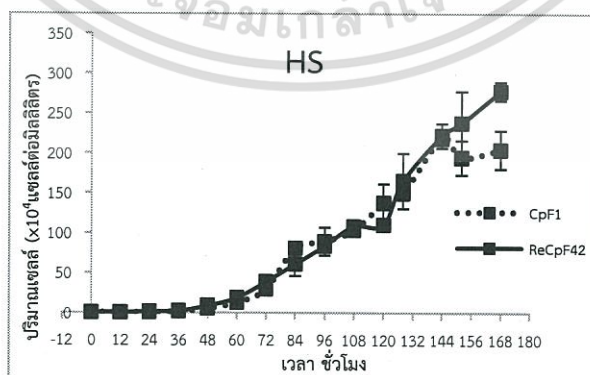


รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* ระหว่างสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive *FBP1* (ReCpF42) และสายพันธุ์ที่ Overexpression *FBP1* (CpF1) ภายใต้สภาวะมิกโซโทฟิก (ในอาหาร HSA)

4.3.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร HS (High salt medium)

จากการทดลอง พบว่าสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้มการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันในทุกช่วงเวลา โดยสามารถเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ log phase ได้พร้อมกันในช่วงเวลาที่ 48 (ดังรูปที่ 4.6) แต่ในช่วงท้ายของการทดลองแนวโน้มการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CpF1 ลดลง อาจเกิดจากความผิดพลาดในการนับ สืบเนื่องจากค่าความคลาดเคลื่อน (Error bar) บนกราฟ

จากผลการทดลองจะเห็นว่าการเพิ่มยีน *FBP1* ที่มีลักษณะแตกต่างกันในสาหร่ายนั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายต่างกัน กล่าวคือสาหร่ายสายพันธุ์ที่ Overexpression *FBP1* มีผลไปเร่งการเจริญเติบโตของสาหร่ายทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ช้าลง (Wipawee and Stephen M., 2016) ส่วนสาหร่ายสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive *FBP1* มีผลทำให้สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้เร็วขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีน *FBP1* ที่ถูกดัดแปลง ไปลดการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ ทำให้ยีนสามารถทำงานได้มากขึ้น จึงทำให้สาหร่ายมีการสังเคราะห์แสงได้มากขึ้น สาหร่ายจึงมีปริมาณเซลล์สะสมเพิ่มมากขึ้น

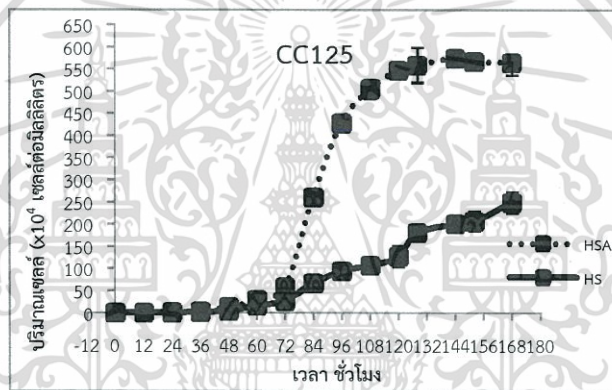


รูปที่ 4.6 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* ระหว่างสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive *FBP1* (ReCpF42) กับสายพันธุ์ที่ Overexpression *FBP1* (CpF1) ภายใต้สภาวะโพโตออโตโทฟิก (ในอาหาร HS)

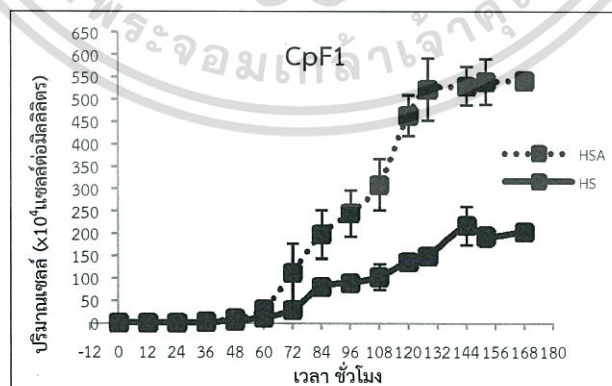
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* แต่ละกลุ่มภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (photoautotrophic) และ มิกโซโทรฟิก (mixotrophic)

จากการทดลองพบว่า สาหร่าย *C. reinhardtii* ทั้งสามกลุ่มมีอัตราการเจริญเติบโตในสภาวะมิกโซโทรฟิกได้ดีกว่าในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิก กล่าวคือ ภายใต้สภาวะทั้งสอง สาหร่ายทั้งสามกลุ่มมีการปรับตัวในระยะ lag phase ช่วง 60 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากชั่วโมงที่ 60 หรือ 72 ภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิก สาหร่ายทั้งสามกลุ่มจึงเข้าสู่ระยะ log phase และมีอัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์ที่สูงขึ้นอย่างรวดเร็วประมาณ 4.8, 3.5, 5.7 เท่า ของสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC125, CpF1, ReCpF42 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับที่สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (รูปที่ 4.7 - 4.9) ในขณะที่สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก สาหร่ายทั้งสามกลุ่มมีอัตราการเพิ่มของจำนวนเซลล์เป็นไปอย่างช้าในระยะ log phase และมีปริมาณเซลล์ที่ค่อนข้างต่ำมาก คือ เมื่อเทียบกับสาหร่ายทั้งสามกลุ่มเมื่อเลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิก

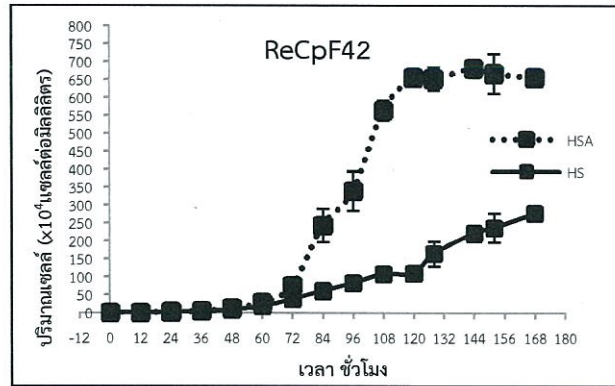


รูปที่ 4.7 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* (CC125) ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (photoautotrophic) และ มิกโซโทรฟิก (mixotrophic)



รูปที่ 4.8 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* (CpF1) ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (photoautotrophic) และ มิกโซโทรฟิก (mixotrophic)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* (ReCpF42) ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (photoautotrophic) และ มิกโซโทรฟิก (mixotrophic)

จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นให้เห็นว่า สาหร่ายทั้งสามกลุ่มสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะมิกโซโทรฟิก เนื่องจากในสภาวะมิกโซโทรฟิก ได้มีการเพิ่มแหล่งคาร์บอนคืออะซิเตท ลงในอาหารด้วย ซึ่งสาหร่ายจะมีการสังเคราะห์แสงโดยใช้คาร์บอนอินทรีย์และคาร์บอนอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน (Mata et al., 2010) ถือเป็นกรเพิ่มแหล่งธาตุอาหารให้กับสาหร่ายทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีกว่าในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิก ที่ไม่ได้มีการเพิ่มแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jesse. B et al. (2014) ได้ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *C. reinhardtii* ภายใต้อาหารที่ปราศจากอะซิเตท เมื่อเลี้ยงร่วมกับไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus sp.* ผลการทดลองพบว่า อัตราการเจริญเติบโตของสายพันธุ์พื้นเมือง และ สายพันธุ์ดัดแปลงพันธุกรรม ของเชื้อ *C. reinhardtii* ที่มีอะซิเตท มีการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตในอาหารที่ไม่มี อะซิเตท ซึ่งมีการเจริญเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ Scarsella. et al. (2010) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง 3 แบบ คือ มิกโซโทรฟิก ออโตโทรฟิก และ เฮเทอโรโทรฟิก พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบ มิกโซโทรฟิก ให้ผลดีกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ ออโตโทรฟิก และ เฮเทอโรโทรฟิก โดยสาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่า และมี lipid content ประมาณ 16.6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบ มิกโซโทรฟิก ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบ เฮเทอโรโทรฟิก และ ออโตโทรฟิก มี lipid content ประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์ และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Heredia-Arroyo. et al. (2011) ซึ่งได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* เพื่อสะสมไขมันโดยเปรียบเทียบการใช้สารต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิก เฮเทอโรโทรฟิก และ มิกโซโทรฟิก พบว่าชีวมวลของสาหร่ายดังกล่าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ มิกโซโทรฟิก จะมีปริมาณมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบอื่นๆ และพบว่าการใช้อะซิเตท เป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้สาหร่ายมีการเจริญดีกว่าการใช้กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1) ผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* ระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง (CC125) กับสายพันธุ์ที่ Overexpression *FBP1* (CpF1) พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ที่ Overexpression *FBP1* มีการเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์สะสมน้อยกว่า สาหร่ายสายพันธุ์พื้นเมือง CC125

2) ผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* ระหว่างสายพันธุ์พื้นเมือง (CC125) กับสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive *FBP1* (ReCpF23, ReCpF41, ReCpF42) พบว่า สาหร่ายสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive *FBP1* มีการเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์สะสมมากกว่า สาหร่ายสายพันธุ์พื้นเมือง CC125

3) ผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* ระหว่างสายพันธุ์ Overexpression *FBP1* (CpF1) กับสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive *FBP1* (ReCpF42) พบว่า สาหร่ายสายพันธุ์ที่ Redox-insensitive *FBP1* มีการเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์สะสมมากกว่าสายพันธุ์ที่ Overexpression *FBP1*

4) จากผลการเปรียบเทียบ ข้อ 1- 3 แสดงว่าการเพิ่มยีน *FBP1* มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* ที่เลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิก แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตเมื่อเลี้ยงในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิก จึงอาจยังสรุปไม่ได้ว่าการเพิ่มยีน *FBP1* เกี่ยวข้องโดยตรงกับการเจริญเติบโตสาหร่าย *C. reinhardtii*

5) จากผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* ทั้ง 3 กลุ่ม ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (photoautotrophic) และ มิกโซโทรฟิก (mixotrophic) พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิก(mixotrophic) มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่า การเลี้ยงในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (photoautotrophic) ซึ่งมีความแตกต่างกัน ดังนั้น อะซิเตทมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii*

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่ายโดยใช้วิธีพันธุวิศวกรรมต่อไป ที่จะทำให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิก เพื่อเป็นประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจ

5.2.2 หลังจากที่ได้กราฟอัตราการเจริญเติบโตแล้ว ควรนำสาหร่ายสายพันธุ์ที่ได้ทำการตัดแปลงพันธุกรรมไปตรวจสอบในระดับเอนไซม์เพื่อให้แน่ชัดว่าเอนไซม์ที่ได้ทำการเปลี่ยนนั้น ได้ถูกตัดพันธุกรรมออกจริงหรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ผกาวดี แก้วกันเนตร. 2552. ศักยภาพการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ได้จากสาหร่าย. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา.
- ผกาวดี แก้วกันเนตร , พนิดา รัตนพลที และพรเทพ ถนนแก้ว . 2552. การเพาะเลี้ยงและการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลที่ยั่งยืน. กรุงเทพฯ : ฐานข้อมูลโครงสร้างพื้นฐานภาครัฐด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.
- พิพัฒน์ และณัฐรินทร์. 2556. ความแปรปรวนของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเตา และสาหร่ายลอนในแหล่งน้ำธรรมชาติของจังหวัดเพชรบูรณ์. เพชรบูรณ์ : มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.
- ยุวดี พีรพรพิศาล 2546. สาหร่ายสไปรูลินา. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา (Phycology). พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ยุวดี พีรพรพิศาล 2551. “สาหร่ายน้ำจืดที่กินได้ในภาคเหนือของประเทศไทย.” *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง*. 2(1) : 178-189
- ยุวดี พีรพรพิศาล, ศุภรินทร์ ไชยกลางเมือง, จีรพร เพกเกาะ, ชยากร ภูมาศ, กรองกาญจน์ จันดี และ สุนิสา บุญมา. 2553. การพัฒนาการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงจากสาหร่ายขนาดเล็ก ระยะที่ 1. เชียงใหม่ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ยุวดี พีรพรพิศาล และคณะ. 2557. “สาหร่ายขนาดใหญ่ที่เป็นอาหารในภาคเหนือของประเทศไทย.” *วารสารวิทยาศาสตร์ สหาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์*. 3(58) : 164-173.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2524. *เพลงก่ตอนวิทยาเบื้องต้น*. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2543. *คู่มือการเลี้ยงเพลงก่ตอน*. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2544. *เพลงก่ตอนพืช*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อัญชลี ศิริขจรกิจ. 2011. “สาหร่ายเซลล์เดียวแคลมิดิโอไมแนส (*Chlamydomonas reinhardtii*) กับงานวิจัยทางพันธุศาสตร์.” *Thai Journal of Genetics*. 4(1) : 9-21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สุมาลี ดุลยอนุกิจ. 2636. ผลของไนโตรเจนฟอสเฟตต่อการเจริญของสาหร่ายเขียวทอง. จันทบุรี: สถาบันวิจัยระมงน้ำจืด กรมประมง.
- สกันต์ พูลทวี. 2535. สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Chlorella sp.* สายพันธุ์ B.K.1. กรุงเทพมหานคร : ฐานข้อมูลวิทยานิพนธ์ไทย
- Ana, P., Abreu, F., Bruno, A., Antonio. Vicente, T., Jose, D., Giuliano. 2012. "Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source". *Bioresource Technology*. 118 : 61-66.
- Asamizu, E., Miura, K., Kucho, K., Inoue, Y., Fukuzawa, H., Ohyama, K., Nakamura, Y. and Tabata, S. 2000. "Generation of expressed sequence tags from low-CO₂ and high-CO₂ adapted cells of *Chlamydomonas reinhardtii*". *DNA Res*, 7 : 305-307.
- Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S., Fukuzawa, H. and Tabata, S. 1999. "A large scale structural analysis of cDNAs in a unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*". I Generation of 3433 non-redundant expressed sequence tags. *DNA Res*, 6 : 369-373.
- Foidl, N., Foidl, G., Sanchez, M., Mittelbach, M. and Hackel, S. 1996. "Jatropha curcas as a source for the production of biofuel in Nicaragua". *Bioresource Technology*. 58 : 77-82.
- Huang, G.H., Chen, F., Wei D., Zhang, X.W. and Chen, G. 2010. "Biodiesel production by microalgal biotechnology". *Applied Energy*. 87 : 38-46.
- Illman, AM., Scragg, AH. and shales, SW. 2000. "Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium". *Enzyme Microb Technol*. 27 : 631-635.
- Jesse, B., Therien, Oleg, A., Zadvornyy, Matthew, C., Posewitz, Donald, A., Bryant, and John, W., Peters, 2014. "Growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in acetate-free medium when co-cultured with alginate-encapsulated, acetate-producing strains of *Synechococcus sp.* PCC 7002". *Therien et al Biotechnology for Biofuels*. 7 : 157.
- Mandal, S. and Mallick N. 2009. "Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production". *Appl Microbiol Biotechnol*. 84 : 281-291.
- Masahiro, T., N., Miki, M., Yoshiko, and Shigeoka, S. 2006. "Contribution of Fructose-1,6-bisphosphatase and Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase to the Photosynthetic Rate and Carbon Flow in the Calvin Cycle in Transgenic Plants". *Plant Cell Physiol*. 47(3): 380-390.
- M.B., Venkataramana Reddy, S.S., Lakshamana Rao AND C.S., Rao. 2013. "Preliminary study of different medlas and various process parameters on

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- the growth of blue-green algae (*Anabaena Ambigua*)". *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 4(3) : 140-148.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, et al. 2007. "The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions". *Science*. 318 : 245-250.
- Miao, X.L. and Wu, Q.Y. 2004. "High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*". *Journal of Biotechnology*, 110 : 85-93.
- Noue, J., D.L. and de Pauw, N.D. 1988. "The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae". *Biotechnol*, 6(4) : 725-70.
- Rochaix, J-D. 1995. "*Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast". *Ann Rev Genet*. 29 : 209-30.
- Shrager, J., Hauser, C., Chang, C-W., Harris, E.H., Davies, J., McDermott, J., Tamse, R., Zhang, Z. and Grossman, A.R. 2003. "*Chlamydomonas reinhardtii* Genome Project". A Guide to the Generation and Use of the cDNA Information. *Plant Physiol*. 13 : 401-408.
- Scarsella, M., Belotti, G., De., Filippis, P., Bravi, M. 2010. "Study on the optimal growing conditions of *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactors". *Chemical Engineering Transactions*. 20 : 85-90.
- Wipawee Dejitsakdi, Stephen, M., Miller, 2015. "Overexpression of Calvin cycle enzyme fructose 1,6-bisphosphatase in *Chlamydomonas reinhardtii* has a detrimental effect on growth". *Algal Research* 14 : 116-126.
- [Online]. Available : <http://www.examplesof.net/2014/04/example-of-green-algae-chlorophyceae.html#.V4iV19w71h4>
- [Online]. Available : <https://www.ohio.edu/plantbio/vislab/algaeimage/pages/laminaria.html>
- [Online]. Available : <http://www.thaibio.com>
- [Online]. Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Chlamydomonas_reinhardtii
- [Online]. Available : https://kingdomprotista00.files.wordpress.com/2014/12/10846818_1066358840045770_532004600_n-e1417544896324.jpg
- [Online]. Available : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1543/generation-time>
- [Online]. Available : http://plantphys.info/plant_physiology/calvincycle.shtml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online]. Available : <https://www.studyblue.com/notes/note/n/photosynthesisexam/deck/10560120>

[Online]. Available : <http://www.myfirstbrain.com/thaidata/viewimage.aspx?id=1638671>

[Online]. Available : https://learning.uonbi.ac.ke/courses/SBT306/scormPackages/path_2/calvin_cycle_c3_pathway.html

[Online]. Available : http://www.wikipremed.com/image.php?img=021400_68zzzz194550_Redox_reaction_68.jpg&image_id=194550

[Online]. Available : <http://thuoctrinam.vn/hieu-qua-cua-l-cystein-trong-thuoc-trinam.shtml>

[Online]. Available : http://www.smallscalechemistry.colostate.edu/labtop/soft_machines/building_enzyme/aa.html



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก-1 การเตรียม TAP medium

ก-1.1 การทำ stock solution

1) สารละลาย A

แอมโมเนียม คลอไรด์	20.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	5.0	กรัม
แคลเซียม คลอไรด์ ไดไฮเดรต	2.5	กรัม

ปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

2) ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ II

ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต	10.8	กรัม
โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	5.6	กรัม

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3) Hutner's trace elements

ก-1.2 การผสมอาหาร

1 โมล ทริส เบส (e.g. Trizma)	20.0	มิลลิลิตร
ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ II (2)	1.0	มิลลิลิตร
สารละลาย A (1)	10.0	มิลลิลิตร
Hutner's trace elements (3)	1.0	มิลลิลิตร
กรดกลูตาเมต	1.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร สำหรับอาหารแข็งให้เพิ่ม ผลวุ้น 15 กรัมต่อลิตร

ปรับ pH 7.0 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก แล้วนำไปฆ่าเชื้อ

ก-2 การเตรียม Sueoka's high salt medium

ก-2.1 การทำ stock solution:

1) สารละลายเกลือ

แอมโมเนียม คลอไรด์	100.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	4.0	กรัม
แคลเซียม คลอไรด์ ไดไฮเดรต	2.0	กรัม

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร

2) สารละลายฟอสเฟต

ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต	288	กรัม
โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	144	กรัม

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร

3) Hutner's trace elements

ก-2.2 การผสมอาหาร

สารละลายเกลือ (1)	5.0	มิลลิลิตร
สารละลายฟอสเฟต (2)	5.0	มิลลิลิตร
Hutner's trace elements (3)	1.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วใส่ โซเดียมอะซิเตทแอนไฮดรัส 1.2 กรัม
แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ สำหรับอาหารแข็งให้เพิ่ม กล้วย 15 กรัมต่อลิตร สามารถเติมสารสกัดจากยีสต์
4.0 กรัมต่อลิตร แต่ไม่แนะนำในอาหารเหลวเนื่องจากเสี่ยงต่อการปนเปื้อนแบคทีเรีย

ก-3 การเตรียม stock แอมพิซิลิน

เตรียมโดยชั่ง แอมพิซิลิน (ampicilin) มา 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มี
ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

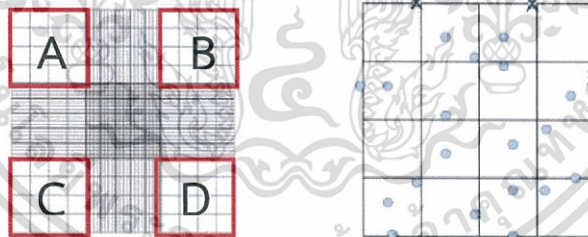
ภาคผนวก ข

วิธีวิธีการวิเคราะห์

ข-1 การนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้นับจำนวนเซลล์ ประกอบด้วยส่วนที่เป็นสไลด์ (slide) และแผ่นปิดสไลด์ (cover slide) สไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์ 1 อัน จะมีตารางสี่เหลี่ยมเล็กๆ 2 ตารางอยู่ที่ตรงกลางสไลด์โดยแต่ละตารางจะมี พื้นที่เท่ากับ 1 มิลลิเมตร² จะมีความลึก 1/10 มิลลิเมตร บริเวณรอบตารางสี่เหลี่ยมจะล้อมรอบด้วยร่องลึกขนาดใหญ่ให้น้ำขังได้ นิยมใช้สำหรับนับสหายขนาดเล็ก (0.5 – 10 ไมครอน) สไลด์นับเซลล์แบบนี้จำเป็นต้องใช้ปริมาณที่แน่นอนสามารถ ใช้นับสหายที่ยังมีชีวิตและตายแล้ว โดยมีวิธีการดังนี้

1. สุ่มตัวอย่างเชื้อ หยดลงในช่องใส่ตัวอย่างบน ฮีมาไซโตมิเตอร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
2. เซลล์สหายจะกระจายไปทั่วสไลด์รอให้เซลล์นิ่งประมาณ 1 นาที แล้วจึงเริ่มนับจำนวนเซลล์ โดยให้เก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง
3. วางสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์ บนแท่นกลิ้งจุลทรรศน์ปรับกล้องและเริ่มนับจากกำลังขยายจากค่าต่ำไปสูงถึง 40 เท่า
4. นับเซลล์สหายบนช่องสี่เหลี่ยมใหญ่สี่มุม (4 ช่องใหญ่ซึ่งประกอบด้วยตารางขนาดเล็กจำนวน 16 ช่อง)
5. คำนวณปริมาณเซลล์ได้ดังนี้



รูปที่ ข-1 ช่องนับตัวอย่างฮีมาไซโตมิเตอร์

ที่มา: <http://www.abcam.com/protocols/counting-cells-using-a-Haemocytometer>

จากรูป ช่อง A B C D มีความกว้างและยาวเท่ากับ 1 มิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรของน้ำในช่อง A B C หรือ D ช่องใดช่องหนึ่ง

$$\begin{aligned}
 &= \text{ความกว้าง} \times \text{ความยาว} \times \text{ความลึก} \\
 &= 1 \text{ มม.} \times 1 \text{ มม.} \times 0.1 \text{ มม.} \\
 &= 0.1 \text{ ซม.} \times 0.1 \text{ ซม.} \times 0.01 \text{ ซม.} \\
 &= 0.0001 \text{ ลบ.ซม. หรือ } 0.0001 \text{ มล.} \\
 &= 10^{-4} \text{ มล.}
 \end{aligned}$$

ดังนั้น หากเลือกนับที่ช่อง A B C และ D = $(A + B + C + D)/4 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-3 วิธีการใช้โปรแกรม SPSS (เวอร์ชัน IBM SPSS Statistics 20)

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) หรือเรียกย่อๆว่า ANOVA เป็นวิธีหนึ่งในการทดสอบสมมติฐานเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างมากกว่า 2 กลุ่มขึ้นไปพร้อมๆกัน ซึ่งใช้หลักการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างกลุ่มเดียวหรือ 2 กลุ่มในการใช้ตาราง z หรือ ตาราง t ทดสอบ

- 1) เปิดโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 ขึ้นมา
- 2) เลือก Type in data เพื่อทำการป้อนข้อมูลใหม่
- 3) คลิกที่ Variable View เพื่อกำหนดตัวแปร ส่วนหน้าต่าง Data View นั้นเป็นหน้าต่างข้อมูล
- 4) กำหนดตัวแปรที่ต้องการที่ช่อง Name และกำหนดค่าตัวแปรที่ต้องการที่ช่อง Values จะปรากฏหน้าต่าง Value labels ขึ้นมาให้เรากำหนดค่าตัวแปร ตั้งค่าเสร็จแล้วกดปุ่ม OK
- 5) เลือกชนิดของข้อมูลที่ช่อง Type จะปรากฏหน้าต่าง Variable Type ให้เลือกชนิดของข้อมูลเป็นตัวเลข ตัวหนังสือ ฯลฯ กรณีนี้ต้องการป้อนข้อมูลเป็นตัวเลข ด้านขวามือจะมีช่องให้ใส่จำนวนตัวเลขหน้าจุดทศนิยม (Width) และจำนวนตัวเลขหน้าจุดทศนิยม (Decimal Places)
- 6) เลือกประเภทของข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์ Scale, Ordinal or Nominal
- 7) กรอกข้อมูลที่ได้จากการทดลองตามตัวแปรที่เรากำหนดไว้ในช่อง Data View
- 8) คำแนะนำสถิติโดยไปที่เมนู Analyze > Compare Means> One-Way ANOVA
- 9) เลือกตัวแปรที่ระบุกลุ่ม (ชุด) แล้วกดปุ่ม > ให้มาอยู่ในช่อง Factor จากนั้นเลือกหัวข้อที่จะทดสอบ กดปุ่ม > ให้มาอยู่ในช่อง Dependent List
- 10) หากต้องการทดสอบหาค่าเฉลี่ยของกลุ่มที่แตกต่างกันกดปุ่ม Post Hoc เลือกช่อง Duncan กดปุ่ม Continue
- 11) หากต้องการค่าสถิติของกลุ่มตัวอย่าง กดปุ่ม Options เลือก Descriptive กดปุ่ม Continue กดปุ่ม Ok เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลจะปรากฏหน้าต่างแสดงข้อมูลดังนี้
 - 11.1) ตารางค่าสถิติต่างๆของกลุ่ม (ภายใต้หัวข้อ Oneway, Descriptives ของ output tree) ตาราง ANOVA (ภายใต้หัวข้อ Oneway, Descriptives ของ output tree) แสดงในรูปจากตารางค่า sig.<0.05 นั่นคือค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างอย่างน้อย 1 คู่ มีค่า แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 - 11.2) ตารางผล multiple comparison (ภายใต้หัวข้อ Oneway, Descriptives ของ output tree)

ภาคผนวก ค

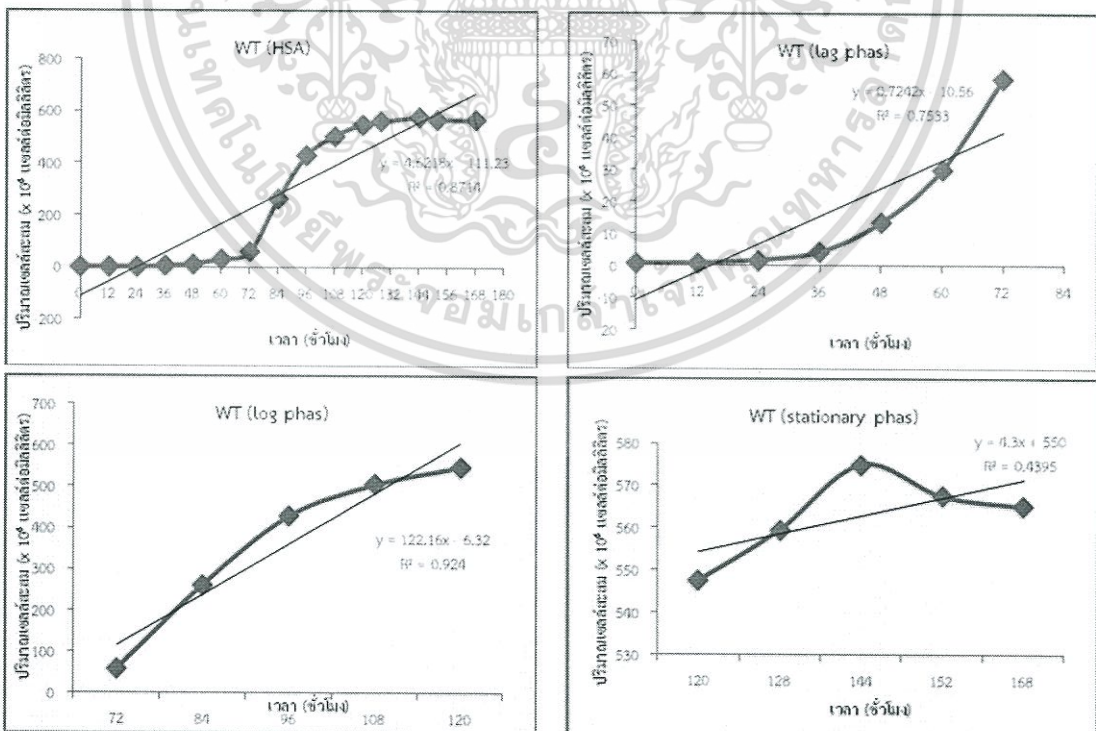
ข้อมูลผลการทดลอง

ค-1 ปริมาณเซลล์สะสมสูงสุดของสาหร่าย *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์

ตารางที่ ค-1 ปริมาณเซลล์สะสมของสาหร่าย *C. reinhardtii* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร HS และ HSA

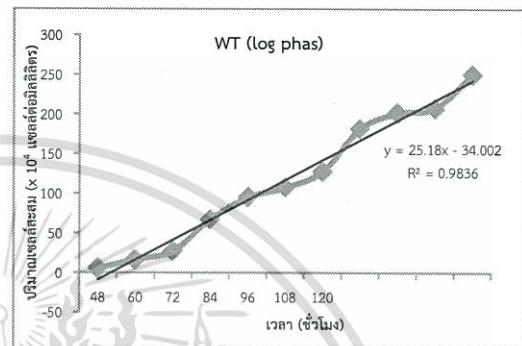
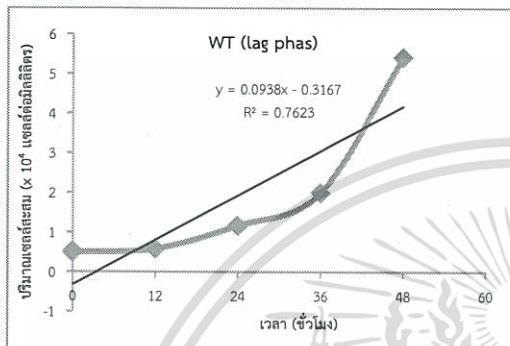
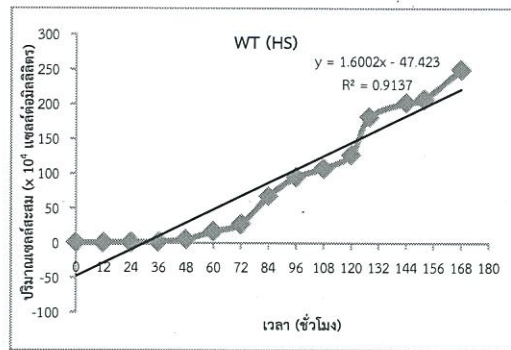
สายพันธุ์ของสาหร่าย	ปริมาณเซลล์สะสมสูงสุด ($\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิกรัม)	
	HS	HSA
<i>C. reinhardtii</i> CC125	250.83	575
<i>C. reinhardtii</i> CpF1	218.33	542
<i>C. reinhardtii</i> ReCpF23	275.83	684.17
<i>C. reinhardtii</i> ReCpF41	260.83	626.67
<i>C. reinhardtii</i> ReCpF42	277.5	682.5

ค-2 กราฟแสดงการวิเคราะห์หาค่าถดถอย (Regression Analysis)

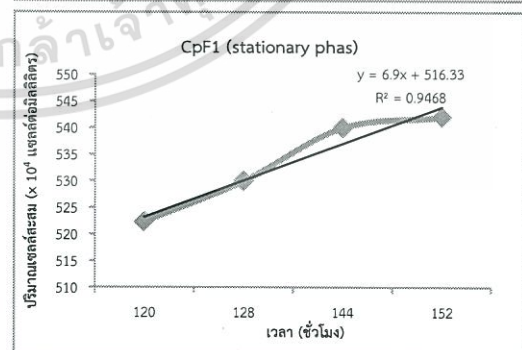
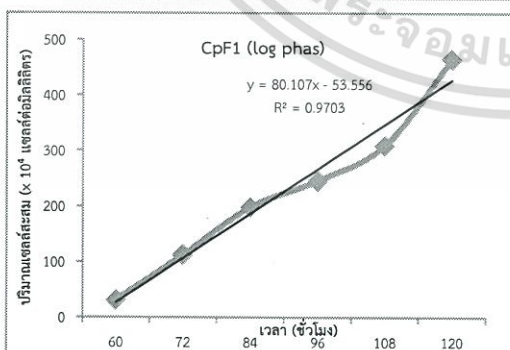
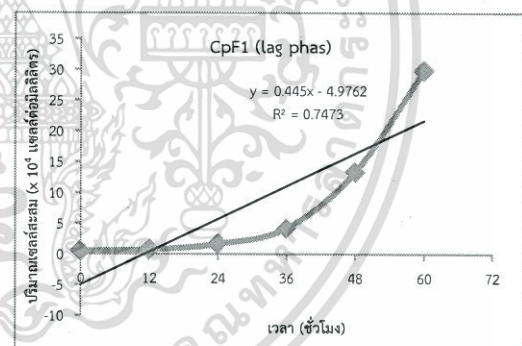
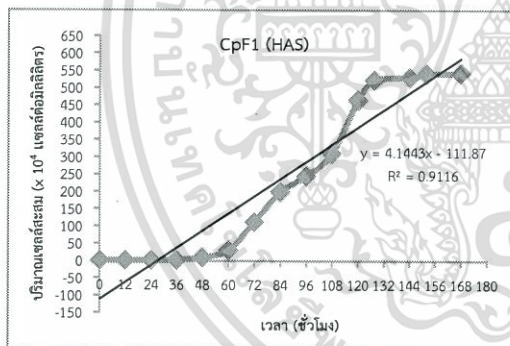


รูปที่ ค-1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC125 ในช่วงระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะмикโซโทรฟิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

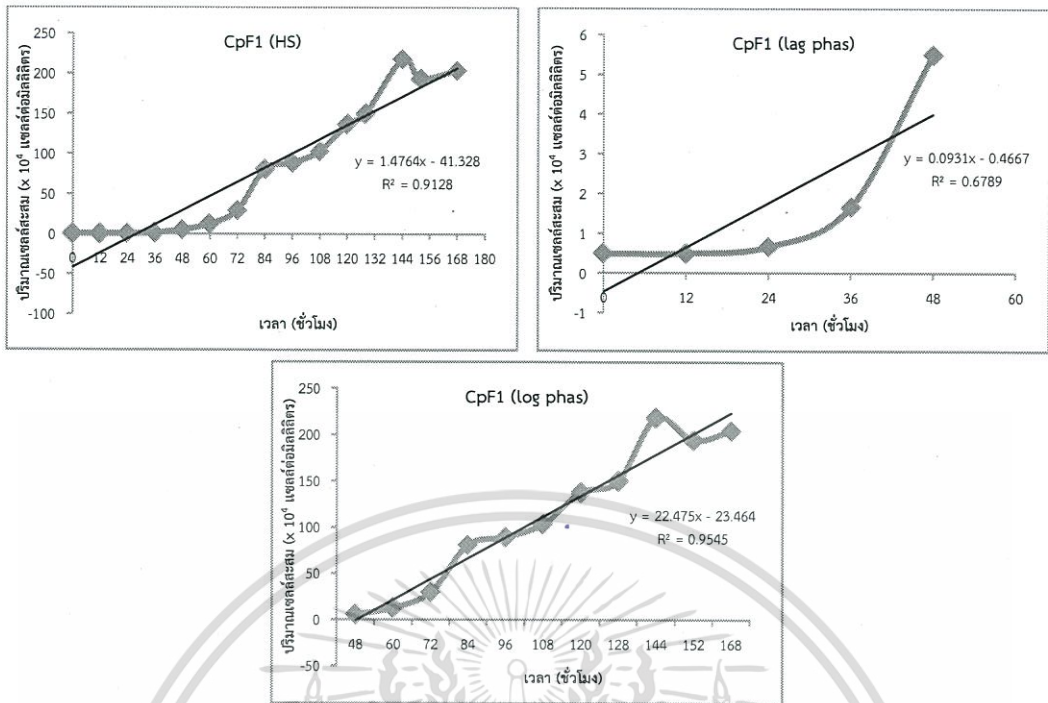


รูปที่ ค-2 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC125 ในช่วงระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก

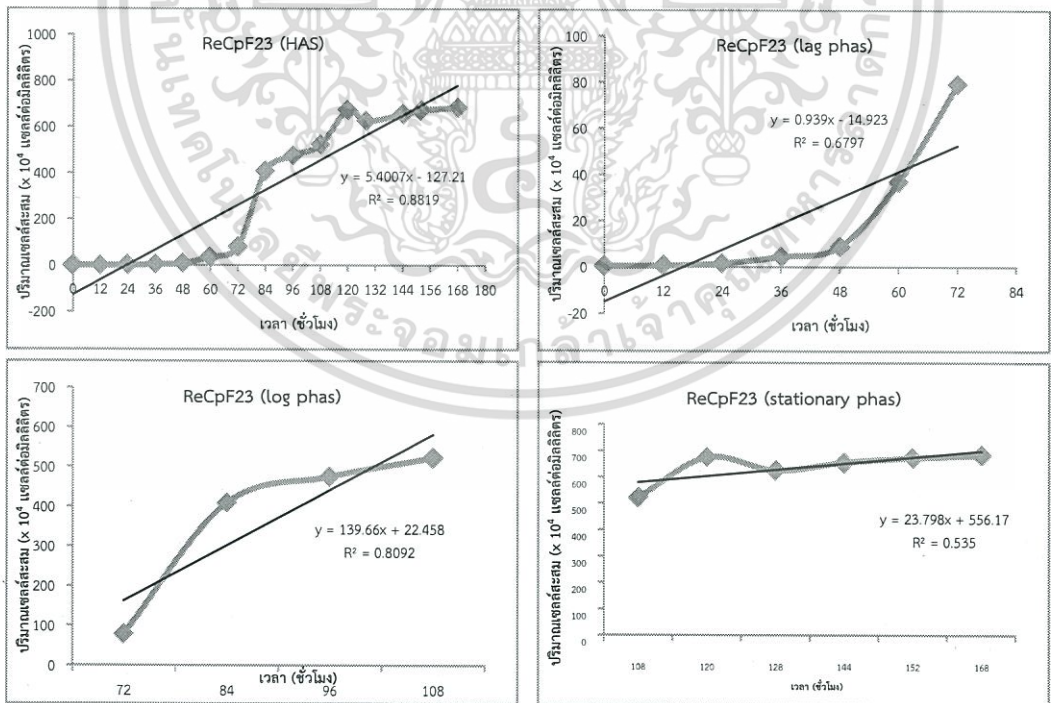


รูปที่ ค-3 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CpF1 ในช่วงระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะมิกโซโทรฟิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

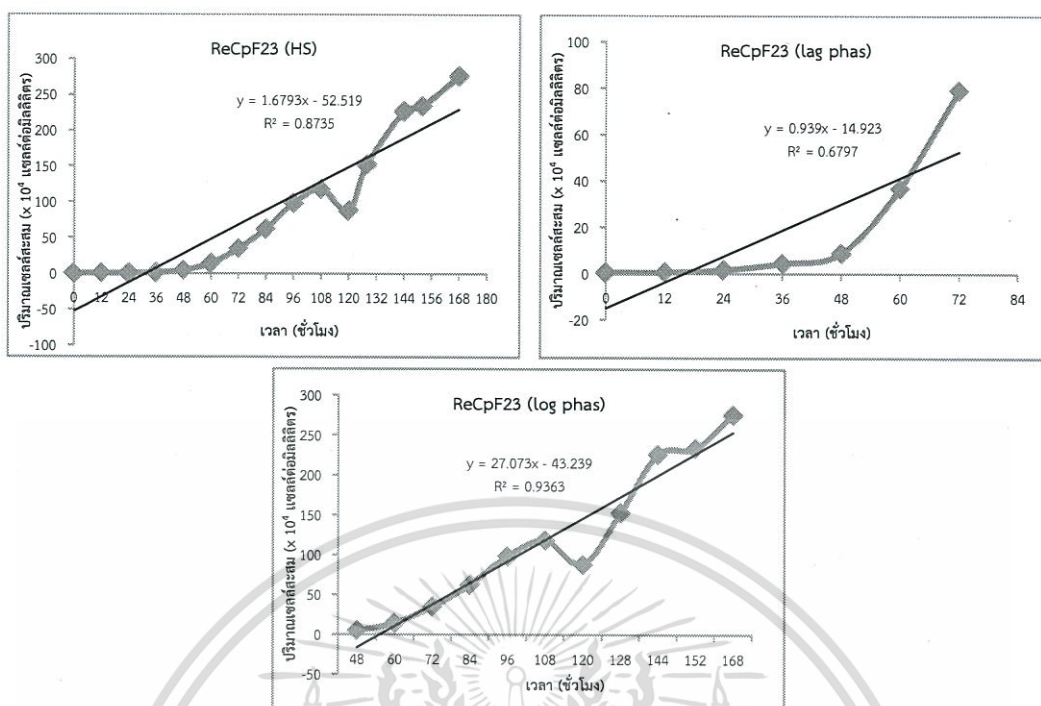


รูปที่ ค-4 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CpF1 ในช่วงระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก

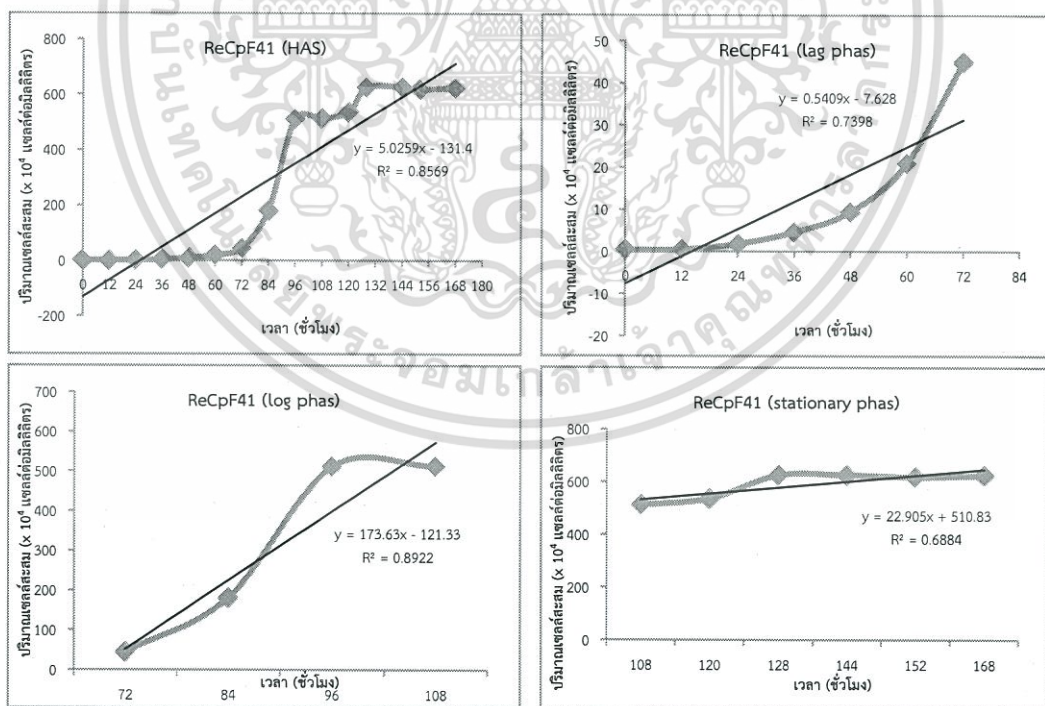


รูปที่ ค-5 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ ReCpF23 ในช่วงระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะมิกโซโทรฟิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

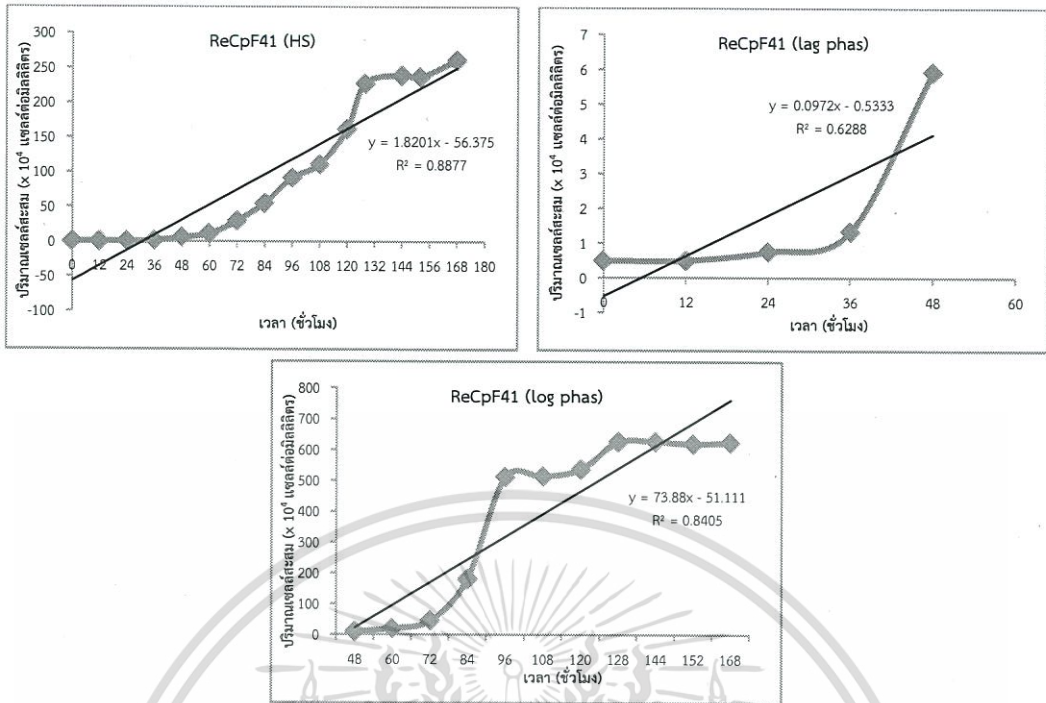


รูปที่ ค-6 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ ReCpF23 ในช่วงระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก

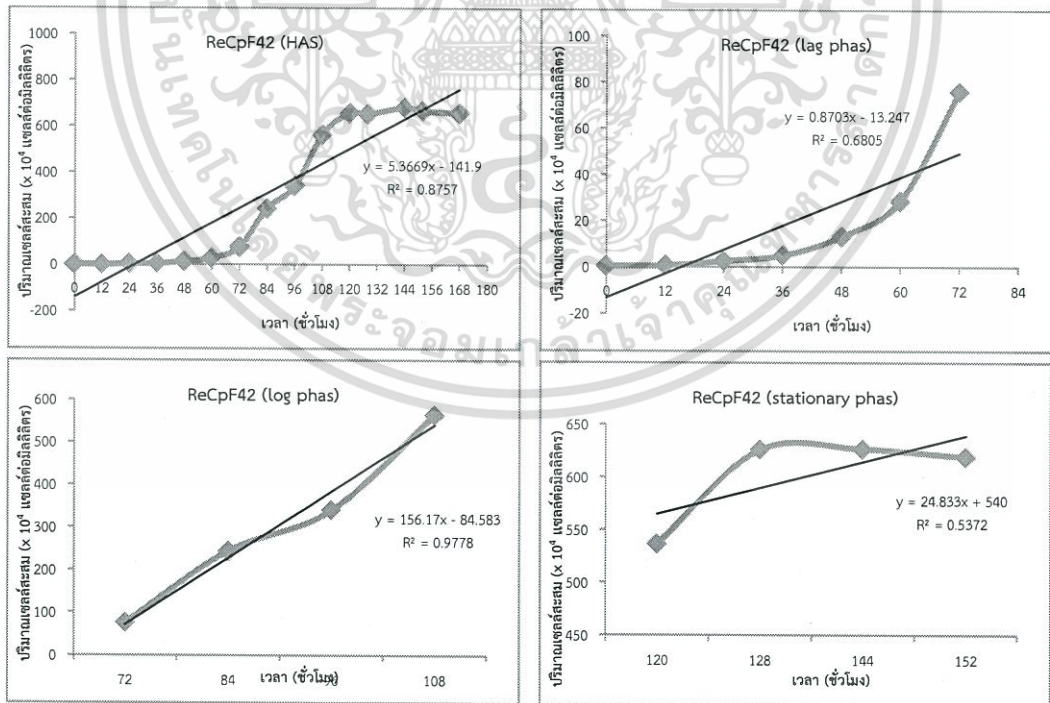


รูปที่ ค-7 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ ReCpF41 ในช่วงระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะมิกโซโทรฟิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

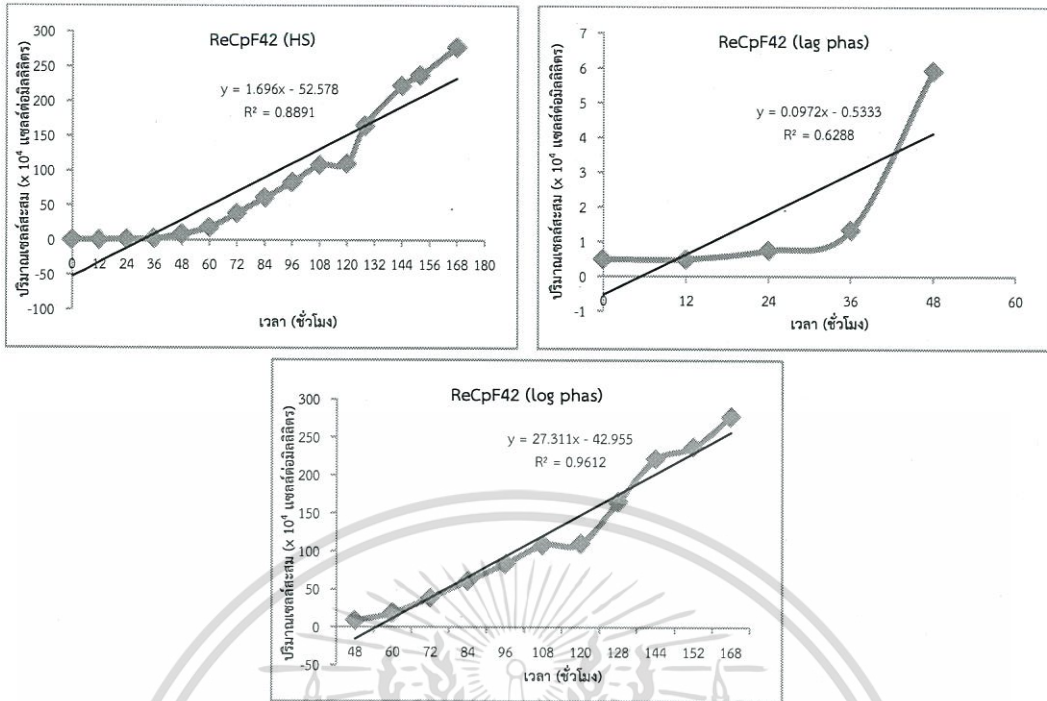


รูปที่ ค-8 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ ReCpF41 ในช่วงระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก



รูปที่ ค-9 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ ReCpF42 ในช่วงระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะมิกโซโทรฟิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-10 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ ReCpF42 ในช่วงระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ที่สภาวะโฟโตออโตโทฟิก