

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์

FACTORS AFFECTING GROWTH OF CYANOBACTERIA FOR
CAROTENOID PRODUCTION

กนกอร จารุจารีต
KHANOK-ON JARUJAREET

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของงานที่ศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2543

ISBN 974-622-927-3

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์

FACTORS AFFECTING GROWTH OF CYANOBACTERIA FOR
CAROTENOID PRODUCTION

กนกอร จารุจารีต

KHANOK-ON JARUJAREET

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2543

ISBN 974-622-927-3

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน...38037

วัน, เดือน, ปี 2.0 พ.ย. 2543

**FACTORS AFFECTING GROWTH OF CYANOBACTERIA FOR
CAROTENOID PRODUCTION**

KHANOK-ON JARUJAREET

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2000

ISBN 974-622-927-3

COPYRIGHT 2000

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT' S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียเพื่อผลิต แคโรทีนอยด์
นักศึกษา	นางสาวกนกอร จารุจาริต
รหัสประจำตัว	40065204
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2543
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร.นवलพรรณ ฌ ระนอง
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.สุรียา สาสนรักกิจ

บทคัดย่อ

การศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด 5 สายพันธุ์ จาก 83 สายพันธุ์ ของคลังเก็บเชื้อฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เชื้อที่คัดเลือกได้ ได้แก่ *Anabaena siamensis* ANCG1709, *Calothrix* sp. ANCG18, *Nostoc* sp. ANCG1660, *Calothrix* sp. ANCG14 และ *Calothrix* sp. ANCG1542 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG 11 ในหลอดเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียมีปริมาณแคโรทีนอยด์ 3.86, 3.54, 2.89, 2.17 และ 2.01 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำทั้ง 5 สายพันธุ์ มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยเลี้ยงในสูตรอาหาร BG 11 ที่มีปริมาณสารโคโรแพนเทสเซียมฟอสเฟต 0.06 กรัม/ลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.15 กรัม/ลิตร โซเดียมคลอไรด์ 1 กรัม/ลิตร พีเอช 7.5-8 อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส แสงสีขาวความเข้มแสง 2000 – 4000 ลักซ์ พบว่าเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ ผลิตแคโรทีนอยด์สูงชันดังนี้ 9.14, 4.52, 6.00, 3.66 และ 4.63 มิลลิกรัม/ลิตร จากการวิเคราะห์ปริมาณเบต้า-แคโรทีน พบว่าสกุล *Calothrix* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ผลิตเบต้า-แคโรทีนได้สูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ส่วน *Nostoc* และ *Anabaena* ผลิตได้สูงสุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการชักนำการผลิตแคโรทีนอยด์จาก *A. siamensis* ซึ่งสามารถผลิตได้สูงเพื่อให้เกิดการสร้างแคโรทีนอยด์เพิ่มมากขึ้น โดยการใช้โซเดียมคลอไรด์ , โซเดียมอะซิเตต , เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรต และแสง ปรากฏว่าการชักนำด้วยแสงทำให้ *A. siamensis* ผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 17 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนการทดสอบความคงตัวของสีและเบต้า-แคโรทีน พบว่าการเติมน้ำมันพืชสกัดจากปาล์มน้ำมันสามารถรักษาความคงตัวของสีได้นานที่สุด ส่วนสารเบต้า-แคโรทีนคงตัวได้นานที่สุดเมื่อเติม BHT

Thesis Title	Factors Affecting Growth of Cyanobacteria for Carotenoid Production
Student	Miss Khanok-on Jarujareet
Student ID.	40065204
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2000
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Nuanphan Naranong
Thesis Co-Advisor	Dr. Suriya Sassanarakkit

ABSTRACT

The aim of this thesis was to investigate the effect of factors on growth and carotenoid production of cyanobacteria. Eighty-three isolates of cyanobacteria from Culture Collection of Biotechnology Department, Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) were selected for high carotenoid production. Five selected strains were *Anabaena siamensis* ANCG1709, *Calothrix* sp. ANCG18, *Nostoc* sp. ANCG1660, *Calothrix* sp. ANCG14 and *Calothrix* sp. ANCG1542. Carotenoid yields were 3.86, 3.54, 2.89, 2.17 and 2.01 mg/l respectively. Effects of some essential organic elements and physical factors on growth for carotenoid production from the selected strains were studied. Selected strains were cultured in modified medium using the BG 11 medium that contains 0.06 g/l K₂HPO₄, 0.15 g/l MgSO₄ and 1 g/l NaCl adjust pH to 7.5-8, physical factors such as white light intensities at 2000-4000 lux. The result showed that carotenoid yields were increase as 9.14, 4.52, 6.00, 3.66 and 4.63 mg/l respectively. Analyses of β-carotene evolution in 5 strains with HPLC shown that the maximum production of *Calothrix* genus was after 10 days cultivation. In others (*Nostoc* and *A. siamensis*) the maximum production was after 8 days cultivation. Finally *A. siamensis* was selected as the highest carotenoid production strain. *A. siamensis* was induced with Sodium Chloride, Sodium Acetate, Ferric Ammonium Citrate and high intensity light in order to increase carotenoid content. The maximum production of carotenoid (17 mg/l) was obtained when induce with high light intensity. In the stability study of color and β-carotene from *A. siamensis*, color was longest storage when adding vegetable oil (Jade Brand) and β-carotene was longest storage when adding BHT.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดี ด้วยคำแนะนำและคำปรึกษาในทุกด้านจาก อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ดร. สุริยา สาสนรักกิจ ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา รวมทั้งความอนุเคราะห์ทุน อุปกรณ์และสถานที่ ซึ่งช่วยทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินการวิจัยได้ราบรื่น

กราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ ที่ไม่ทอดทิ้ง เฝ้ารอวันนี้ของลูก

ขอขอบคุณ คุณอัจฉรา คอประเสริฐศักดิ์ คุณเปรมสุดา สมาน และคุณทวิช ทำนาเมือง ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สำหรับสารเคมี ความช่วยเหลือ คำปรึกษาดีๆ และช่วยแก้ไขปัญหาที่ผู้วิจัยติดขัด

ขอขอบคุณ คุณรุจิรา วาจ่าง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี สำหรับสารเคมี และทุกๆ อย่าง

ขอขอบคุณ คุณชัชฌ อัมพรายน สำหรับกำลังทุน กำลังใจ และการอำนวยความสะดวกในทุกด้าน

ขอขอบคุณเพื่อนๆ นักศึกษาทุกคน ที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาตลอด

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

กนกอร จารุจารีต

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา	1
1.3 สมมติฐานของการศึกษา	2
1.4 ทฤษฎีหรือแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย	2
1.5 ขอบเขตการวิจัย	2
1.6 ขั้นตอนการศึกษา	2
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แคลโรทีนอยด์	3
2.1.1 ชนิดและโครงสร้างของแคลโรทีนอยด์	3
2.1.2 การสังเคราะห์แคลโรทีนอยด์	6
2.1.3 การกระจายตัวของแคลโรทีนอยด์	10
2.1.4 คุณสมบัติของแคลโรทีนอยด์	11
2.1.5 หน้าที่ของแคลโรทีนอยด์	13
2.1.6 ประโยชน์ของแคลโรทีนอยด์	14
2.1.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแคลโรทีนอยด์	16
2.1.8 การเก็บรักษาแคลโรทีนอยด์	18
2.2 ไชยานินแบคทีเรีย	18
2.2.1 ลักษณะทั่วไป	19
2.2.2 ลักษณะพิเศษบางประการ	25
2.2.3 การเพาะเลี้ยงไชยานินแบคทีเรีย	26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	27
3.1 อุปกรณ์, สารเคมี และจุลินทรีย์	27
3.2 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย	28
3.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	28
3.2.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้น	29
3.2.3 การเพาะเลี้ยงในหลอดเพาะเลี้ยง	29
3.3 วิธีดำเนินการทดลอง	29
3.3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการ สร้างแคโรทีนอยด์	29
3.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ ของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	31
3.3.3 ศึกษาปริมาณสารสกัดที่เหมาะสม	32
3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณเบต้า-แคโรทีนในสารละลายแคโรทีนอยด์	32
3.3.5 การชักนำให้เกิดการสร้างสารแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น	33
3.3.6 การศึกษาความคงตัวของสีจากแคโรทีนอยด์และเบต้า-แคโรทีน	34
3.3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ	34
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	35
4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตแคโรทีนอยด์	35
4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์	36
4.2.1 ผลของโซเดียมไนเตรท	36
4.2.2 ผลของไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	39
4.2.3 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟต	42
4.2.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์	45
4.2.5 ผลของพีเอชเริ่มต้น	48
4.2.6 ผลของอุณหภูมิ	51
4.2.7 ผลของชนิดของแสง	54

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.8 ผลของความเข้มแสง	57
4.3 ศึกษาปริมาณสารสกัดที่เหมาะสม	62
4.4 ปริมาณเบต้า-แคโรทีนในสารละลายแคโรทีนอยด์	66
4.5 การชักนำให้เกิดการสร้างสารแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น	66
4.5.1 ผลของโซเดียมคลอไรด์	66
4.5.2 ผลของโซเดียมอะซิเตต	68
4.5.3 ผลของเฟอริกแอม โมเนียมซิเตรต	68
4.5.4 ผลของความเข้มแสง	68
4.6 การศึกษาความคงตัวของสีจากแคโรทีนอยด์และเบต้า-แคโรทีน	69
4.6.1 การศึกษาความคงตัวของสีเหลืองจากแคโรทีนอยด์	69
4.6.2 การศึกษาความคงตัวของเบต้า-แคโรทีน	69
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	76
5.1 การคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์	76
5.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์	76
5.2.1 <i>A. siamensis</i>	76
5.2.2 <i>Nostoc</i> sp.	76
5.2.3 <i>Calothrix</i> sp. ANCG14	76
5.2.4 <i>Calothrix</i> sp. ANCG18	76
5.2.5 <i>Calothrix</i> sp. ANCG1542	77
5.3 การศึกษาปริมาณสารสกัดที่เหมาะสม	77
5.4 การศึกษาปริมาณเบต้า-แคโรทีน	77
5.5 การชักนำให้มีการผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น	77
5.6 การศึกษาความคงตัวของสีจากแคโรทีนอยด์และเบต้า-แคโรทีน	77
5.7 ข้อเสนอแนะ	77
บรรณานุกรม	78
ภาคผนวก ก. รูปประกอบ	84

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	93
ประวัติผู้เขียน	128

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงแคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่าย	12
3.1 แสดงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11	28

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของไอโซพรีนและไลโคพีน	3
2.2 โครงสร้างของเบต้า-แคโรทีน	3
2.3 โครงสร้างของแอลฟา-แคโรทีน	4
2.4 โครงสร้างของแซนโทฟิลล์บางชนิด	4
2.5 โครงสร้างของแคโรทีนอยด์บางชนิด	6
2.6 กลไกการเกิดไอโซเพนทีนิลไพโรฟอสเฟตจากอะซิติลโค เอ	7
2.7 กลไกการเปลี่ยนกลับของไอโซเพนทีนิลไพโรฟอสเฟตเป็นเจอร์รานิลเจอร์รานิลไพโรฟอสเฟต	8
2.8 การเปลี่ยนไฟโตอินเป็นไลโคพีน	8
2.9 การเกิดปฏิกิริยาไซโคลเซชันของวงแหวน 3 แบบ	9
2.10 การเปลี่ยนเบต้า-แคโรทีนเป็นแซนโทฟิลล์บางชนิด	9
2.11 โครงสร้างของมิกโซแซนโทฟิลล์	11
2.12 ผลของตัวทำลายต่อการดูดกลืนแสงของแคโรทีนอยด์	13
2.13 กลไกการเปลี่ยนเบต้า-แคโรทีนไปเป็นวิตามิน เอ (เรตินอล)	16
2.14 โครงสร้างภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแบบเส้นสาย	20
2.15 ส่วนประกอบภายในเส้นสายของไซยาโนแบคทีเรียแต่ละเส้น	21
2.16 ภาคตัดขวางของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย	22
2.17 เซเทอโรซิสต์ภายในสายเซลล์	23
2.18 เซเทอโรซิสต์ที่อยู่บริเวณปลายเส้นสายทั้ง 2 ข้าง	24
2.19 เซเทอโรซิสต์บริเวณปลายสาย	24
2.20 เซเทอโรซิสต์บริเวณปลายแขนงสั้นๆ และที่เกิดข้างสาย	25
4.1 ไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	37
4.2 แสดงการเจริญและปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	38
4.3 แสดงผลของโซเดียมไนเตรตต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย	40
4.4 แสดงผลของโซเดียมไนเตรตต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย	41
4.5 แสดงผลของไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย	43
4.6 แสดงผลของไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย	44

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 แสดงผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย	46
4.8 แสดงผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย	47
4.9 แสดงผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย	49
4.10 แสดงผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย	50
4.11 แสดงผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย	52
4.12 แสดงผลของพีเอชเริ่มต้นต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย	53
4.13 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย	55
4.14 แสดงผลของอุณหภูมิต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย	56
4.15 แสดงผลของชนิดของแสงต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย	58
4.16 แสดงผลของชนิดของแสงต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย	59
4.17 แสดงผลของความเข้มแสงต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย	60
4.18 แสดงผลของความเข้มแสงต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย	61
4.19 เปรียบเทียบการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติและสภาวะที่เหมาะสม	63
4.20 เปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติและสภาวะที่เหมาะสม	64
4.21 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้	65
4.22 แสดงปริมาณเบต้า-แคโรทีนที่ผลิตขึ้นในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	67
4.23 แสดงการเจริญของ <i>A. siamensis</i> ที่ถูกชักนำให้ผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น	70
4.24 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์ของ <i>A. siamensis</i> ที่ถูกชักนำ	71
4.25 เปรียบเทียบผลของการชักนำต่อการเจริญ, ปริมาณแคโรทีนอยด์และปริมาณเบต้า-แคโรทีนที่เพิ่มขึ้นใน <i>A. siamensis</i>	72
4.26 ความคงตัวของสีแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรีย	74
4.27 ความคงตัวของเบต้า-แคโรทีนที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรีย	75
ผ1 การเพาะเลี้ยง <i>A. siamensis</i> ในหลอดเพาะเลี้ยง	85
ผ2 สีเหลืองของแคโรทีนอยด์จากไซยาโนแบคทีเรีย	85
ผ3 โครมาโตแกรมของเบต้า-แคโรทีน	86
ผ4 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับปริมาณเบต้า-แคโรทีน	87

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ผ5 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD ₉₀₀ กับน้ำหนักแห้งของ <i>Calothrix</i> sp. ANCG14.....	88
ผ6 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD ₉₀₀ กับน้ำหนักแห้งของ <i>Calothrix</i> sp. ANCG18.....	89
ผ7 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD ₉₀₀ กับน้ำหนักแห้งของ <i>Calothrix</i> sp. ANCG1542.....	90
ผ8 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD ₉₀₀ กับน้ำหนักแห้งของ <i>Nostoc</i> sp. ANCG1660.....	91
ผ8 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD ₉₀₀ กับน้ำหนักแห้งของ <i>A. siamensis</i> ANCG1709.....	92

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

นักวิทยาศาสตร์สังเกตเห็นความสำคัญและประโยชน์ของสาหร่ายที่มีต่อมวลมนุษยชาติอยู่มาก เนื่องจากสาหร่ายเป็นแหล่งของสารชีวเคมีที่มีศักยภาพไม่จำกัด สารชีวเคมีหลักที่มีศักยภาพในเชิงการค้าหรือกำลังให้ความสำคัญ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ (carotenoid), ไฟโคบิลิน (phycobilins), กรดไขมัน (fatty acid), โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide), วิตามิน และสเตอรอล (sterols)

แคโรทีนอยด์ที่สำคัญและมีมูลค่าสูง ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน (betacarotene) ในปัจจุบันมีการผลิตจากสาหร่ายสีเขียวน้ำเค็ม (*Dunaliella*) และนำออกขายแล้วในรูปของสารสกัด, แชนลอนยในน้ำมันพืช หรือทำเป็นผงสาหร่ายแห้งสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยผู้ผลิตรายใหญ่อยู่ในประเทศออสเตรเลีย (Western Biotechnology, Ltd.; Betatene, Ltd.) ประเทศสหรัฐอเมริกา (Microbio Resource Inc.) และประเทศอิสราเอล (Nature Beta)

สำหรับในประเทศไทยได้มีผู้พยายามทำการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella* เพื่อผลิตเบต้า-แคโรทีนเป็นจำนวนมาก แต่ยังประสบปัญหาเพราะ *Dunaliella* มีอัตราการเจริญต่ำ เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ยาก และสามารถเพาะเลี้ยงได้เฉพาะในน้ำทะเล หรือน้ำที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์สูง (สรัญญา, 2537) ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงทดลองนำเอาไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่พบในประเทศไทย มาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ ทั้งนี้เนื่องจากสาหร่ายดังกล่าวมีการเจริญรวดเร็วและอัตราการเจริญสูง เก็บเกี่ยวง่าย และสามารถเลี้ยงได้ในน้ำจืด ซึ่งจะส่งผลให้เกิดอุตสาหกรรมการผลิตแคโรทีนอยด์ขึ้นภายในประเทศลดการนำเข้าจากต่างประเทศ

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการสร้างสารแคโรทีนอยด์จากคลังเก็บเชื้อสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.)

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1.2.3 เพื่อศึกษาปริมาณของสารสกัดที่เหมาะสมต่อการสกัดแคโรทีนอยด์จาก ไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1.2.4 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเบต้า-แคโรทีนจากแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1.2.5 เพื่อศึกษาผลของการชักนำการผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นในไซยาโนแบคทีเรียให้มีปริมาณสูง

1.2.6 เพื่อศึกษาความคงตัวของแคโรทีนอยด์และเบต้า-แคโรทีนที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรีย

1.3 สมมติฐานของการศึกษา

ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะที่เหมาะสมและมีการชักนำให้มีอัตราการเจริญและอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์สูง

1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

Fogg และคณะ (1973) พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดมีสารสีหรือรงควัตถุแคโรทีนอยด์และเกือบทุกชนิดมีเบต้า-แคโรทีนเป็นสารหลัก ประกอบกับปัจจุบันมีการผลิตแคโรทีนอยด์จากไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Spirulina* เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาในไซยาโนแบคทีเรียสกุลอื่นๆ ซึ่งอาจนำไปสู่การพบสายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพสูงกว่า *Spirulina* โดยแนวทางการทดลองได้รวบรวมมาจากงานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย ดังแสดงในบรรณานุกรม

1.5 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้คัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียได้มาจากคลังเก็บเชื้อฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) และทำการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ วท. ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2541 - เดือนเมษายน 2543

1.6 ขั้นตอนการศึกษา

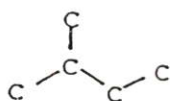
นำไซยาโนแบคทีเรียจากคลังเก็บเชื้อมาทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการสร้างแคโรทีนอยด์ จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยการแปรผันธาตุอาหารและสภาวะแวดล้อมบางสภาวะ ศึกษาปริมาณสารสกัดที่เหมาะสมต่อการสกัด และวิเคราะห์หาเบต้า-แคโรทีนในแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) นำเอาไซยาโนแบคทีเรียที่มีปริมาณเบต้า-แคโรทีนสูงมาชักนำให้สร้างสารใหม่ปริมาณเพิ่มขึ้นโดยการใส่สารเคมีและสภาวะแวดล้อมบางประการ รวมทั้งศึกษาความคงตัวของสีแคโรทีนอยด์และความคงตัวของเบต้า-แคโรทีนที่สกัดได้

บทที่ 2

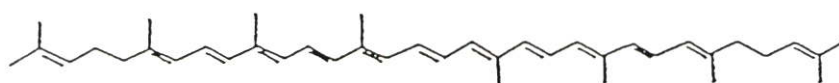
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แคโรทีนอยด์ (Carotenoid)

เป็นสารประกอบเทอร์เทอโรพีนส์ (tetraterpenes) ที่มีคาร์บอน 40 อะตอม โครงสร้างของเทอร์เทอโรพีนส์เกิดจากไอโซพรีน (isoprene) ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม มาต่อกัน 8 โมเลกุล เกิดเป็น C_{40} เรียก ไลโคพีน (lycopene)



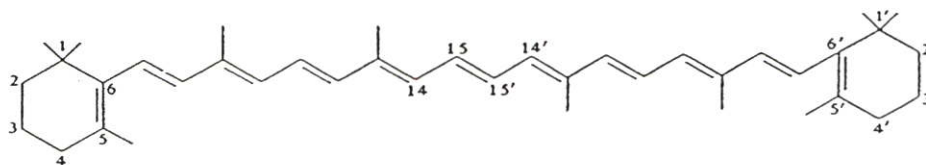
หน่วยไอโซพรีน



ไลโคพีน

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไอโซพรีนและไลโคพีน (ที่มา : อรพรรณ, 2532)

ปลายโมเลกุลข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างของไลโคพีน อาจเปลี่ยนแปลงเป็นวงหกเหลี่ยม (six-membered ring) หรือวงห้าเหลี่ยม (five-membered ring) เช่น เบต้า-แคโรทีน (β -carotene)



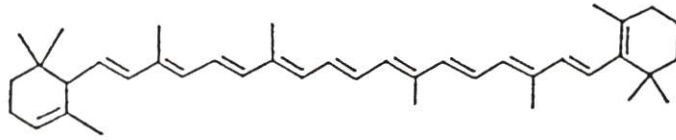
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของเบต้า-แคโรทีน (ที่มา : Fogg และคณะ, 1973)

2.1.1 ชนิดและโครงสร้างของแคโรทีนอยด์

แบ่งออกเป็น 3 ชนิดใหญ่ๆ คือ

2.1.1.1 แคโรทีน (Carotenes)

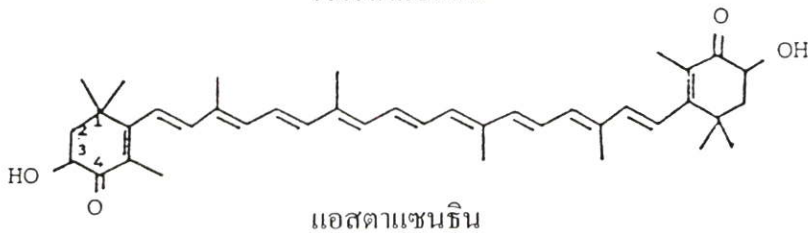
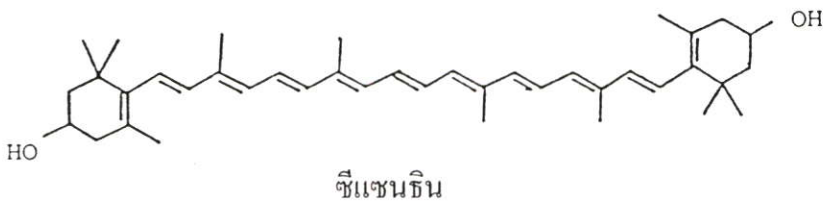
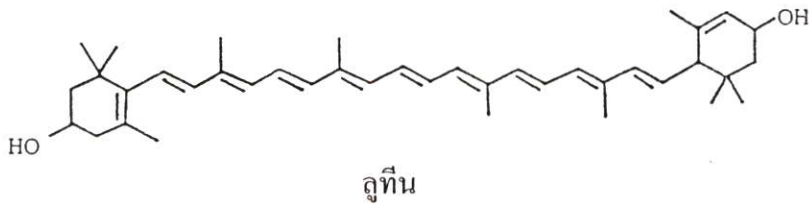
เป็นแคโรทีนอยด์ที่ประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนเท่านั้น ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน แอลฟา-แคโรทีน (α -carotene) และไลโคพีน เป็นต้น



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของแอลฟา-แคโรทีน (ที่มา : Britton, 1983)

2.1.1.2 แซนโทฟิลล์ (Xanthophylls)

เป็นแคโรทีนอยด์ที่มีออกซิเจนประกอบอยู่ในโมเลกุลด้วย ชนิดที่พบกระจายตัวอยู่ในธรรมชาติมากที่สุด ได้แก่ ลูทีน (lutein) และซีแซนทิน (zeaxanthin) ซึ่งเป็นเม็ดสีที่พบในใบไม้ นอกจากนี้ยังมี ไวโอลาแซนทิน (violaxanthin) เป็นเม็ดสีในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) และแอสตาแซนทิน (astaxanthin) พบในสัตว์น้ำเค็มหลายชนิด



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของแซนโทฟิลล์บางชนิด (ที่มา : Britton, 1983)

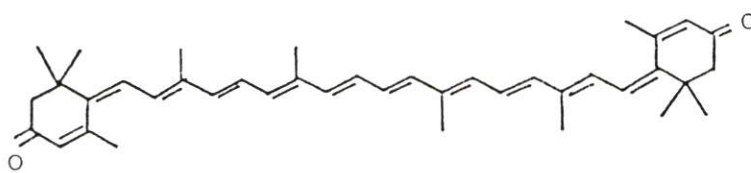
2.1.1.3 แคโรทีนอยด์อื่นๆ

1) รีโทร-แคโรทีนอยด์ (Retro-carotenoid) คือ แคโรทีนอยด์ที่เกิดมีการเคลื่อนย้ายพันธะภายในโมเลกุล เช่น โรโดแซนทิน (rhodoxanthin) ซึ่งเป็นเม็ดสีแดงที่พบในผลไม้ขนาดเล็กบางชนิด

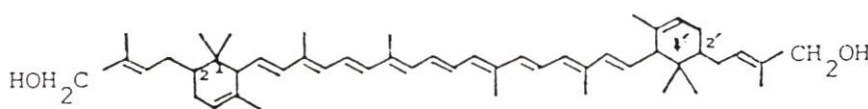
2) โฮโม-แคโรทีนอยด์ (Homo-carotenoid) คือ แคโรทีนอยด์ที่ประกอบด้วย C_{40} แต่มีการเพิ่มกลุ่มของอะตอมคาร์บอนเข้าไป 1-2 ชุด กลายเป็น C_{45} หรือ C_{50} เช่น ดีคาพรีโนแซนทิน (decaprenoxanthin) และแบคเทอริโอรูเบอร์ริน (bacterioruberrin) ในแบคทีเรียบางชนิด

3) อะโป-แคโรทีนอยด์ (Apo-carotenoid) คือ แคโรทีนอยด์ที่มีคาร์บอนน้อยกว่า 40 อะตอม เนื่องจากมีการดึงคาร์บอนบางส่วนออกจากปลายโมเลกุล เช่น เบต้า-ซิตรายูริน (β -citraurin, C_{30}) ซึ่งเป็นเม็ดสีส้มที่พบในผลไม้รสเปรี้ยว (citrus fruit) บางชนิด

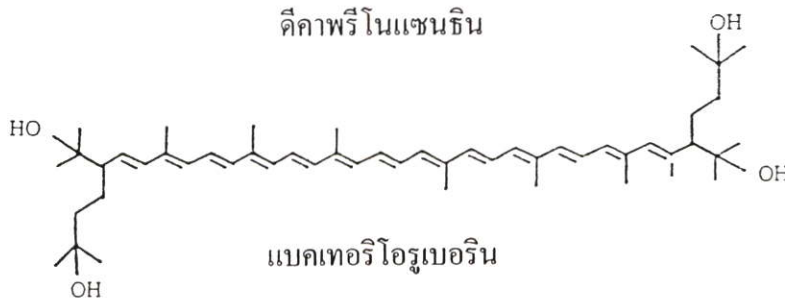
4) นอร์-แคโรทีนอยด์ (Nor-carotenoid) คือ แคโรทีนอยด์ที่มีคาร์บอนน้อยกว่า 40 อะตอม เนื่องจากเสียคาร์บอนออกจากภายในโมเลกุล เช่น แอกติโนเออริทริน (actinioerythrin) เป็นเม็ดสีม่วงที่พบในดอกไม้ทะเล (sea anemone)



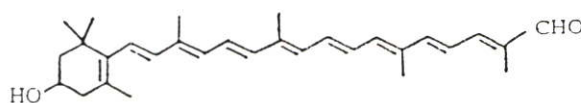
โรโดแซนทิน



ดีคาพรีโนแซนทิน

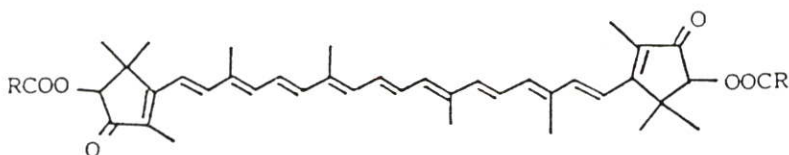


แบคเทอริโอรูเบอร์ริน



เบต้า-ซิตรายูริน

รูปที่ 2.5 โครงสร้างของแคโรทีนอยด์บางชนิด (ที่มา : Britton, 1983)



แอสซินไออีรีทริน

รูปที่ 2.5 (ต่อ)

2.1.2 การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์เป็นสารสีธรรมชาติกลุ่มใหญ่ เกิดจากการรวมตัวกันของไอโซพรีน 8 หน่วย เรียกว่า “ไฟโตอีน (phytoene)”

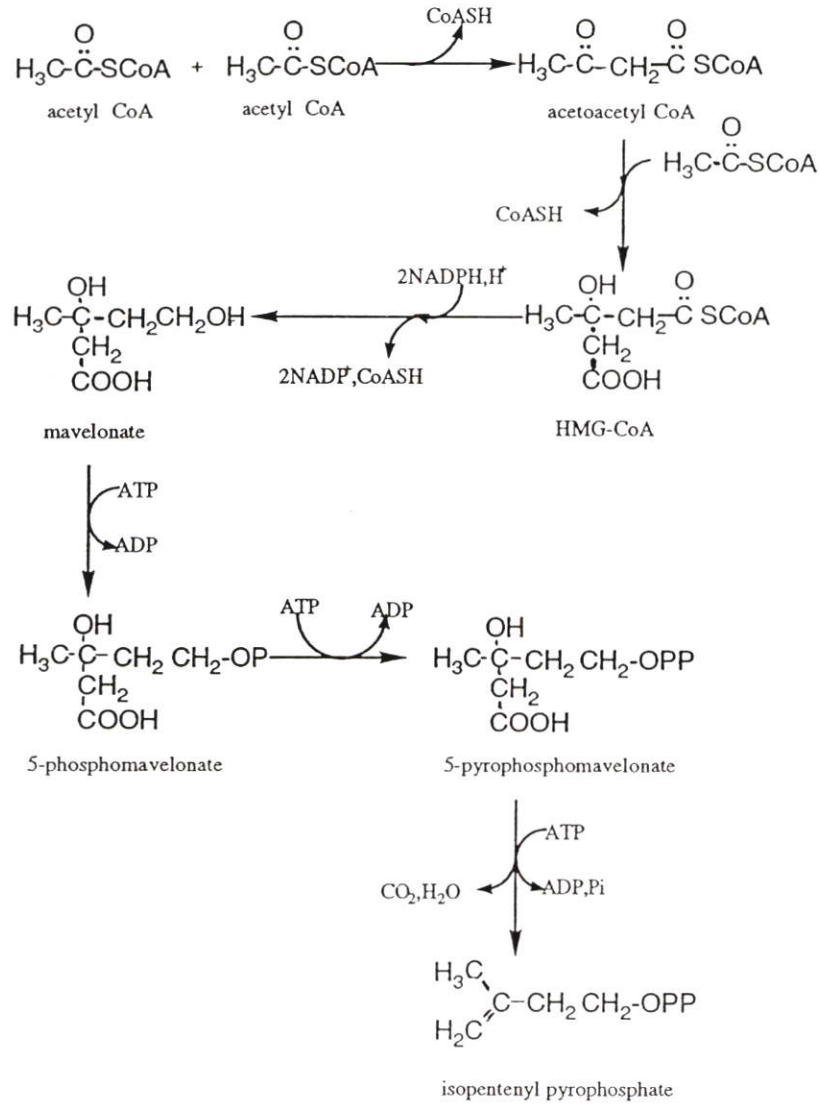
2.1.2.1 การเกิดไฟโตอีน แบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ

- 1) **ปฏิกิริยาฟอร์มเมชัน (Formation)** เป็นการเกิดขึ้นของไอโซเพนทานิลไพโรฟอสเฟต (isopentanyl pyrophosphate) ดังรูปที่ 2.6
- 2) **ปฏิกิริยาคอนเวอร์ชัน (Conversion)** เป็นการเปลี่ยนจาก ไอโซเพนทานิลไพโรฟอสเฟต ไปเป็นเจอร์รานิลเจอร์รานิลไพโรฟอสเฟต (geranylgeranyl pyrophosphate) (รูปที่ 2.7)
- 3) **ปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน (Condensation)** เป็นการรวมโมเลกุลของเจอร์รานิลเจอร์รานิลไพโรฟอสเฟต 2 โมเลกุล เกิดเป็นไฟโตอีน (รูปที่ 2.8)

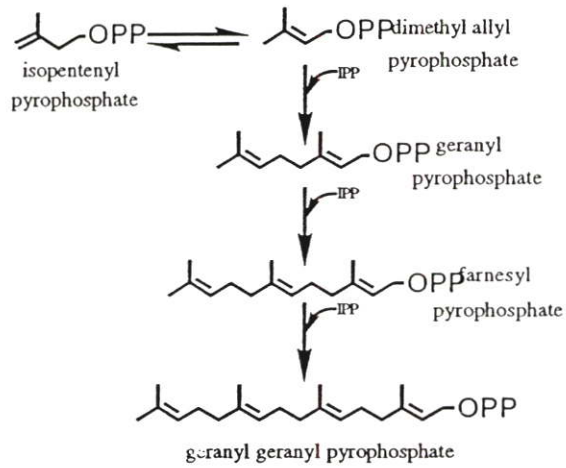
2.1.2.2 การเกิดไลโคพีน

ไฟโตอีนจะถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นไลโคพีน ซึ่งไลโคพีนเป็นสารตั้งต้น (precursor) ในกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์หลายชนิด เช่น การเกิดปฏิกิริยาไซโคลเซชัน (cyclization) ที่ปลายโมเลกุล เกิดเป็น โมเลกุลของแคโรทีน (รูปที่ 2.9)

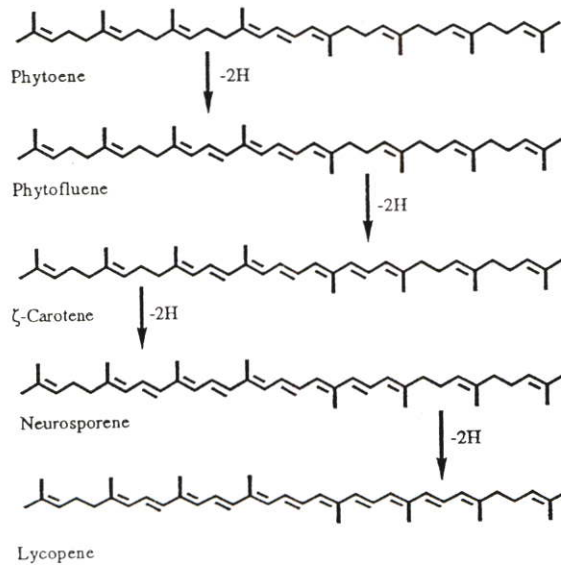
จากนั้น โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็นแคโรทีนอยด์ที่มีลักษณะเฉพาะต่างๆ กัน ที่สำคัญคือกระบวนการเปลี่ยนแคโรทีนเป็นแซนโทฟิลล์ ด้วยการเติมออกซิเจนเข้าไปในโมเลกุล ดังรูปที่ 2.10 (Camara และ Moneger, 1981)



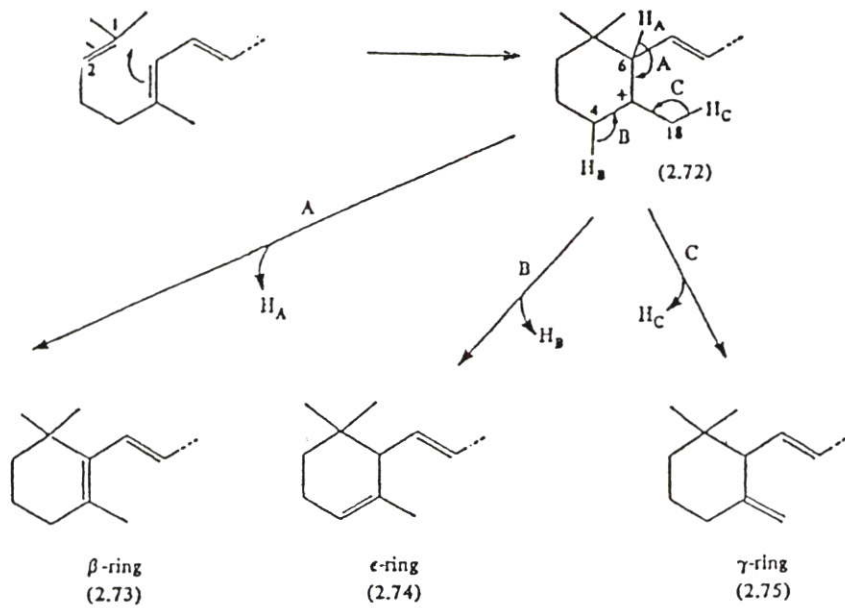
รูปที่ 2.6 กลไกการเกิดไอโซเพนทีลไพโรฟอสเฟต (isopentenyl pyrophosphate) จากอะซิติลโคเอ (acetyl CoA.) (ที่มา : Camera และ Moneger, 1981)



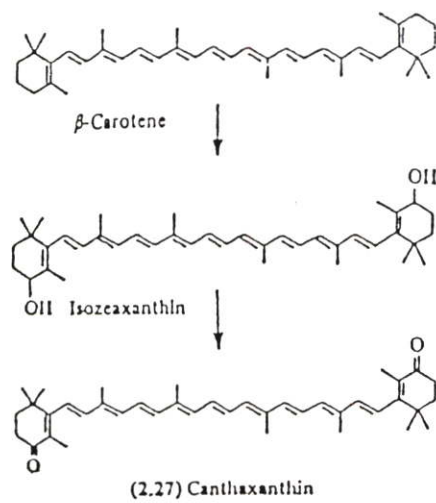
รูปที่ 2.7 กลไกการเปลี่ยนกลับของไอโซเพนทานิลไพโรฟอสเฟต เป็นเจอร์รานิลเจอร์รานิลไพโรฟอสเฟต (ที่มา : Camara และ Moneger, 1981)



รูปที่ 2.8 การเปลี่ยนไฟโตอินเป็นไลโคพีน (ที่มา : Camara และ Moneger, 1981)



รูปที่ 2.9 การเกิดปฏิกิริยาไซโคลเซชันของวงแหวน 3 แบบ (ที่มา : อรพรรณ, 2532)



รูปที่ 2.10 การเปลี่ยนเบต้า-แคโรทีนเป็นแซนโทฟิลล์บางชนิด (ที่มา : อรพรรณ, 2532)

2.1.3 การกระจายตัวของแคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์เป็นเม็ดสีที่มีการกระจายตัวในธรรมชาติมากที่สุด พบทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่สัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ขึ้นมาเองได้ ดังนั้นจึงต้องได้รับจากพืชหรือสัตว์ที่เป็นอาหารโดยตรง (Fox, 1957)

2.1.3.1 สัตว์

แคโรทีนอยด์ทำให้เกิดสีในสัตว์ได้ ยกเว้นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ทำให้เนื้อปลาหรือสีของปลาสวยงาม ทำให้ขนนกมีสีเหลืองถึงแดง และยังพบในแมลง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังน้ำเค็มเกือบทุกชั้น รวมทั้งพบในฟองน้ำทะเลด้วย

2.1.3.2 พืช

ในคลอโรพลาสต์ของเนื้อเยื่อพืชที่มีสีเขียว จะประกอบด้วยแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ เช่น เบต้า-แคโรทีน ลูทีน ไวโอลาแซนธิน และนีโอแซนธิน (neoxanthin) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบเม็ดสีแคโรทีนอยด์อยู่ในโครโมพลาสต์ (chromoplast) ทำให้เกิดสีในดอกไม้และผลไม้ ตามปกติจะไม่ค่อยพบแคโรทีนอยด์ในรากพืช แต่พบว่ามีเบต้า-แคโรทีน และแอลฟา-แคโรทีน ปริมาณมากในหัวแครอท

2.1.3.3 แบคทีเรีย

แคโรทีนอยด์ที่พบในแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแซนโทฟิลล์มากกว่าแคโรทีน (Ciegler, 1965) โดยพบอยู่ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียไม่สังเคราะห์แสง (non-photosynthetic bacteria) บางสายพันธุ์ และพบได้มากในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (photosynthetic bacteria) เนื่องจากแคโรทีนอยด์มีส่วนสำคัญในการสังเคราะห์แสง

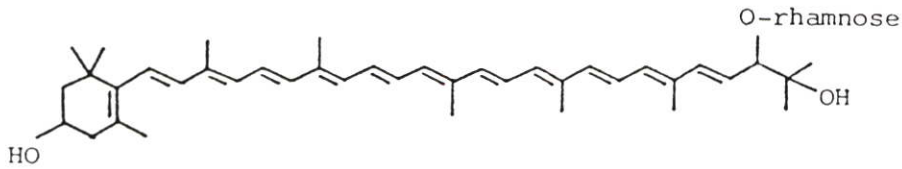
2.1.3.4 รา

ส่วนใหญ่ราสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ไม่ได้ ราที่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้ส่วนใหญ่เป็นราชั้นต่ำ (lower fungi) โดยสังเคราะห์ขึ้นที่ไมซีเลียม (mycelium) มักจะสะสมแคโรทีน ส่วนแซนโทฟิลล์พบน้อยมาก สำหรับเห็ดพบแคโรทีนอยด์ในเห็ดชั้นเทอเรล (chanterelle) ส่วนในยีสต์ พบได้ในยีสต์สีแดงสกุล *Rhodotorula* ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน แกมมา-แคโรทีน โทรูลิน และโทลูอาร์โฮดิน และ *Phaffia* ได้แก่ แอสตาแซนธิน (Goodwin, 1962)

2.1.3.5 สาหร่าย

พบว่าทุกดิวิชัน (division) ของสาหร่ายจะสร้างเบต้า-แคโรทีน ยกเว้นในคริปโตไฟตา (Cryptophyta) ที่สร้างแอลฟา-แคโรทีน สำหรับแซนโทฟิลล์นั้นจะแตกต่างกันออกไปในแต่ละดิวิชัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 (Nakayama, 1962)

สำหรับสีน้ำเงินแกมเขียว (blue-green algae) หรือไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) จะสร้างเบต้า-แคโรทีน และอนุพันธ์ (hydroxy- และ keto-derivatives) ได้ นอกจากนี้หลายสายพันธุ์สามารถผลิตมิกโซแซนโทฟิลล์ได้ด้วย (myxoxanthophyll)



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของมิกโซแซนโทฟิลล์ (ที่มา : Britton, 1983)

2.1.4 คุณสมบัติของแคโรทีนอยด์

2.1.4.1 คุณสมบัติทางฟิสิกส์

แคโรทีนอยด์เป็นไขมัน ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ การสกัดแคโรทีนอยด์ออกมาจากเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตได้โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น อะซีโตน แอลกอฮอล์ และสารละลายผสมของตัวทำละลายทั้งสองชนิด (Humbeck, 1990; Miki และคณะ, 1986) แคโรทีนอยด์ทุกชนิดเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง และทำให้เป็นผลึกได้โดยใช้ตัวทำละลายผสมที่เหมาะสม

2.1.4.2 ความคงตัว

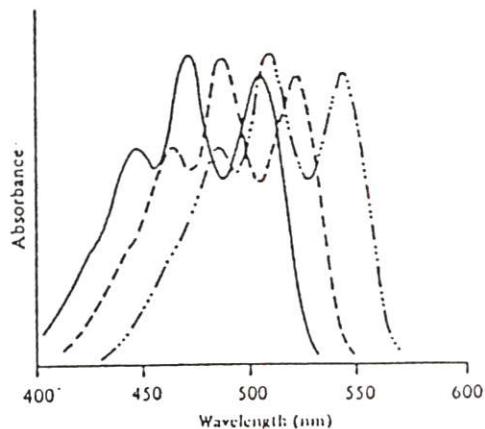
แคโรทีนอยด์ที่สกัดออกมาแล้ว จะไวต่อแสงสว่าง ความร้อนและกรด โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนไอโซเมอร์ (cis-trans isomerization) นอกจากนี้ยังไวต่อค่า ซึ่งทำให้เกิดการออกซิไดซ์ภายในโมเลกุล (autooxidation) และไวต่อออกซิเจนในอากาศ จะทำให้เกิด การออกซิไดซ์ที่บริเวณพันธะคู่ (oxidation bleaching) ได้

2.1.4.3 การดูดกลืนแสง

แคโรทีนอยด์ดูดกลืนแสงในช่วงที่มองเห็น และความสามารถการดูดกลืนแสงจะเปลี่ยนไปตามชนิดของตัวทำละลาย

ตารางที่ 2.1 แสดงแคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่าย (ที่มา : Nakayama, 1962)

Division	Carotenoids present	Division	Carotenoids present	
Bacillariophyta	β -carotene	Cryptophyta	α -carotene	
	ϵ -carotene		ϵ -carotene	
	Fucoxanthin		Zeaxanthin	
	Diatoxanthin		Euglenophyta	β -carotene
	Diadinoxanthin			γ -carotene
Chlorophyta	α -carotene	Pyrrophyta	Lutein	
	β -carotene		Neoxanthin	
	γ -carotene		Astaxanthin	
	ϵ -carotene		Echinenone	
	Lutein		Cryptoxanthin	
	Zeaxanthin		Euglenanone	
	Violaxanthin		Hydroxyechinenone	
	Neoxanthin		β -carotene	
	Astaxanthin		Diadinoxanthin	
	Siphonaxanthin		Sulcatoxanthin	
Chrysophyta	α -carotene	Phaeophyta	Dinoxanthin	
	β -carotene		β -carotene	
	Lutein		Lutein	
	Fucoxanthin		Violaxanthin	
	Diatoxanthin		Fucoxanthin	
	Diadinoxanthin		Diatoxanthin	
Cyanophyta	β -carotene	Rhodophyta	α -carotene	
	Lutein		β -carotene	
	Zeaxanthin		Lutein	
	Myxoxanthin		Violaxanthin	
	Myxoxanthophyll		Neoxanthin	
	Aphanizophyll		Taraxanthin	
	Flavacin		Xanthophyta	β -carotene
Echinenone	Lutein			
			Violaxanthin	
			Neoxanthin	



รูปที่ 2.12 ผลของตัวทำละลายต่อการดูดกลืนแสงของแคโรทีนอยด์ :

- ในปิโตรเลียม (light petroleum) หรือเอทานอล
- ในคลอโรฟอร์ม หรือเบนซิน
- ...- ในคาร์บอนเตตระคลอไรด์

2.1.5 หน้าที่ของแคโรทีนอยด์

2.1.5.1 การสังเคราะห์แสง (Photosynthesis)

แคโรทีนอยด์เป็นเม็ดสีทำหน้าที่รับพลังงานแสง แล้วส่งต่อไปยังคลอโรฟิลล์ เอ ในระบบ Photosystem I Goedheer (1969) กล่าวว่าประสิทธิภาพในการส่งถ่ายสมบูรณ์เกือบ 100% ในแบคทีเรีย แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ และรงควัตถุอื่นๆ จะรวมตัวกันอยู่ในโครมาโตพอร์ (chromatophore) บนเยื่อเซลล์ ส่วนในพืชสีเขียวทั่วไปและสาหร่ายจะเป็นส่วนหนึ่งของคลอโรพลาสต์ โดยรวมกันเป็นแผ่น เรียก แผ่นไทลาคอยด์ (thylakoid disk) แคโรทีนอยด์จะทำหน้าที่ดูดกลืนแสงในช่วงที่คลอโรฟิลล์ไม่มีประสิทธิภาพ ได้แก่แสงที่มีความยาวคลื่นสูงกว่า 680 นาโนเมตร (Moor และคณะ, 1982)

2.1.5.2 การป้องกันแสง (Photoprotection)

เซลล์ของพืชชั้นสูง แบคทีเรีย และรา จะถูกทำลายด้วยแสงได้ง่ายขึ้นเมื่อมีส่วนที่ไวต่อแสง (photosensitizing agent) รวมอยู่ด้วย สารเหล่านี้ ได้แก่ ฮีม และโปรตีนที่ประกอบ

ด้วยฮีม เช่น ไซโตโครม (cytochrome) โดยผ่านกระบวนการที่ทำให้เกิดโมเลกุลออกซิเจนที่ถูกกระตุ้น (excited oxygen molecule) แครโรทีนอยด์ทำหน้าที่เป็นตัวป้องกัน (protective agent) ซึ่งสามารถจับโมเลกุลออกซิเจนที่ถูกกระตุ้นเหล่านั้นได้ จึงสามารถป้องกันอันตรายแก่เซลล์ที่เกิดจากความไวต่อแสง (photosensitization) ได้ (Krinsky, 1971; Will III และคณะ, 1984) ยังมีแครโรทีนบางตัว คือ แอลฟา-แครโรทีน ที่มีความสามารถกระจายแสง เพื่อลดอันตรายและป้องกันการออกซิไดซ์โดยแสง (photo-oxidation) ได้ด้วย

2.1.5.3 การรับแสง (Photoreception)

กระบวนการมองเห็นภาพขึ้นอยู่กับกลุ่มเม็ดสีที่ไวต่อแสง (photosensitive pigments) คือ โรดอปซิน (rhodopsin) ซึ่งอยู่ที่เรตินาของดวงตา โรดอปซินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างออปซิน (opsin) กับ 11-ซิส-เรตินัลดีไฮด์ (11-cis-retinaldehyde) หรือ 11-ซิสดีไฮโดรเรตินัลดีไฮด์ (11-cis-dehydroretinaldehyde) โดยสารประกอบทั้งสองเป็นไอโซเมอร์ของวิตามิน เอ ซึ่งได้มาจากเบต้า-แครโรทีน ถ้าขาดวิตามิน เอ ปริมาณโรดอปซินในเรตินาจะลดลง ทำให้เกิดภาวะมองไม่เห็นในที่มืดหรือสลัว (สิรินทร์ และคณะ, 2523)

2.1.5.4 ทำให้เกิดสีในเนื้อเยื่อต่างๆ

แครโรทีนอยด์สามารถทำให้เกิดสีขึ้นในเนื้อเยื่อต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตทั้งที่สามารถสังเคราะห์แครโรทีนอยด์ขึ้นได้เองและสังเคราะห์ไม่ได้ สีที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากแครโรทีนอยด์เพียงอย่างเดียว หรือเป็นสีจากสารประกอบเชิงซ้อนของแครโรทีนอยด์กับรงควัตถุชนิดอื่น เมื่อสัตว์ได้รับแครโรทีนอยด์ปริมาณมากจะเกิดการสะสมที่ผิวหนัง เช่น ปลาเทราท์ (trout) จะสะสมลูทีนที่บริเวณผิวหนัง ไข่ ตับ และเนื้อ (Peterson และคณะ, 1966) ส่วนไก่จะสะสมลูทีนไว้ที่ผิวหนังจนทำให้มีสีเหลืองเข้ม (Soeder, 1978)

2.1.6 ประโยชน์ของแครโรทีนอยด์

2.1.6.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Food industry)

ใช้เป็นสีผสมอาหาร (food colorant) โดยเฉพาะเบต้า-แครโรทีน โดยใช้ผสมในอาหารประเภทไขมันต่างๆ เช่น เนยแข็ง เนยเหลว มาร์การีน น้ำมันพืช และผลิตภัณฑ์มักกะโรนี เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางประเภทน้ำสั้ม และอาหารประเภทอื่น โดยใช้เบต้า-แครโรทีนที่ถูกปรับปรุง และสารสังเคราะห์ คือ แคนทาแซนธิน (canthaxanthin) และอะโป-แครโรทีนอยด์ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ หรือกระจายตัวในน้ำได้ (Britton, 1983)

2.1.5.2 ใช้เป็นอาหารสัตว์ (Animal feed)

ในการทำเป็นอาหารสัตว์จะใช้ชีวมวลโดยตรง ไม่จำเป็นต้องนำไปสกัด แยกแคโรทีนอยด์แต่ละชนิด เช่น ในสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีน้ำตาลเงินแกมเขียว ซึ่งนอกจากสัตว์จะมี สีเนื้อ หนัง ไข่ สวยงามแล้ว ยังได้รับ โปรตีนและวิตามินอีกด้วย (Ninet และ Renaut, 1979) โดยทั่วไปอาหารสัตว์จะผสมแคโรทีนอยด์พวกแซนโทฟิลล์ที่เป็นผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์จากกระบวนการทางเคมีอินทรีย์ เช่น แคโรฟิลล์ เยลโล (Carophyll yellow) ซึ่งประกอบด้วยอะโปแคโรทีโนอิกเอสเทอร์ (apocarotenoid ester) 10% ได้จากการสกัดแยกจากหญ้า alfalfa และผลไม้รสเปรี้ยวบางชนิด แคโรฟิลล์ ออเรนจ์ (Carophyll orange) ซึ่งประกอบด้วยแคนธาแซนธิน (canthaxanthin) 10% ที่ได้จากการสกัดแยกจากเห็ดขั้วเห็ด และขนนกฟลามิงโก และแคโรฟิลล์ เรด (Carophyll red) ประกอบด้วยอะโปแคโรทีโนอิกเอสเทอร์ 5% และแคนธาแซนธิน 5% (ขรรชชัย, 2524)

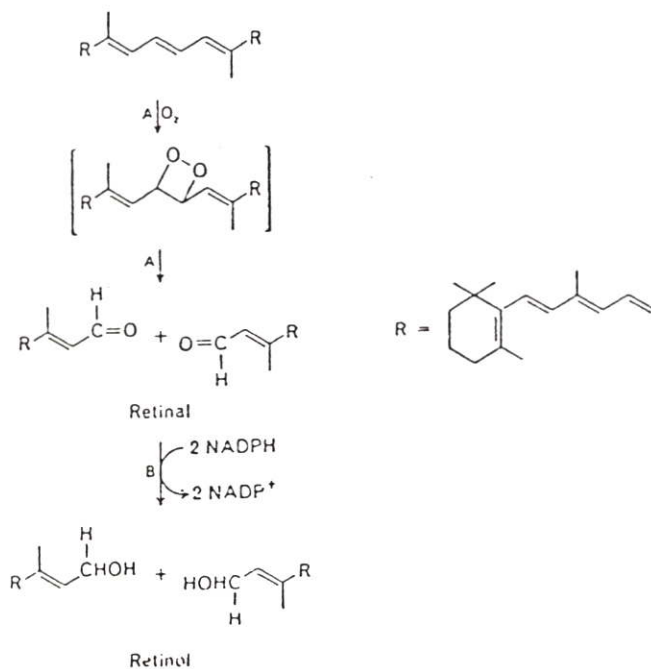
2.1.5.3 เป็นโปรวิตามิน เอ (Provitamin A)

เบต้า-แคโรทีนเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์วิตามิน เอ ที่สำคัญที่สุด โดยโมเลกุลของเบต้า-แคโรทีนจะถูกตัดตรงกลางด้วยเอนไซม์เบต้า-แคโรทีน 15, 15'-ออกซิจีเนส (β -carotene 15, 15'-oxygenase) กลายเป็น 2 โมเลกุลของเรตินัลดีไฮด์ (เรตินัล ; retinal) ภายในลำไส้และตับของสัตว์ จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นเรตินอล (retinol) โดยเอนไซม์เรตินัลรีดักเตส (retinal reductase) ดังรูป 2.13

2.1.5.4 ใช้ในทางเภสัชกรรม (Pharmaceutical)

จากการเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามิน เอ ของเบต้า-แคโรทีน จึงสามารถใช้ในการปรับสภาพและป้องกันการขาดวิตามิน เอ ได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารป้องกันแสง (light-protective agents) เพื่อปกป้องผิวหนังจากอาการคัน ไหม้ และเป็นผื่น ที่เกิดจากการรับแสงแดดของคนไข้ที่ป่วยเป็นโรคไวแสง (photosensitivity diseases) (Frossberg และคณะ, 1959)

ในการผลิตยาจะใช้แคโรทีนอยด์ เช่น เบต้า-แคโรทีน และแคนธาแซนธิน เป็นส่วนผสมในน้ำตาลที่เคลือบ (sugar-coated) บนเม็ดยา ผสมลงเจลาติน (gelatin) ที่ใช้ทำแคปซูล หรือผสมในเม็ดยาจำพวก soft gel (Munzel และ Fuller, 1961)



รูปที่ 2.13 กลไกการเปลี่ยนเบต้า-แคโรทีน ไปเป็นวิตามิน เอ (เรตินอล)

A คือ เบต้า-แคโรทีน 15, 15'-ออกซิจีเนส

B คือ เรตินัล รีดักเตส

(ที่มา : Goodwin, 1984)

2.1.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

2.1.7.1 ผลของธาตุอาหารบางชนิด

1) ฟอสฟอรัส

Blum และ Begin-Heick (1967) พบว่าถ้าในอาหารเพาะเลี้ยง *Euglena* sp. มีฟอสเฟตความเข้มข้นต่ำๆ จะเป็นการกระตุ้นการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ถึง 3 เท่า

Dholokia และ Modi (1984) ใช้โปรตีนเชื่อมไฮโดรเจนฟอสเฟตเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง *Blakeslea trispora* เพื่อศึกษาผลของสารต่อการสังเคราะห์เบต้า-แคโรทีน พบว่าที่ความเข้มข้นฟอสเฟตสูงๆ เชื้อจะผลิตเบต้า-แคโรทีนเพิ่มขึ้น 4-5 เท่า แต่รูปแบบการสังเคราะห์ไม่แตกต่างกันในระดับฟอสเฟตสูงๆ และต่ำๆ

2) ไนโตรเจน

Rau (1976) พบว่าการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จะเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน

Withers และ Haxo (1978) รายงานว่าปริมาณเบต้า-แคโรทีนของสาหร่าย *Peridinium foliaceum* จะเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้ออยู่ในระยะสแตชันนารี (stationary phase) มากกว่าระยะล็อก (log phase) เนื่องจากเกิดการขาดอาหารโดยเฉพาะไนเตรต โดยเซลล์จะเจริญเติบโตได้และผลิตเบต้า-แคโรทีนได้ดีเมื่อระดับไนโตรเจนในอาหารต่ำถึง 1 มิลลิโมลาร์

De Laura และคณะ (1987) พบว่าเมื่อไซยาโนแบคทีเรีย (*Pseudoanabaena* sp. และ *Oscillatoria splendida*) ขาดไนโตรเจนจะทำให้สูญเสียไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliproteins) ส่วนแคโรทีนอยด์มีปริมาณเพิ่มขึ้น

3) ซัลเฟอร์

สร้อยญา (2537) ทดลองเพาะเลี้ยง *Spirulina* ในอาหารสูตร Zarrouk พบว่าปริมาณโคโปสต์ซีเอ็มซัลเฟตที่ระดับต่างๆ ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของสาหร่าย แต่หากไม่ใส่โคโปสต์ซีเอ็มซัลเฟตลงในอาหารเลยกลับทำให้สาหร่ายผลิตเบต้า-แคโรทีนได้ดีที่สุด และยังพบว่าถ้าไม่ใส่แมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้การเจริญลดลงรวมทั้งการผลิตเบต้า-แคโรทีนต่ำ แต่เมื่อเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร ทำให้สาหร่ายผลิตเบต้า-แคโรทีนต่ำได้สูงสุด

4) โซเดียมคลอไรด์

สร้อยญา (2537) พบว่าโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัม/ลิตร ทำให้สาหร่าย *Spirulina* เจริญได้ดีที่สุด และเมื่อนำสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 20 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัม/ลิตร ทำให้ได้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด

Powthongsook (1993) รายงานว่า เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Dunaliella* ภายใต้ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงสูง เป็นเหตุให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อเซลล์ลดลง ส่วนปริมาณเบต้า-แคโรทีนต่อเซลล์เพิ่มขึ้น

2.1.7.2 ฟีเอช

Lilly และคณะ (1960) ทดลองเพาะเลี้ยง *Choanephora cucurbitarum* ที่ระดับฟีเอชต่างๆ พบว่าการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จะเกิดได้ดีที่ฟีเอช 7

อรพรรณ (2532) พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ที่เลี้ยงในอาหารที่มีฟีเอชเริ่มต้น 7.5 จะผลิตแคโรทีนสูงสุด และที่ฟีเอช 6.0 ผลิตแซนโทฟิลล์ได้สูงสุด

2.1.7.3 ความยาวคลื่นแสง

De Fabo และคณะ (1976) ได้ทำการศึกษา *Neurospora crassa* พบว่าช่วงของแสงสีน้ำเงิน สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์มากที่สุด

Haggbloom และ Unestum (1979) ศึกษา *Alternaria alternata* พบว่าเมื่อเชื้อได้รับแสงสีขาวหรือสีน้ำเงินจะผลิตตรงควัตถุสีน้ำตาลแดง โดยมีเบต้า-แคโรทีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ

Fiksdahl และ Liaaen-Jensen (1983) ทำการทดลองในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว ได้แก่ *Lyngbya*, *Plectonema*, *Phormidium*, *Fremyella diplosiphon*, *Tolypothrix tenuis*, และ *Aphanizomenon flos-aquae* และพบว่าจะผลิตเบต้า-แคโรทีนในแสงสีขาวได้ดีกว่าแสงสีแดง

2.1.7.4 ความเข้มแสง

แสงจำเป็นต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ใน *Neurospora crassa* และทำให้การผลิตเบต้า-แคโรทีนสูงขึ้นใน *Phycomyces sclerotiorum* (Zarokar, 1954; Lilly และคณะ, 1957)

Schiff (1980) พบว่าใน *Euglena gracilis* สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้แม้ในที่มืด แต่เมื่อเลี้ยงในที่ที่ได้รับแสงตลอดเวลาจะผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้นมาก

2.1.8 การเก็บรักษาแคโรทีนอยด์

Simpson และคณะ (1981) กล่าวว่า แสงสว่างมีผลต่อแคโรทีนอยด์คือ ทำให้คุณสมบัติของแคโรทีนอยด์เสียไป สามารถแก้ไขได้โดยการเติมสารบิวทิเลเตดไฮดรอกซีแอนนิโซล (butylated hydroxyanisole : BHA) และบิวทิเลเตดไฮดรอกซีโทลูอีน (butylated hydroxytoluene : BHT)

พงศ์เทพ และคณะ (2538) ทำการศึกษาเสถียรภาพของแซนโทฟิลล์ในกลีบดาวเรืองและสารที่ได้จากกลีบดาวเรืองด้วยการเติมสารต่อต้านการออกซิไดซ์ (antioxidant) ลงไป ซึ่งสารเหล่านั้นได้แก่ อีธอกซีควิน (ethoxyquin) และ BHA พบว่าทำให้เสถียรภาพของสารดีขึ้น

2.2 ไชยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไชยาโนแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (blue-green algae) จัดอยู่ในดิวิชันไชยาโนไฟตา (Division Cyanophyta) หรือดิวิชันไชยาโนไฟโคตา (Division Cyanophycota) เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต ทำให้โครงสร้างและชีวเคมีของเซลล์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียมากกว่าที่จะใกล้เคียงกับสาหร่ายในดิวิชันอื่นๆ ลักษณะที่แตกต่างจากแบคทีเรีย คือ มีรงควัตถุคลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) ทำให้สามารถสังเคราะห์แสงและปลดปล่อยออกซิเจนได้ ในขณะที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (photosynthetic bacteria) ผลิตออกซิเจนได้

ไซยาโนแบคทีเรีย พบกระจายตัวอยู่ทั่วไป ที่อยู่อาศัย (habitat) มีความหลากหลายมาก เช่น พบเกาะอยู่บนผิวดิน ผิวน้ำ ผิวน้ำตื้น ผิวน้ำลึก หรืออาจอยู่ตามเปลือกไม้ของพืชขึ้นดินแม้ว่าบริเวณดังกล่าวอาจขาดความชื้นในบางเวลาก็มีชีวิตอยู่ได้ เนื่องจากสามารถสร้างเมือกหุ้มโคโลนีขึ้นมาเพื่อรักษาความชื้นไว้ได้ ลักษณะเช่นนี้จึงทำให้ทนต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ดีกว่าสาหร่ายในดิวิชันอื่น อย่างไรก็ตามการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรียพบมากที่สุดตามที่อยู่อาศัยที่เป็นแหล่งน้ำ (aquatic habitat) โดยจะปรากฏทั้งในลักษณะที่เป็นแพลงก์ตอน (planktonic) หรือเกาะตามพื้นท้องน้ำ (benthic) (สมศักดิ์, 2530)

2.2.1 ลักษณะทั่วไป

2.2.1.1 รงกวัตรู ประกอบด้วย

- 1) คลอโรฟิลล์ เป็นคลอโรฟิลล์ เอ
- 2) แคโรทีนอยด์ ประกอบด้วย
 - เบต้า-แคโรทีน
 - แซนโทฟิลล์หลายชนิด ส่วนใหญ่จะเป็นมิโกแซนธิน และมิโกแซนโทฟิลล์
- 3) ไฟโคบิลิน (Phycobilin) ประกอบด้วย
 - ซี-ไฟโคไซยานิน (c-phycoyanin)
 - อัลโลไฟโคไซยานิน (allophycoyanin)
 - ซี-ไฟโคอีริทริน (c-phycoerythrin)

ในไซยาโนแบคทีเรียไม่มีคลอโรพลาสต์ชัดเจน มีเพียงไทลาคอยด์ซึ่งอยู่เดี่ยวๆ ไม่มีเยื่อต่างๆ หุ้ม และไม่มีการจัดเรียงตัวเป็นชั้นๆ พบอิสระทั่วไปในเซลล์ หรือบริเวณรอบนอกของตัวเซลล์ เรียกบริเวณที่มีรงกวัตรูเหล่านี้ว่า โครโมพลาสต์ (chromoplasm) บริเวณไทลาคอยด์เป็นที่อยู่ของคลอโรฟิลล์ เอ ส่วนรงกวัตรูอื่นๆ จะเกาะอยู่บนผิวของไทลาคอยด์ในลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ เรียก ไฟโคบิลิโซม (รูปที่ 2.14)

2.2.1.2 ส่วนประกอบของเซลล์

1) ผนังเซลล์ (Cell wall)

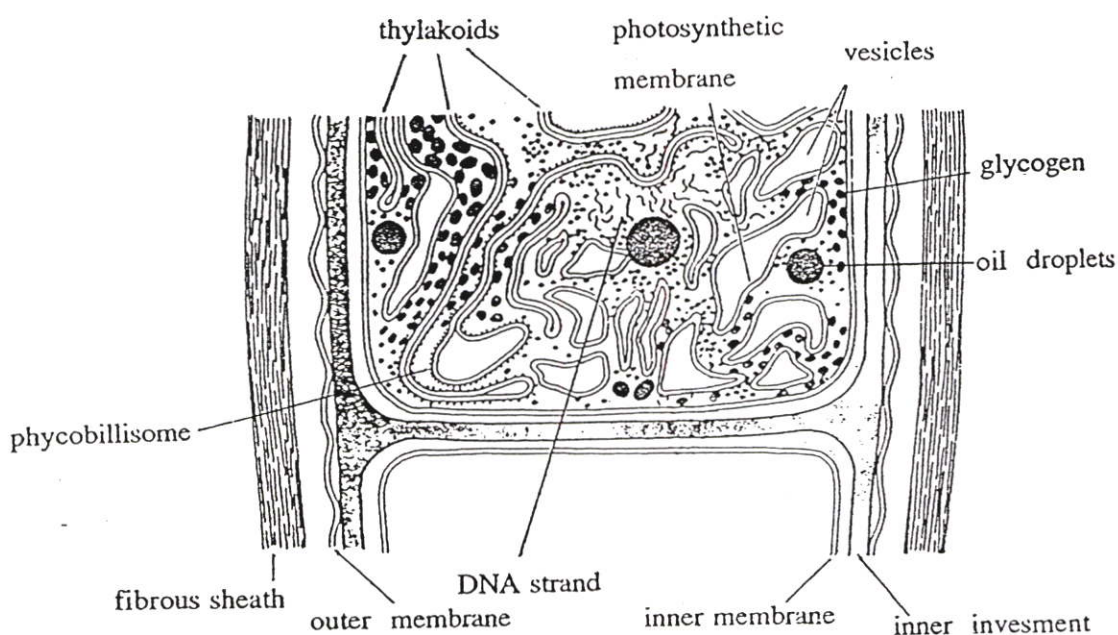
Desikachary (1959) กล่าวว่า ไซยาโนแบคทีเรียมีผนังเซลล์ 2 ชั้น ชั้นในบางประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลส ผนังชั้นนอกหนาประกอบด้วยสารพวกเจลาติน แต่ Prescott (1981) อ้างว่าไซยาโนแบคทีเรียมีผนังเซลล์ 3 ชั้น โดยชั้นในบางประกอบด้วยเซลลูโลส ชั้นกลางเป็นสาร

พวกเพคติน ส่วนชั้นนอกสุดเป็นสารเมือกเจลาติน ซึ่งเป็นชั้นที่เรียกว่า ซิท (sheath) ชั้นนี้สามารถเก็บความชื้นไว้ได้มาก เป็นประโยชน์ต่อสาหร่ายเมื่อตกอยู่ในสภาวะแห้งแล้ง

2) ไซโตพลาสซึม (Cytoplasm)

ไซยาโนแบคทีเรียมีไซโตพลาสซึมที่แตกต่างจากสาหร่ายอื่น คืออยู่ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปข้างใน มีเยื่อพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) หุ้มไว้ ไซโตพลาสซึมแบ่งออกเป็น 2 ส่วน บริเวณส่วนในไม่มีสีเนื่องจากไม่มีรงควัตถุเรียก เซนโตรพลาสซึม (centroplasm) ส่วนบริเวณรอบนอกมีรงควัตถุสะสมอยู่เรียก โครโมพลาสซึม (chromoplasm) ในบริเวณโครโมพลาสซึมนี้มีไซยาโนไฟซินกรานูล (cyanophycin granule) ซึ่งเป็นพวกแป้งเม็ดเล็กๆ รวมทั้งไกลโคเจนกรานูล และหยดน้ำมันเล็กๆ (lipid globule) กระจายอยู่ทั่วไป (รูปที่ 2.14 และ 2.16)

ไซยาโนแบคทีเรียไม่มีนิวเคลียสชัดเจน มีเพียงสารที่ทำหน้าที่คล้ายนิวเคลียสคือดีเอ็นเอ ซึ่งอาจรวมตัวกันเป็นร่างแหหลวมๆ หรือเป็นท่อนสั้นๆ หรือจับตัวกันแน่นมากก็ได้



รูปที่ 2.14 โครงสร้างภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแบบเส้นสาย (ที่มา : ยูดี้, 2542)

3) แวกิวโอล (Vacuole)

อาจพบแก๊สแวกิวโอล (gas vacuole) หรือชูโดแวกิวโอล (pseudovacule) ลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายทั่วไป แก๊สที่อยู่ในแวกิวโอลส่วนใหญ่เป็นไนโตรเจน ส่วนน้อยเป็นออกซิเจน

แก๊สแวกิวโอลช่วยในการลอยตัวของสาหร่าย โดยทั่วไปจะพบในพวกที่เป็นแพลงก์ตอนพืช (phytoplankton) เช่น *Anacystis*, *Anabaena*, *Nostoc* และ *Coelosphaerium* เป็นต้น

4) อาหารที่เก็บสะสม (Storage food)

อาหารที่เก็บสะสมเป็นพวกคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ แป้งไซยาโนไฟซิน (cyanophycin starch) นอกจากนั้นยังมีไกลโคเจนกรานูล และหยดน้ำมัน

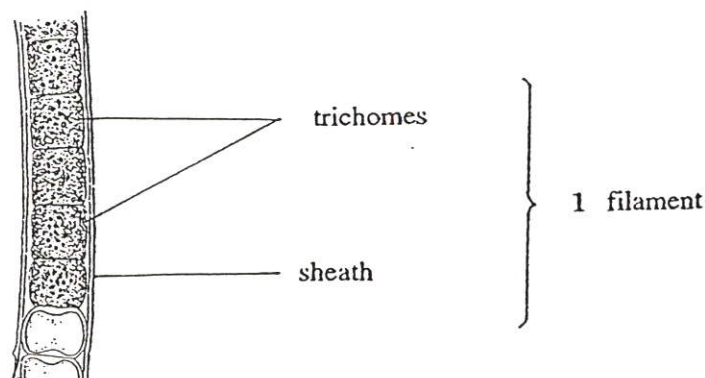
2.2.1.3 รูปร่าง

ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่าง 2 แบบ คือ

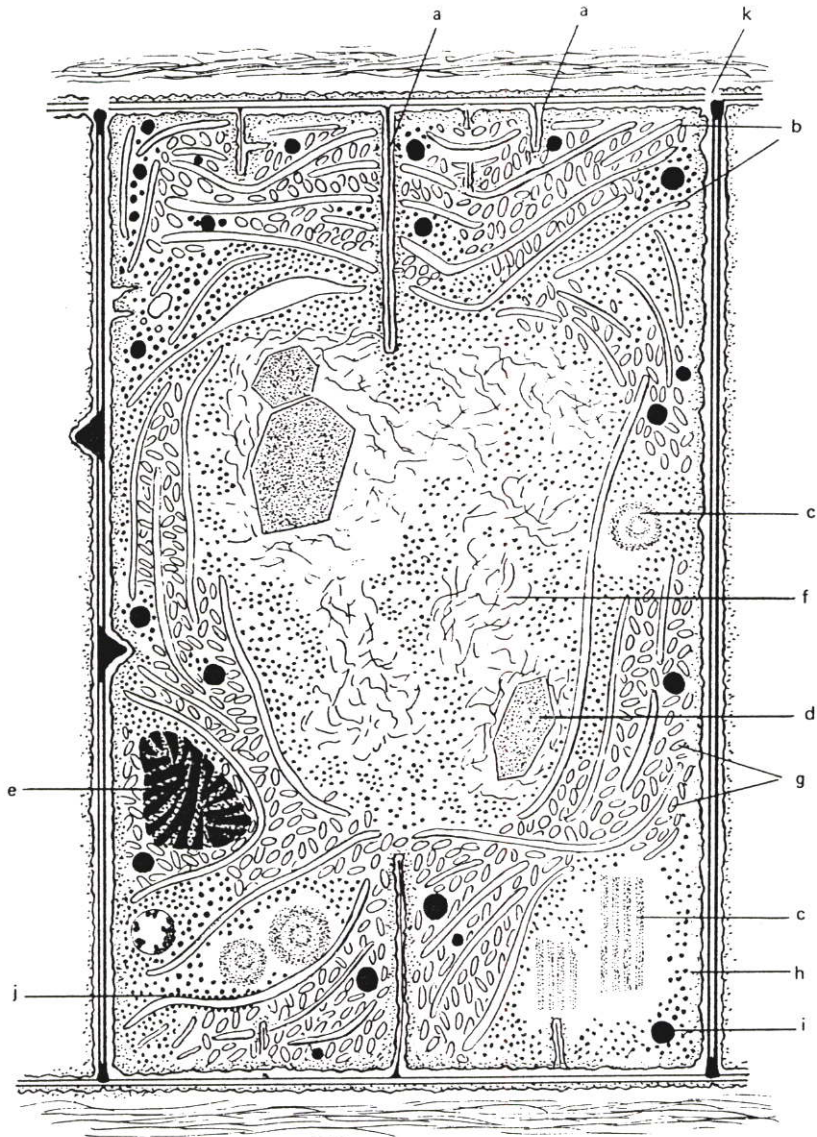
1) รูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีไม่เป็นเส้นสาย (non-filamentous form)

2) รูปร่างเป็นเส้นสาย (filamentous form) เกิดจากเซลล์หลายเซลล์มาต่อกันจนเป็นสายยาว เส้นสายนี้อาจตรงเรียบไม่มีการแตกแขนง บางชนิดเส้นสายอาจมีปลายโค้งหรือบิดเป็นเกลียว บางชนิดเป็นเส้นสายที่แตกแขนง ซึ่งอาจแตกแขนงจริงหรือแตกแขนงไม่จริงก็ได้

ในพวกที่เป็นเส้นสาย ส่วนของเซลล์ที่เรียงกันเป็นแถวเรียก ไตรโคม (trichome) ดังนั้นในแต่ละเส้นสายจึงประกอบด้วยไตรโคมและซีทรวมกัน (รูปที่ 2.15) เซลล์ในไตรโคมจะมีการเชื่อมโยงของไซโตพลาสซึมระหว่างเซลล์ โดยผ่านรูเล็กๆ ที่ผนังเซลล์



รูปที่ 2.15 ส่วนประกอบภายในเส้นสายของไซยาโนแบคทีเรียแต่ละเส้น (ที่มา : ยูวดี, 2542)



- (a) cross wall.
- (b) thylakoids or photosynthetic membranes.
- (c) cylindrical body seen in cross section (upper) and longitudinal section (lower).
- (d) polyhedral body, also found in bacteria.
- (e) structured granule, also called cyanophycin granule.
- (f) DNA strands in the "centroplasm."
- (g) glycogen granules.
- (h) ribosomes.
- (i) lipid globule.
- (j) phycobilisomes.
- (k) pore.

รูปที่ 2.16 ภาคตัดขวางของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย (ที่มา : Trainor, 1978)

2.2.1.4 เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst)

เป็นเซลล์พิเศษที่มีผนังหนาทำหน้าที่ช่วยในการตรึงไนโตรเจน พบในพวกที่เป็นเส้นสายเท่านั้น และบริเวณเฮเทอโรซิสต์นี้เป็นจุดอ่อนที่ทำให้เซลล์ขาดออกจากกัน แต่ละตอนที่ขาดออกจากกันเรียก ฮอร์โมโกน (hormogone) หรือฮอร์โมโกเนีย (hormogonia) ซึ่งอาจเป็นสายยาว หรือสายสั้นๆ ก็ได้ และฮอร์โมโกนดังกล่าวสามารถแบ่งเซลล์ให้เป็นสายยาวต่อไปได้

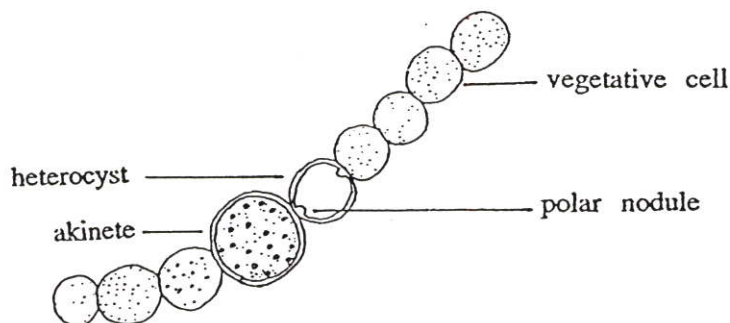
ปกติเฮเทอโรซิสต์ในเซลล์จะใส หรือมีสีเหลืองอ่อน หรือน้ำตาลจาง เนื่องจากขาดรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง เหลือแต่แคโรทีนอยด์ ถ้าหลุดจากเส้นสายก็จะสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้มากกว่าเซลล์ธรรมดา เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมก็จะงอกเป็นเส้นสายใหม่ได้

ตำแหน่งการเกิดเฮเทอโรซิสต์มี 2 ตำแหน่ง ดังนี้

1) เกิดระหว่างเซลล์ภายในสาย (intercalary heterocyst) เช่น พบใน *Anabaena* ดังรูปที่ 2.17

2) เกิดที่ปลายสายเซลล์ (terminal heterocyst) แบ่งเป็น

2.1 เกิดบริเวณปลายสายทั้ง 2 ข้าง เช่น ที่พบใน *Anabaenopsis*, *Cylindrospermopsis* (รูปที่ 2.18)

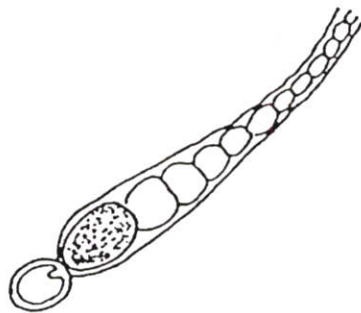


รูปที่ 2.17 เฮเทอโรซิสต์ภายในสายเซลล์ (ที่มา : ยุกดี, 2542)



รูปที่ 2.18 เฮเทอโรซิสต์ที่อยู่บริเวณปลายสายทั้ง 2 ข้าง (ที่มา : ยิวดี, 2542)

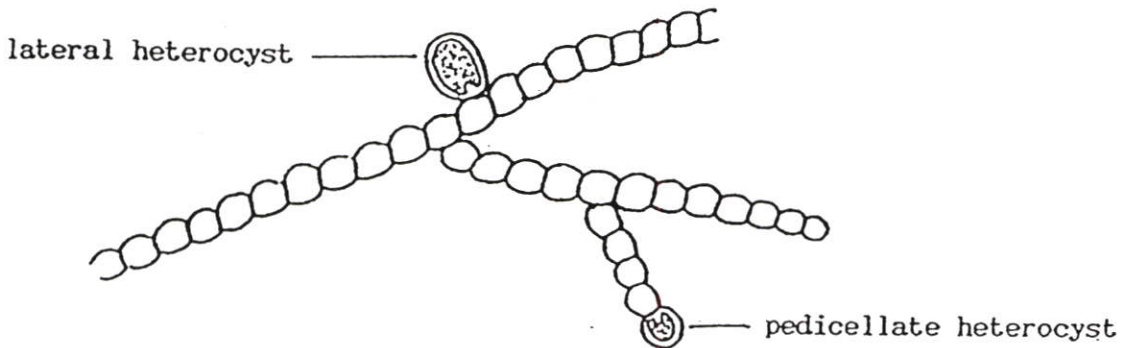
2.2 เกิดบริเวณโคนติดกับปลายอื่น (basal heterocyst) เช่น พบใน *Calothrix* (รูปที่ 2.19)



รูปที่ 2.19 เฮเทอโรซิสต์บริเวณปลายสาย (ที่มา : ยิวดี, 2542)

2.3 เกิดที่ปลายของแขนงสั้นๆ (pedicellate heterocyst) พบใน *Nostochopsis*

2.4 เกิดข้างๆ สายโดยแนบติดกับเซลล์ในเส้นสาย (lateral heterocyst) พบใน *Nostochopsis* (ดังรูปที่ 2.20)



รูปที่ 2.20 เฮเทอโรซิสต์บริเวณปลายแขนงสั้นๆ และที่เกิดข้างสายโดยแนบติดกับเซลล์ในเส้นสาย
(ที่มา : ยิวดี, 2542)

2.2.2 ลักษณะพิเศษบางประการ

2.2.2.1 การเปลี่ยนสี (chromatic adaptation)

การเปลี่ยนสีของไซยาโนแบคทีเรียขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นแสง (wave length) และความเข้มของแสง (intensity) เพราะแสงสีต่างกันทำให้สาหร่ายสร้างรงควัตถุมีปริมาณมากน้อยต่างกัน โดยถ้าให้แสงสีเขียวไซยาโนแบคทีเรียจะมีสีแดง เพราะสีเขียวไปกระตุ้นให้สร้างรงควัตถุสีแดงพวกไฟโคอีริทริน แต่ถ้าเลี้ยงในแสงสีแดงจะทำให้มีสีน้ำเงิน เพราะแสงสีแดงกระตุ้นการสร้างไฟโคไซยานิน

การเปลี่ยนสีอีกประการหนึ่งของไซยาโนแบคทีเรีย คาดว่าจะเกี่ยวกับการขาดไนโตรเจน พบว่าถ้าขาดสารอาหารตัวนี้จะทำให้สาหร่ายมีสีซีดลงหรือเป็นสีเหลือง

2.2.2.2 การตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation)

เฮเทอโรซิสต์เป็นตัวสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ซึ่งสำคัญต่อการตรึงไนโตรเจนโดยสามารถเปลี่ยนไดไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย และจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นโปรตีนในที่สุด ดังนั้นถ้าอาหารที่ใช้เลี้ยงขาดสารประกอบไนโตรเจน ไซยาโนแบคทีเรานั้นจะสร้างเฮเทอโรซิสต์เพิ่มขึ้น แต่ถ้าอาหารสมบูรณ์อาจมีการสร้างเฮเทอโรซิสต์เล็กน้อยหรือไม่สร้างเลย

2.2.2.3 ความสามารถทนต่อสภาพอุณหภูมิสูงและต่ำมาก ๆ ได้

ไซยาโนแบคทีเรียมีซีทหนา และโมเลกุลของโปรตีนภายในโปรโตพลาสซึมจับกันแน่น จึงช่วยให้ทนทานต่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าปกติได้ เช่น บริเวณขั้วโลก ในทะเลสาบในบ่อน้ำพุร้อน

2.2.3 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียมีหลายสูตร ตามที่กาญจนภาชน์ (2527) ได้รายงานไว้มีดังนี้ Allen's blue green medium (modified), Bristol's medium, Chu no.1 medium, Modified Chu no.1 medium, BG 11 medium และ Soil water medium

สุวรรณ (2542) รายงานว่า BG 11 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่แยกจากแหล่งต่างๆ เช่น ดิน แหล่งน้ำ และเมื่อให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (เช่น cool white, warm white, day light) ทำให้การเพาะเลี้ยงมีความสำเร็จมากขึ้น

สุพจน์และสุริยา (2542) ศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *A. siamensis* พบว่าการให้อากาศในอัตรา 3 vvm สำหรับมีการเจริญสูงสุด

Antarikanonda (1980) พบว่า การวัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร สามารถวัดค่าความเข้มข้นของเซลล์สำหรับสีน้ำเงินแกมเขียวได้โดยที่สีของรงควัตถุไม่รบกวน

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์, สารเคมี และจุลินทรีย์

1. ไชยาโนแบคทีเรียจากคลังเก็บเชื้อ วท. จำนวน 83 สายพันธุ์
2. สารเคมีที่เกี่ยวข้องในสูตรอาหาร BG 11, สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ และสารเคมีที่ใช้ทดสอบความคงตัว
3. หลอดเพาะเลี้ยง (Culture tube) เส้นผ่าศูนย์กลางกลาง 4.5 ซม. สูง 30 ซม. มีช่องให้อากาศเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม.
4. เครื่องแก้ว เช่น ฟลาสก์, บีกเกอร์, กระจบอขวด, ปิเปตต์ ฯลฯ
5. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) รุ่น pipetman ของ Gilson France
6. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Faster Bio 48
7. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น New Brunswick Scientific ของ Brunswick Scientific USA
8. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave) รุ่น SS-325 ของ Tomy
9. เครื่องปั่นละเอียด (Homogenizer) รุ่น Ultra-turrax T25 ของ Kika-Labortechnik
10. ชุดบดเนื้อเยื่อ (Tissue Homogenizers) ของ Thomas Scientific
11. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Spectronic 20 ของ Bausch & Lomb
12. เครื่องเขย่าสาร (Vortex) model K-550-GB ของ Scientific Industries, Inc. USA
13. กรวยแยก (Separatory funnel) 250 มิลลิลิตร ของ Witeg Preciso และ Pyrex no. 6402
14. กระดาษกรอง Whatmann GF/C และชุดกระดาษกรองสารของ HP
15. ชุดกรองต่อกับปั๊ม (suction pump)
16. ตู้อบ (Oven) ของ Mammert
17. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Labofuge 6000 ของ Heraeus Christ และเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Ultra centrifuge) รุ่น RC 285 ของ Sorvall
18. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) model PHB2 ของ Yokokawa Electric Corporation
19. เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter) รุ่น 51001 illuminance meter ของ Yokokawa
20. เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ (Air flow meter) ของ Kofloc
21. HPLC Series 1100 Diode array detector ของ Hewlett Packard
22. เครื่องระเหย (Evaporator)
23. อ่างน้ำร้อน (Water bath) รุ่น GFL 1083
24. โถดูดความชื้น (Desiccator) รุ่น Glaswerk wertheim GL 32

25. หลอดฟลูออเรสเซนต์ รุ่น TLD 36 W Daylight 2600/m. 72 Lm/W ของ Philips
26. ปีมัลม รุ่น Heavy duty industrial ของ Puma Taiwan
27. วาล์วปรับแรงลมสแตนเลสแบบ 5 หัว
28. สายยางขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร
29. สายยางซิลิโคน เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

3.2 การเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรีย

3.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้เป็นอาหารสังเคราะห์ตามสูตร BG 11 มีองค์ประกอบดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	200 เท่า (กรัม/ลิตร)
NaNO ₃	1.500	300.000
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.040	8.000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	15.000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036	7.200
Citric acid	0.006	1.200
Ferric ammonium citrate	0.006	1.200
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (disodium magnesium salt)	0.001	0.200
Na ₂ CO ₃	0.020	4.000
Trace metal mix	1.0 มิลลิลิตร	
Distilled water	1.0 ลิตร	
หลังจากฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูงแล้ว ปรับพีเอชเป็น 7.4		
Trace metal mix	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	กรัม/ลิตร
H ₃ BO ₃	2.860	2.860
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.810	1.810
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222	0.222
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.049	0.049
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079	0.079
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.049	0.049

ในการเตรียมธาตุอาหารหลัก จะเตรียมเป็น stock ของแต่ละสารให้มีความเข้มข้น 200 เท่า โดยชั่งสารแต่ละชนิด ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ส่วนธาตุอาหารรองชั่งสารทุกชนิดมาละลายรวมกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร (ละลายทีละชนิด) การนำไปใช้เตรียมอาหารเหลวสูตร BG 11 ปริมาตร 1 ลิตร ทำได้โดยดูด stock ธาตุอาหารหลักมาชนิดละ 5 มิลลิลิตร และดูดธาตุอาหารรองมา 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร หลังจากฆ่าเชื้อปรับพีเอชของอาหารเป็น 7.4

3.2.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

ถ่ายเชื้อจากอาหารวุ้น (slant) มาเลี้ยงในอาหารเหลว (broth) ในฟลาสก์ ซึ่งบรรจุอาหาร BG 11 ไม่เติมโซเดียมไนเตรท ปริมาตร 70-75 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที และให้แสงจากหลอด ฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวความเข้มแสง 1200-1500 ลักซ์ ตลอดเวลา หลังจากมีการเจริญของเซลล์มากพอแล้ว จึงนำไปเป็นเชื้อตั้งต้นในการทดลองต่อไป

3.2.3 การเพาะเลี้ยงในหลอดเพาะเลี้ยง

เตรียมหลอดเพาะเลี้ยงบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG 11 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วเติมเชื้อตั้งต้นให้ได้ค่าความขุ่นเริ่มต้น (Optical Density) ที่ 900 นาโนเมตร เท่ากับ 0.03 ให้อากาศ 3 vvm และแสง 1500 ลักซ์ ตลอดเวลาเพาะเลี้ยง

3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการสร้างแคโรทีนอยด์

นำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 83 สายพันธุ์ จากคลังเก็บเชื้อสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) มาเพาะเลี้ยงในหลอดเพาะเลี้ยงปริมาตร 250 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ และให้อากาศ 3 vvm เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ทุกวัน เพื่อวัดการเจริญด้วยการวัดค่าความขุ่นของเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร และวันที่ 7 เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เพื่อหาน้ำหนักแห้งและวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ตามวิธีของ KMITT (1996) คัดเลือกตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด 5 สายพันธุ์ จากนั้นนำเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ ไปจัดจำแนกตามวิธีของ Desikachary (1959)

3.3.1.1 การวัดค่าการเจริญ

การวัดค่าการเจริญ จะทำการวัดอยู่ในรูปของค่าความขุ่น โดยเครื่อง spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร

3.3.1.2 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

นำไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C ที่ต่อกับ suction pump ก่อนการกรอง นำกระดาษกรองไปอบในตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ไซยาโนแบคทีเรียที่กรองได้บนกระดาษกรอง นำไปทำแห้งในตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ น้ำหนักแห้งหาได้จากผลต่างระหว่างน้ำหนักกระดาษก่อนและหลังการกรอง

3.3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ตามวิธีของ KMITT (1996)

- 1) กรองไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงประมาณ 5-25 มิลลิลิตร ด้วยกระดาษกรอง GF/C
- 2) เอากระดาษกรองที่มีเซลล์อยู่ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยง
- 3) เติมน้ำ 99.8% เอทานอล 10 มิลลิลิตร และ 60% โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (60% KOH) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- 4) สกัดในอ่างน้ำร้อนที่ 45-50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
- 5) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3500 รอบ/นาที นาน 5-10 นาที
- 6) ใส่น้ำสกัดลงในกรวยแยก
- 7) เติมนิโอดีทอีเทอร์ (diethyl ether) 15-20 มิลลิลิตร และ 90 กรัม/ลิตร โซเดียมคลอไรด์ จำนวน 20 มิลลิลิตร
- 8) เขย่า ปล่อยทิ้งไว้จนแยกชั้น
- 9) ไขชั้นสีเขียวออกช้าๆ
- 10) เติมน้ำ 90 กรัม/ลิตร โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร ลงในชั้นสีเหลือง ทำซ้ำขั้นตอนที่ 8-9 จนกระทั่งสารละลายแยกเป็นชั้นใสไม่มีสีกับสีเหลือง
- 11) ไขชั้นสีเหลืองออก เติมนิโอดีทอีเทอร์ (Na₂SO₄ anhydrous) ลงไปเพื่อดูดน้ำ
- 12) ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยนิโอดีทอีเทอร์
- 13) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์เทียบกับ *Spirulina* sp. จากสูตร

$$\text{mg. Carotenoid/g. cell} = \frac{A_{450} \times 25 \times 100}{260 \times \text{mg. Dry weight}}$$

3.3.1.4 การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียตามวิธีของ Desikachary (1959)

ทำการขีดเชื้อลงบนอาหารแข็งสูตร BG 11 บ่มเชื้อไว้บนชั้นเพาะเลี้ยงที่ติดแผ่นหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีขาว ความเข้มแสงประมาณ 1500 ลักซ์ จนกระทั่งโคโลนีของเชื้อเจริญ สังเกตลักษณะของโคโลนี

ศึกษาลักษณะของเซลล์ โดยเตรียมสไลด์ตัวอย่างดังนี้ หยคน้ำลงบนแผ่นกระจกสไลด์ จากนั้นเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งใส่ลงในหยคน้ำ เขี่ยเชื้อให้กระจาย ปิดด้วยโคเวอร์สไลด์ (cover slid) นำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า สังเกตลักษณะต่างๆ และทำการจัดจำแนกจนถึงระดับสกุลตามแนววินิจฉัยของ Desikachary (1959)

3.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

3.3.2.1 ผลของโซเดียมไนเตรท (NaNO_3)

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในหลอดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหารเหลวสูตร BG 11 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ในสูตรอาหารเป็น 0, 1.5 และ 3 กรัม/ลิตร ให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญและปริมาณแคโรทีนอยด์ดังการทดลองที่ 3.3.1

3.3.2.2 ผลของไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในหลอดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหารสูตรเดิม 250 มิลลิลิตร แปรผันความเข้มข้นของไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 0.04, 0.06 และ 0.08 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1

3.3.2.3 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในหลอดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหารสูตรเดิม 250 มิลลิลิตร แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 0.075, 0.113 และ 0.15 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1

3.3.2.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในหลอดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหารสูตรเดิม 250 มิลลิลิตร แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ เป็น 0, 1 และ 10 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1

3.3.2.5 ผลของพีเอชเริ่มต้น

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในหลอดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหารสูตรเดิม 250 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7, 7.5 และ 8 เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1

3.3.2.6 ผลของอุณหภูมิ

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในหลอดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหารสูตรเดิม 250 มิลลิลิตร ภายใต้อุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับ คือ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1

3.3.2.7 ผลของชนิดของแสง

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในหลอดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหารสูตรเดิม 250 มิลลิลิตร ภายใต้แสงสีขาว, เขียว และแดง จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1

3.3.2.8 ผลของความเข้มแสง

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในหลอดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหารสูตรเดิม 250 มิลลิลิตร ภายใต้แสงสีที่เหมาะสม แปรผันความเข้มแสงเป็น 2000, 3000 และ 4000 ลักซ์ เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1

3.3.3 ศึกษาปริมาณสารสกัดที่เหมาะสม

นำไซยาโนแบคทีเรียมา 5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที นาน 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์มาสกัดด้วย 99.8%, 90%, 80% และ 60% เอทานอล จำนวน 10 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่นละเอียด 2 นาที วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่เทียบกับการสกัดด้วย 99.8% เมทานอล

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณเบต้า-แคโรทีนในสารละลายแคโรทีนอยด์

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน ครั้งละ 5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที นาน 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์มาสกัดด้วย 99.8% เอทานอล 5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที นาน 15 นาที กรองส่วน น้ำใสด้วยชุดกระดาษกรองสารของ HP จากนั้นระเหยเอาเอทานอลออกที่อุณหภูมิต่ำ (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เดิมเฮกเซนลงในสาร 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณและการเปลี่ยนแปลงของเบต้า-แคโรทีนในไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์โดยการฉีด HPLC คอลัมน์ ODS hypersil C₁₈ ของ HP DAD detector ตรวจจับที่ 450 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile)

: ไคคลอโรมีเทน (dichloromethane) : เมทานอล : น้ำที่ปราศจากไอออน อัตราส่วน 79.9 : 10 : 10 : 0.1 ใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที

3.3.5 การชักนำให้เกิดการสร้างสารแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น

นำไซยาโนแบคทีเรียที่มีแคโรทีนอยด์สูงสุดจากการวิเคราะห์ในการทดลองที่ 3.3.4 มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่เหมาะสม จนกระทั่งปลายระยะระยะล็อก ทำการเก็บเซลล์ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วย้ายลงสู่อาหารใหม่ที่ปราศจากไนเตรทและสารอินทรีย์ เติมน้ำต่าง ๆ เพื่อดูผลที่เกิดขึ้นกับการสร้างแคโรทีนอยด์

3.3.5.1 ผลของโซเดียมคลอไรด์

ย้ายไซยาโนแบคทีเรียลงเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ที่แปรผันความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์เป็น 3, 5 และ 7 กรัม/ลิตร ให้แสงต่อเนื่องด้วยแสงสีและความเข้มแสงที่เหมาะสม เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อวัดการเจริญ วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ก่อนและหลังการชักนำวิธีของ KMITT (1996) และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเบต้า-แคโรทีนด้วย HPLC

3.3.5.2 ผลของเหล็ก

ย้ายไซยาโนแบคทีเรียลงเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ที่แปรผันความเข้มข้นเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต (Ferric ammonium citrate) เป็น 0.006, 0.009 และ 0.012 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ดังการทดลองที่ 3.3.5.1

3.3.5.3 ผลของโซเดียมอะซิเตต

ย้ายไซยาโนแบคทีเรียลงเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ที่แปรผันความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตตเป็น 0.1, 0.15 และ 0.2 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ดังการทดลองที่ 3.3.5.1

3.3.5.4 ผลของความเข้มแสง

ย้ายไซยาโนแบคทีเรียลงเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ ภายใต้อุณหภูมิและความเข้มแสงต่างกัน 3 ระดับ คือ 3000, 4000 และ 5000 ลักซ์ เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ดังการทดลองที่ 3.3.5.1

3.3.6 การศึกษาความคงตัวของสีจากแคโรทีนอยด์และเบต้า-แคโรทีน

3.3.6.1 การศึกษาความคงตัวของสีเหลืองจากแคโรทีนอยด์

นำไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงมาประมาณสายพันธุ์ละ 200-250 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง หมุนเหวี่ยงเอาเซลล์ที่ได้มาสกัดด้วย 99.8% เอทานอล 50 มิลลิลิตร ทำการแยกแคโรทีนอยด์ออกจากคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ KMITT (1996) จะได้สารสีเหลือง ระเหยไดเอทิลอีเทอร์ออกที่อุณหภูมิต่ำ

จากนั้นเติมบิวทิลไฮดรอกซีแอนนิโซล (Butylatedhydroxyanisole; BHA) 0.2%, เติมบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylatedhydroxytoluene; BHT) 0.2% และน้ำมันพืชสกัดจากปาล์ม เก็บที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสีที่ 450 นาโนเมตร ก่อนและหลังเติมสารไปแล้วเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์

3.3.6.2 การศึกษาความคงตัวของเบต้า-แคโรทีน

นำไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงมาประมาณสายพันธุ์ละ 200-250 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง หมุนเหวี่ยงเอาเซลล์ที่ได้มาสกัดด้วย 99.8% เอทานอล 50 มิลลิลิตร ระบายเอทานอลออกที่อุณหภูมิต่ำ จากนั้นเติมบิวทิลไฮดรอกซีแอนนิโซล 0.2%, เติมบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน 0.2% และน้ำมันพืชหยก เก็บที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส วิเคราะห์เบต้า-แคโรทีน ด้วย HPLC ก่อนและหลังเติมสารไปแล้วเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์

3.3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลของการเจริญและปริมาณแคโรทีนออกซ์ในแต่ละกลุ่มทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งแผนของการทดลองเป็นแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ดังนั้นจึงต้องวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS/PC version 5.1 ในการวิเคราะห์ F-test และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($LSD_{0.05}$)

กรณีเปรียบเทียบการเจริญและปริมาณแคโรทีนออกซ์ที่ผลิตขึ้นในแต่ละเชื้อระหว่างสูตรอาหาร BG 11 ปกติกับสูตรอาหาร BG 11 ที่เหมาะสม ใช้ Levene's test ทดสอบค่า Variance แล้ววิเคราะห์ความแตกต่างด้วย T-test

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตแคโรทีนอยด์

ทำการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์จาก 83 สายพันธุ์ของคลังเก็บเชื้อฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) จากการทดลองสามารถคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด 5 สายพันธุ์ คือ ไซยาโนแบคทีเรียรหัส ANCG1709, ANCG18, ANCG1660, ANCG14 และ ANCG1542 ตามลำดับ เมื่อนำไปจัดจำแนกตามแนวการวินิจฉัยของ Desikachary (1979) พบว่าทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *Anabaena siamensis*, *Calothrix*: sp., *Nostoc* sp., *Calothrix* sp. และ *Calothrix* sp. ตามลำดับ (ดังรูปที่ 4.1) โดยมีค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร (OD_{900}) เป็น 0.48, 0.24, 0.28, 0.20 และ 0.23 ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 3.86, 3.54, 2.89, 2.17 และ 2.01 มิลลิกรัม/ลิตร โดยทุกสายพันธุ์ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง จากค่า OD_{900} จะเห็นได้ว่า *A. siamensis* เจริญได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Nostoc* sp., *Calothrix* sp. ANCG18, *Calothrix* sp. ANCG1542 และ *Calothrix* sp. ANCG14 กราฟการเจริญและปริมาณแคโรทีนอยด์ ดังแสดงในรูปที่ 4.2

การที่ *A. siamensis* มีผลผลิตแคโรทีนอยด์มากอาจเนื่องมาจากสายเซลล์สั้น ขนาดเซลล์เล็ก ทำให้สามารถเจริญได้ดีและรวดเร็ว มีปริมาณเซลล์มาก ดังเช่นสุวรรณ (2542) รายงานว่า ไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Anabaena* บางสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตเร็วมาก ถ้ามีธาตุอาหารที่สมบูรณ์ในน้ำ ทำให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และตามที่สุพจน์และสุริยา (2542) กล่าวว่า *A. siamensis* มีอัตราการเจริญเติบโตสูง เนื่องจากในสายเซลล์มีเฮเทอโรซิสต์หัวท้าย (intercalary heterocyst) ทำให้สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ในการเจริญได้ดี ประกอบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจน คือโซเดียมไนเตรทลงไปจึงทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสังเคราะห์แคโรทีนอยด์มากขึ้นกว่าในสภาวะที่มีไนเตรทในอาหาร ซึ่งตรงกับที่ Rau (1976) กล่าวว่าไว้ว่าสาหร่ายจะสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เมื่ออยู่ในสภาวะขาดไนโตรเจน

ส่วนพวก *Calothrix* มีปริมาณแคโรทีนอยด์รองลงมาอาจเนื่องมาจากปริมาณเซลล์ที่น้อยกว่า เพราะไซยาโนแบคทีเรียพวกนี้เจริญได้ช้ากว่า *A. siamensis* ด้วยลักษณะของสายเซลล์ *Calothrix* ที่คัดเลือกได้เป็นแบบมีเฮเทอโรซิสต์บริเวณปลายเซลล์ที่เป็นฐาน (basal) ข้างเดียวหรือพบได้บ้างบริเวณกลางสายเซลล์ รวมทั้งสายเซลล์ที่ยาวและยังมีเฮเทอโรซิสต์จำนวนน้อย ทำให้ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนมาใช้ในการเจริญน้อยกว่า *A. siamensis*

กรณี *Nostoc* มีการเจริญต่ำกว่า *A. siamensis* ปริมาณเซลล์น้อยกว่าจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีปริมาณแคโรทีนอยด์น้อยกว่า เพราะที่ลัสเป็นเมือกเหมือนวุ้นทำให้อาหารที่เลี้ยงมีความ

หนืด การไหลเวียนของสารอาหารเป็นไปได้ไม่คึก และเมือกที่มีอยู่ทำให้เซลล์ค่อนข้างเกาะกลุ่มกัน การรับแสงจึงไม่ทั่วถึง

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์

4.2.1 ผลของโซเดียมไนเตรท

เมื่อทดลองแปรผันความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทในอาหารเป็น 0, 1.5 และ 3 กรัม/ลิตร ได้ผลดังรูปที่ 4.3 และ 4.4 พบว่า *Calothrix* sp. ANCG14 มีการเจริญไม่แตกต่างกันแต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($P_{0.01}$) โดยผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 2.96 กรัม/ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมไนเตรท (0 กรัม/ลิตร)

Calothrix sp. ANCG18 มีการเจริญไม่แตกต่างกันแต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร ผลิตได้ 3.29 กรัม/ลิตร

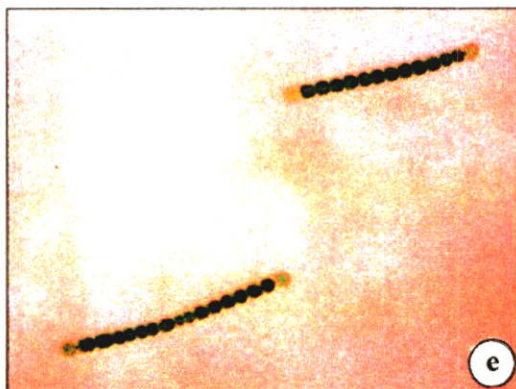
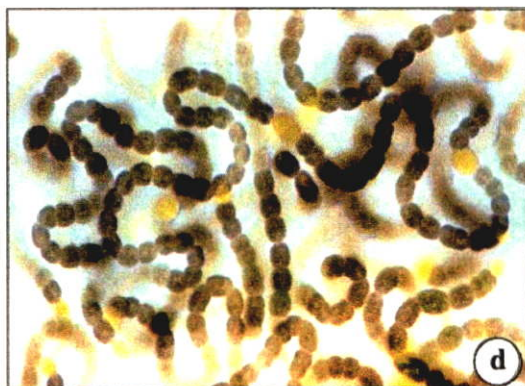
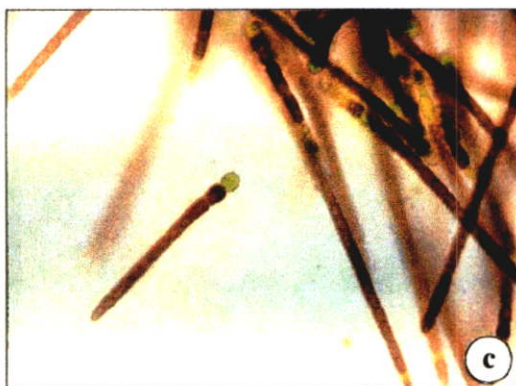
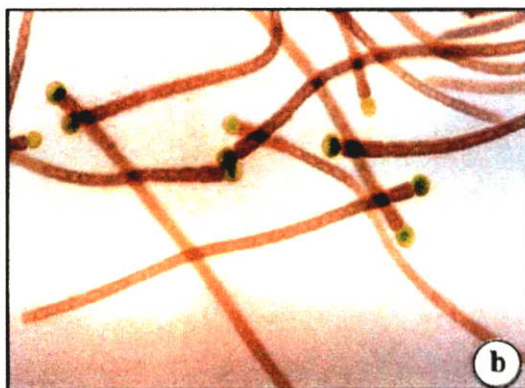
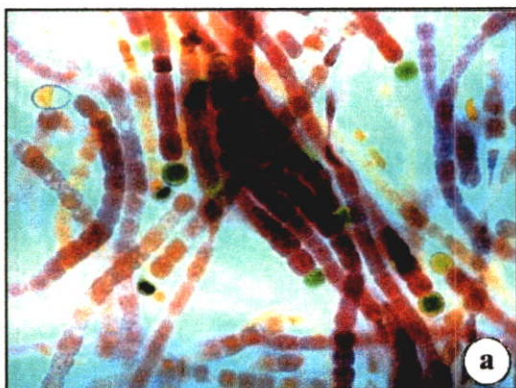
Calothrix sp. ANCG1542 มีการเจริญไม่แตกต่างกันแต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร ผลิตได้ 3.29 กรัม/ลิตร

Nostoc sp. มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P_{0.05}$) รวมทั้งมีการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยมีการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร ค่า OD_{900} เป็น 0.85 และผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0 กรัม/ลิตร โดยผลิตได้ 3.29 กรัม/ลิตร

A. siamensis มีการเจริญแตกต่างกันและมีการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยมีการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมไนเตรท มีค่า OD_{900} เป็น 0.98 ผลิตได้ 6.76 กรัม/ลิตร

การที่ไซยาโนแบคทีเรียเจริญได้ดีเมื่อเติมโซเดียมไนเตรทลงไป ในอาหาร เนื่องจากไนโตรเจนเป็นธาตุที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต ดังนั้นการเติมไนเตรทลงไปปริมาณเล็กน้อยจึงเป็นการส่งเสริมการเจริญเติบโต แต่การที่ไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์เจริญได้ไม่ดีหรือเจริญได้ลดลงเมื่อเติมไนเตรทอาจเนื่องมาจากความเป็นพิษ ดังที่สุวรรณ (2542) รายงานไว้ว่าในการเติมไนเตรทให้กับไซยาโนแบคทีเรียต้องระวังเรื่องของความเป็นพิษถ้าใช้ในความเข้มข้นที่สูงเกินไป สำหรับไซยาโนแบคทีเรียชนิดนั้นๆ

ในด้านการผลิตแคโรทีนอยด์ *A. siamensis*, *Nostoc* sp. และ *Calothrix* sp. ANCG14 ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ระดับไนเตรท 0 กรัม/ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับ Becker (1994) ที่กล่าวว่าเมื่อไซยาโนแบคทีเรียอยู่ในสภาวะขาดไนโตรเจนจะดึงไนโตรเจนจาก



รูปที่ 4.1 ไชยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

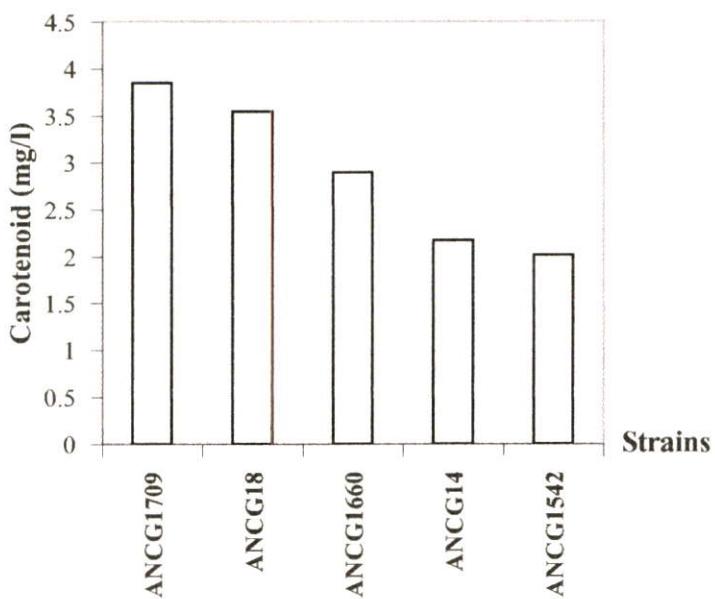
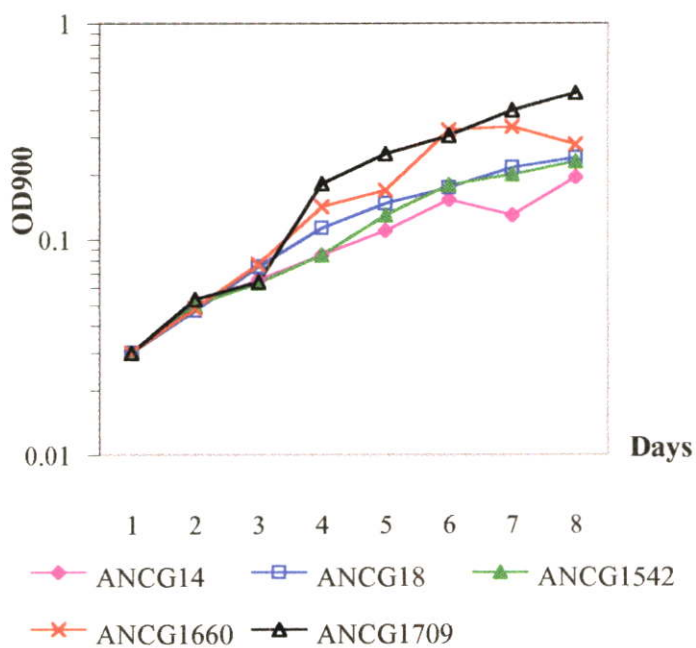
a) *Calothrix* sp. ANCG14

c) *Calothrix* sp. ANCG1542

e) *A. siamensis* ANCG1709

b) *Calothrix* sp. ANCG18

d) *Nostoc* sp. ANCG1660



รูปที่ 4.2 แสดงการเจริญและปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

อากาศมาใช้ ร่วมกับการสลายตัวของรงควัตถุจำพวกไฟโคไซยานิน ทำให้สารสีไฟโคไซยานินซึ่งปกติทำหน้าที่เป็นตัวรับแสงความเข้มสูงลดน้อยลงไป ไชยานินแบคทีเรียจึงจำเป็นต้องสร้างสารสีจำพวกแคโรทีนอยด์ขึ้นมารับแสงความเข้มสูงแทน เพราะคลอโรฟิลล์ไม่สามารถรับแสงความเข้มสูงได้ต้องรับต่อจากไฟโคไซยานินและแคโรทีนอยด์อีกที ส่วน *Calothrix* sp. ANCG18 และ ANCG1542 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุดเมื่อเติมไนเตรท 1 กรัม/ลิตร การที่ผลเป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะมีปริมาณเซลล์สูงกว่าที่ระดับอื่นๆ จึงทำให้แคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้สูงตามไปด้วย

4.2.2 ผลของไดโปกัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

เมื่อทดลองแปรผันความเข้มข้นของไดโปกัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารเป็น 0.04, 0.06 และ 0.08 กรัม/ลิตร ได้ผลดังรูปที่ 4.5 และ 4.6 พบว่า *Calothrix* sp. ANCG14 มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% และการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.08 กรัม/ลิตร มีค่า OD₉₀₀ 0.59 ผลิตได้ 3.65 กรัม/ลิตร

Calothrix sp. ANCG18 มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.04 กรัม/ลิตร ซึ่งผลิตได้ 4.12 กรัม/ลิตร

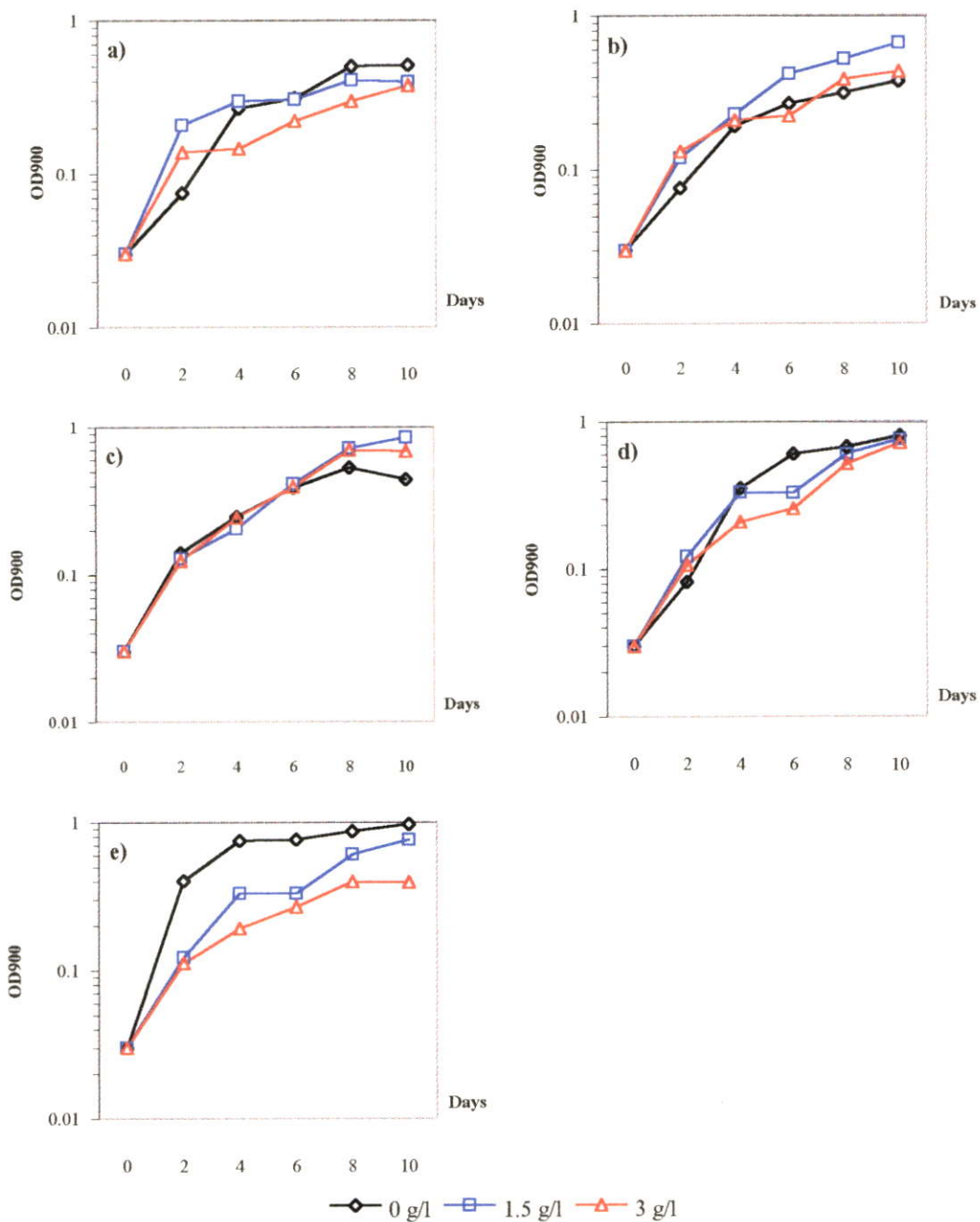
Calothrix sp. ANCG1542 มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% และการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.06 กรัม/ลิตร มีค่า OD₉₀₀ 0.74 ผลิตได้ 2.94 กรัม/ลิตร

Nostoc sp. มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0.06 กรัม/ลิตร ผลิตได้ 3.67 กรัม/ลิตร

A. siamensis มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% และการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0.08 กรัม/ลิตร มีค่า OD₉₀₀ 1.12 แต่ผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0.06 กรัม/ลิตร ผลิตได้ 5.14 กรัม/ลิตร

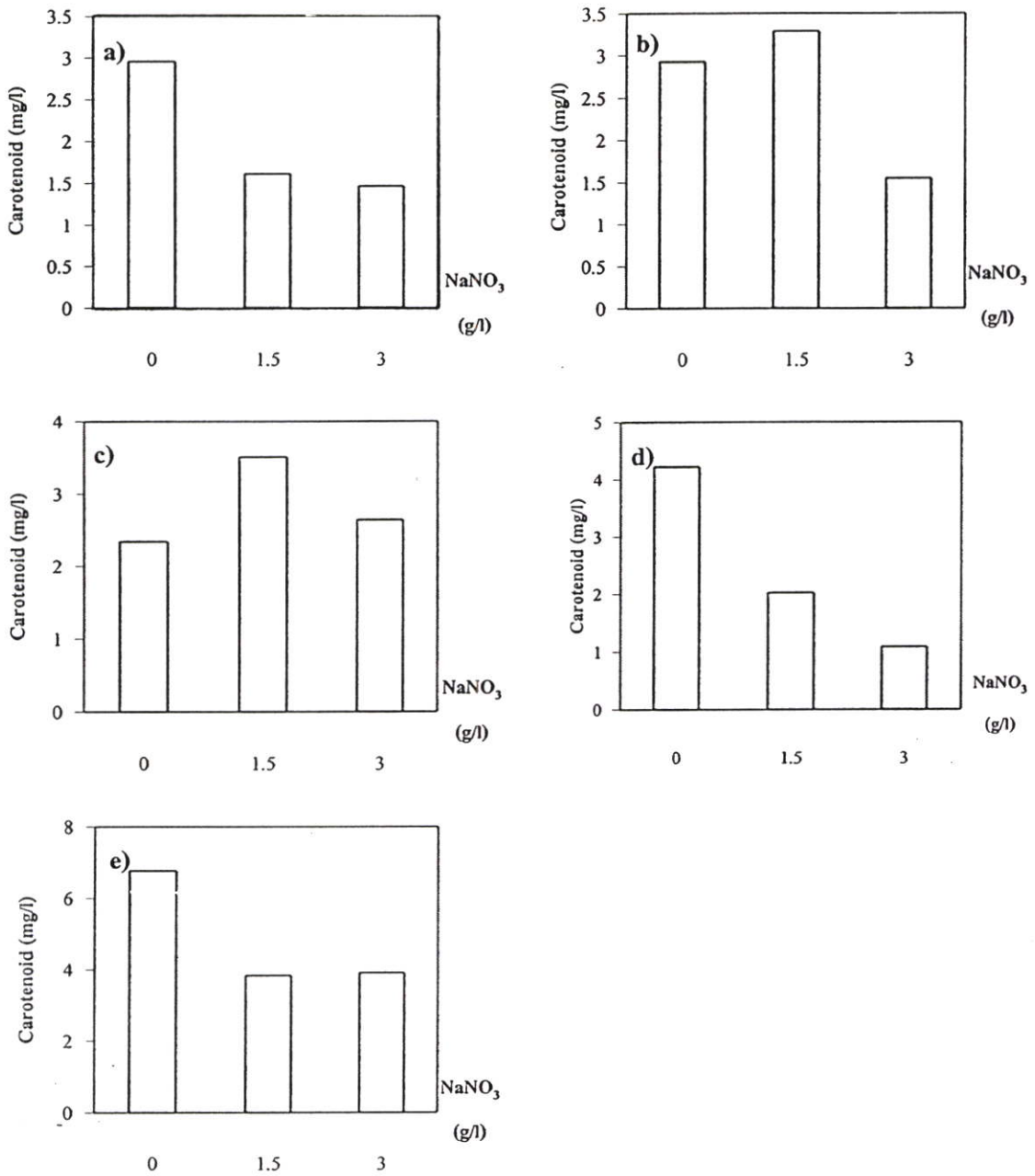
เมื่อเพิ่มปริมาณไดโปกัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงในอาหารสูตร BG 11 ทำให้ไชยานินแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีการเจริญสูงขึ้น เนื่องจากฟอสเฟตเป็นสารอาหารที่สำคัญมากอีกชนิดหนึ่ง เพราะเป็นองค์ประกอบของสารที่ให้พลังงาน เช่น ATP และ ADP เป็นต้น ดังนั้นฟอสเฟตจึงมีความสำคัญต่อการสร้างพลังงานของเซลล์

ในเรื่องของการผลิตแคโรทีนอยด์เกือบทุกสายพันธุ์ผลิตได้สูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณไดโปกัสเซียมฟอสเฟตในสูตรอาหาร เพราะในกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ก็จำเป็นต้อง



รูปที่ 4.3 แสดงผลของโซเดียมไนเตรตต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

- a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542
- d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709



รูปที่ 4.4 แสดงผลของไซเดียมไนเตรตต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542;

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709

ใช้พลังงานเช่นเดียวกัน ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียจึงต้องการฟอสเฟตเพิ่มขึ้นเพื่อสร้างพลังงานมาใช้ในการผลิตสาร แต่ใน *Calothrix* sp. ANCG18 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณโคโปคัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงไปในการผลิตแคโรทีนอยด์ได้น้อยลง และผลิตได้สูงสุดเมื่อใช้เท่ากับสูตรอาหารเดิมคือ 0.04 กรัม/ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับออร์พรณ (2532) ที่พบว่าในการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ถ้าเพิ่มปริมาณฟอสเฟตเป็น 3 เท่าของสูตรอาหารเดิมปริมาณแคโรทีนและแซนโทฟิลล์จะลดลง ซึ่งออร์พรณได้ให้เหตุผลว่าน่าจะเกี่ยวกับการยับยั้งเมตาบอลิซึมของเซลล์อันเกิดจากฟอสเฟตความเข้มข้นสูง

4.2.3 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟต

เมื่อทดลองแปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเป็น 0.075, 0.113 และ 0.15 กรัม/ลิตร ได้ผลดังรูปที่ 4.7 และ 4.8 พบว่า *Calothrix* sp. ANCG14 มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% และการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.075 กรัม/ลิตร มีค่า OD_{900} 0.37 ผลิตได้ 2.24 กรัม/ลิตร

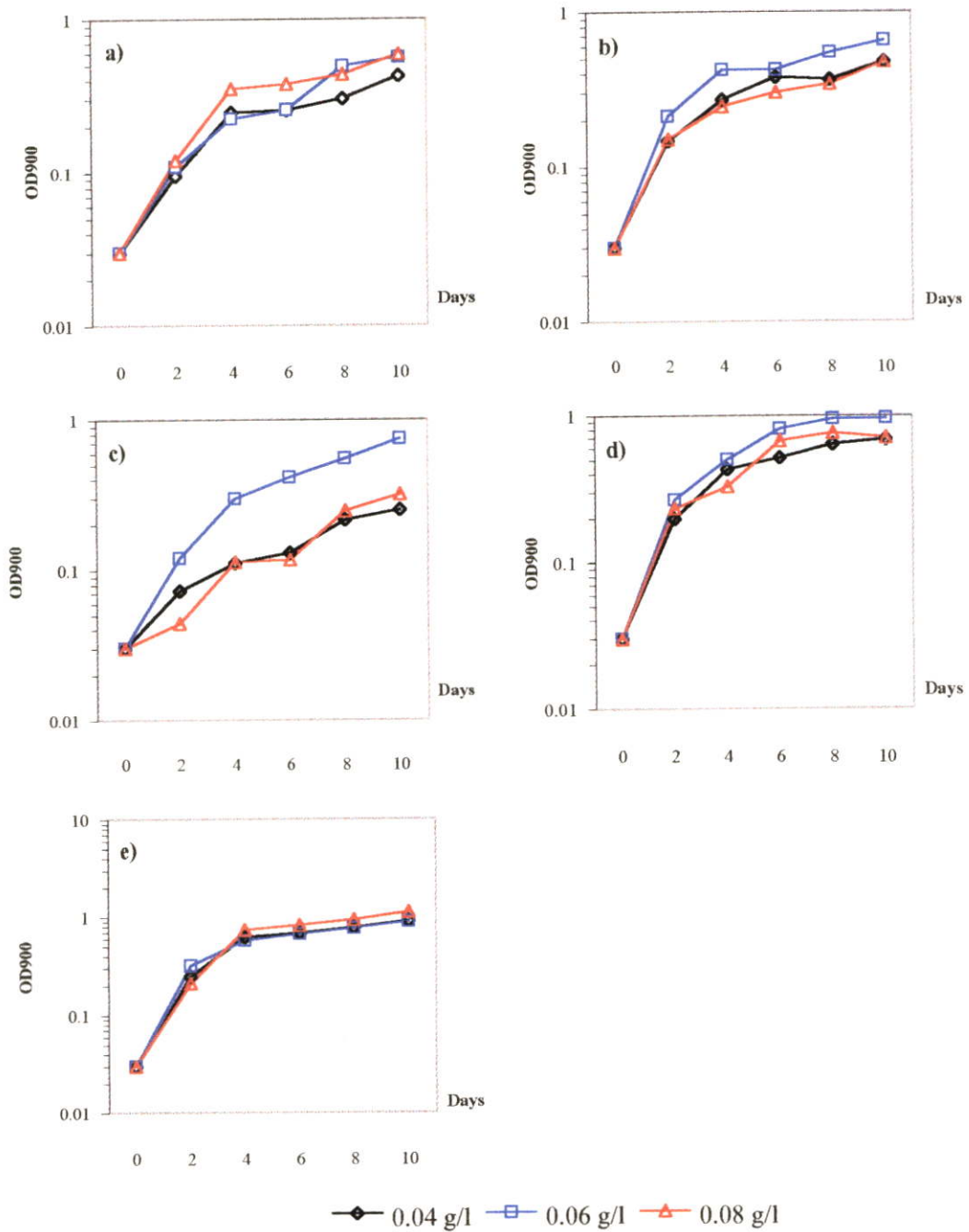
Calothrix sp. ANCG18 มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% โดยมีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.15 กรัม/ลิตร ซึ่งผลิตได้ 2.66 กรัม/ลิตร

Calothrix sp. ANCG1542 มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.15 กรัม/ลิตร ผลิตได้ 2.75 กรัม/ลิตร

Nostoc sp. มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0.075 กรัม/ลิตร ผลิตได้ 4.72 กรัม/ลิตร

A. siamensis มีการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0.15 กรัม/ลิตร มีค่า OD_{900} 1.11 แต่ผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0.075 กรัม/ลิตร ผลิตได้ 6.44 กรัม/ลิตร

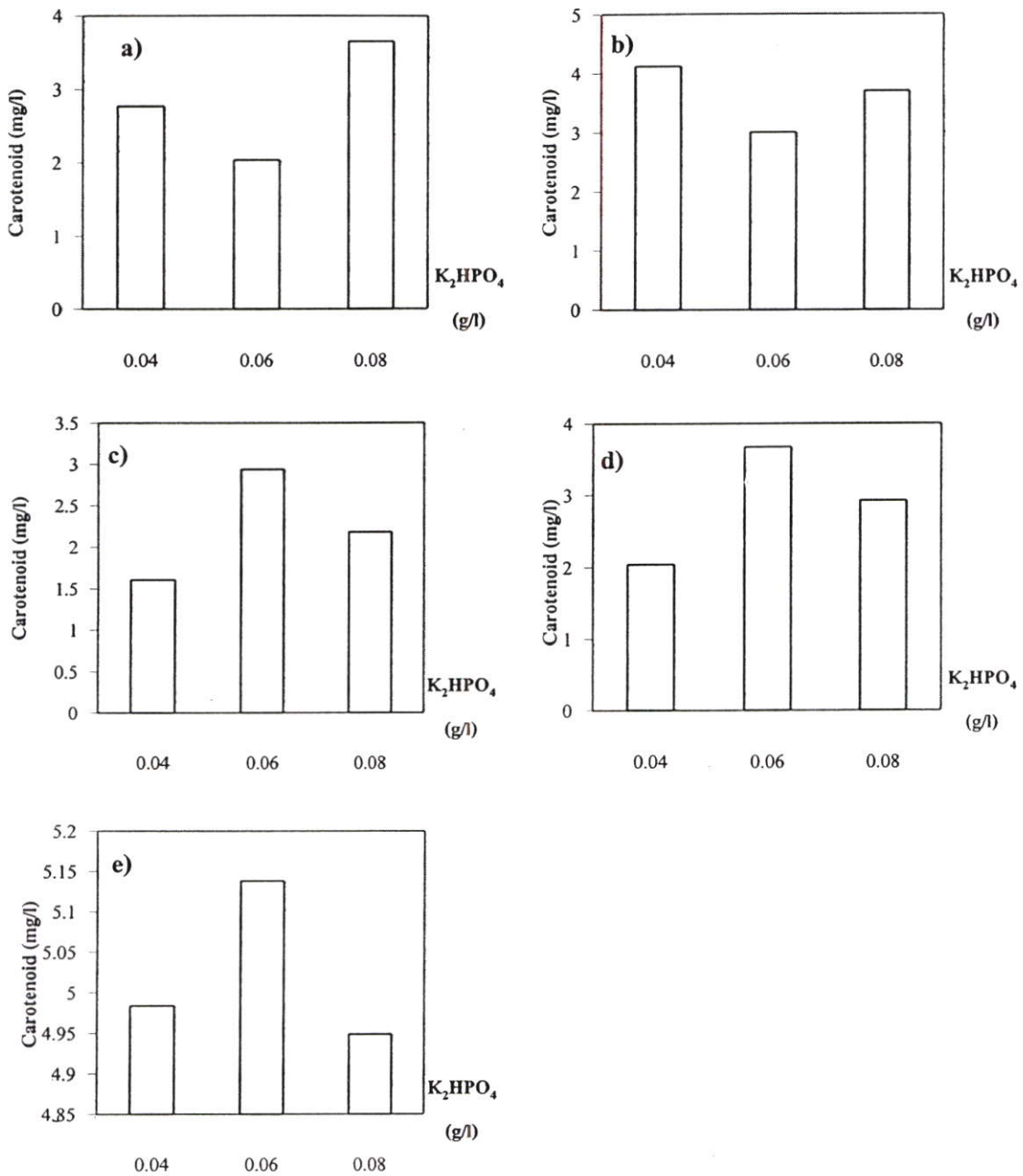
เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแมกนีเซียมซัลเฟตในสูตรอาหารมีผลให้ไซยาโนแบคทีเรียเกือบทุกสายพันธุ์มีการเจริญสูงขึ้นเล็กน้อย ยกเว้น *Calothrix* sp. ANCG14 เนื่องจากแมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบสำคัญของคลอโรฟิลล์ เมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมมากขึ้นเซลล์จะสร้างคลอโรฟิลล์ได้มากขึ้น ทำให้สามารถดูดกลืนพลังงานมาใช้ในการสังเคราะห์แสงได้มากขึ้น จึงเจริญเติบโตได้รวดเร็ว นอกจากนั้นซัลเฟอร์ซึ่งอยู่ในรูปของซัลเฟตในอาหารยังจำเป็นต่อการเจริญ โดยเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของวิตามินและกรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น เมไทโอนีน (methionine), ซีสเทอีน



รูปที่ 4.5 แสดงผลของไดโปรตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709



รูปที่ 4.6 แสดงผลของโคโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของ

ไซยาโนแบคทีเรีย

a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542;

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709

(cysteine), ซีสทีน (cystine) (เซวาน์และพรณิ, 2528) ดังนั้นเมื่อเพิ่มซัลเฟตลงในอาหารเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียจึงน่าจะนำซัลเฟตไปใช้ในการเจริญเพิ่มขึ้นด้วย

สำหรับผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ พบว่าไซยาโนแบคทีเรียส่วนมากผลิตแคโรทีนอยด์ได้มากเมื่อเพาะเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นแมกนีเซียมซัลเฟตไม่สูง (0.075, 0.113 กรัม/ลิตร) ยกเว้น *Calothrix* sp. ANCG18 และ ANCG1542 ผลิตได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงที่ระดับ 0.15 กรัม/ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับอรพรณิ (2532) ที่พบว่า *Chlorella* sp. มีการผลิตแคโรทีนและแซนโทฟิลล์ได้สูงสุดเมื่อลดแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงลงครึ่งเท่า และผลิตได้น้อยลงเมื่อเติมแมกนีเซียมลงในอาหาร 1, 2 และ 3 เท่า จากผลดังกล่าวสามารถอธิบายได้ดังนี้ แมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ ดังนั้นถ้ามีปริมาณมากเพียงพอที่จะนำไปใช้สังเคราะห์คลอโรฟิลล์เพื่อใช้รับพลังงานในการสังเคราะห์แสง เซลล์ก็จะไม่มีความจำเป็นที่จะสร้างรงควัตถุจำพวกแคโรทีนอยด์มาช่วยรับแสง เพราะฉะนั้นหากต้องการให้เซลล์มีการสะสมแคโรทีนอยด์ ควรจะลดปริมาณแมกนีเซียมลง

4.2.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์

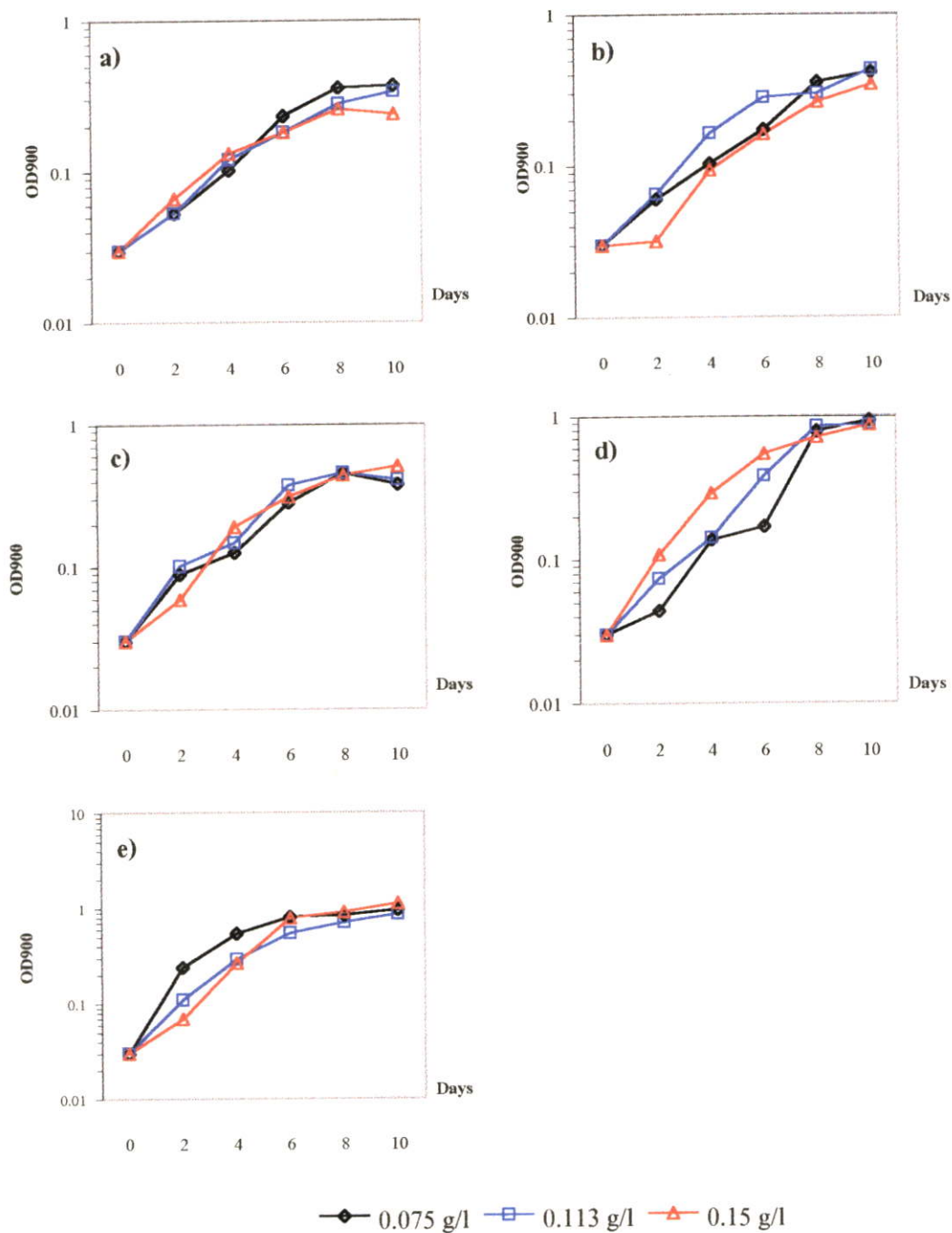
เมื่อทดลองแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเป็น 0, 1 และ 10 กรัม/ลิตร ได้ผลดังรูปที่ 4.9 และ 4.10 พบว่า *Calothrix* sp. ANCG14 มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% และการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญสูงสุดที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร และผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดที่ความเข้มข้น 0 กรัม/ลิตร โดยผลิตได้ 3.18 กรัม/ลิตร

Calothrix sp. ANCG18 มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% และการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร มีค่า OD_{900} เป็น 0.62 ผลิตได้ 3.31 กรัม/ลิตร

Calothrix sp. ANCG1542 มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% และการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร มีค่า OD_{900} เป็น 0.43 ผลิตได้ 2.45 กรัม/ลิตร

Nostoc sp. มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% และการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร มีค่า OD_{900} เป็น 0.77 ผลิตได้ 3.74 กรัม/ลิตร

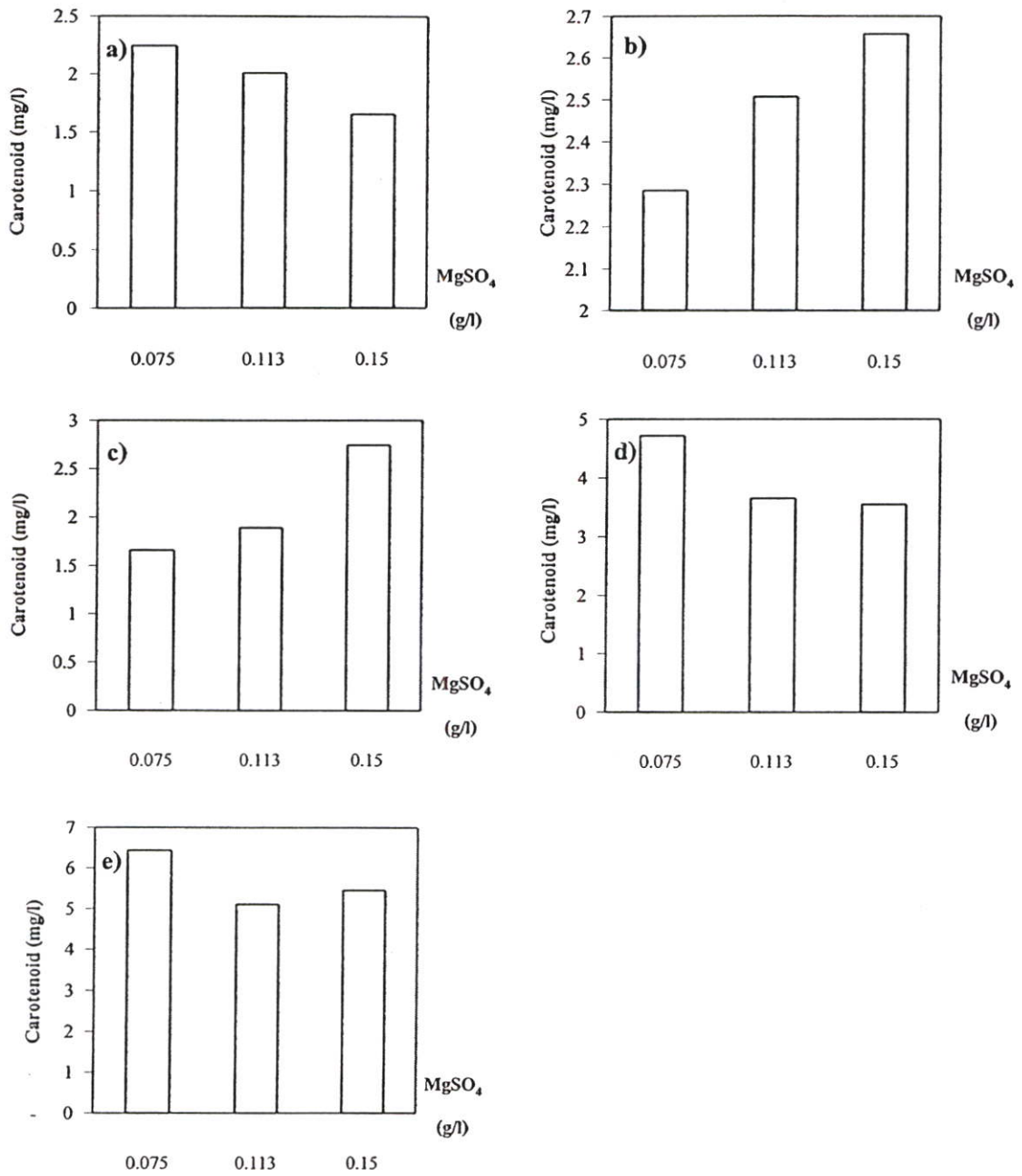
A. siamensis มีการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0 กรัม/ลิตร มีค่า OD_{900} 1.29 ผลิตได้ 5.45 กรัม/ลิตร



รูปที่ 4.7 แสดงผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709



รูปที่ 4.8 แสดงผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542;

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709

จากการทดลองจะเห็นว่าเมื่อเติมเกลือลงในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาณเล็กน้อยคือ 1 กรัม/ลิตร ทำให้เกือบทุกสายพันธุ์มีการเจริญสูงขึ้น ยกเว้น *A. siamensis* เนื่องจากโซเดียมเป็นธาตุอาหารที่ไซยาโนแบคทีเรียใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการเคลื่อนย้ายไบคาร์บอเนต และกระบวนการไนเตรทรีดักชันด้วย นอกจากนั้นยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงไนโตรเจนด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ Makarewicz และ McKellan (1985) ที่พบว่าโซเดียมส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Anacystis nidulans* ในกรณี *A. siamensis* เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหารเพาะเลี้ยงกลับทำให้การเจริญลดลง อาจเป็นเพราะเซลล์ของ *A. siamensis* มีขนาดเล็ก โซเดียมคลอไรด์ที่เติมลงไปแทนที่จะส่งเสริมการเจริญกลับทำให้เซลล์แตกบางส่วนปริมาณเซลล์จึงลดลง

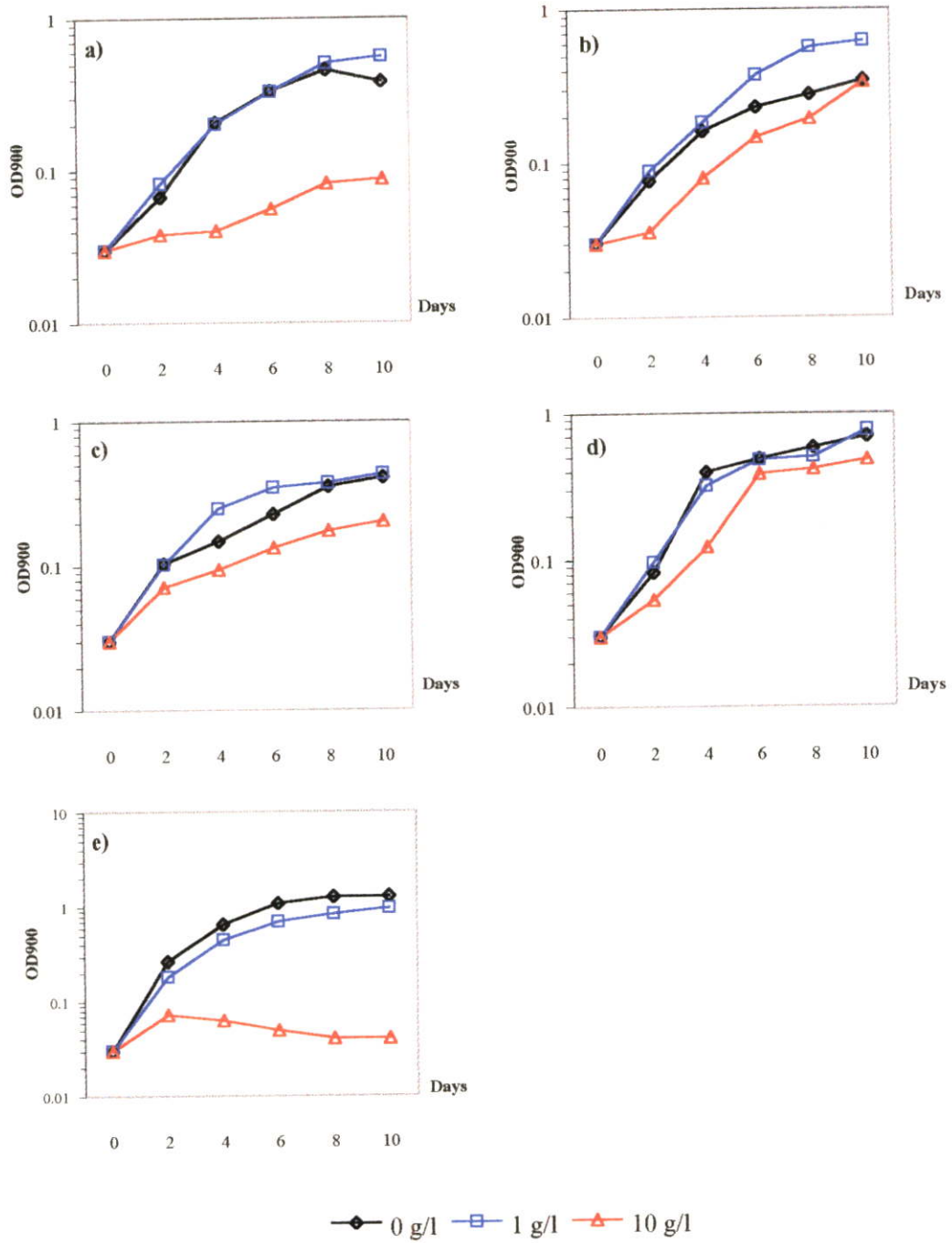
นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไป 10 เท่าของสูตรอาหาร (10 กรัม/ลิตร) ทำให้ทุกสายพันธุ์มีการเจริญลดลง โดยเฉพาะ *Calothrix* sp. ANCG14 และ *A. siamensis* ถูกยับยั้งการเจริญอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากความเข้มข้นที่มากเกินไปของโซเดียมคลอไรด์ทำให้อาหารที่ถูกเติมด้วยเกลือความเข้มข้นสูงกลายเป็น lysis solution ทำให้พวกที่มีขนาดเล็ก เช่น *A. siamensis* เกิดการแตกของเซลล์และตายในที่สุด แต่กรณีของ *Calothrix* พวกนี้จะมีชีวิต รวมทั้งมีการสร้างเมือกออกห่อหุ้มเซลล์และมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่ม ซึ่งช่วยป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์ได้บ้าง ขณะเดียวกัน *Nostoc* เป็นพวกที่มีเมือกหนาหุ้มและเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนอยู่แล้ว ความเสียหายที่เกิดจากโซเดียมคลอไรด์จึงมีเพียงเล็กน้อย

ในเรื่องของการผลิตแคโรทีนอยด์พบว่าไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่จะผลิตได้สูงสุดเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหารเลี้ยง 1 กรัม/ลิตร เพราะจากเหตุผลที่กล่าวมาคือ เซลล์ได้รับความเสียหายน้อยและยังสามารถเจริญต่อไปได้ และในขณะที่เจริญเติบโตโซเดียมจะขัดขวางการเก็บกักไนโตรเจนไว้ในเซลล์ (Makarewicz และ McKellan, 1985) จึงไม่สามารถสร้างสารสีพวกไฟโคไซยานินมาช่วยในกระบวนการสังเคราะห์แสงได้เพียงพอ ดังนั้นเซลล์จึงจำเป็นต้องสร้างสารสีแคโรทีนอยด์ขึ้นมาทดแทนเพื่อช่วยคลอโรฟิลล์ในกระบวนการสังเคราะห์แสง

4.2.5 ผลของพีเอชเริ่มต้น

เมื่อทดลองแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 7, 7.5 และ 8 ได้ผลดังรูปที่ 4.11 และ 4.12 พบว่า *Calothrix* sp. ANCG14 มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยมีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 มีค่า OD_{900} 0.68 ผลิตได้ 4.50 กรัม/ลิตร

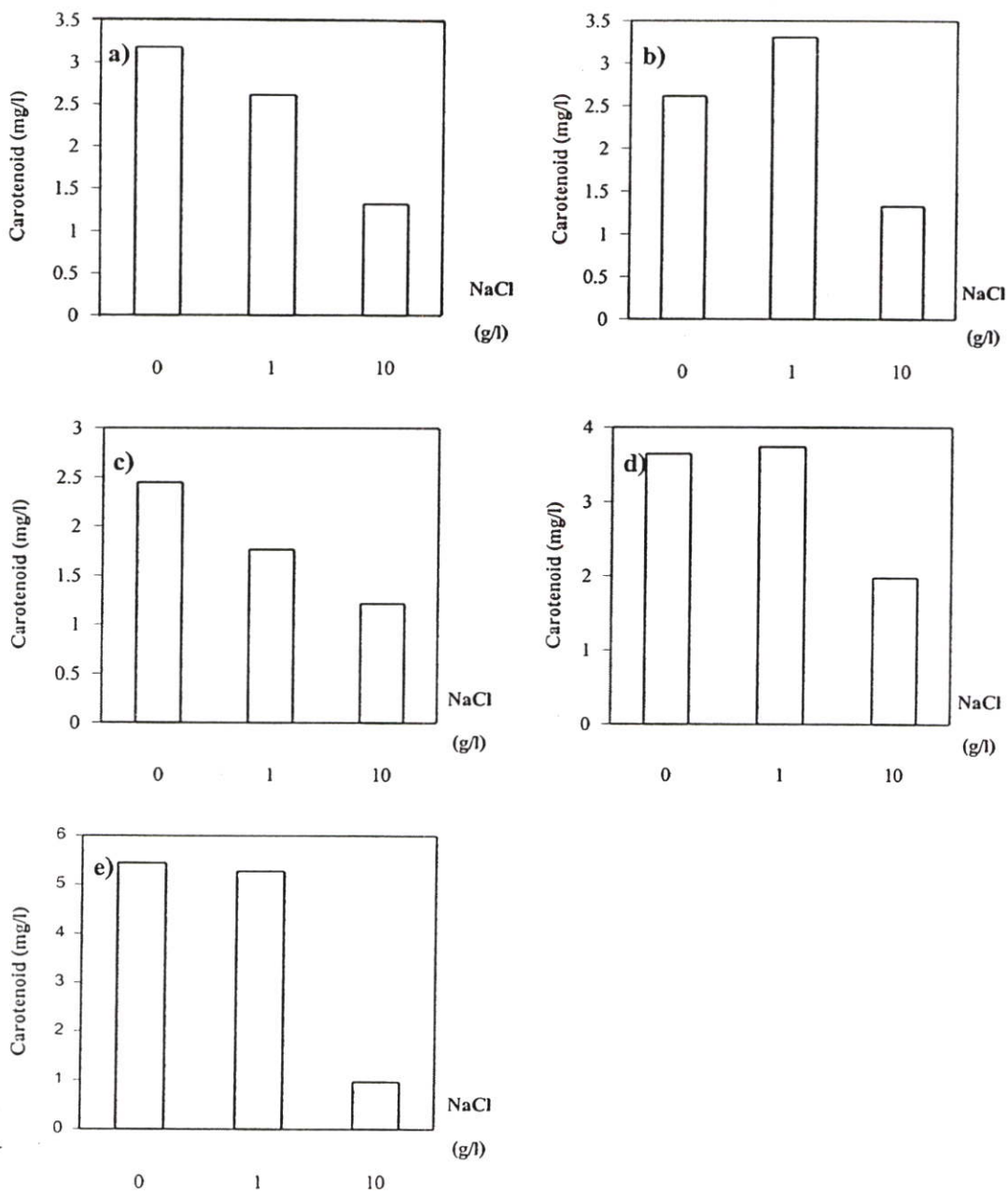
Calothrix sp. ANCG18 มีการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ไม่แตกต่างกัน โดยมีการเจริญสูงสุดที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 ส่วนการผลิตแคโรทีนอยด์ผลิตได้สูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 ผลิตได้ 2.68 กรัม/ลิตร



รูปที่ 4.9 แสดงผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709



รูปที่ 4.10 แสดงผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

- a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542;
 d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709

Calothrix sp. ANCG1542 มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% โดยมีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.5 ผลิตได้ 2.46 กรัม/ลิตร

Nostoc sp. มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.5 มีค่า OD₉₀₀ 1.025 ผลิตได้ 6.22 กรัม/ลิตร

A. siamensis มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% โดยมีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.5 ผลิตได้ 5.92 กรัม/ลิตร

จะเห็นว่าการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียส่วนมากไม่แตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงที่ระดับพีเอชต่างกันเพียงเล็กน้อย (พีเอช 7-8) ซึ่งสอดคล้องกับ Ciferri (1985) ที่รายงานไว้ว่า *Spirulina platensis* สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมในช่วงกว้างคือ 7-11 และ Rippka และคณะ (1979) กล่าวว่า ไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ในสภาพพีเอชเป็นกลางถึงเป็นด่าง (พีเอช 7-10)

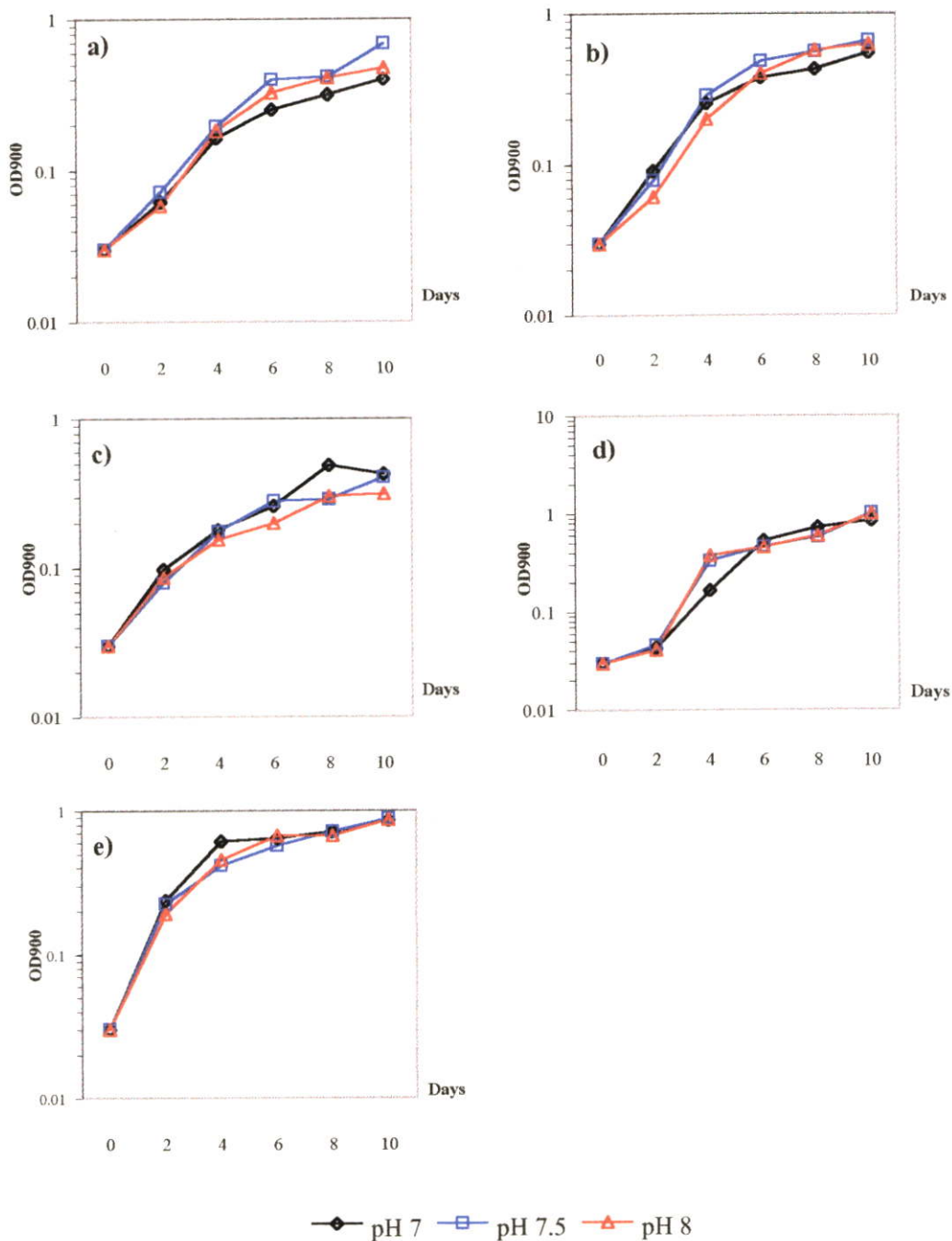
ในด้านการผลิตแคโรทีนอยด์เป็นไปตามที่ Lilly และคณะ (1960) พบว่า *Choanephora cucurbitarum* สังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้ดีที่ระดับพีเอชของอาหารใกล้ๆ 7 และอรพรรณ (2532) ทดลองเลี้ยง *Chlorella* sp. พบว่าในอาหารเลี้ยงที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 7.5 จะผลิตแคโรทีนสูงสุด และที่พีเอช 6.0 ผลิตแซนโทฟิลล์ดีที่สุด

4.2.6 ผลของอุณหภูมิ

เมื่อทดลองเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียภายใต้อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลดังรูปที่ 4.13 และ 4.14 พบว่า *Calothrix* sp. ANCG14 มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส มีค่า OD₉₀₀ 0.33 ผลิตได้ 2.49 กรัม/ลิตร

Calothrix sp. ANCG18 มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส ผลิตได้ 2.56 กรัม/ลิตร

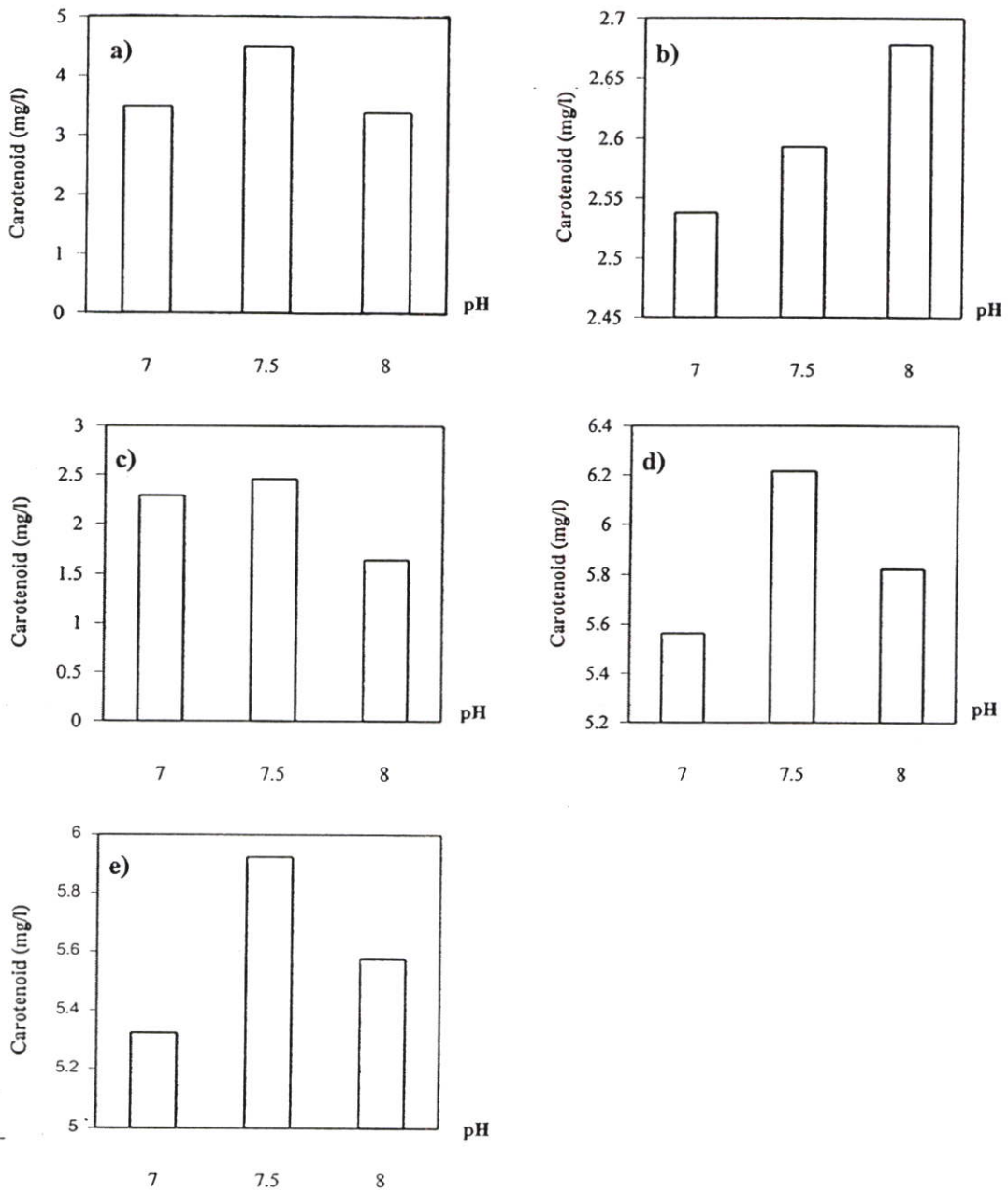
Calothrix sp. ANCG1542 มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% และการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส มีค่า OD₉₀₀ 0.40 ผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ 30 องศาเซลเซียส ผลิตได้ 2.92 กรัม/ลิตร



รูปที่ 4.11 แสดงผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709



รูปที่ 4.12 แสดงผลของพีเอชเริ่มต้นต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542;

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709

Nostoc sp. มีการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ 35 องศาเซลเซียส มีค่า OD_{900} 0.76 และการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ 30 องศาเซลเซียส ผลิตได้ 4.08 กรัม/ลิตร

A. siamensis มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% และการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ 30 องศาเซลเซียส มีค่า OD_{900} 0.83 ผลิตได้ 3.82 กรัม/ลิตร

ผลที่ได้จากการทดลองคล้ายคลึงกับงานของ Zarrouk (1966) ที่พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Spirulina* อยู่ระหว่าง 35-40 องศาเซลเซียส และ Allen และ Stainer (1968) พบว่าที่อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส จะมีไซยาโนแบคทีเรียแพร่กระจายอยู่มากที่สุด ส่วน *A. siamensis* เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งขัดแย้งกับ Antarikanonda (1986) ที่สรุปว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. siamensis* คือประมาณ 37 องศาเซลเซียส ส่วนการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย พบว่าสอดคล้องกับสร้อยัญญา (2537) ที่รายงานว่า *Spirulina* จะผลิตเบต้า-แคโรทีนได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ 25-35 องศาเซลเซียส

4.2.7 ผลของชนิดของแสง

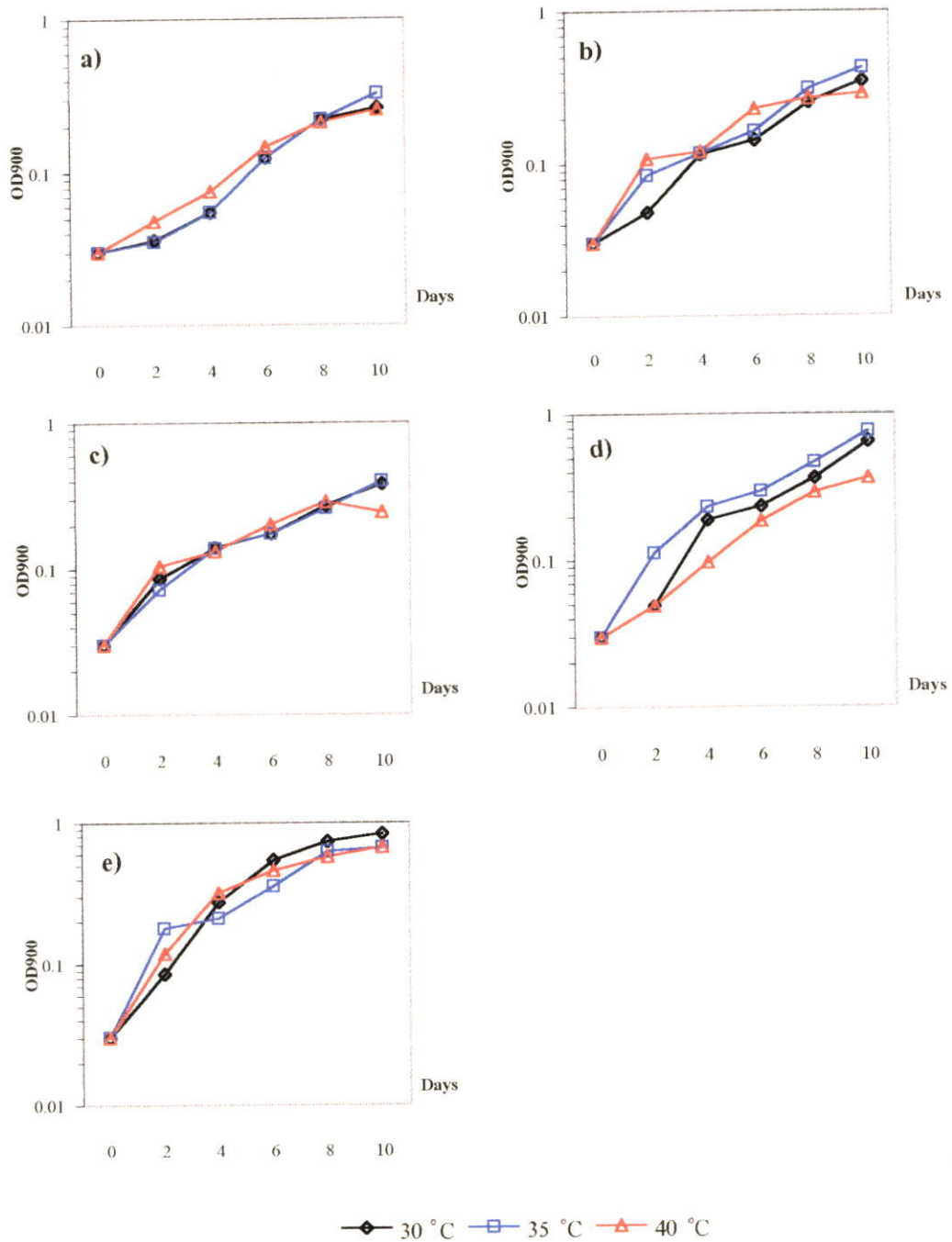
เมื่อทดลองเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียภายใต้แสง 3 ชนิด คือ สีขาว, สีเขียว และสีแดง ได้ผลดังรูปที่ 4.15 และ 4.16 พบว่า *Calothrix* sp. ANCG14 มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว มีค่า OD_{900} 0.35 ผลิตได้ 4.49 กรัม/ลิตร

Calothrix sp. ANCG18 มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% และการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว มีค่า OD_{900} 0.58 ผลิตได้ 4.64 กรัม/ลิตร

Calothrix sp. ANCG1542 มีการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงมีค่า OD_{900} 0.59 ผลิตได้ 3.48 กรัม/ลิตร

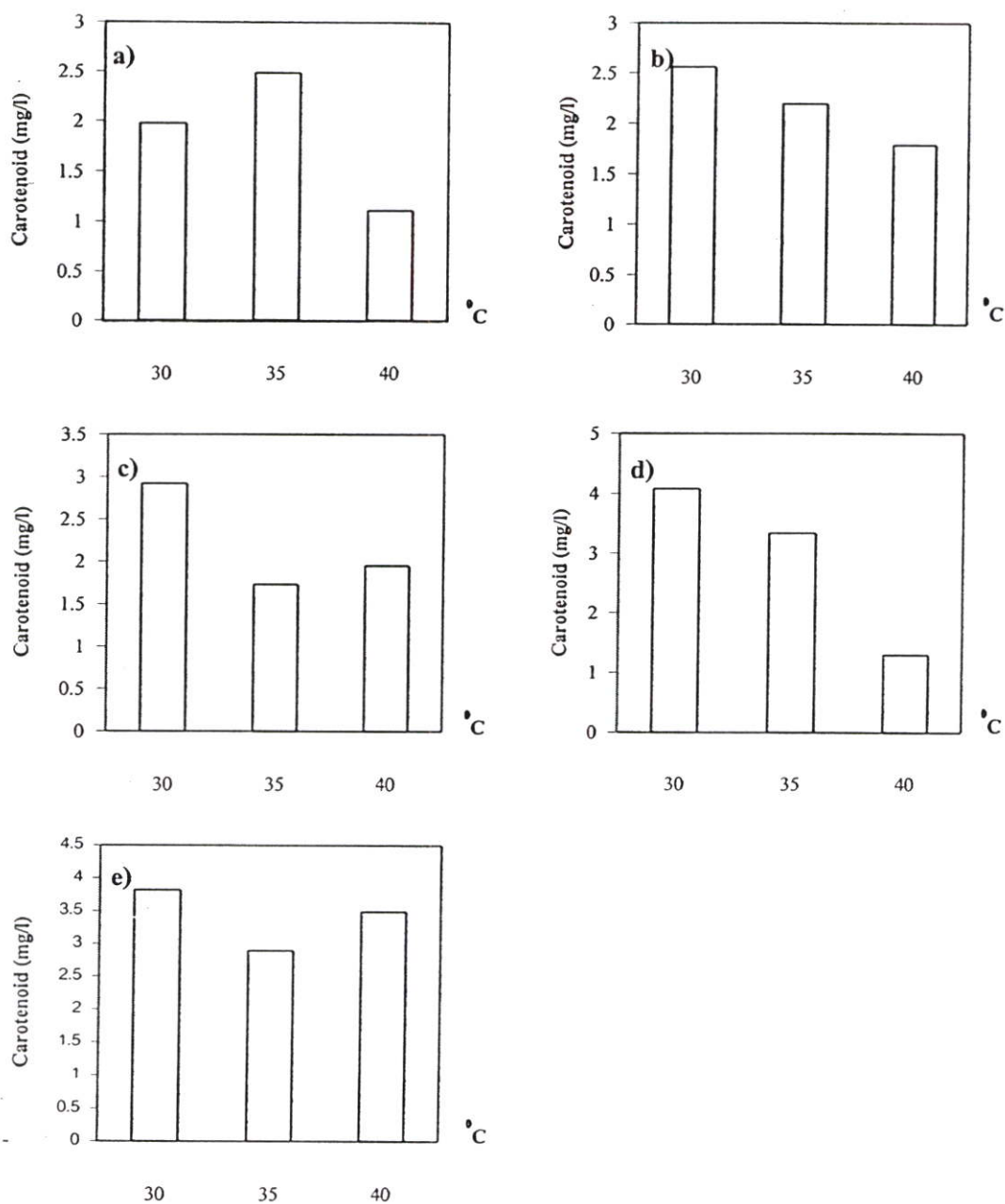
Nostoc sp. มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว ผลิตได้ 4.02 กรัม/ลิตร

A. siamensis มีการเจริญแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% แต่การผลิตแคโรทีนอยด์ไม่แตกต่างกัน โดยมีการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว มีค่า OD_{900} 0.91



รูปที่ 4.13 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

- a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542
 d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709



รูปที่ 4.14 แสดงผลของอุณหภูมิต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542;

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709

จากผลการทดลอง จะเห็นว่าสอดคล้องกับ Fiksdahl และคณะ (1983) ที่รายงานว่า สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวหลายชนิดจะผลิตแคโรทีนได้ดีในแสงสีขาว และ Theriault (1964) ก็พบว่า *Chlorella pyrenoidosa* จะผลิตแซนโทฟิลล์ได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว

4.2.8 ผลของความเข้มแสง

เมื่อทดลองเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ความเข้มแสงแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 2000, 3000 และ 4000 ลักซ์ ได้ผลดังรูปที่ 4.17 และ 4.18 พบว่า *Calothrix* sp. ANCG14 มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ผลิตได้ 3.05 กรัม/ลิตร

Calothrix sp. ANCG18 มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 4000 ลักซ์ ผลิตได้ 2.84 กรัม/ลิตร

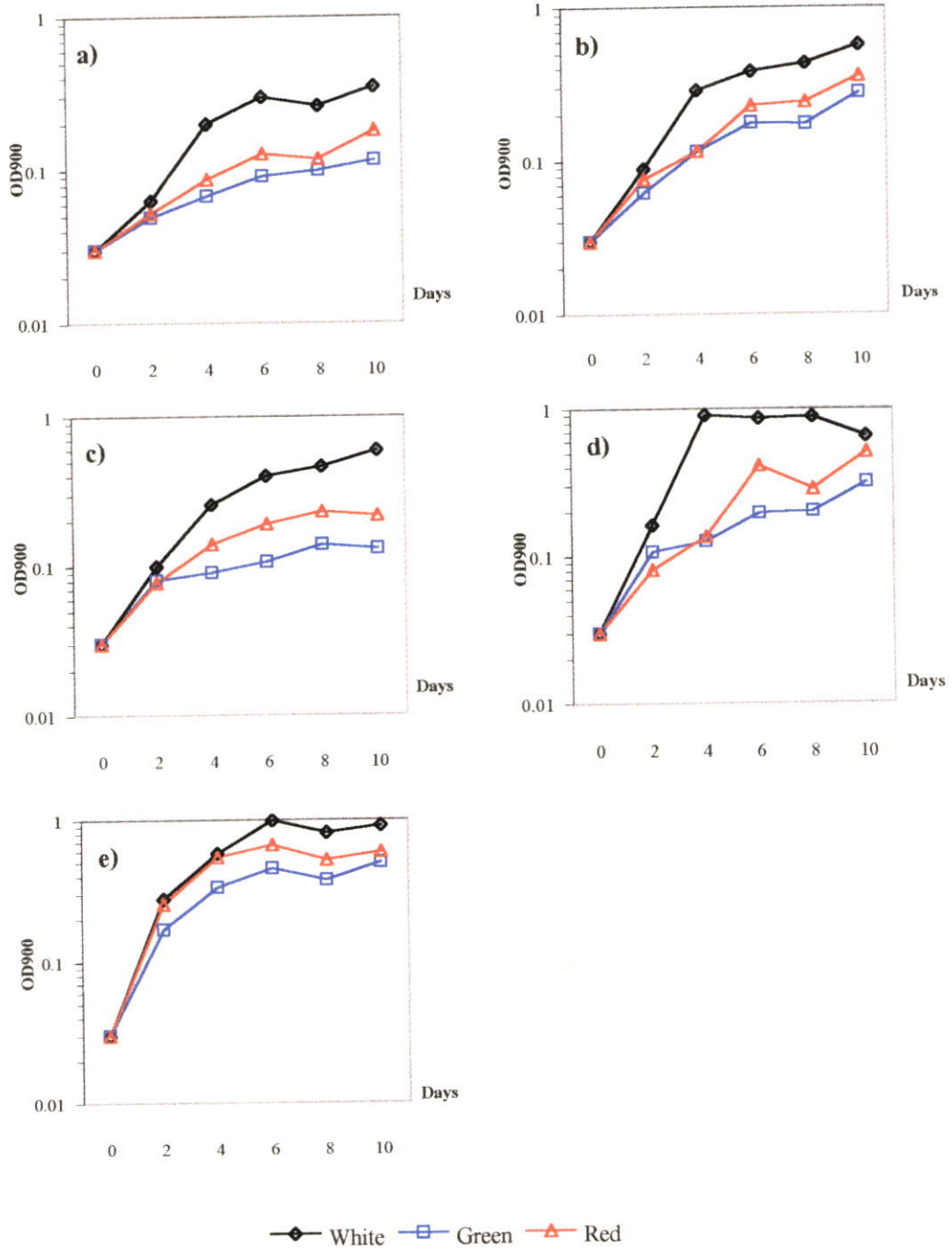
Calothrix sp. ANCG1542 มีการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% โดยมีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 4000 ลักซ์ มีค่า OD_{900} 0.78 ผลิตได้ 3.64 กรัม/ลิตร

Nostoc sp. มีการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ไม่แตกต่างกันในแต่ละระดับความเข้มแสง

A. siamensis มีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 99% โดยมีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 4000 ลักซ์ ซึ่งผลิตได้ 3.82 กรัม/ลิตร

จากผลการทดลอง สอดคล้องกับสุพจน์และสุรียา (2542) ที่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ระดับความเข้มแสง 2500-3000 ลักซ์ จะมีอัตราการเจริญสูงสุด ที่เป็นเช่นนี้เพราะแสงสว่างมีความจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง และช่วงความเข้มแสงที่พอเหมาะจะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของไซยาโนแบคทีเรีย

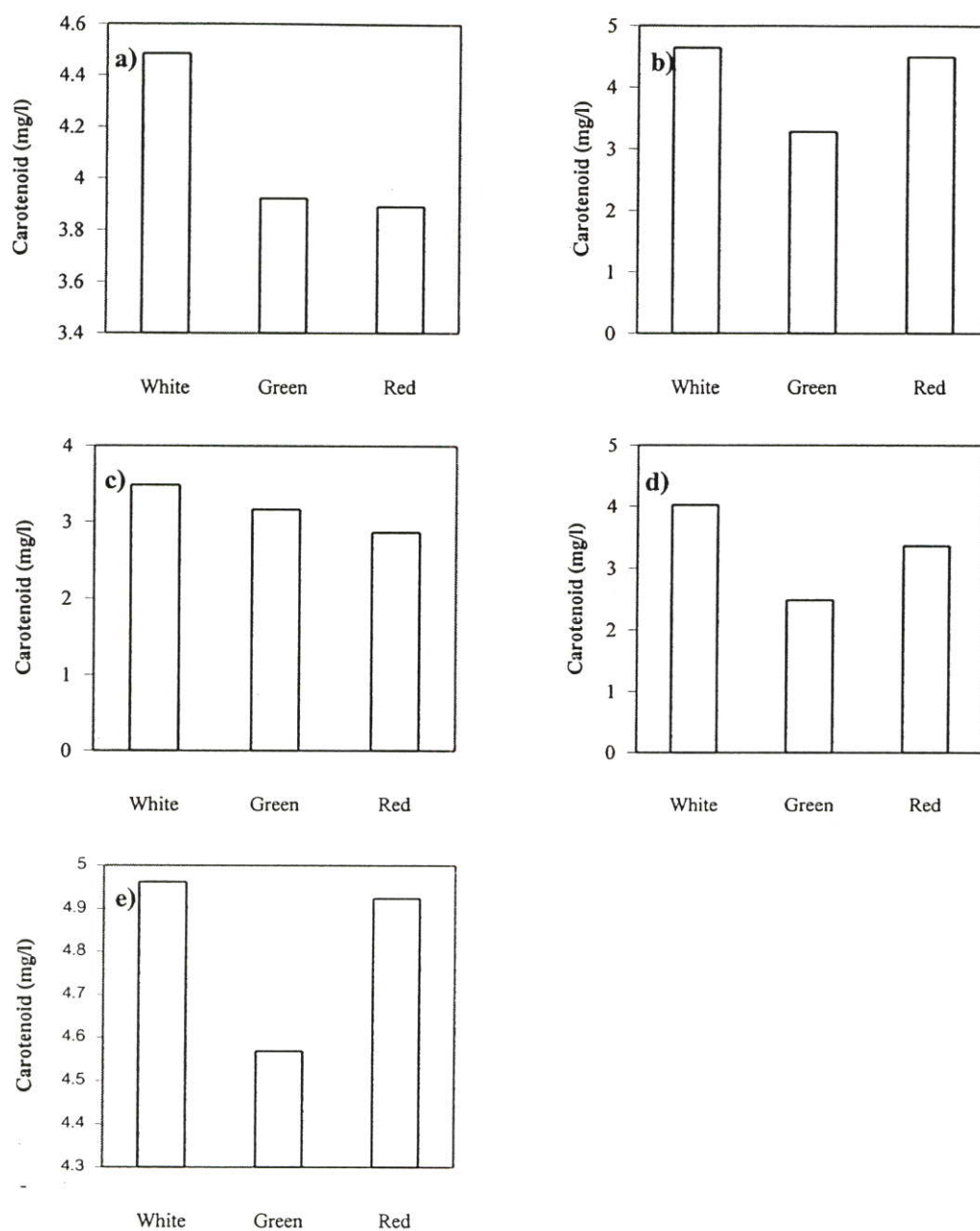
ในการผลิตแคโรทีนอยด์ แสงเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง และแคโรทีนอยด์ก็เป็นรงควัตถุที่ช่วยในการดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความเข้มสูงแล้วส่งต่อไปให้กับคลอโรฟิลล์ ดังนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มแสงสูงให้ไซยาโนแบคทีเรีย ก็จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น ส่วนบางสายพันธุ์ผลิตได้สูงสุดที่ 2000 ลักซ์ ซึ่งเป็นระดับความเข้มแสงที่ค่อนข้างต่ำ พบว่าสอดคล้องกับรายงานของอรพรรณ (2532) ที่พบว่า *Chlorella* sp. ถูกกระตุ้นให้ผลิตแคโรทีนและแซนโทฟิลล์เพิ่มมากขึ้น เมื่อเซลล์ได้รับแสงที่มีความเข้มต่ำ ซึ่งเป็นตัวก่อให้เกิดความกดดันทำให้เซลล์ต้องพยายามผลิตแคโรทีนอยด์ให้มากขึ้นเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงเพื่อการอยู่รอดของเซลล์ต่อไป



รูปที่ 4.15 แสดงผลของชนิดของแสงต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

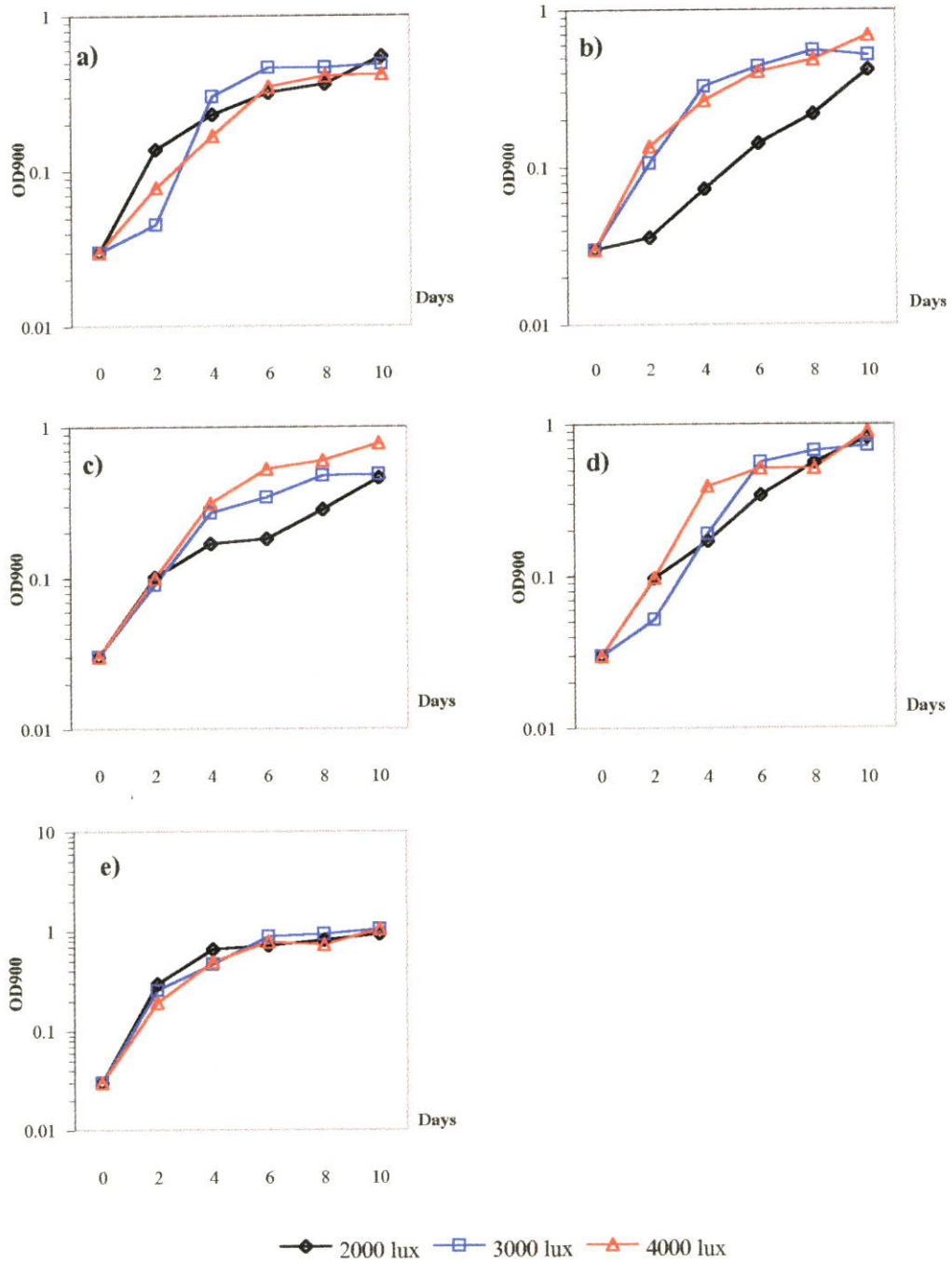
a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709



รูปที่ 4.16 แสดงผลของชนิดของแสงต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

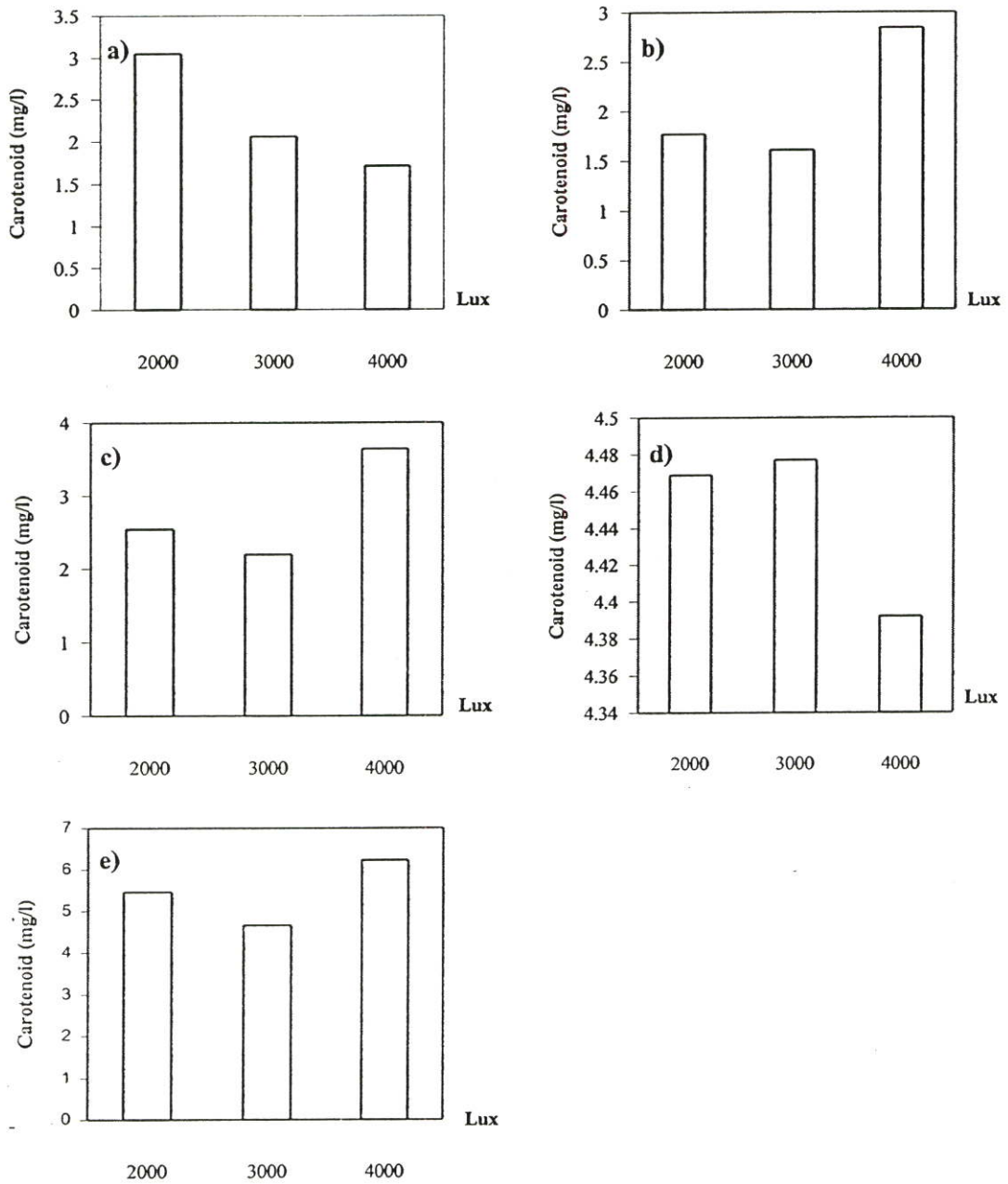
- a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542;
 d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709



รูปที่ 4.17 แสดงผลของความเข้มแสงต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709



รูปที่ 4.18 แสดงผลของความเข้มแสงต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

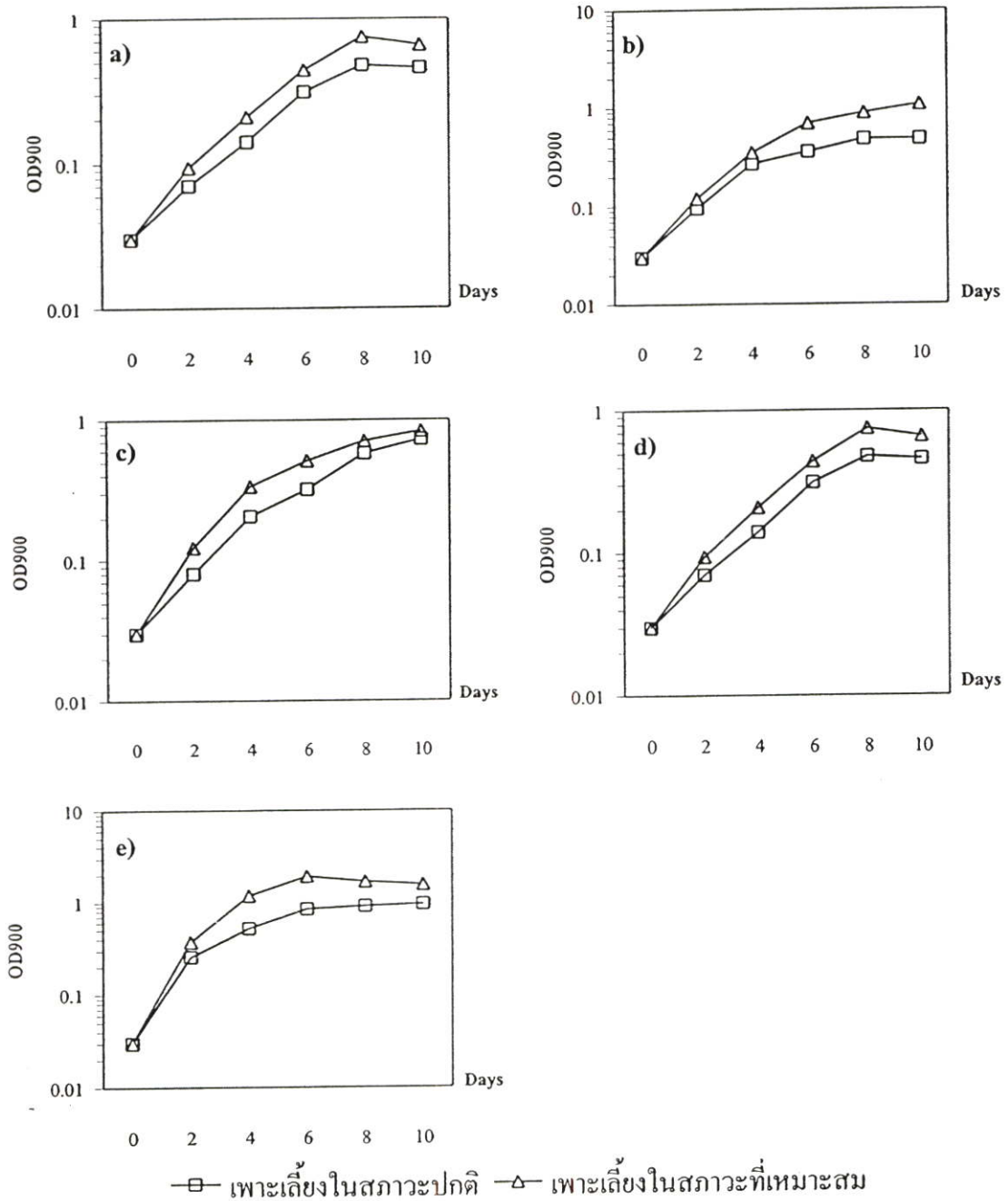
- a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542;
 d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709

เมื่อทดลองเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ในอาหาร BG 11 สูตรปกติ ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG 11 สูตรที่เหมาะสม ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ ได้ผลดังรูปที่ 4.19 และ 4.20 จากรูปพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสม ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว ไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีการเจริญเพิ่มขึ้น ดังนี้ *Calothrix* sp. ANCG14, *Calothrix* sp. ANCG18, *Calothrix* sp. ANCG1542, *Nostoc* sp. และ *A. siamensis* มีค่า OD₉₀₀ เท่ากับ 0.65, 1.07, 0.83, 0.65 และ 1.55 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สถิติพบว่าเกือบทุกสายพันธุ์มีการเจริญไม่แตกต่างกันระหว่างอาหาร 2 สูตร ยกเว้น *Nostoc* sp. ที่มีการเจริญต่างกันระหว่างอาหารสูตรปกติกับอาหารสูตรปรับปรุง

ส่วนการผลิตแคโรทีนอยด์ เชื้อ *Calothrix* sp. ANCG14, *Calothrix* sp. ANCG18, *Calothrix* sp. ANCG1542, *Nostoc* sp. และ *A. siamensis* ผลิตได้ 3.66, 4.52, 4.63, 6.00 และ 9.14 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการผลิตระหว่างอาหารทั้ง 2 สูตรด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันในเกือบทุกสายพันธุ์ นั่นคือ มีการผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้น *Nostoc* sp. ที่การผลิตไม่แตกต่างกัน นอกจากนั้นยังพบว่าทุกสายพันธุ์ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตแคโรทีนอยด์สูงที่สุดคือ *A. siamensis* ANCG1709 ซึ่งจะนำไปทดลองชักนำให้เกิดการสร้างสารแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น

4.3 ศึกษาปริมาณสารสกัดที่เหมาะสม

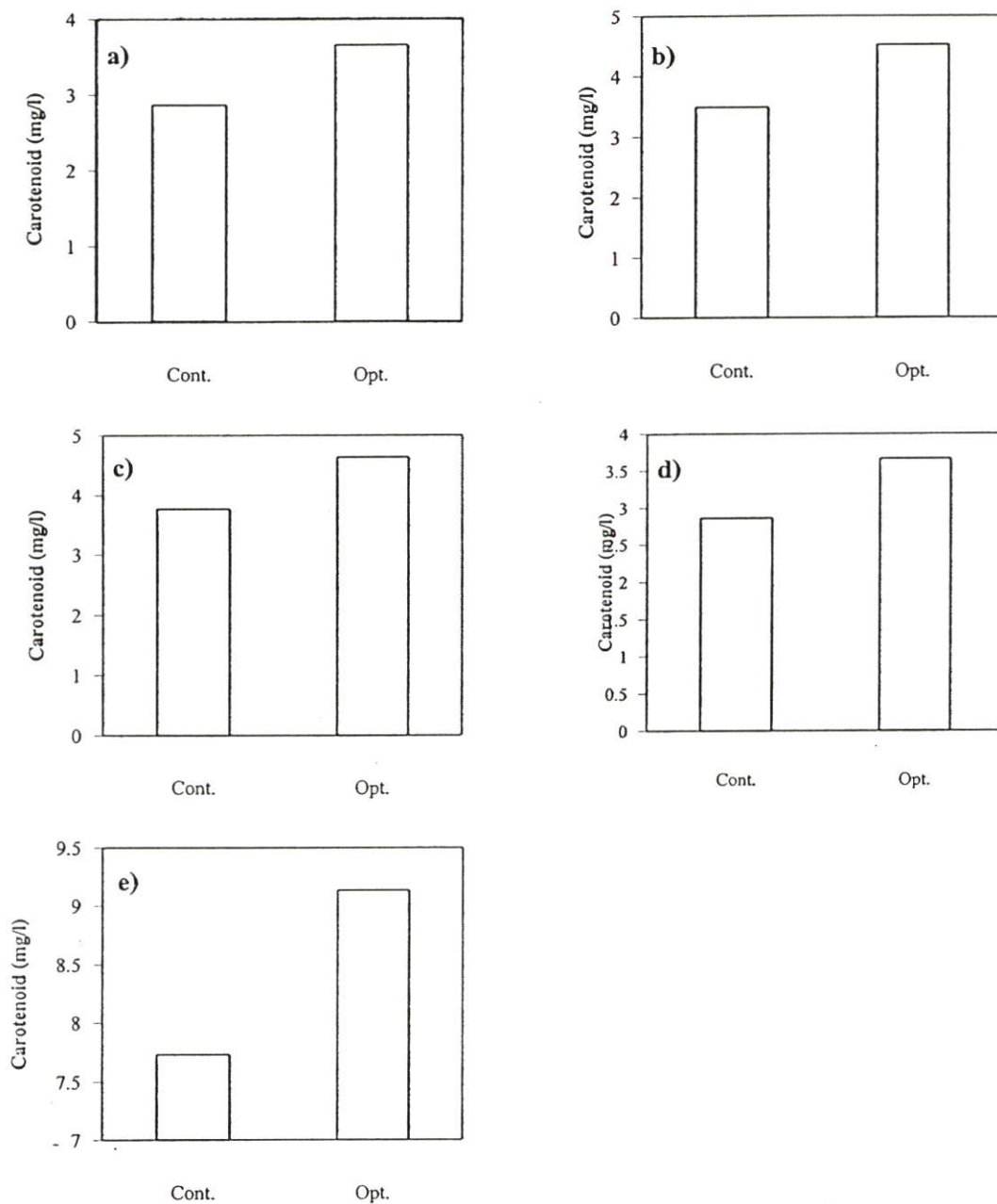
ทดลองสกัดไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วย 99.8% เมทานอล, 99.8%, 90%, 80%, 70% และ 60% เอทานอล จากรูปที่ 4.21 พบว่าการสกัดด้วย 99.8% เมทานอล ได้แคโรทีนอยด์ปริมาณมากที่สุดในทุกสายพันธุ์ จัดให้เป็น 100% และการสกัดด้วย 99.8% เอทานอล ทำให้ได้แคโรทีนอยด์ปริมาณต่ำกว่าที่สกัดด้วย 99.8% เมทานอล เพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งตรงกับผลการวิจัยของสรัญญา (2537) ที่พบว่าการสกัดด้วย 99.8% เมทานอล ทำให้ได้ผลผลิตเบต้า-แคโรทีนจาก *Spirulina* สูงสุด ในขณะที่เดียวกันเมื่อใช้ 99.8%, 90%, 80%, 70% และ 60% เอทานอลสกัด ปรากฏว่าประสิทธิภาพการสกัดลดลงตามเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ลดลง โดยจะเห็นได้ว่า 99.8% เอทานอล และ 90% เอทานอล มีประสิทธิภาพต่างกันค่อนข้างมาก กล่าวได้ว่าการลดเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลลงไม่เป็นผลดีต่อการสกัดสารที่ต้องการ เนื่องจากแคโรทีนอยด์ละลายได้ในไขมันและตัวทำละลายอินทรีย์ไม่ละลายน้ำ (Humbeck, 1990) ดังนั้นน้ำที่เติมลงไปผสมกับเอทานอลจึงไปลดประสิทธิภาพของแอลกอฮอล์ และลดการละลายของแคโรทีนอยด์ลง เพราะฉะนั้นควรเลือกใช้ 99.8% เอทานอลเป็นตัวสกัด เนื่องจากปลอดภัยกว่าเมทานอลและสกัดได้ดีพอๆ กัน



รูปที่ 4.19 เปรียบเทียบการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติและสภาวะที่เหมาะสม

a) *Calothrix* sp. ANCG14 ; b) *Calothrix* sp. ANCG18 ; c) *Calothrix* sp. ANCG1542

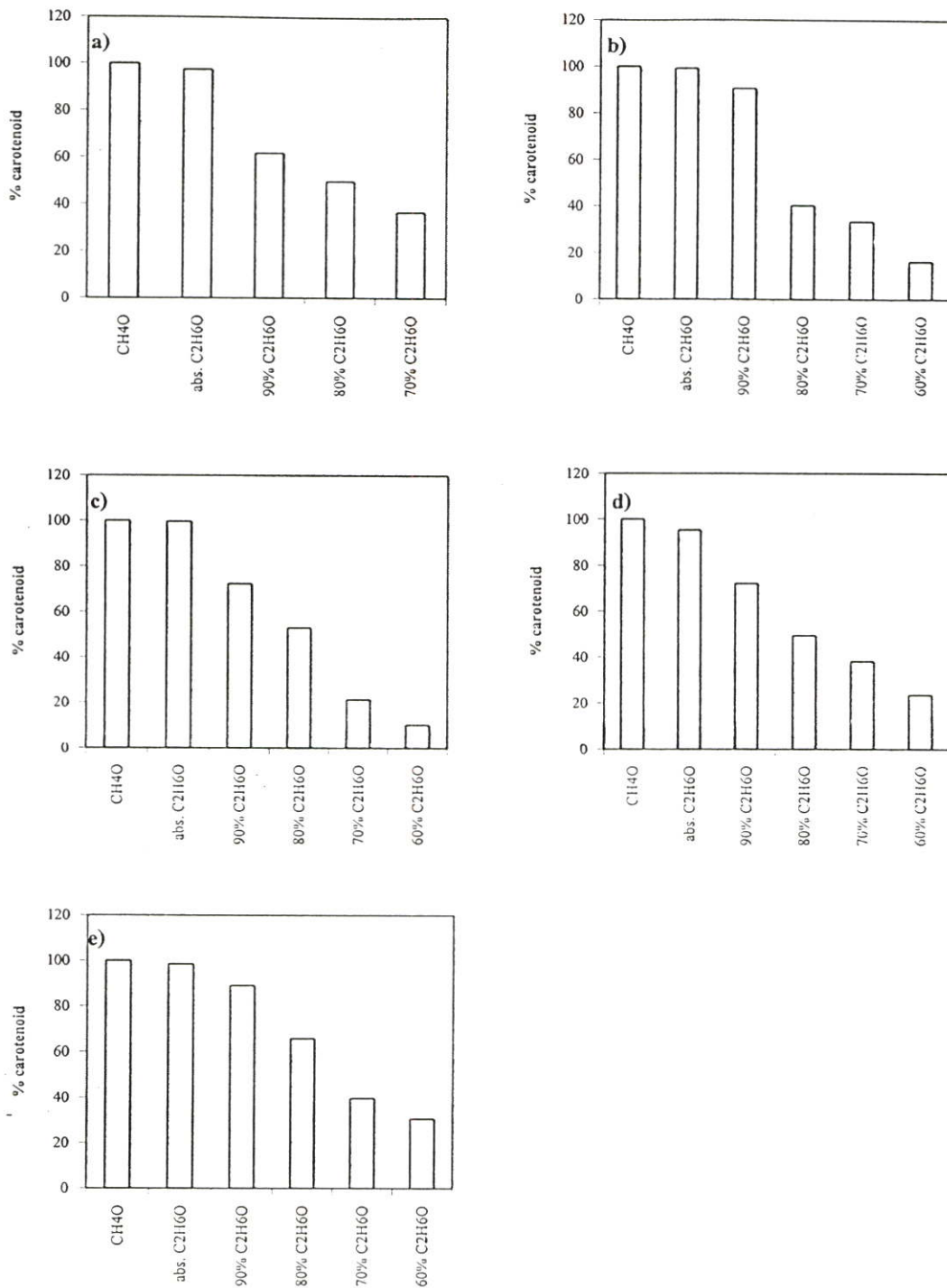
d) *Nostoc* sp. ANCG1660 ; e) *A. siamensis* ANCG1709



Cont. = เพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ Opt. = เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม

รูปที่ 4.20 เปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติและสภาวะที่เหมาะสม

- a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542;
d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709



รูปที่ 4.21 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้

a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542;

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* sp.

4.4 ปริมาณเบต้า-แคโรทีนในสารละลายแคโรทีนอยด์

การวิเคราะห์หาเบต้า-แคโรทีนในสารสกัดของไซยาโนแบคทีเรีย ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งในการทดลองใช้คอลัมน์ ODS hypersil C₁₈ ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่เฟสนิ่งเป็น ออกตาเดซิลซิลิล (Octadecylsilyl) หรือเป็นซิลิกาที่จับกับไฮโดรคาร์บอน C-18 สายยาว (McMaster, 1994) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย อะซิโตนไตรัส : เมทานอล : ไดคลอโรมีเทน : น้ำปราศจากอิออน (79.9 : 10 : 10 : 0.1) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที

ผลการทดลองดังรูปที่ 4.22 พบว่าในทุกเชื้อผลิตเบต้า-แคโรทีนเพิ่มขึ้นตามจำนวนวันที่เพาะเลี้ยง โดยมีรูปแบบการเกิดขึ้นของเบต้า-แคโรทีนใกล้เคียงกันในกลุ่มดังนี้ กลุ่มที่มีเฮเทอโรซิสต์ปลายเซลล์ คือสกุล *Calothrix* ทั้ง 3 สายพันธุ์ (ANCG14, ANCG18 และ ANCG1542) การผลิตเบต้า-แคโรทีนจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และผลิตได้สูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง คือเท่ากับ 0.99, 0.23 และ 2.34 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ในกลุ่มที่มีเฮเทอโรซิสต์ภายในสายเซลล์คือ *Nostoc* sp. และ *A. siamensis* มีการผลิตเบต้า-แคโรทีนคล้ายคลึงกัน โดยผลิตได้สูงที่สุดคิดเป็น 4.51 และ 10.65 มิลลิกรัม/ลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงและจะลดลงเมื่อเลี้ยงต่อไป

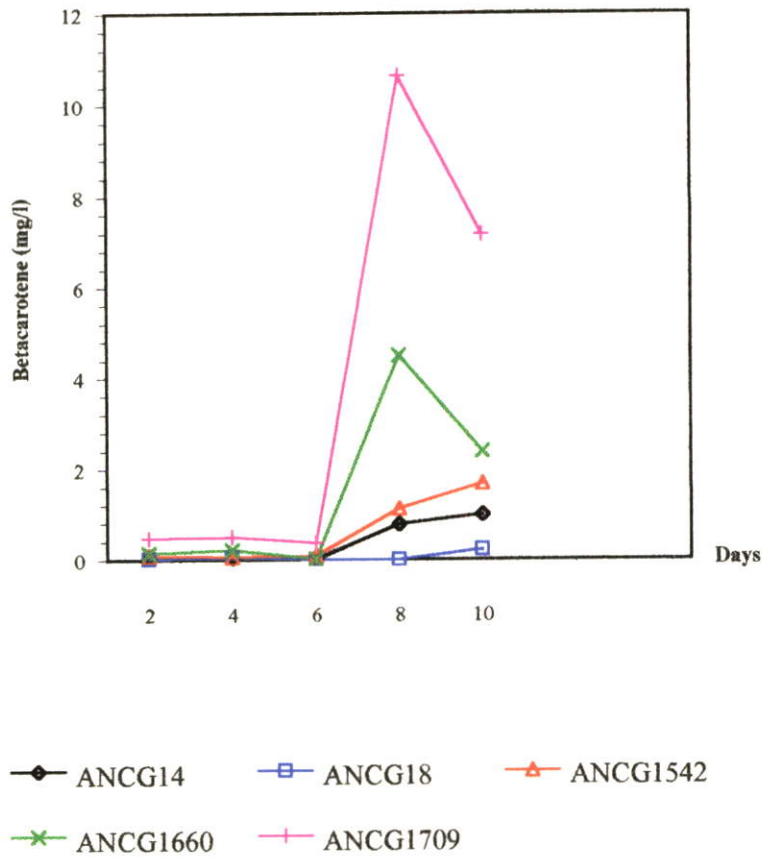
4.5 การชักนำให้เกิดการสร้างสารแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น

จากงานวิจัยของ Harker และคณะ (1996) ที่ทดลองเพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* แบบ 2 ขั้นตอน (two-step culture) คือเลี้ยงให้ได้ปริมาณเซลล์มากๆ ก่อน แล้วย้ายเซลล์ลงไปเลี้ยงในสภาวะที่เครียด (stress) มากขึ้น พบว่าสาหร่ายชนิดนี้ผลิตแคโรทีนอยด์จำพวกแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้น

จากงานดังกล่าว ผู้วิจัยจึงลองนำไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุดคือ *A. siamensis* มาทดลองชักนำให้เกิดการสร้างสารดังกล่าวบ้าง โดยกระทำการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ด้วยการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญก่อน เมื่อถึงช่วงปลายระยะลือก จึงย้ายเชื้อลงเลี้ยงในอาหารใหม่ที่ไม่มีการเติมไนเตรทหรือสารอินทรีย์ และเพิ่มสารหรือสภาวะเครียดให้กับเชื้อโดยใช้ โซเดียมคลอไรด์, โซเดียมอะซิเตต, เฟอริกแอมโมเนียมซัลเฟต และความเข้มข้นปรากฏผลดังนี้

4.5.1 ผลของโซเดียมคลอไรด์

เพาะเลี้ยง *A. siamensis* ตามหลักการดังที่กล่าวไว้ข้างต้น พบว่าเมื่อแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ชักนำ ทำให้การเจริญไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ปริมาณแคโรทีนอยด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 7 กรัม/ลิตร ทำให้การเจริญของเชื้อสูงที่สุด ค่า OD₉₀₀ เท่ากับ 2.66 และทำให้ปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด โดยผลิตได้ 10.77 มิลลิกรัม/ลิตร ดังรูปที่ 4.23 และ 4.24 เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC ทั้งก่อนและหลังการ



รูปที่ 4.22 แสดงปริมาณเบต้า-แคโรทีนที่ผลิตขึ้นในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ชักนำ (รูปที่ 4.25) จะเห็นได้ว่าเบต้า-แลโรทีนของ *A. siamensis* ที่ถูกชักนำด้วยโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้นเป็น 2.15 เท่าของชุดควบคุม เนื่องจากโซเดียมจะขัดขวางการเก็บกักไนโตรเจนไว้ในเซลล์ (Makarewicz และ McKellan, 1985) จึงไม่สามารถสร้างสารสีพวกไฟโคไซยานินมาช่วยในกระบวนการสังเคราะห์แสงได้เพียงพอ ดังนั้นเซลล์จึงจำเป็นต้องสร้างสารสีแคโรทีนอยด์ขึ้นมาทดแทนเพื่อช่วยดูดซับแสง และส่งต่อไปยังคลอโรฟิลล์เพื่อใช้ในการกระบวนการสังเคราะห์แสงต่อไป

4.5.2 ผลของโซเดียมอะซิเตด

เมื่อทำการชักนำด้วยการแปรผันความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตด พบว่า *A. siamensis* มีการเจริญไม่แตกต่างกันในแต่ละระดับความเข้มข้น แต่การผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ความเข้มข้น 0.1 กรัม/ลิตร ทำให้ *A. siamensis* มีการเจริญสูงสุดและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด มีค่า OD₉₀₀ 2.10 ผลิตได้ 16.62 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 4.23 และ 4.24) ผลของการชักนำต่อเบต้า-แลโรทีน พบว่าเมื่อถูกชักนำเชื่อมีการผลิตเบต้า-แลโรทีนเพิ่มสูงขึ้นเป็น 2.71 เท่าของชุดควบคุม (รูปที่ 4.25) ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Harker และคณะ (1996) ที่พบว่าโซเดียมอะซิเตดสามารถชักนำให้ *Haematococcus pluvialis* ผลิตแอสตาแซนธิน (แคโรทีนอยด์ชนิดหนึ่ง) เพิ่มสูงขึ้น

4.5.3 ผลของเฟอริกแอมโมเนียมซิเตรต

ผลการทดลองดังในรูปที่ 4.23 และ 4.24 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของเฟอริกแอมโมเนียมซิเตรตพบว่า การเจริญของเชื้อและการผลิตแคโรทีนอยด์ในแต่ละความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยที่เชื่อมีการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของ 0.012 กรัม/ลิตร มีค่า OD₉₀₀ 1.85 ผลิตแคโรทีนอยด์เท่ากับ 12.00 มิลลิกรัม/ลิตร และพบว่าเมื่อถูกชักนำ *A. siamensis* มีการผลิตเบต้า-แลโรทีนเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.05 เท่าของชุดควบคุม (รูปที่ 4.25) เนื่องจากเหล็กเป็นองค์ประกอบของรงควัตถุจำพวกคลอโรฟิลล์จึงทำให้เซลล์สามารถผลิตคลอโรฟิลล์ขึ้นมาสังเคราะห์แสงได้เพิ่มขึ้น การเจริญจึงสูงขึ้น และเมื่อปริมาณเซลล์มากขึ้นก็ส่งเสริมให้ผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้นตามไปด้วย

4.5.4 ผลของความเข้มแสง

จากการทดลอง ดังรูปที่ 4.23 และ 4.24 เมื่อแปรผันความเข้มแสงที่ใช้เพาะเลี้ยง *A. siamensis* พบว่าการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อในแต่ละระดับความเข้มแสงแตกต่างกัน โดยที่ความเข้มแสง 5000 ลักซ์ การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อสูงสุด ดังนี้ ค่า OD₉₀₀ 3.2 แคโรทีนอยด์ 17.00 มิลลิกรัม/ลิตร และ พบว่าเมื่อถูกชักนำเชื่อมีการผลิตเบต้า-แลโรทีนเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุด โดยคิดเป็น 4.89 เท่าของชุดควบคุม (รูปที่ 4.25) เนื่องจากเมื่อไซยาโนแบคทีเรีย

ตกอยู่ในสถานะที่มีความเข้มแสงค่อนข้างสูงหรือสูงขึ้นไปจะมีการปรับตัวเพื่ออยู่รอดและเจริญเติบโตต่อไปด้วยการสร้างสารแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น เพราะในอาหารที่ไม่มีไนเตรทสาหร่ายต้องสลายไฟโคไซยานินซึ่งเป็นรงควัตถุชนิดหนึ่งซึ่งช่วยดูดซับแสงที่มีความเข้มสูงมาใช้ในการเจริญ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องสร้างแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นเพื่อใช้ในการรับแสงที่มีความเข้มสูงแล้วส่งต่อให้คลอโรฟิลล์ในกระบวนการสังเคราะห์แสงต่อไป ดังที่ Grazer (1987) ได้พบว่ารงควัตถุพวกไฟโคไซยานินมีประสิทธิภาพในการดูดซับแสงได้มากเป็น 6 เท่าของคลอโรฟิลล์ เอ ขณะที่แคโรทีนอยด์ดูดซับแสงได้เป็น 5 เท่าของคลอโรฟิลล์ เอ เนื่องจากคลอโรฟิลล์ เอ ไม่สามารถทนต่อแสงความเข้มสูงได้นั่นเอง

และเมื่อเปรียบเทียบผลของการชักนำให้ *A. siamensis* มีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้น พบว่าการใช้แสงความเข้ม 5000 ลักซ์ สามารถชักนำให้ *A. siamensis* ผลิตแคโรทีนอยด์และเบต้า-แคโรทีนได้สูงที่สุด ดังรูปที่ 4.25

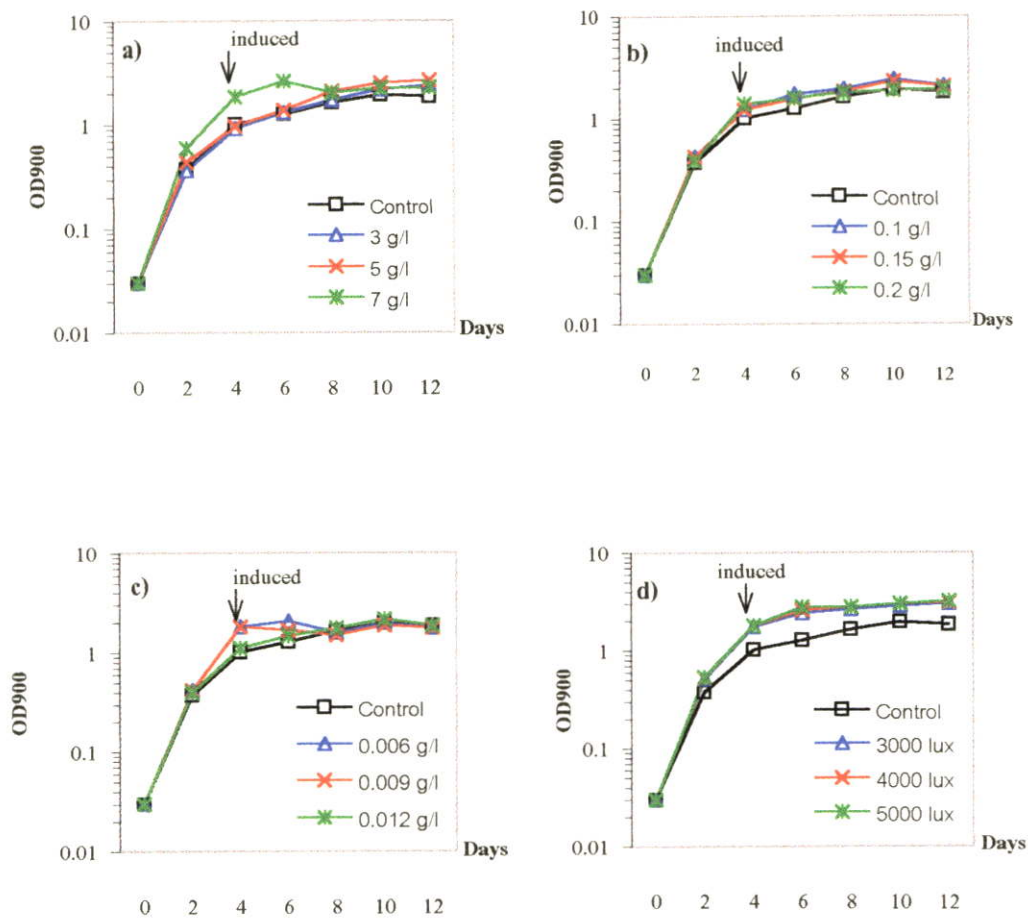
4.6 การศึกษาความคงตัวของสีจากแคโรทีนอยด์และเบต้า-แคโรทีน

4.6.1 การศึกษาความคงตัวของสีเหลืองจากแคโรทีนอยด์

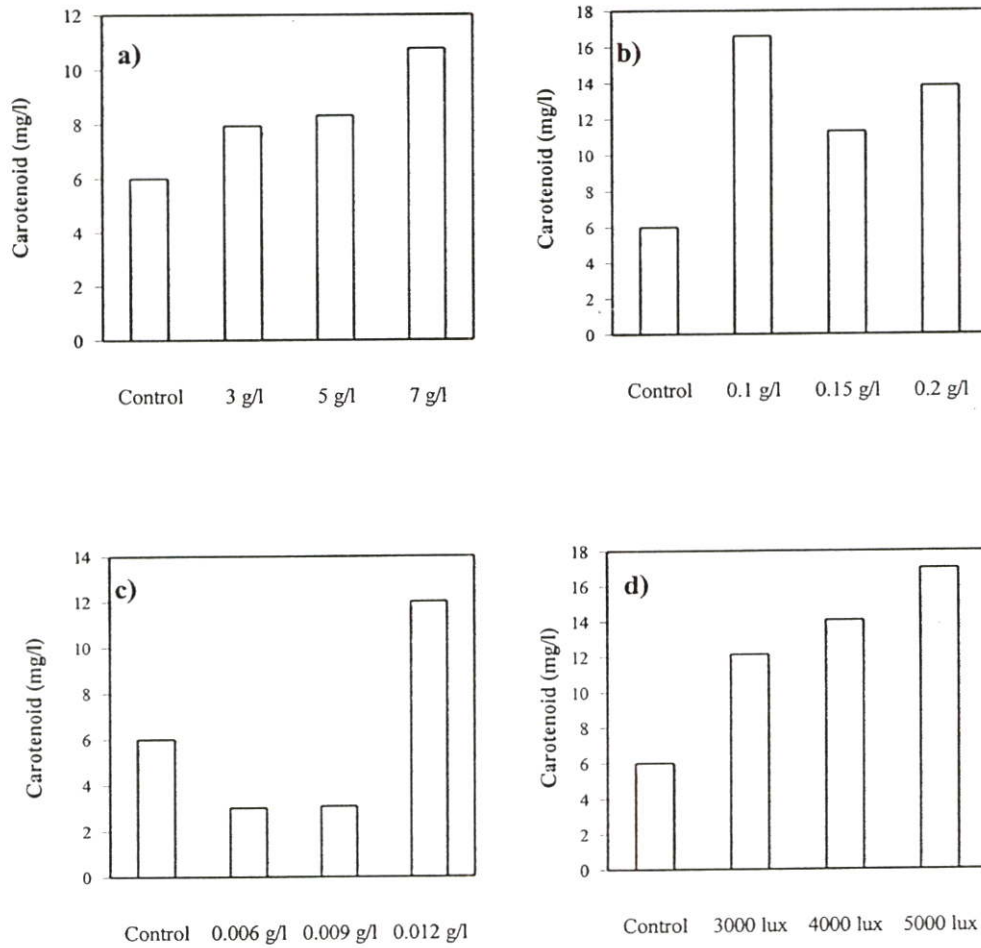
ผลการทดลองดังรูปที่ 4.26 ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสีเมื่อเริ่มทำการทดลองเป็น 100% เมื่อเวลาผ่านไปจะเห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงของสีเหลืองของชุดควบคุมลดลงเรื่อยๆ ในทุกเชื้อ นั่นคือสีเหลืองซีดลงเรื่อยๆ แต่เมื่อเติมสารต่างๆ ลงไปโดยเฉพาะน้ำมันพืชหยก ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของสีเหลืองจากเกือบทุกเชื้อลดลงน้อยที่สุด โดยเฉพาะสีเหลืองจาก *A. siamensis* สีในน้ำมันมีค่าการดูดกลืนแสงคงที่ นั่นคือสีไม่ซีดลงเลย ยกเว้นสีเหลืองจาก *Calothrix* sp. ANCG1542 และ *Nostoc* sp. มีค่าการดูดกลืนแสงของสีลดลงน้อยที่สุดเมื่อเติม BHT 0.2% ลงไป เนื่องจากในน้ำมันพืชหยกมีการเติมสารกันหืน ซึ่งก็คือสารจำพวกต่อต้านการออกซิไดซ์นั่นเอง รวมทั้งน้ำมันมีความหนืดค่อนข้างมากจึงทำให้โอกาสที่สารจะสัมผัสกับออกซิเจนมีน้อย

4.6.2 การศึกษาความคงตัวของเบต้า-แคโรทีน

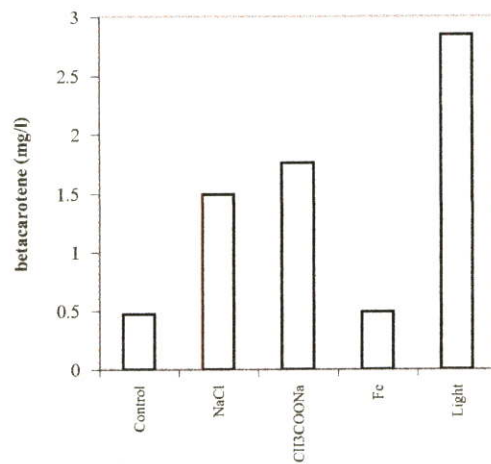
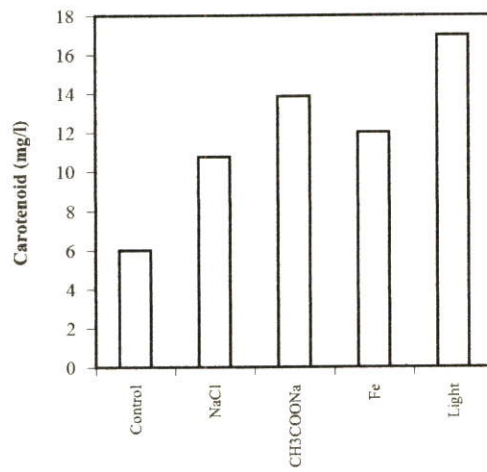
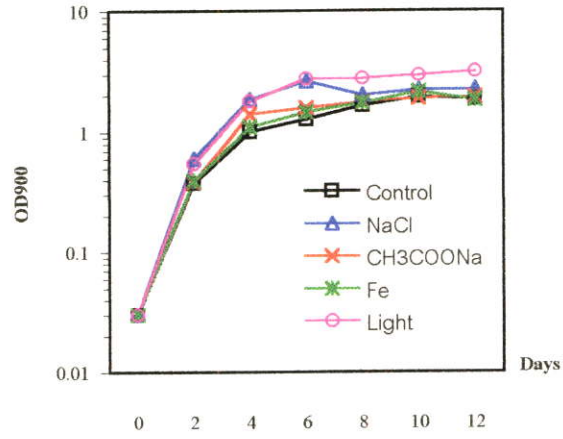
ผลการทดลองดังรูปที่ 4.27 ให้พื้นที่ได้ฟีกของเบต้า-แคโรทีนเมื่อเริ่มทำการทดลอง (สัปดาห์ที่ 0) เป็น 100% เมื่อเวลาผ่านไปจะเห็นว่าพื้นที่ได้ฟีกของเบต้า-แคโรทีนของชุดควบคุมลดลงเรื่อยๆ โดยในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง (สัปดาห์ที่ 4) แคโรทีนอยด์จาก *A. siamensis*, *Nostoc* sp., *Calothrix* sp. ANCG14, ANCG18 และ ANCG1542 มีปริมาณเบต้า-แคโรทีนลดลง 99%, 100%, 79%, 91% และ 99% ตามลำดับ จากการเติมสารต่างๆ พบว่าแคโรทีนอยด์ที่เติม BHT 0.2% จากทุกเชื้อมีการลดลงของปริมาณเบต้า-แคโรทีนน้อยที่สุด โดยแคโรทีนอยด์จาก *A. siamensis*, *Nostoc* sp., *Calothrix* sp. ANCG14, ANCG18 และ ANCG1542 มีปริมาณเบต้า-แคโรทีนลดลง 31%, 96%, 61%, 71% และ 89% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Simpson



รูปที่ 4.23 แสดงการเจริญของ *A. siamensis* ANCG1709 ที่ถูกชักนำให้ผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น
 a) ผลของโซเดียมคลอไรด์; b) ผลของโซเดียมอะซิเตต; c) ผลของเหล็ก; d) ผลของแสง

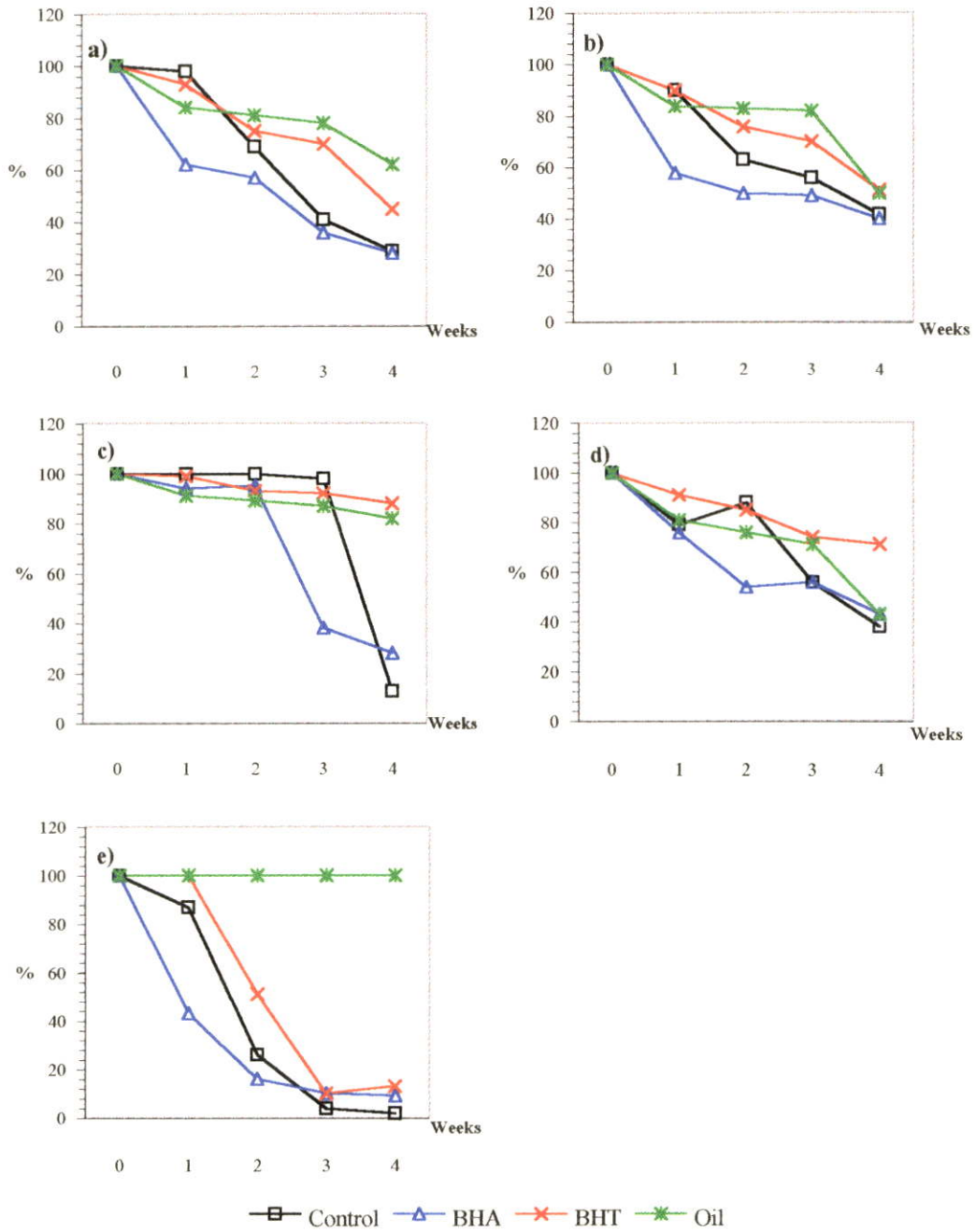


รูปที่ 4.24 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์ของ *A. siamensis* ANCG1709 ที่ถูกชักนำ
 a) ผลของโซเดียมคลอไรด์; b) ผลของโซเดียมอะซิเตด;
 c) ผลของเหล็ก; d) ผลของแสง



รูปที่ 4.25 เปรียบเทียบผลของการชักนำต่อการเจริญ, ปริมาณแคโรทีนอยด์และปริมาณเบต้าแคโรทีนที่เพิ่มขึ้นใน *A. siamensis* ANCG1709

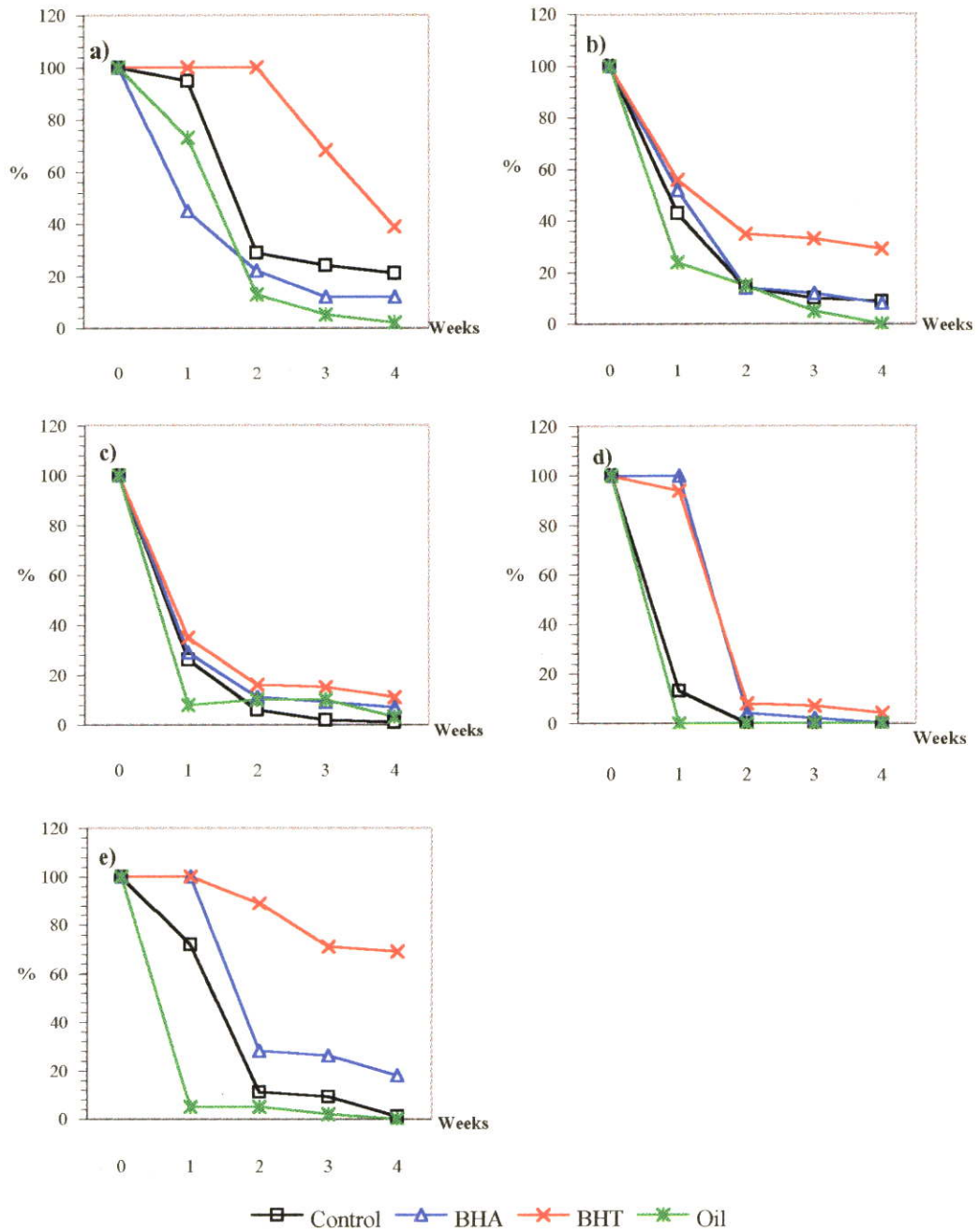
(1981) ที่ว่าแสงมีผลต่อคุณสมบัติของแคโรทีนอยด์คือทำให้เกิดการออกซิไดซ์ได้ การเติม BHT ลงไปจะเป็นการป้องกันแคโรทีนอยด์จากแสงได้



รูปที่ 4.26 ความคงตัวของสีแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรีย

a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709



รูปที่ 4.27 ความคงตัวของเบต้า-แคโรทีนในแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรีย

a) *Calothrix* sp. ANCG14; b) *Calothrix* sp. ANCG18; c) *Calothrix* sp. ANCG1542

d) *Nostoc* sp. ANCG1660; e) *A. siamensis* ANCG1709

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 การคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์

จากการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียจากคลังเก็บเชื้อจำนวน 83 สายพันธุ์ ได้ไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด 5 ไอโซเลต จากนั้นนำไปจัดจำแนกพบว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต ได้แก่ *A. siamensis*, *Nostoc* sp., *Calothrix* sp. ANCG14, *Calothrix* sp. ANCG18, และ *Calothrix* sp. ANCG1542

5.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์

5.2.1 *A. siamensis*

อาหารสูตร BG 11 ไม่เติมโซเดียมไนเตรท เพิ่มโคโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็น 0.06 กรัม/ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แสงสีขาว ความเข้มแสง 4000 ลักซ์

5.2.2 *Nostoc* sp.

อาหารสูตร BG 11 ไม่เติมโซเดียมไนเตรท เพิ่มโคโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็น 0.06 กรัม/ลิตร เติมโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัม/ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000-4000 ลักซ์

5.2.3 *Calothrix* sp. ANCG14

อาหารสูตร BG 11 ไม่เติมโซเดียมไนเตรท เพิ่มโคโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็น 0.08 กรัม/ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์

5.2.4 *Calothrix* sp. ANCG18

อาหารสูตร BG 11 เพิ่มแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 0.15 กรัม/ลิตร เติมโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัม/ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แสงสีขาว ความเข้มแสง 4000 ลักซ์

5.2.5 *Calothrix* sp. ANCG1542

อาหารสูตร BG 11 เพิ่มโคปโตสซีมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 0.06 กรัม/ลิตร เพิ่มแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 0.15 กรัม/ลิตร เติมนิโคตินคลอไรด์ 1 กรัม/ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แสงสีขาว ความเข้มแสง 4000 ลักซ์

5.3 การศึกษาปริมาณสารสกัดที่เหมาะสม

สารสกัดที่เหมาะสมต่อการสกัดแคโรทีนอยด์คือ 99.8% เอทานอล

5.4 การศึกษาปริมาณเบต้า-แคโรทีน

สกุล *Calothrix* ผลิตเบต้า-แคโรทีนสูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ส่วน *Nostoc* sp. และ *A. siamensis* ผลิตเบต้า-แคโรทีนได้สูงสุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง โดยที่ *A. siamensis* ผลิตเบต้า-แคโรทีนได้สูงที่สุด

5.5 การชักนำให้มีการผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น

พบว่าทุกสภาวะที่ใช้ในการชักนำสามารถชักนำให้ *A. siamensis* มีการเจริญสูงขึ้นและผลิตแคโรทีนอยด์ (โดยเฉพาะเบต้า-แคโรทีน) ได้มากขึ้น โดยจะผลิตได้สูงที่สุดเมื่อชักนำด้วยแสงสีขาว ความเข้ม 5000 ลักซ์

5.6 การศึกษาความคงตัวของสีจากแคโรทีนอยด์และเบต้า-แคโรทีน

พบว่าสีเหลืองที่ได้จะคงตัวได้ดีเมื่อเติมน้ำมันพืชที่สกัดจากปาล์ม ยกเว้นสีที่ได้จาก *Calothrix* sp. ANCG1542 และ *Nostoc* sp. จะคงตัวได้ดีเมื่อเติม BHT 0.2% ส่วนเบต้า-แคโรทีนจากทุกสายพันธุ์มีความคงตัวดีเมื่อเติม BHT 0.2%

ข้อเสนอแนะ

- 1) ควรมีการศึกษาต่อในเรื่องของการทำบริสุทธิ์เบต้า-แคโรทีน
- 2) ควรมีการศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงระดับใหญ่
- 3) ควรมีการศึกษาต่อในเรื่องผลของการทำเซลล์แห้งด้วยวิธีต่างๆ ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์และเบต้า-แคโรทีน
- 4) ในการวิเคราะห์เบต้า-แคโรทีนด้วยเครื่อง HPLC ควรเลือกใช้คอลัมน์เฉพาะสำหรับวิเคราะห์เบต้า-แคโรทีน

บรรณานุกรม

- กาญจนภาชน์ ถิ่วมโนมนต์. 2527. **สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่าย**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ขรรชัช คงอินทร์. 2524. **ข่าวกรองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์**. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์กรมปศุสัตว์.
- เชาวน์ ชิโนรักษ์ และพรณี ชิโนรักษ์. 2528. **ชีววิทยา เล่ม 3**. กรุงเทพฯ : อมรการพิมพ์.
- พงศ์เทพ อันตริกานนท์, สุรียา สาสนรักกิจ, อัญชญา พัฒนสุพงษ์, จารุวรรณ ไควสุรัตน์, ณิชพร พันธุมนาวิน, สยาม สิ้นสวัสดิ์ และสุมาลี แสนพลเมือง. 2540. “การผลิตสารเซนโทฟิลล์จากดอกดาวเรืองเพื่ออุตสาหกรรม.” กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.
- ยุวดี พีรพรพิศาล. 2542. **สาหร่าย (Algae) ตอนที่ 1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สาหร่ายสีเขียว**. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สุพจน์ บุญแรง และสุรียา สาสนรักกิจ. 2542. “สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฟโคไซยานินของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว.” กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. เอกสารอัดสำเนา.
- สร้อยญา พันธุ์พุกฤษ. 2537. “สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าเพื่อผลิตเบต้าแคโรทีน.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สิรินทร์ วิโมกษ์สันต์, เจมส์ เอ โอลสัน, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, สุวิทย์ เพ็ชรกิจกรรม, สกล พันธุ์ยิ้ม และมนตรี จุฬาวัฒนทล. 2523. **ชีวเคมี ฉบับปรับปรุงใหม่**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยมหิดล.

- สุวรรณา สาสนรักกิจ. 2542. “การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียของไทยที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศเพื่อนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์คุษฎีบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมศักดิ์ โชคนุกูล. 2530 การนำทรัพยากรธรรมชาติทะเลสาบสงขลา (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) มาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มผลผลิตทางด้านเกษตรกรรมในท้องถิ่นภาคใต้. สงขลา : มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- อรพรรณ ทองประสงค์. 2532. “การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคาโรทีนอยด์ของสาหร่ายคลอเรลลา.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต คณะพลังงานและวัสดุ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- Allen, M. M. and Stainer, R. Y. 1968. “Selective isolation of blue-green algae from water and soil.” *J. Gen. Microbiol.* 51 : 203-209.
- Antarikanonda, P. 1980. “Morphological and Biochemical Studies with the Effectively N₂-fixing Blue-Green Alga (Cyanobacterium) *Anabaena* sp. TA. 1.” Ph. D. Thesis of Geory-August University.
- Becker, E. W. 1994. **Microralgae : Biotechnology and Microbiology.** Cambridge : Cambridge University Press.
- Blum, J. J. and Begin-Heick, N. 1967. “Metabolic changes during phosphate derivative in *Euglena* in air and oxygen.” **Biochem. J.** 105 : 821-829.
- Britton, G. 1983. “Carotenoids.” 61-68. in Miller, L. P. **The Biochemistry of Natural Pigments.** Van Nastrand : Reinhold Company.
- Camara, B. and Moneger, R. 1981. “Carotenoids biosynthesis. In vitro conversion of antheraxanthin to capsanthin by a chromoplast enriched fraction of capsicum fruits.” **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 99 : 1117.

- Ciegler, A. 1965. "Microbial Carotenogenesis." **Adv. Appl. Microbiol.** 7 : 1-29.
- Ciferri, O. and Tiboni, O. 1985. "Biochemistry and industrial potential of *Spirulina*." Annual Review of Microbiology. 39 : 503-526.
- De Fabo, E. C., Harding, R. W. and Shropshire. 1976. "Action spectrum between 260 and 800 nanometers for the photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Neurospora crassa*." **Plant Physiol.** 57 : 440-445.
- De Laura, C. I., Dubacq, P. J. and Thomas, C. J. 1987. "The effects of nitrogen deficiency on pigments and lipids of cyanobacteria." **Plant Physiol.** 83 : 838-843.
- Desikachary, T. V. 1959. **Cyanophyta**. New Delhi : Indian Council of Agricultural research.
- Dholokia, J. N. and Modi, V. V. 1984. "Regulation of carotenogenesis by inorganic phosphate in *Blakeslea trispora*." **J. Gen. Microbiol.** 130 : 2043-2049.
- Fiksdahl, A., Foss, P. and Liaaen-Jensen, S. 1983. "Carotenoids of blue-green algae – 11. Carotenoids of chromatically-adapted cyanobacteria." **Comp. Biochem. Physiol.** 76B (3) : 509-601.
- Fogg, G. E., Stewart, W. D. P., Fay, P. and Walsby, A. E. 1973. **The Blue-Green Algae**. London : Academic Press.
- Fox, H. M. 1957. **Physiology of Fish**. New York : Academic Press.
- Frossberg, A., Lingen, C., Ernster, L. and Linberg, O. 1959. "Modification of X-irradiation syndrome for lycopene." **Exp. Cell Res.** 16 : 7.
- Goedheer, J. C. 1969. "Energy transfer from carotenoids to chlorophyll in blue-green, red and green algae and greening bean leaves." **Biochim. Biophys. Acta.** 172 : 252-265.

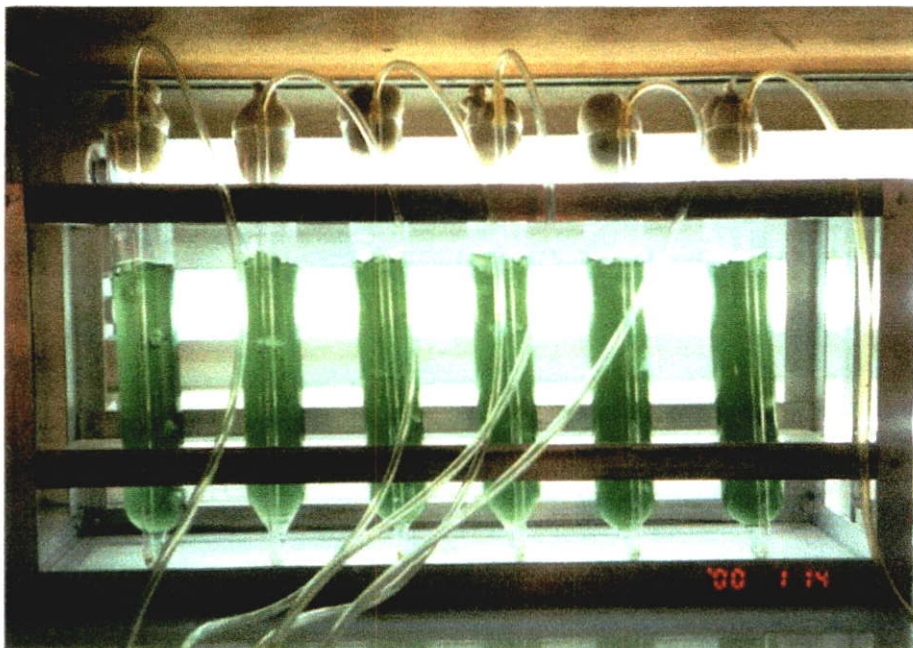
- Goodwin, T. W. and Willmer, J. S. 1962. "Studies in carotenogenesis 4. Nitrogen metabolism and carotene synthesis in *Phycomyces blakesleeanus*." **Biochem. J.** 51 : 213-217.
- Goodwin, T. W. 1984. **The Biochemistry of the Carotenoids.** London : Chapman and Hall.
- Grazer, A. N. 1987. "Phycobilisomes : assembly and attachment." 69-94. in Fay, P. and Baclen, C. V. **The Cyanobacteria.** Amsterdam : Elsevier Science Publisher.
- Hagblom, P. and Unestam, T. 1979. "Blue light inhibits mycotoxin production and increases total lipids and pigmentation in *Alternaria alternata*." **Appl. Environ. Microbiol.** 38 : 1074-1077.
- Harker, M., Tsavalos, A. and Young, A. J. 1996. "Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*." **Bioresource Technology.** 55 : 207-214.
- Humbeck, K. 1990. "Light-dependent carotenoid biosynthesis in mutant C-6D of *Scenedesmus obliquus*." **Photochem. Photobiol.** 51 : 113-118.
- KMITT. 1996. **Laboratory document : A regional workshop on mass cultivation of microalgae.** Bangkok : King Mongkut's Institute of Technology Thonburi.
- Krinsky, N. I. 1971. **Carotenoids.** Basil : Birkhaeuser.
- Lilly, V. G., Barnett, H. L. and Krause, R. F. 1957. "The effects of light and temperature on the production of carotenoid pigments by + and - sexes of *Phycomyces blakesleeanus*." **Proc. W. Va. Acad. Sci.** 29 : 29-31.
- Lilly, V. G., Barnett, H. L. and Krause, R. F. 1960. "The production of carotene by *Choanephora cucurbitarum*." **W. Va. Agric. Expt. Sta. Bull.** 441T.
- Makarewicz, J. C. and McKellan, D. A. 1985. "Growth response of *Anacystis nidulans* to sodium and phosphate availability. *Hydrobiol.*" 121 : 129-137.

- McMaster, M. 1994. **HPLC A Practical User's Guide**. New York. VCH Publisher, Inc.
- Miki, W., Yamakuchi, K. and Konosu, S. 1986. "Carotenoid composition of *Spirulina maxima*." **Bull. Jan. Soc. Sci. Fish.** 52 : 1225-1227.
- Moore, A. L., Joy, A., Tom, R., Gust, D. and Moore, T. A. 1982. "Photoprotection by carotenoids during photosynthesis : Motional dependence of intramolecular energy transfer." **Science.** 216 : 982-984.
- Munzel, K., and Fuller, W. 1961. "Coloration of fatty suppositories with carotenoid-dyes." **Pharm. Acta. Helv.** 44 : 108.
- Nakayama, T. O. M. 1962. **Physiology and Biochemistry of Algae**. New York : Academic Press.
- Ninet, L. and Renaut, J. 1979. **Microbial Technology**. Washington D. C. : Carnegie Institute of Washington Publication.
- Peterson, A. H. 1996. **Genome Mapping in Plants**. Texas : Texas A&M University.
- Powthongsook, S. 1993. "Strain selection and culture of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) for betacarotene production." Master's thesis of Chulalongkorn University.
- Prescott, G. W. 1981. **How to know the Freshwater Algae**. Iowa : Wm. C. Company Publishers.
- Rau, W. 1976. "Photoregulation of carotenoid biosynthesis in plants." **Pure & Appl. Chem.** 57 (5) : 777-784.
- Rippka, R. J., Deruelles, B., Waterbury, Herdman, M. and Stainer, R. Y. 1979. "Generic assignment strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria." **J. Gen. Microbiol.** 11 : 1-61.

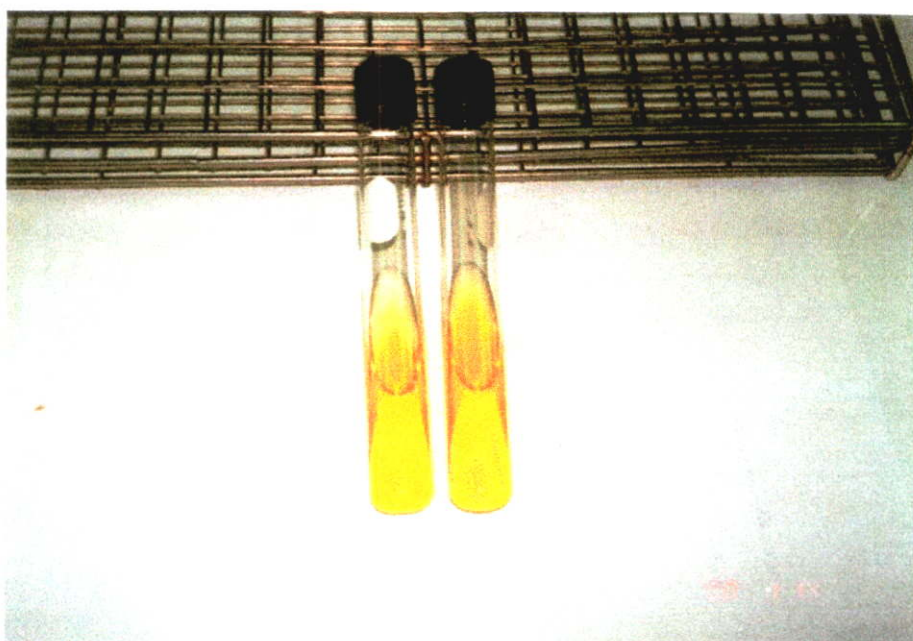
- Schiff, J. A. 1980. p. 495. in Senger, H. S. **The Blue Light Syndrome**. Berlin : Springer.
- Simpson, K. L., Katayama, T. and Chichester, C. O. 1981. **Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors Technological and Nutritional Applications**. London : Academic Press.
- Soeder, C. J. 1978. **Biochemical Aspects of New Protein Food and Biochemical Aspects of Single-cell Protein**. Copenhagen : Pergamon Press.
- Theriault, R. J. 1964. "Heterotrophic growth and production of xanthophylls by *Chlorella pyrenoidosa*." **Appl. Microbiol.** 13 : 402-415.
- Trainor, F. R. 1978. **Introductory Phycology**. Toronto : John Wiley & Sons.
- Will III, O. H., Ruddat, M., Garber, E. D. and Kezdy, F. J. 1984. "Characterization of carotene accumulation in *Ustilago violacea* using high-performance liquid chromatography." **Current Microbiol.** 10 : 57-64.
- Withers, N. W. and Haxo, F. T. 1978. "Isolation and characterization of carotenoid-rich lipid globules from *Peridinium foliaceum*." **Plant Physiol.** 62 : 36-39.
- Zarokar, M. 1954. "Studies on biosynthesis of carotenoids in *Neurospora crassa*." **Arch. Biochem. Biophys.** 50 : 71-80.
- Zarrouk, C. 1966. "Contribution a l'etude de la culture dual cyanophyceae. Influence de divers facteurs physiques sur la croissance et la photosynthesis de *Spirulina maxima*." Ph. D dissertation : Paris.

ภาคผนวก ก.

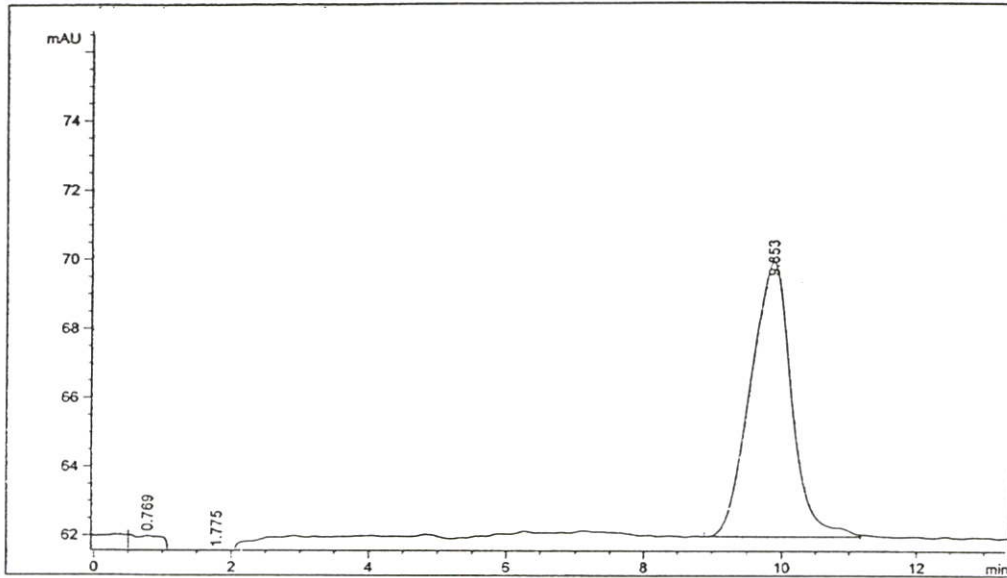
ภาพประกอบ



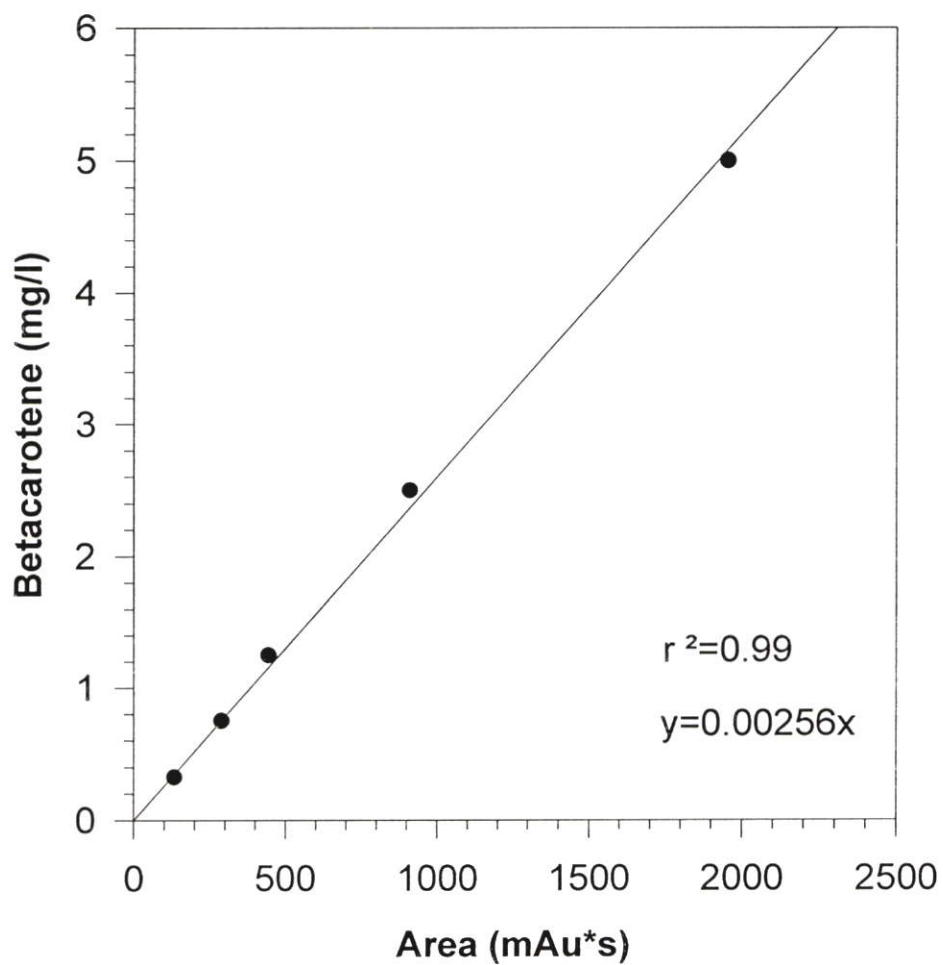
รูปที่ ผ1 การเพาะเลี้ยง *A. siamensis* ในหลอดเพาะเลี้ยง



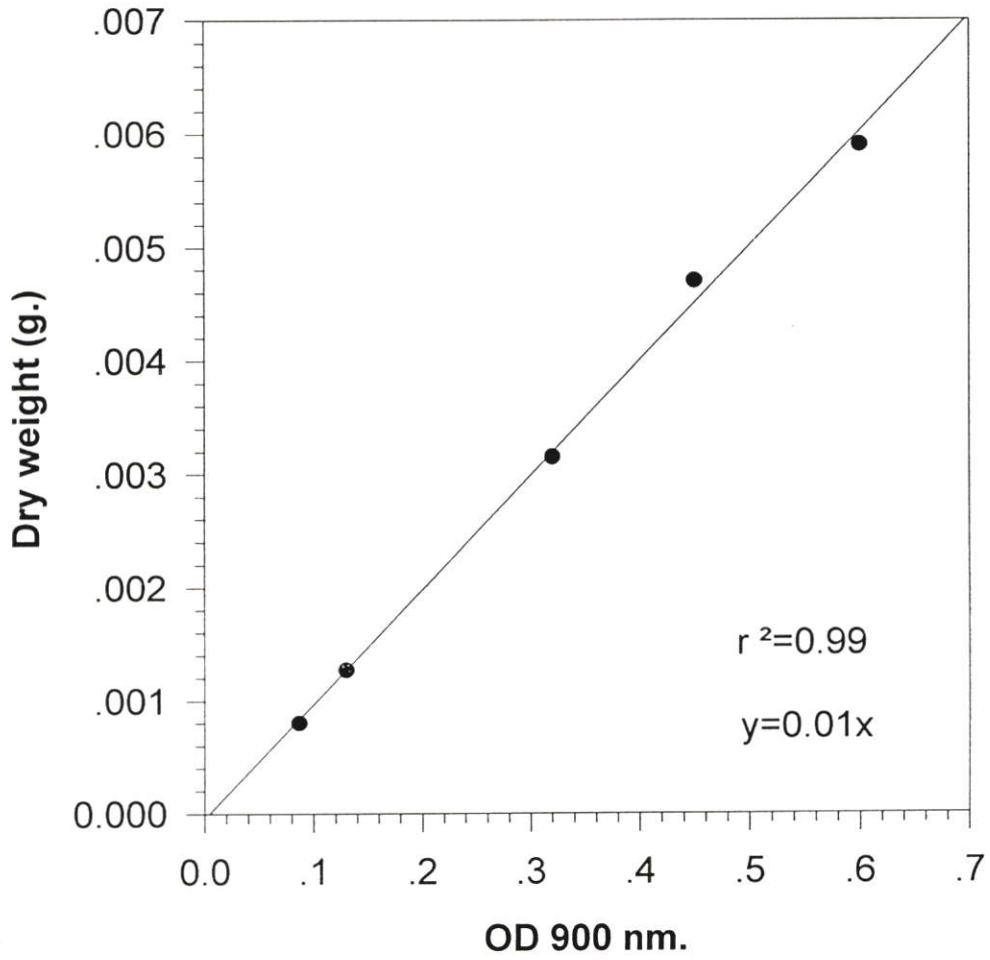
รูปที่ ผ2 สีเหลืองของแคโรทีนอยด์จากไซยาโนแบคทีเรีย



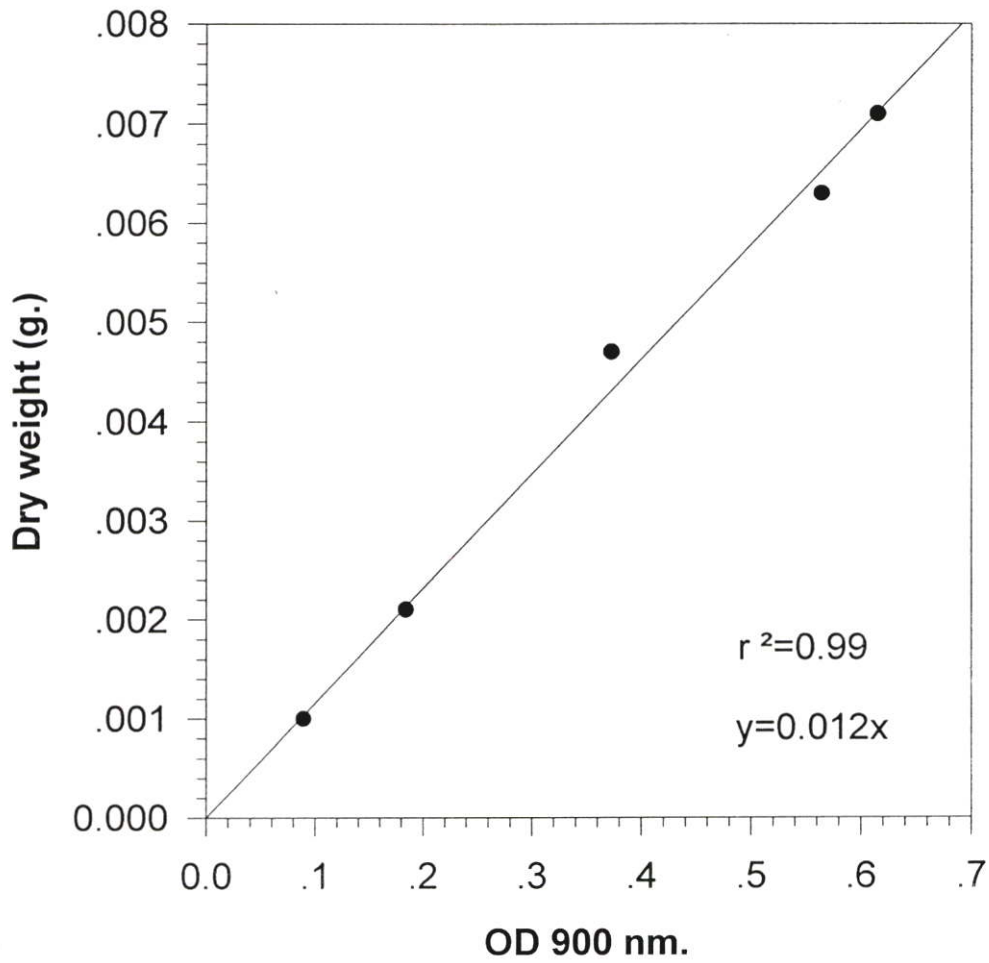
รูปที่ ๓. โครมาโตแกรมของเบต้า-แคโรทีนมาตรฐาน



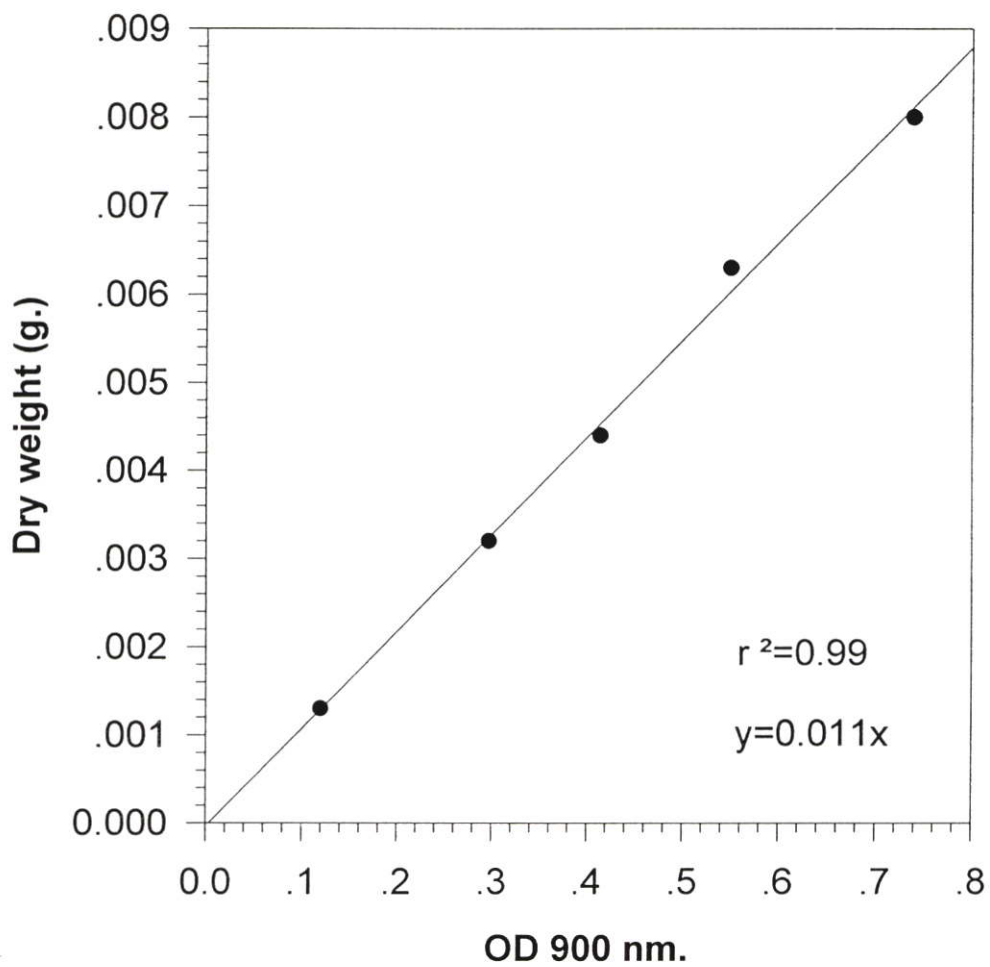
รูปที่ ๑1. กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ที่ได้พิกกับปริมาณเบต้า-แคโรทีน



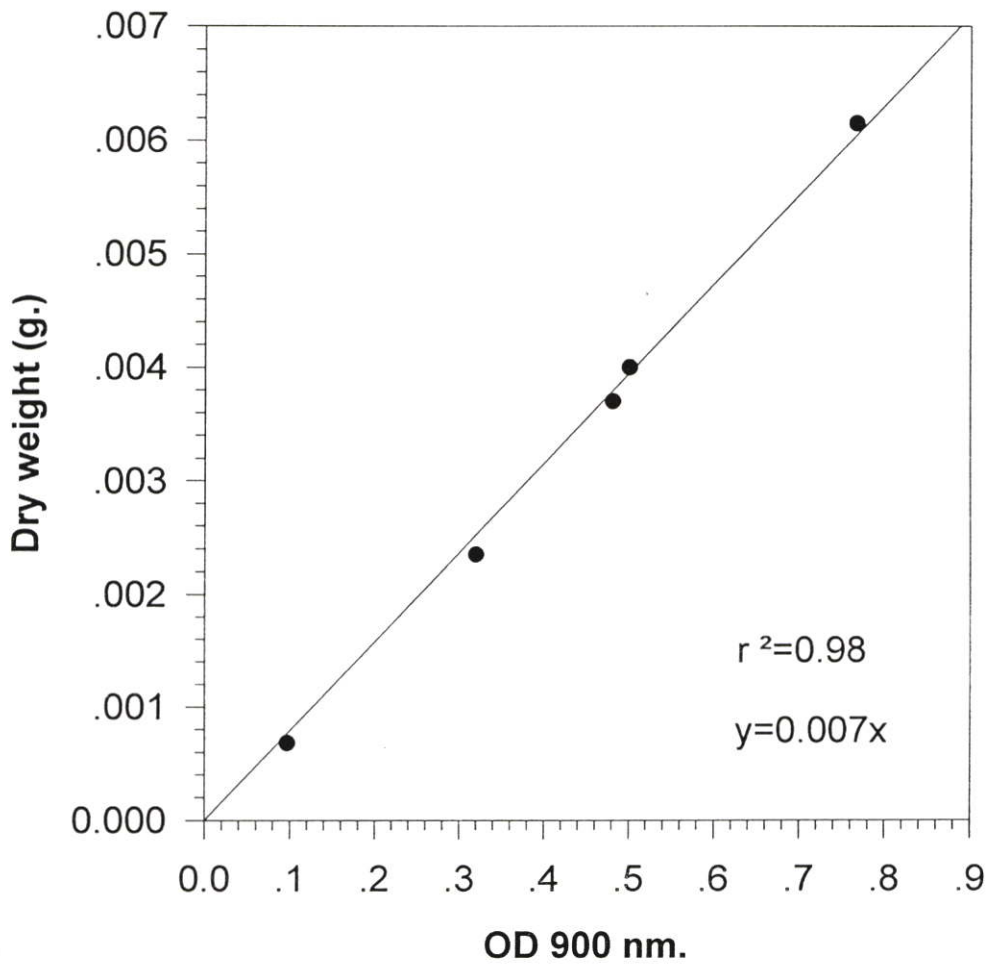
รูปที่ ๘๕. กราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD₉₀₀ กับน้ำหนักแห้งของ *Calothrix* sp. ANCG14



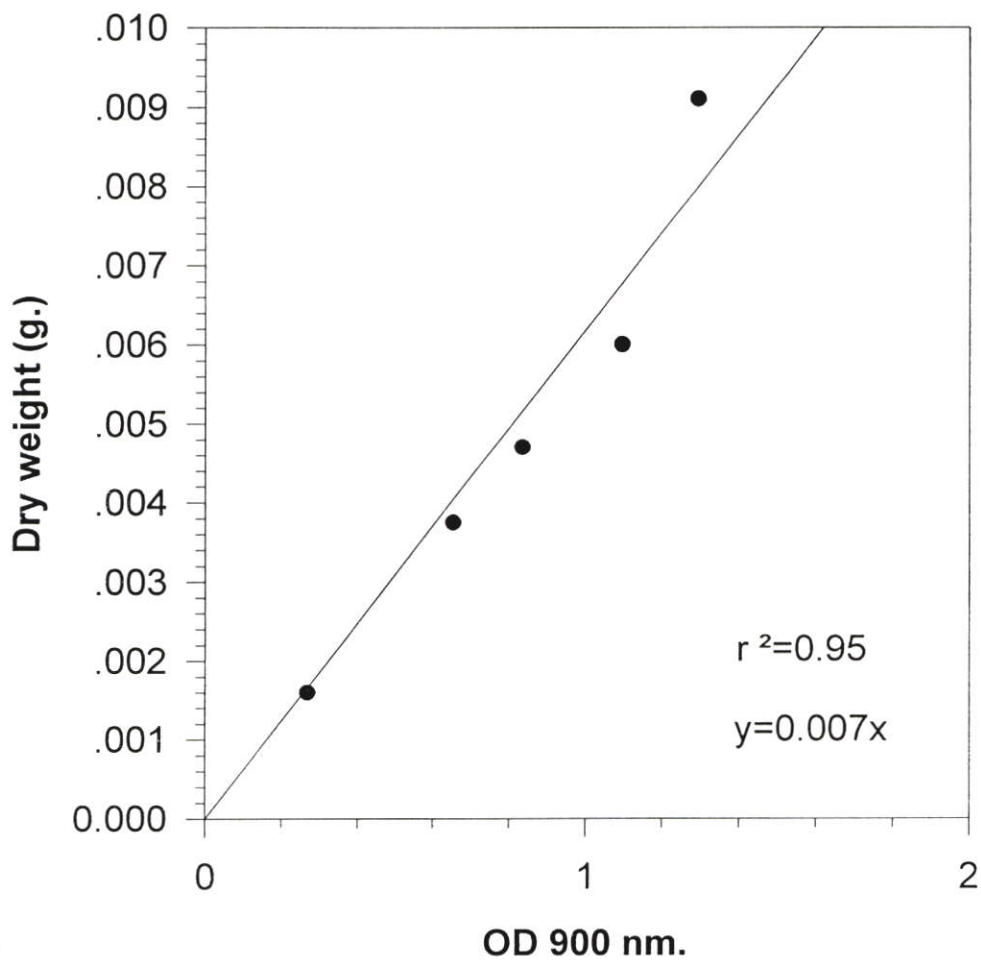
รูปที่ ๘๖. กราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD₉₀₀ กับน้ำหนักแห้งของ *Calothrix* sp. ANCG18



รูปที่ ๗. กราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD₉₀₀ กับน้ำหนักแห้งของ *Calothrix* sp. ANCG1542



รูปที่ ๘. กราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD₉₀₀ กับน้ำหนักแห้งของ *Nostoc* sp. ANCG1660



รูปที่ ๘9. กราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD_{๙๐๐} กับน้ำหนักแห้งของ *A. siamensis* ANCG1709

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์สถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

1. ผลของโซเดียมไนเตรตต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

1.1 *Calothrix* sp. ANCG14

1.1.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0240	0.0120 ^{NS}
Within Groups	3	0.0384	0.0128
Total	5	0.0625	

C.V. = 26.81%

1.1.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.3650	1.3650**
Within Groups	3	0.0028	0.0009
Total	5	2.7328	

C.V. = 1.493%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaNO ₃ (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0	2.96 ^a
1.5	1.61 ^b
3	1.46 ^c

1.2 *Calothrix* sp. ANCG18

1.2.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0961	0.0481 ^{NS}
Within Groups	3	0.0274	0.0091
Total	5	1.1235	

C.V. = 19.35%

1.2.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.6872	1.6872**
Within Groups	3	0.0010	0.0003
Total	5	3.3754	

C.V. = 0.669%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaNO ₃ (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0	2.93 ^a
1.5	3.29 ^b
3	1.55 ^c

1.3 *Calothrix* sp. ANCG1542

1.3.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0091	0.0045 ^{NS}
Within Groups	3	0.0061	0.0020
Total	5	0.0151	

C.V. = 5.85%

1.3.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.4772	0.7386**
Within Groups	3	0.0080	0.0027
Total	5	1.4852	

C.V. = 1.836%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaNO ₃ (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0	2.34 ^a
1.5	3.51 ^b
3	2.64 ^c

1.4 *Nostoc* sp. ANCG1660

1.4.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.1697	0.0849*
Within Groups	3	0.0172	0.0057
Total	5	0.1869	

C.V. = 11.491%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaNO ₃ (g/l)	O.D. 900 nm.
0	0.44 ^{ac}
1.5	0.85 ^b
3	0.68 ^{abc}

1.4.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	10.3345	5.1673**
Within Groups	3	0.0060	0.0020
Total	5	10.3405	

C.V. = 1.831%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaNO ₃ (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0	4.22 ^a
1.5	2.02 ^b
3	1.09 ^c

1.5 *A. siamensis* ANCG1709

1.5.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.3657	0.1829**
Within Groups	3	0.0076	0.0025
Total	5	0.3733	

C.V. = 6.916%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaNO ₃ (g/l)	O.D. 900 nm.
0	0.98 ^a
1.5	0.80 ^b
3	0.39 ^c

1.5.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.0656	5.5328**
Within Groups	3	0.0122	0.0041
Total	5	10.3405	

C.V. = 1.323%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaNO ₃ (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0	6.76 ^a
1.5	3.84 ^{bc}
3	3.92 ^{bc}

2. ผลของไคโปตัสเชื่อมไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

2.1 *Calothrix* sp. ANCG14

2.1.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0296	0.0148*
Within Groups	3	0.0017	0.0006
Total	5	0.0313	

C.V. = 4.684%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

K_2HPO_4 (g/l)	O.D. 900 nm.
0.04	0.44 ^a
0.06	0.85 ^{bc}
0.08	0.68 ^{bc}

2.1.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	2.5996	1.2998**
Within Groups	3	0.0090	0.0030
Total	5	2.6086	

C.V. = 1.942%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

K_2HPO_4 (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0.04	2.77 ^a
0.06	2.04 ^b
0.08	3.65 ^c

2.2 *Calothrix* sp. ANCG18

2.2.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0432	0.0216 ^{NS}
Within Groups	3	0.0170	0.0057
Total	5	0.0602	

C.V. = 14.112%

2.2.2 ผลต่อการผลิตแกโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.2564	0.6282**
Within Groups	3	0.0058	0.0019
Total	5	1.2622	

C.V. = 1.207%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

K_2HPO_4 (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0.04	4.12 ^a
0.06	3.01 ^b
0.08	3.70 ^c

2.3 *Calothrix* sp. ANCG1542

2.3.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.2749	0.1375*
Within Groups	3	0.0345	0.0115
Total	5	0.3094	

C.V. = 24.652%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

K₂HPO₄ (g/l)	O.D. 900 nm.
0.04	0.25 ^a
0.06	0.74 ^b
0.08	0.32 ^{ac}

2.3.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.7785	0.8893**
Within Groups	3	0.0060	0.0020
Total	5	1.7845	

C.V. = 1.836%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

K₂HPO₄ (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0.04	1.61 ^a
0.06	2.19 ^b
0.08	2.94 ^c

2.4 *Nostoc* sp. ANCG1660

2.4.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0868	0.0434*
Within Groups	3	0.0172	0.0057
Total	5	0.1040	

C.V. = 9.679%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

K₂HPO₄ (g/l)	O.D. 900 nm.
0.04	0.69 ^{ac}
0.06	0.95 ^b
0.08	0.70 ^{ac}

2.4.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	2.6644	1.3322**
Within Groups	3	0.0194	0.0065
Total	5	2.6838	

C.V. = 2.799%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

K ₂ HPO ₄ (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0.04	2.04 ^a
0.06	3.67 ^b
0.08	2.93 ^c

2.5 *A. siamensis* ANCG1709

2.5.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0589	0.0294*
Within Groups	3	0.0043	0.0014
Total	5	0.0632	

C.V. = 3.818%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

K ₂ HPO ₄ (g/l)	O.D. 900 nm.
0.04	0.92 ^{ab}
0.06	0.91 ^{ab}
0.08	1.12 ^c

2.5.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0417	0.0209*
Within Groups	3	0.0024	0.0008
Total	5	0.0441	

C.V. = 0.563%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaNO ₃ (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0	4.98 ^{ac}
1.5	5.14 ^b
3	4.95 ^{ac}

3. ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

3.1 *Calothrix* sp. ANCG14

3.1.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0170	0.0085*
Within Groups	3	0.0013	0.0004
Total	5	0.0183	

C.V. = 6.390%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

MgSO ₄ (g/l)	O.D. 900 nm.
0.075	0.37 ^{ab}
0.113	0.34 ^{ab}
0.150	0.24 ^c

3.1.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.3412	0.1706**
Within Groups	3	0.0108	0.0036
Total	5	0.3520	

C.V. = 3.046%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

MgSO ₄ (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0.075	2.24 ^a
0.113	2.01 ^b
0.150	1.66 ^c

3.2 *Calothrix* sp. ANCG18

3.2.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0100	0.0050 ^{NS}
Within Groups	3	0.0037	0.0012
Total	5	0.0137	

C.V. = 8.726%

3.2.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.1385	0.0693*
Within Groups	3	0.0082	0.0027
Total	5	0.1467	

C.V. = 2.089%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

MgSO ₄ (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0.075	2.29 ^a
0.113	2.51 ^{bc}
0.150	2.66 ^{bc}

3.3 *Calothrix* sp. ANCG1542

3.3.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0175	0.0087 ^{NS}
Within Groups	3	0.0135	0.0045
Total	5	0.0310	

C.V. = 15.60%

3.3.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.3204	0.6602**
Within Groups	3	0.0162	0.0054
Total	5	1.3366	

C.V. = 3.499%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

MgSO ₄ (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0.075	1.66 ^{ab}
0.113	1.89 ^{ab}
0.150	2.75 ^c

3.4 *Nostoc* sp. ANCG1660

3.4.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	22.6602	11.3301 ^{NS}
Within Groups	3	32.1611	10.7204
Total	5	54.8213	

C.V. = 146.04%

3.4.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.6825	0.8413**
Within Groups	3	0.0096	0.0032
Total	5	1.6921	

C.V. = 1.424%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

MgSO ₄ (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0.075	4.72 ^a
0.113	3.65 ^{bc}
0.150	3.55 ^{bc}

3.5 *A. siamensis* ANCG1709

3.5.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0641	0.0321**
Within Groups	3	0.0004	0.0001
Total	5	0.0632	

C.V. = 1.028%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

MgSO ₄ (g/l)	O.D. 900 nm.
0.075	0.95 ^a
0.113	0.86 ^b
0.150	1.11 ^c

3.5.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.2789	0.1395 ^{NS}
Within Groups	3	5.0154	1.6718
Total	5	5.2943	

C.V. = 24.996%

4. ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

4.1 *Calothrix* sp. ANCG14

4.1.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.2257	0.1128*
Within Groups	3	0.0159	0.0053
Total	5	0.2416	

C.V. = 21.412%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaCl (g/l)	O.D. 900 nm.
0	0.38 ^{ab}
1	0.56 ^{ab}
10	0.09 ^c

4.1.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	3.6324	1.8162**
Within Groups	3	0.108	0.0036
Total	5	3.6432	

C.V. = 2.532%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaCl (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0	3.18 ^a
1	2.61 ^b
10	1.32 ^c

4.2 *Calothrix* sp. ANCG18

4.2.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0992	0.0496*
Within Groups	3	0.0101	0.0034
Total	5	0.1093	

C.V. = 13.466%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaCl (g/l)	O.D. 900 nm.
0	0.35 ^{ac}
1	0.62 ^b
10	0.34 ^{ac}

4.2.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	3.8745	1.9373*
Within Groups	3	0.0068	0.0023
Total	5	3.8813	

C.V. = 1.998%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaCl (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0	2.62 ^a
1	3.25 ^b
10	1.32 ^c

4.3 *Calothrix* sp. ANCG1542

4.3.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0608	0.0304*
Within Groups	3	0.0053	0.0018
Total	5	0.0661	

C.V. = 12.227%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaCl (g/l)	O.D. 900 nm.
0	0.41 ^{ac}
1	0.43 ^b
10	0.21 ^{ac}

4.3.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	2.0172	1.0086**
Within Groups	3	0.0050	0.0017
Total	5	2.0222	

C.V. = 11.950%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaCl (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0	2.45 ^{ab}
1	2.45 ^{ab}
10	1.22 ^c

4.4 *Nostoc* sp. ANCG1660

4.4.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0916	0.0458*
Within Groups	3	0.0082	0.0027
Total	5	0.0998	

C.V. = 7.994%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaCl (g/l)	O.D. 900 nm.
0	0.70 ^{ab}
1	0.77 ^{ab}
10	0.48 ^c

4.4.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	4.1301	2.0651**
Within Groups	3	0.0140	0.0047
Total	5	4.1441	

C.V. = 2.174%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaCl (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0	3.74 ^{ab}
1	3.74 ^{ab}
10	1.98 ^c

4.5 *A. siamensis* ANCG1709

4.5.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.6891	0.8445**
Within Groups	3	0.0015	0.0005
Total	5	1.6905	

C.V. = 2.923%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaCl (g/l)	O.D. 900 nm.
0	1.30 ^a
1	0.96 ^b
10	0.04 ^c

4.5.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	25.9009	12.9505**
Within Groups	3	0.0152	0.0051
Total	5	25.9161	

C.V. = 1.833%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

NaCl (g/l)	Carotenoid (mg/l)
0	5.54 ^{ab}
1	5.28 ^{ab}
10	0.96 ^c

5. ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

5.1 *Calothrix* sp. ANCG14

5.1.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0824	0.0412*
Within Groups	3	0.0079	0.0026
Total	5	0.0903	

C.V. = 9.768%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

pH	O.D. 900 nm.
7	0.40 ^{ac}
7.5	0.68 ^b
8	0.49 ^{ac}

5.1.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.5081	0.7541**
Within Groups	3	0.0328	0.0109
Total	5	1.5409	

C.V. = 2.753%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

pH	Carotenoid (mg/l)
7	3.49 ^{ac}
7.5	4.50 ^b
8	3.39 ^{ac}

5.2 *Calothrix* sp. ANCG18

5.2.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0114	0.0057 ^{NS}
Within Groups	3	0.0115	0.0038
Total	5	0.0229	

C.V. = 10.056%

5.2.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0201	0.0101 ^{NS}
Within Groups	3	0.0192	0.0064
Total	5	0.0393	

C.V. = 3.073%

5.3 *Calothrix* sp. ANCG1542

5.3.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0129	0.0064 ^{NS}
Within Groups	3	0.0201	0.0067
Total	5	0.0330	

C.V. = 21.540%

5.3.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.7492	0.3746*
Within Groups	3	0.0372	0.0124
Total	5	0.7864	

C.V. = 5.228%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

pH	Carotenoid (mg/l)
7	2.29 ^{ab}
7.5	2.46 ^{ab}
8	1.64 ^c

5.4 *Nostoc* sp. ANCG1660

5.4.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0277	0.0139*
Within Groups	3	0.0023	0.0008
Total	5	0.0300	

C.V. = 2.931%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

pH	O.D. 900 nm.
7	0.87 ^{ab}
7.5	1.03 ^{ab}
8	1.00 ^c

5.4.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.4421	0.2211**
Within Groups	3	0.0138	0.0046
Total	5	0.4559	

C.V. = 1.156%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

pH	Carotenoid (mg/l)
7	5.56 ^a
7.5	6.22 ^b
8	5.82 ^c

5.5 *A. siamensis* ANCG1709

5.5.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0009	0.0005 ^{NS}
Within Groups	3	0.0010	0.0003
Total	5	0.0019	

C.V. = 2.007%

5.5.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.3621	0.1811*
Within Groups	3	0.0388	0.0129
Total	5	0.4009	

C.V. = 2.026%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

pH	Carotenoid (mg/l)
7	5.32 ^{ab}
7.5	5.92 ^{ab}
8	5.58 ^c

6. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

6.1 *Calothrix* sp. ANCG14

6.1.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0070	0.0035 ^{NS}
Within Groups	3	0.0063	0.0021
Total	5	0.0133	

C.V. = 16.25%

6.1.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.9467	0.9738**
Within Groups	3	0.0298	0.0099
Total	5	1.9774	

C.V. = 5.349%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Temp. (°C)	Carotenoid (mg/l)
30	1.98 ^a
35	2.49 ^b
40	1.11 ^c

6.2 *Calothrix* sp. ANCG18

6.2.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0093	0.0047 ^{NS}
Within Groups	3	0.0597	0.0199
Total	5	0.0690	

C.V. = 34.831%

6.2.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.6089	0.3045**
Within Groups	3	0.0050	0.0017
Total	5	0.6139	

C.V. = 1.894%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Temp. (°C)	Carotenoid (mg/l)
30	2.56 ^a
35	2.19 ^b
40	1.78 ^c

6.3 *Calothrix* sp. ANCG1542

6.3.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0296	0.0148*
Within Groups	3	0.0042	0.0014
Total	5	0.0339	

C.V. = 11.070%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Temp. (°C)	O.D. 900 nm.
30	0.38 ^{ab}
35	0.40 ^{ab}
40	0.24 ^c

6.3.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.6036	0.8018**
Within Groups	3	0.0460	0.0153
Total	5	1.6496	

C.V. = 5.622%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Temp. (°C)	Carotenoid (mg/l)
30	2.92 ^a
35	1.73 ^{bc}
40	1.95 ^{bc}

6.4 *Nostoc* sp. ANCG1660

6.4.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.1911	0.0956**
Within Groups	3	0.0047	0.0016
Total	5	0.1958	

C.V. = 6.897%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Temp. (°C)	O.D. 900 nm.
30	0.65 ^{ab}
35	0.76 ^{ab}
40	0.34 ^c

6.4.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	8.2917	4.1459**
Within Groups	3	0.0160	0.0053
Total	5	8.3077	

C.V. = 2.504%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Temp. (°C)	Carotenoid (mg/l)
30	4.08 ^a
35	3.34 ^b
40	1.30 ^c

6.5 *A. siamensis* ANCG1709

6.5.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0363	0.0181*
Within Groups	3	0.0033	0.0011
Total	5	0.0396	

C.V. = 4.606%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Temp. (°C)	O.D. 900 nm.
30	0.83 ^a
35	0.67 ^{bc}
40	0.67 ^{bc}

6.5.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.8689	0.4345**
Within Groups	3	0.0220	0.0073
Total	5	0.8909	

C.V. = 2.511%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Temp. (°C)	Carotenoid (mg/l)
30	3.82 ^{ab}
35	2.90 ^{ab}
40	3.49 ^c

7. ผลของชนิดของแสงต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

7.1 *Calothrix* sp. ANCG14

7.1.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0589	0.0294**
Within Groups	3	0.0014	0.0005
Total	5	0.0603	

C.V. = 10.400%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Light	O.D. 900 nm.
White	0.35 ^a
Green	0.12 ^{bc}
Red	0.18 ^{bc}

7.1.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.4572	0.2286**
Within Groups	3	0.0028	0.0009
Total	5	0.4600	

C.V. = 2.314%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Light	Carotenoid (mg/l)
White	4.49 ^a
Green	3.92 ^{bc}
Red	3.89 ^{bc}

7.2 *Calothrix* sp. ANCG18

7.2.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0965	0.0483*
Within Groups	3	0.0065	0.0022
Total	5	0.1031	

C.V. = 11.668%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Light	O.D. 900 nm.
White	0.58 ^{ab}
Green	0.28 ^{ab}
Red	0.36 ^c

7.2.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	2.2070	1.1035**
Within Groups	3	0.0037	0.0012
Total	5	2.2107	

C.V. = 0.837%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Light	Carotenoid (mg/l)
White	4.64 ^a
Green	3.29 ^b
Red	4.49 ^c

7.3 *Calothrix* sp. ANCG1542

7.3.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.2341	0.1171**
Within Groups	3	0.0011	0.0004
Total	5	0.2352	

C.V. = 6.452%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Light	O.D. 900 nm.
White	0.59 ^a
Green	0.13 ^b
Red	0.22 ^c

7.3.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.3844	0.1922**
Within Groups	3	0.0062	0.0021
Total	5	0.3907	

C.V. = 1.447%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Light	Carotenoid (mg/l)
White	3.48 ^{ab}
Green	3.17 ^{ab}
Red	2.86 ^c

7.4 *Nostoc* sp. ANCG1660

7.4.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.1126	0.0563 ^{NS}
Within Groups	3	0.0521	0.0174
Total	5	0.1647	

C.V. = 26.756%

7.4.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	2.3877	1.1939**
Within Groups	3	0.0050	0.0017
Total	5	2.3927	

C.V. = 1.254%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Light	Carotenoid (mg/l)
White	4.02 ^a
Green	2.48 ^b
Red	3.36 ^c

7.5 *A. siamensis* ANCG1709

7.5.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.1842	0.0921**
Within Groups	3	0.0051	0.0017
Total	5	0.1893	

C.V. = 6.219%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Light	O.D. 900 nm.
White	0.91 ^{ab}
Green	0.50 ^{ab}
Red	0.59 ^c

7.5.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.1841	0.0921 ^{NS}
Within Groups	3	0.1988	0.0663
Total	5	0.3829	

C.V. = 5.345%

8. ผลของความเข้มแสงต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย

8.2 *Calothrix* sp. ANCG14

8.2.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0156	0.0078 ^{NS}
Within Groups	3	0.0237	0.0079
Total	5	0.0393	

C.V. = 18.402%

7.2.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.9321	0.9661 ^{**}
Within Groups	3	0.0468	0.0156
Total	5	1.9789	

C.V. = 5.495%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Intensity (lux)	Carotenoid (mg/l)
2000	3.05 ^a
3000	2.06 ^{bc}
4000	1.71 ^{bc}

7.3 *Calothrix* sp. ANCG18

8.2.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0697	0.0349 ^{NS}
Within Groups	3	0.0580	0.0193
Total	5	0.1277	

C.V. = 13.890%

8.2.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	1.7889	0.8945**
Within Groups	3	0.0130	0.0043
Total	5	1.8019	

C.V. = 5.500%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Intensity (lux)	Carotenoid (mg/l)
2000	1.77 ^{ab}
3000	1.61 ^{ab}
4000	2.84 ^c

8.3 *Calothrix* sp. ANCG1542

8.3.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.1249	0.0625*
Within Groups	3	0.0225	0.0075
Total	5	0.1475	

C.V. = 15.140%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Intensity (lux)	O.D. 900 nm.
2000	0.46 ^{ab}
3000	0.49 ^{ab}
4000	0.78 ^c

8.3.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	2.2561	1.1281*
Within Groups	3	0.1500	0.0500
Total	5	2.4061	

C.V. = 7.995%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Intensity (lux)	Carotenoid (mg/l)
2000	2.55 ^{ab}
3000	2.20 ^{ab}
4000	3.64 ^c

8.4 *Nostoc* sp. ANCG1660

8.4.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0308	0.0154 ^{NS}
Within Groups	3	0.0403	0.0134
Total	5	0.0711	

C.V. = 14.344%

8.4.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0097	0.0049 ^{NS}
Within Groups	3	0.0898	0.0299
Total	5	0.0995	

C.V. = 0.672%

8.5 *A. siamensis* ANCG1709

8.5.1 ผลต่อการเจริญ

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	0.0169	0.0085 ^{NS}
Within Groups	3	0.0065	0.0022
Total	5	0.0234	

C.V. = 4.667%

8.5.2 ผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares
Between Groups	2	2.4657	1.2329**
Within Groups	3	0.0666	0.0222
Total	5	2.5323	

C.V. = 2.732%

Multiple Range Test : LSD test with significance level 0.05

Intensity (lux)	Carotenoid (mg/l)
2000	5.47 ^{ab}
3000	4.66 ^{ab}
4000	6.23 ^c

ประวัติผู้เขียน

นางสาวกนกอร จารุจารีต เกิดเมื่อวันที่ 14 กรกฎาคม 2518 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยบูรพา ปีการศึกษา 2539

ปี พ.ศ. 2543 เสนอผลงานเรื่อง สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย ในการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 38 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543

ปัจจุบันเป็นลูกจ้างโครงการ ตำแหน่งผู้ช่วยนักวิชาการ ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย