T_646002

การศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย "สาหร่ายเห็ดลาบ" (*Nostoc commune*, Cyanophyta)

STUDIES ON SUGAR COMPOSITIONS OF POLYSACCHARIDE OF "HED LAB ALGA" (*Nostoc commune*, CYANOPHYTA)

นารินทร์ จันทร์สว่าง

NARIN CHANSAWANG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974-9700-72-4

3 1 W.A. 2547

โคร การพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/c ศูนย์วิจัยเกษตรกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

T_646002 PK39

การศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย "สาหร่ายเห็ดลาบ" (*Nostoc commune*, Cyanophyta)

STUDIES ON SUGAR COMPOSITIONS OF POLYSACCHARIDE OF "HED LAB ALGA" (*Nostoc commune*, CYANOPHYTA)

นารินทร์ จันทร์สว่าง

NARIN CHANSAWANG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974-9700-72-4

STUDIES ON SUGAR COMPOSITIONS OF POLYSACCHARIDE OF "HED LAB ALGA" (*Nostoc commune*, CYANOPHYTA)

NARIN CHANSAWANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2004

ISBN 974-9700-72-4

COPYRIGHT 2004

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย "สาหร่ายเห็ดลาบ" (*Nostoc commune,* Cyanophyta)

STUDIES ON SUGAR COMPOSITIONS OF POLYSACCHARIDE OF "HED LAB ALGA" (*Nostoc commune,* CYANOPHYTA)

ชื่อนักศึกษา นางสาวนารินทร์ จันทร์สว่าง

รหัสประจำตัว 44065205

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.สุขใจ ชูจันทร์

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.อาภารัตน์ มหาขันธ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.พรรณี	จิตาภิชิต	
รศ.สุขใจ	ชูจันทร์	
รศ.มาลินี	ตันติยาภรณ์	
รศ.อรุณี	คงศักดิ์ไพศาล	
ดร.อาภารัตน์	มหาขันธ์	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 28 เมษายน 2547 เวลา 9.00-11.00 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4 ห้อง 424

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ดร.จารุวัตร เจริญสุข)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ๑๐ **เดือน** พฤษภาคม **พ.ศ.** ๒๕๔๗

T_ 646002

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย "สาหร่ายเห็ดลาบ" (*Nostoc commune*, Cyanophyta)
นักศึกษา	นางสาวนารินทร์ จันทร์สว่าง
รหัสประจำตัว	44065205
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2547
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. สุขใจ ชูจันทร์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. อาภารัตน์ มหาขันธ์

บทคัดย่อ

นำสาหร่ายเห็ดลาบ (*Nostoc commune* Vaucher, Cyanobacteria) จาก 3 แหล่ง คือ (1) ที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง (2) จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นได้สาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตลักษณะเป็นก้อนวุ้นคล้ายเยลลี (3) จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้สาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตในลักษณะของกลุ่มเซลล์เป็นรูปทรงกลมห่อหุ้มของเหลวหนืดอยู่ภายในกลุ่มเซลล์ มาสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำร้อน เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ และ EDTA 0.1 โมลาร์ พบว่าการใช้น้ำร้อนสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและ EDTA ตามลำดับ พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุดเท่ากับ 53.03 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งสาหร่าย เนื่องจากสาหร่ายเห็ดลาบมีคุณสมบัติปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์ จึงศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นสูตร BGA พบว่าให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 79.48 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารที่ปล่อยออกนอกเซลล์ ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA และ BG-11 ในถังคาร์บอย ขนาด 8 ลิตร อายุ 20 วัน ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ เท่ากับ 52.11 และ 42.53 มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากทั้ง 3 กลุ่ม สกัดด้วยน้ำร้อน เอทานอล และ EDTA มาวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาล 11 ชนิด ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี เครื่องตรวจวัดเป็น mass selective detector พบว่าทุกตัวอย่างสาหร่ายให้องค์ประกอบน้ำตาลทุกชนิด ได้แก่ ฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค อะราบิโนส และแรมโนส ในปริมาณที่แตกต่างกัน

Thesis Title	Studies on Sugars Compositions of Polysaccharide of "Hed Lab Alga" (*Nostoc commune*, Cyanophyta)
Student	Miss Narin Chansawang
Student ID.	44065205
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2004
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Sukjai Choojun
Thesis Co-advisor	Dr. Aparat Mahakhant

ABSTRACT

Three different characteristics of "Hed Lab Alga" (*Nostoc commune* Vaucher, Cyanobacteria) were collected from 3 sources; (1) thin jelly-like sheets, from a natural habitat; (2) jelly-like spheroid colonies, from solid media cultivation; and (3) spheroid colonies containing viscous fluid, from liquid media cultivation. All samples were extracted for polysaccharides using 3 solvents, hot water, 80% ethanol, and 0.1 M EDTA. Hot water extraction yielded the highest amount of polysaccharide, followed by ethanol and EDTA extractions. The highest amount of polysaccharide of 53.03 $mg.g^{-1}$ dry alga was obtained from the cells cultured on the BGA agar medium. The polysaccharide amount of 79.48 mg. of dry (substances) released was extracted. The polysaccharides released by the cells cultured on the liquid BGA, and BG-11, in 8 litre carboy tanks, yielded water soluble polysaccharides of 52.11 and 42.53 $mg.l^{-1}.day^{-1}$ at days 20. The 3 groups were extracted for polysaccharides using hot water, ethanol, and EDTA, and were analysed using Gas Chromatography-Mass Selective Detector for 11 monosaccharides : fucose, xylose, ribose, mannose, fructose, galactose, glucose, galacturonic acid, glucuronic acid, arabinose, and rhamnose. All of the monosaccharides were found in the 3 groups. However the amount of each monosaccharide found in each group was different.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดี เพราะได้รับความกรุณาจาก ดร.อาภารัตน์ มหาขันธ์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ และ รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบและให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_646002 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ

ขอขอบพระคุณ ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่อนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือการวิจัยในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน และน้อง จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัย

และที่สำคัญขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุก ๆ คนในครอบครัวที่ได้ให้ความรัก ความเข้าใจ กำลังใจ ปัจจัย และความเสียสละแก่ผู้วิจัยตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นารินทร์ จันทร์สว่าง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VI

สารบัญรูป..... VII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว.....4

2.2 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว.....4

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว.....11

2.4 ลักษณะของสาหร่ายเห็ดลาบ (*Nostoc commune*).....18

2.5 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว.....20

2.5.1 บทบาทของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว.....20

2.5.2 องค์ประกอบของน้ำตาลจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว.....23

2.5.3 ปัจจัยในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์.....30

2.5.4 คุณสมบัติและความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว.....36

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....42

3.1 แหล่งสาหร่ายเห็ดลาบ.....42

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....42

3.3 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารและเคมีภัณฑ์.....43

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4 วิธีการวิจัย.....46

3.4.1 การเตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาล.....46

3.4.2 การตรวจสอบเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากสาหร่าย.....47

3.4.3 การศึกษาเบื้องต้นอัตราการเจริญของสาหร่ายเห็ดลาบ.....47

3.4.4 การศึกษาเบื้องต้นสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ออกจากเซลล์ กลุ่มเซลล์ ส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ อาหารเพาะเลี้ยงเหลว และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์.....47

3.4.5 การเตรียมสารมาตรฐาน.....48

3.4.6 การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาล.....49

3.4.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลด้วยแก๊สโครมาโทรกราฟี.....50

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....53

4.1 ตัวอย่างสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์.....53

4.2 การทดสอบเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากสาหร่าย.....53

4.3 การศึกษาเบื้องต้นอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....55

4.4 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้.....56

4.5 การวิเคราะห์น้ำตาลในสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทรกราฟี...60

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....71

บรรณานุกรม.....74

ภาคผนวก ก.....85

ภาคผนวก ข.....87

ภาคผนวก ค.....91

ประวัติผู้เขียน.....96

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้ว ละลายน้ำได้ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวลำดับ Chroococcales 24

2.2 องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้ว ละลายน้ำได้ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวลำดับ Oscillatoriales.....26

2.3 องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้ว ละลายน้ำได้ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวลำดับ Nostocales และ Sticgonematales.....28

2.4 สายพันธุ์สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในแต่ละวัน.....32

2.5 มวลโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว.....36

2.6 กลุ่มแทนที่และปริมาณโปรตีนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว.....38

2.7 สิทธิบัตรของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้.....41

4.1 พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากแหล่งสาหร่ายต่าง ๆ.....56

4.2 เปรียบเทียบผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ที่ศึกษาในครั้งนี้ กับรายงานผลการศึกษาที่ผ่านมา.....59

4.3 อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่มีมากที่สุดจากตัวอย่างสาหร่าย ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ..... 64

4.4 อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์..... 65

4.5 เปรียบเทียบองค์ประกอบของน้ำตาลจาก *N. commune* ที่ศึกษาในครั้งนี้ กับรายงานผลการศึกษาที่ผ่านมา..... 69

ตารางภาคผนวก ค.....91

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 สาหร่ายเห็ดลาบ (*Nostoc commune*) ใต้กล้องจุลทรรศน์ (x 400).....18
2.2 ลักษณะแผ่นวุ้นบางของสาหร่ายเห็ดลาบ (*Nostoc commune*) ที่เก็บจากป่าดูนลำพัน.....18
2.3 สูตรโครงสร้างโมเลกุลน้ำตาลชนิดต่าง ๆ.....22
3.1 ไดอะแกรมแสดงการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค ที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์.....51
3.2 ไดอะแกรมแสดงการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลอะราบิโนส และแรมโนส ที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์.....52
4.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเห็ดลาบในอาหารเหลวในถังคาร์บอย (ก.) และลักษณะกลุ่มเซลล์ทรงกลมมีของเหลวหนืดอยู่ภายในกลุ่มเซลล์ (ข.).....54
4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายเห็ดลาบบนอาหารวุ้นสูตร BGA ที่ไม่มีแบคทีเรีย (ก.) สูตร BGA+N (BGA ดัดแปลงโดยเติม $NaNO_3$) ที่มีแบคทีเรีย (ข.) สูตร BG-11 ที่มีแบคทีเรีย (ค.) และสูตรBG-11-N (BG-11 ดัดแปลงโดยไม่เติม $NaNO_3$) ที่ไม่มีแบคทีเรีย (ง.).....54
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของสาหร่ายเห็ดลาบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรต่าง ๆ กับจำนวนวันที่เพาะเลี้ยง.....55
ภาพภาคผนวก ข.....88
ภาพภาคผนวก ค.....91

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

นอสตอค (*Nostoc*) *Nostoc commune* ในประเทศไทยเรียกว่า "ไข่หิน" "ดอกหิน" หรือ "เห็ดลาบ" ประเทศจีนเรียกว่า "Koxianmi" และในประเทศญี่ปุ่นเรียกว่า "Ishikurage" ส่วน *N. flagelliforme* ในประเทศจีนเรียกว่า "Fat tsai", "Facai" หรือ "Shi" และในแถบยุโรปเรียก *Nostoc* spp. ว่า "Star shot", "Star jelly", "Witches' butter" หรือ "Fairies' butter" นอสตอคเป็นสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่มีการเจริญเติบโตแบบเป็นเส้นสายมีเมือกห่อหุ้ม บางชนิดดูคล้ายก้อนเยลลี ชนิดที่นิยมรับประทานมาก คือ *N. commume* มีการบริโภคในหลายประเทศทั่วโลก เช่น โบลิเวีย เอควาดอร์ ฟิจิ อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น เมกซิโก มองโกเลียและจีน

สาหร่ายเห็ดลาบ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Nostoc commune* Vaucher เป็นสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (blue-geen alga, Cyanobacterium) ที่ตรึงไนโตรเจน (N_2-fixation)ได้ มีลักษณะเป็นแผ่นวุ้นแบนบางคล้ายเห็ดหูหนูสีเขียวที่ขึ้นบนดิน ชาวบ้านในพื้นที่ อ.นาเชือก จ.มหาสารคาม นิยมเก็บไปทำลาบ จึงได้ชื่อประจำท้องถิ่นว่า "เห็ดลาบ" โดยมีความเชื่อตามภูมิปัญญาท้องถิ่นว่าการบริโภคเห็ดลาบจะช่วยรักษาระบบกระเพาะอาหารและลำไส้ ถึงแม้นว่าสาหร่ายเห็ดลาบ จะเจริญเติบโตบนดินเค็มในพื้นที่คุ้มครองทรัพยากรธรรมชาติป่าดูนลำพัน แต่เนื่องจากในฤดูฝน เมื่อเกิดฝนตกจะทำให้สาหร่ายที่ในหน้าร้อน หดตัวเป็นแผ่นบางกรอบ คล้ายกระดาษ (ซึ่งเป็นระยะพักตัว, resting stage) ดูดซับน้ำฝน ขยายตัวและเจริญเติบโตโดยการแบ่งเซลล์แผ่ออกเป็นแผ่นวุ้นบาง ไม่มีรสชาติ มีเนื้อนิ่มหยุ่นแต่กรอบ คล้ายสาหร่ายทะเล *Undaria pinnatifida* หรือ Wakame ที่นิยมบริโภคในญี่ปุ่น อย่างไรก็ตามสาหร่ายเห็ดลาบมีคุณสมบัติที่ดีกว่าคือไม่มีกลิ่นคาว ทำให้ชาวบ้านนิยมเก็บไปบริโภคเป็นประจำทุกปี ในฤดูฝนซึ่งเป็นเพียงฤดูกาลเดียวเท่านั้นที่สาหร่ายชนิดนี้จะแพร่และขยายพันธุ์ได้ จนเป็นที่น่าเกรงว่าความนิยมบริโภคสาหร่ายเห็ดลาบของชาวบ้านในท้องถิ่นจะเป็นสาเหตุให้สาหร่ายเห็ดลาบสูญหายไปจากพื้นที่ในที่สุด

ในการใช้ประโยชน์จาก *Nostoc* พบว่า *Nostoc* บางชนิดรับประทานได้ บางชนิดใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง โรคเก๊าต์ ลดโคเลสเตอรอลในซีรั่มได้อย่างมีนัยสำคัญในหนูทดลอง ซึ่งคาดว่าความสามารถในการลดโคเลสเตอรอลนี้น่าจะมาจากใยอาหารของ *Nostoc* (Hori และคณะ, 1994) นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการบำบัดโรคตาบอดในเวลากลางคืน แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวกหรืออาการเจ็บป่วยที่ไม่รุนแรงต่าง ๆ มีการวิจัยพบว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนของ *N. flagelliforme* มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก (antitumer) ซึ่งคุณสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้เป็นผลมาจากองค์ประกอบของสารพอลิแซ็กคาไรด์ ยังมีรายงานการวิจัยของ *N. commune* พบว่าองค์ประกอบหลัก

ของสารพอลิแซ็กคาไรด์จากแหล่งธรรมชาติจะมีกลูโคส ไซโรส และกาแลคโตส ในสัดส่วน 2:1:1 โดยประมาณ (Huang และคณะ, 1998)

พอลิแซ็กคาไรด์มีโมเลกุลขนาดใหญ่ สามารถใช้เป็นตัวจับในการดึงเอาโลหะหนักออกจากน้ำหรือชะโลหะหนักที่มีคุณค่าออกจากของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังให้ค่าความหนืดสูงและมีลักษณะเป็น pseudoplastic ใช้ประยุกต์ทางการเกิดสารแขวนลอย การเกิดอิมัลชันหรือสารให้ความข้นเหนียว (thickening agent) (De philippis และคณะ, 2000)

รายงานดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นถึงคุณประโยชน์ของ *Nostoc* จากคุณสมบัติที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ อย่างไรก็ตามรายงานการวิจัยเหล่านี้เป็นของต่างประเทศทั้งสิ้น โดยยังไม่มีรายงานการศึกษา *N. commune* ในประเทศไทยเลย ดังนั้นการศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Nostoc* ในห้องปฏิบัติการจึงเป็นแนวทางในการพัฒนาองค์ความรู้เพื่อเพิ่มศักยภาพในการนำไปใช้ทางการแพทย์ เภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหารและอื่น ๆ ได้อย่างยั่งยืน ในขณะเดียวกันข้อมูลที่ได้ยังสามารถใช้เปรียบเทียบกับรายงานการวิจัยของต่างประเทศ เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งยังเป็นการส่งเสริมให้ตระหนักถึงคุณค่าอาหารประจำท้องถิ่นและเกิดการอนุรักษ์สาหร่ายเห็ดลาบให้คงอยู่คู่ท้องถิ่น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายเห็ดลาบ
2. เปรียบเทียบองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยสาหร่ายเห็ดลาบจากแหล่งธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาเปรียบเทียบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ และที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BGA และ BG-11
2. เปรียบเทียบตัวทำละลายต่างชนิดกัน ในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติและจากที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BGA และ BG-11
3. วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลจากสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติและที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BGA และ BG-11 โดยเทคนิค Gas Chromatography

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์ในสาหร่ายเห็ดลาบที่ได้จากแหล่งธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาต่างกันโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

2. เป็นองค์ความรู้ที่จะนำไปสู่การพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ เภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหารและอื่น ๆ ได้

3 ตระหนักถึงคุณค่าของทรัพยากรชีวภาพและภูมิปัญญาประจำท้องถิ่น และเกิดการอนุรักษ์สาหร่ายเห็ดลาบให้คงอยู่คู่ท้องถิ่น

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวจัดอยู่ในดิวิชัน Cyanophyta หรืออาจมีชื่อเรียกอย่างอื่นว่าดิวิชัน Myxophyta (Morris, 1968), Schizophyta (Smith, 1951) หรือ Cyanochloronta (Bold และMichael, 1978)

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่มีขนาดเล็ก พบได้ในสภาพแวดล้อมทั่วไป เช่น ตามชั้นของดิน หิน ไม้ น้ำ ทะเล รวมทั้งมหาสมุทร และชายฝั่งทะเล มีความแตกต่างจากสาหร่ายอื่น ๆ ตรงที่มีลักษณะหลายอย่างคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย แต่มีความแตกต่างจากแบคทีเรียซึ่งจัดอยู่ในอาณาจักรเดียวกันตรงที่สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวมีคลอโรฟิลล์ เอ จึงสามารถสังเคราะห์แสงและมีออกซิเจนเกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสง

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำจำพวกโปรคาริโอต (prokaryote) จึงมีลักษณะและคุณสมบัติหลายประการที่แตกต่างไปจากสาหร่ายพวกอื่น ๆ เช่น ไม่มีนิวเคลียสที่แท้จริง ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ไม่มีไมโตคอนเดรีย (mitochondria) เซลล์ไม่มีโครงสร้างที่ใช้ในการเคลื่อนที่ ไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ในบางสกุลมีโครงสร้างพิเศษที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เป็นต้น คุณสมบัติอีกอย่างหนึ่งที่ทำให้สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวต่างจากสาหร่ายอื่นที่เป็นพวกยูคาริโอต (eukaryote) คือ สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวมีโครงสร้างของเซลล์ไม่สลับซับซ้อน แต่กลับมีกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ เกิดขึ้นมากมายภายในเซลล์ ขณะที่สาหร่ายที่เป็นพวกยูคาริโอตมีโครงสร้างซับซ้อนกว่ากลับมีกระบวนการเมแทบอลิซึมเกิดขึ้นไม่มากมายภายในเซลล์ (Kumar, 1990)

2.2 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว

2.2.1 รงควัตถุ (pigment) ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวประกอบด้วย

คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) เป็นแหล่งสำคัญในการดูดซับพลังงานแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร (สีแดง) และ 662 นาโนเมตร (สีน้ำเงิน)

แคโรทีนอยด์ (carotenoid) สามารถดูดซับพลังงานแสงในช่วงคลื่นที่คลอโรฟิลล์ เอ ไม่สามารถดูดซับได้ แล้วจะถ่ายทอดพลังงานแสงที่รับไว้ให้แก่คลอโรฟิลล์ เอ (Harold, 1980) แคโรทีนอยด์ประกอบด้วย 2 กลุ่ม คือ แคโรทีน (carotene) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปราศจากออกซิเจน แคโรทีนที่พบมากที่สุดในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว ได้แก่ เบต้าแคโรทีน

(β-carotene) กลุ่มที่สอง คือ แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ได้มาจากปฏิกริยาออกซิเดชันของแคโรทีน มีสีเหลือง ส้ม หรือแดง แซนโทฟิลล์ที่พบมากที่สุด ได้แก่ มิกโซแซนทิน (myxoxanthin)

ไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliprotein) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนประกอบด้วยรงควัตถุอยู่ร่วมกับโปรตีน ในเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว ประกอบด้วย ซี-ไฟโคโซยานิน (c-phycocyanin) ซี-อัลโลไฟโคไซยานิน (c-allophycocyanin) และ ซี-ไฟโคอิริทริน (c-phycoerythrin)

รงควัตถุของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเหล่านี้ไม่พบอยู่ในพลาสติด (plastid) แต่พบอยู่ในไทลาคอยด์ (thylakoid) ไทลาคอยด์ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวต่างไปจากไทลาคอยด์ของสาหร่ายอื่น ๆ ตรงที่ไม่มีเยื่อบาง ๆ หุ้มเพื่อให้เกิดเป็นคลอโรพลาสต์ และไม่มีการจัดเรียงตัวเป็นชั้น ๆ พบเป็นอิสระในไซโตพลาสซึม คลอโรฟิลล์ เอ จะอยู่ในไทลาคอยด์ ส่วนรงควัตถุอื่น ๆ จะเกาะอยู่บนผิวของไทลาคอยด์ในลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ เรียกว่า ไฟโคบิลิโซม (phycobilisome) (Glazer, 1987)

คุณภาพของแสงมีผลต่อการสร้างรงควัตถุของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว ในระหว่างการเจริญเติบโต (Bogorad, 1975) เช่น ใน *Oscillatoria* บางชนิดจะสร้างรงควัตถุสีเขียวเมื่อเจริญอยู่ในสภาพแสงสีแดงหรือรงควัตถุสีเขียวแกมน้ำเงินเมื่อเจริญอยู่ในสภาพแสงสีเหลือง เป็นต้น การเปลี่ยนสีของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเหล่านี้มีประโยชน์ ทำให้สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวสามารถดูดซับพลังงานแสงสำหรับใช้ในการสังเคราะห์แสงได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวสามารถเปลี่ยนโพลีเปบไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของไฟโคบิลิโซมโดยได้รับอิทธิพลจากคุณภาพของแสงที่ได้รับ จึงสามารถจำแนกสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ขึ้นอยู่กับการตอบสนองของไฟโคบิลิโซมต่อแสงที่ได้รับคือ กลุ่มที่หนึ่ง การสังเคราะห์ไฟโคอิริทริน และไฟโคไซยานินจะคงที่ไม่ขึ้นอยู่กับสีของแสงที่ได้รับ กลุ่มที่สอง ไฟโคอิริทรินถูกควบคุมโดยคุณภาพของแสงหรือสีของแสง โดยในแสงสีเขียวจะสังเคราะห์ไฟโคอิริทรินได้สูงกว่าในแสงสีแดง แต่ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ไฟโคไซยานิน นั่นคือระดับไฟโคไซยานินไม่มีการเปลี่ยนแปลง และกลุ่มที่สาม คุณภาพของแสงมีผลต่อทั้งการสังเคราะห์ไฟโคไซยานินและไฟโคอิริทริน คือ ระดับของไฟโคไซยานินจะสูงขึ้น และไฟโคอิริทรินจะลดต่ำลงเมื่อได้รับแสงสีแดง แต่จะเปลี่ยนไปในทางตรงกันข้ามเมื่อได้รับแสงสีเขียว

2.2.2 ส่วนประกอบของเซลล์

2.2.2.1 ผนังเซลล์ (cell wall)

Desikachary (1959) พบว่า สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวมีผนังเซลล์ 2 ชั้น ผนังชั้นในบางเรียกว่าอินเวสเมนท์ (investment) ประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลสและผนังชั้นนอกหนาประกอบด้วยเจลาติน หรือเรียกว่าชีท (sheath)

Kumar (1990) พบว่าสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวมีผนังเซลล์ 2 ชั้น ผนังชั้นในประกอบด้วยมิวโคเปบไทด์ (mucopeptide) และกรดมิวรามิค (muramic acid) ผนังชั้นในมีลักษณะผสมผสานเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenous) ในขณะที่ชั้นนอกมีลักษณะเป็นโครงสร้างละเอียด (fine structure) ถัดจากผนังเซลล์ออกไปมีลักษณะเป็นเจลาตินหรือที่เรียกกันว่า ชีท มีลักษณะเป็นไมโครไฟบริล (microfibril) 3 ชั้น สำหรับองค์ประกอบทางเคมีของไมโครไฟบริลเหล่านี้ ยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน แต่ต่อมาได้มีการศึกษาพบว่าไมโครไฟบริลเหล่านี้ไม่มีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบ

ชีทที่หุ้มเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเหล่านี้ บางชนิดหนาจึงทำให้เห็นได้อย่างเด่นชัด ได้แก่ *Synechococcus*, *Oscillatoria*, *Arthrospira* และ *Spirulina* บางชนิดพบสารประกอบพวกเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นองค์ประกอบภายในชีทด้วย ได้แก่ สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวในวงศ์ Scytonemataceae, Rivulariaceae และ Oscillatoriaceae ชีทอาจใสไม่มีสีทำให้มองเห็นไม่ชัดเจน หรืออาจมีสีน้ำตาล น้ำเงิน แดง และเหลือง ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวอาศัยอยู่ สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวจะสร้างรงควัตถุขึ้นมาภายในชีทภายใต้ความเข้มแสงสูง และจะไม่มีรงควัตถุภายใต้ความเข้มแสงต่ำ (Fogg และคณะ, 1974)

Smith (1951) พบว่าสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวบางสกุลที่ได้รับแสงอาทิตย์โดยตรงเป็นเวลานานๆ หรือได้รับคลื่นความถี่สูง รงควัตถุที่อยู่ภายในเซลล์จะเคลื่อนย้ายเข้ามาอยู่ภายในชีท และการที่ชีทปรากฏมีสีเหลืองน้ำตาล โดยทั่ว ๆ ไปแล้วเป็นผลมาจากหลาย ๆ กรณี และสาเหตุหนึ่งมาจากเชื้อราเข้ามาเป็นปรสิต

การที่สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวมีชีทหุ้มอยู่ภายนอกผนังเซลล์เช่นนี้ ทำให้สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวสามารถเจริญอยู่ในสภาพที่แห้งแล้งได้ เพราะชีทสามารถดูดซึมน้ำและอุ้มน้ำได้ดี (กาญจนภาชน์, 2527)

2.2.2.2 ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ไซโตพลาสซึมอยู่ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปข้างในเป็นเยื่อบาง ๆ เรียก พลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) หุ้มไซโตพลาสซึมไว้ ไซโตพลาสซึมแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ บริเวณรอบนอกเป็นบริเวณที่มีรงควัตถุสะสมอยู่ เรียกว่าโครโมพลาซึม (chromoplasm) ส่วนบริเวณส่วนในซึ่งไม่มีรงควัตถุจึงเป็นส่วนที่ไม่มีสีจะเรียกว่าเซนโตรพลาสซึม (centroplasm) ส่วนนี้ไม่มีผนังหุ้มจึงไม่ใช่นิวเคลียสที่แท้จริง แต่มีสารที่ทำหน้าที่คล้ายนิวเคลียสอยู่ภายใน

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวไม่มีนิวเคลียสชัดเจนเหมือนสาหร่ายอื่น แต่มีสารที่ทำหน้าที่คล้ายนิวเคลียสอยู่ภายในเซนโตรพลาสซึม เพียงแต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) สารที่ทำหน้าที่คล้ายนิวเคลียสนี้ คือ ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) ซึ่งอาจจะ

รวมตัวกันเป็นร่างแหหลวม ๆ หรือเป็นท่อนสั้น ๆ หรืออาจจะจับตัวกันแน่นมากมีรูปร่างต่าง ๆ ก็ได้

2.2.2.3 แวคิวโอล (vacuole) ไม่พบว่าสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวมีแวคิวโอลขนาดใหญ่เหมือนสาหร่ายชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะพวกที่เป็นแพลงก์ตอนพืช เช่น *Anacystis*, *Anabaena*, *Nostoc* และ *Coelosphaerium* จะพบแก๊สแวคิวโอล (gas vacuole) หรือซูโดแวคิวโอล (pseudovacuole) ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป

แก๊สแวคิวโอลช่วยในการลอยตัวของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว แก๊สแวคิวโอลถูกสร้างขึ้นมาเมื่อได้รับความเข้มแสงต่ำ ๆ และจะหายไปเมื่อความเข้มแสงสูง เมื่อสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวทำการสังเคราะห์แสงและผลิตน้ำตาลขึ้นมา เป็นผลทำให้แรงดันออสโมติกภายในเซลล์สูงขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้แก๊สแวคิวโอลหายไป ทำให้แรงลอยตัวลดลงเป็นผลทำให้สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวจมลงจากผิวน้ำลงสู่ใต้น้ำ

2.2.2.4 อาหารที่สะสม (storage product) อาหารที่เก็บสะสมของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเป็นพวกคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ แป้งไซยาโนไฟเซียน (cyanophycean starch) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะปรากฏเห็นเป็นเม็ด (granule) ขนาดเล็กและเมื่อย้อมด้วยไอโอดีนจะติดสีแดง นอกจากนี้ยังมีไกลโคเจนแกรนูล (glycogen granule) และหยดน้ำมันด้วย

2.2.3 รูปร่างสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว มีรูปร่าง 2 แบบ คือ

2.2.3.1 รูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ (colony) และไม่เป็นเส้นสาย (non-filamentous form)

พวกที่มีรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยว เช่น *Chroococcus* หรือรวมกันเป็นกลุ่มเซลล์แบบพาล์เมลลา (palmellate form) เช่น *Merismopedia*, *Eucapsis*, *Anacystis* เป็นต้น เซลล์ของสาหร่าย สีน้ำเงินแกมเขียวพวกนี้มีรูปร่างต่าง ๆ กัน เช่น กลม รูปไข่ ทรงกระบอก สำหรับพวกที่อยู่เป็นโคโลนีแบบพาล์เมลลาอาจมีลักษณะของกลุ่มเซลล์แบบกลม แบน สี่เหลี่ยม หรือรูปร่างที่แน่นอน

2.2.3.2 รูปร่างเป็นเส้นสาย (filamentous form)

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่มีรูปร่างเป็นเส้นสาย เกิดจากเซลล์หลายเซลล์มาต่อกันจนเป็นเส้นยาว ในพวกที่เป็นเส้นสายส่วนของเซลล์ที่เรียงกันเป็นแถว เรียกว่า ทรัยโคม (trichome) ดังนั้นในแต่ละเส้นสายจึงประกอบไปด้วยทรัยโคมและชีทรวมกัน เส้นสายนี้อาจตรงและเรียบไม่มีการแตกแขนง เช่น *Oscillatoria*, *Lyngbya* เป็นต้น บางชนิดอาจมีปลายโค้งงอ หรือบิดเป็นเกลียว เช่น *Arthrospira* เป็นต้น สำหรับเส้นสายที่มีการแตกแขนงมี 2 ประเภท ได้แก่ การแตกแขนงแท้ และการแตกแขนงเทียม ซึ่งจะกล่าวถึงต่อไป

2.2.4 เฮเทอโรซีสต์ (heterocyst)

เฮเทอโรซีสต์ คือ เซลล์พิเศษซึ่งแตกต่างจากเซลล์ปกติ (vegetative cell) ทั่วไป เกิดขึ้นในระหว่างมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (active growth) (Fogg, 1944) โดยปกติเฮเทอโรซีสต์จะมีขนาดใหญ่และมีผนังหนากว่าเซลล์ปกติ พบในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่เป็นเส้นสายบางตระกูลเท่านั้น ได้แก่ Nostocaceae, Rivulariaceae, Scytonemataceae และ Stigonemataceae ซึ่งสามารถพบได้ในเส้นสายทั้งที่แตกแขนงจริง และแตกแขนงเทียม

เฮเทอโรซีสต์อาจปรากฏอยู่ที่ตำแหน่งปลายสุดของเส้นสาย เช่น *Gloeotrichia* ซึ่งเรียกว่า เบซัลเฮเทอโรซีสต์ (basal heterocyst) หรือปรากฏอยู่ที่ปลายทั้ง 2 ข้างของเส้นสาย เช่น *Anabaenopsis* หรืออาจปรากฏอยู่ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งในระหว่างเส้นสาย เช่น *Anabaena* หรือ *Nostoc* sp.

ระหว่างเฮเทอโรซีสต์กับเซลล์ปกติเชื่อมต่อกันโดยผ่านทางรูเล็ก ๆ ที่เรียกว่าโพลาร์โนดุล (polar nodule) เฮเทอโรซีสต์ที่อยู่ที่ปลายจะมีหนึ่งโพลาร์โนดุล ในขณะที่เฮเทอโรซีสต์ที่อยู่ระหว่างเซลล์ในเส้นสายจะมี 2 โพลาร์โนดุล และในชนิดที่มีการแตกแขนงจะปรากฏมี 3 โพลาร์โนดุล เมื่อเฮเทอโรซีสต์ปรากฏอยู่ตรงฐานที่แตกแขนง เช่น *Mastigocladus laminosus* (Venkataraman, 1957) ซึ่งทำให้เฮเทอโรซีสต์สามารถเชื่อมต่อกับเซลล์ปกติได้ทั้ง 3 เซลล์

ถึงแม้ว่าการเกิดเฮเทอโรซีสต์จะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิด แต่ Fay (1973) สรุปการเกิดเฮเทอโรซีสต์ไว้โดยรวมดังนี้ คือ ขั้นแรกเซลล์ปกติเซลล์ใดเซลล์หนึ่งในเส้นสายจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากมีอาหารมาสะสมมากขึ้น ทำให้จากเดิมเซลล์ที่เป็นรูปเหลี่ยมจะเปลี่ยนเป็นกลมขึ้น ขั้นต่อไปเกิดการคอดกิ่วระหว่างเซลล์ที่กำลังพัฒนาไปเป็นเฮเทอโรซีสต์กับเซลล์ปกติมากขึ้น และขั้นสุดท้ายผนังเซลล์จะสร้างไฟบรัสเป็นชั้นขึ้นมา ทำให้ผนังเซลล์มีลักษณะหนากว่าเดิมโดยเฉพาะบริเวณโพลาร์โนดุล

เฮเทอโรซีสต์ มีหน้าที่หลักในการตรึงไนโตรเจน และนอกจากนี้ยังมีทฤษฎีเกี่ยวกับหน้าที่ของเฮเทอโรซีสต์อีกมากมายหลายทฤษฎีด้วยกัน Morris (1968) ได้สรุปว่ามี 3 ทฤษฎีและเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางคือ ข้อแรกเฮเทอโรซีสต์เป็นจุดอ่อนที่ทำให้เกิดการขาดท่อนของ ทรัยโคม ซึ่งแต่ละท่อนที่ขาดออกมานี้เรียกว่าฮอร์โมโกเนีย (hormogonia) หรือเป็นฮอร์โมโกน (hormogone) ซึ่งอาจเป็นเส้นสายยาวหรือสั้น ซึ่งฮอร์โมโกเนียดังกล่าวเหล่านี้สามารถแบ่งตัวเป็นเส้นสายที่ยาวต่อไปได้ ข้อที่สองเฮเทอโรซีสต์จะไปกระตุ้นการสร้างอะคีนีต ซึ่งทฤษฎีข้อนี้มาจากการที่ได้สังเกตและศึกษาในหลาย ๆ ชนิด พบว่า การสร้างอะคีนีตถูกจำกัดให้อยู่ใกล้ ๆ กับบริเวณเฮเทอโรซีสต์ ซึ่ง Fritsch (1945) ได้ขยายความของทฤษฎีข้อนี้ คือ เฮเทอโรซีสต์จะปลดปล่อยสารบางอย่างซึ่งจะไปกระตุ้นการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ และทฤษฎีข้อสุดท้ายสันนิษฐานว่าในอดีตเฮเทอโรซีสต์คือเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งในปัจจุบันสูญเสียหน้าที่ดังกล่าวไปแล้ว ทฤษฎีข้อนี้ได้มาจากการสังเกตเห็นได้จากในบางครั้งเฮเทอโรซีสต์สามารถงอกเป็นเส้นสายใหม่ได้ แต่อย่างไรก็ตาม

การที่เฮเทอโรซีสต์จะงอกเป็นเส้นสายใหม่ขึ้นอยู่กับอาหารที่ต้องมีความจำเพาะเจาะจงแต่เพียงเท่านั้น ซึ่งเฮเทอโรซีสต์ไม่งอกเป็นเส้นสายใหม่ในอาหารพื้นฐานทั่วไป

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวถูกกระตุ้นให้สร้างเฮเทอโรซีสต์ขึ้นมา เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่ขาดไนโตรเจนและจากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าเมื่อใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจน สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวจะสร้างเฮเทอโรซีสต์ขึ้นมามากกว่าใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน (Trainor, 1978) นอกจากนี้ Stewart (1974) ได้กล่าวว่าคลอไรด์ยังมีบทบาทในการสร้างเฮเทอโรซีสต์ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเช่น *Anabaena* จะพัฒนาสร้างเฮเทอโรซีสต์ขึ้นมาเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมคลอไรด์ลงไป

2.2.5 อะคีนีต (akinete)

อะคีนีตเป็นเซลล์พิเศษมีผนังหนา โดยปกติจะมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ปกติและสามารถทนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้มากกว่า อะคีนีตอาจมีรูปร่างเป็นทรงกลม เช่น *Anabaena* ทรงแบน เช่น *Nodularia* หรือยาวเรียว เช่น *Gloeotrichia, Cylindrospermum* ซึ่งใน 2 สกุลหลังนี้อะคีนีตจะเกิดอยู่ชิดกับเฮเทอโรซีสต์ *Anabaena* บางชนิด เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพที่ขาดไนโตรเจน อะคีนีตจะถูกสร้างขึ้นมาอยู่ตรงกลางระหว่างเฮเทอโรซีสต์ สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่เจริญในสภาพที่มีไนโตรเจนจะมีการสร้างอะคีนิตแต่ไม่มีการสร้างเฮเทอโรซีสต์ มีความเชื่อกันว่าการขาดฟอสเฟตจะทำให้อะคีนีตถูกสร้างขึ้นมา แต่ไม่พบในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวทุกชนิด (Rai และคณะ, 1985) นอกจากนี้แสงยังเป็นปัจจัยสำคัญเช่นเดียวกันในการสร้างอะคีนีต โดยปกติอะคีนีตจะถูกสร้างมากขึ้นเมื่อความเข้มแสงลดลง

2.2.6 การแตกแขนง (branching)

การแตกแขนงที่พบในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวมี 2 ประเภท ได้แก่ การแตกแขนงแท้ (true branching) และการแตกแขนงเทียม (false branching)

2.2.6.1 การแตกแขนงแท้ เป็นการแตกแขนงที่พบได้ทั่วไปในสาหร่ายหลายชนิดรวมทั้งสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว การแตกแขนงแท้มี 3 แบบ คือ

1) การแตกแขนงข้าง (lateral branching) เกิดจากเซลล์หนึ่งทำการแบ่งตัวในแนวตั้งฉากกับแนวการแบ่งเซลล์ปกติ หลังจากนั้นเซลล์ที่เกิดใหม่จะแบ่งตัวต่อไปอีก ทำให้เกิดแขนงงอกยาวออกไปทางด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้ง 2 ด้าน

2) การแตกแขนงคู่ (dichotomous branching) เกิดจากการแบ่งเซลล์ยอด (apical cell) ของเส้นสาย โดยทำการแบ่งตามแนวขนานกับแนวแกนได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ หลังจากนั้นทั้ง 2 เซลล์จะแบ่งตัวต่อไปอีกได้เป็นแขนงใหม่อยู่ตรงปลายเป็นคู่

3) การแตกแขนงแบบตัว V คว่ำ (mastigocladaceous หรือ reversed V shaped branching) เกิดจากการแบ่งเซลล์ตามปกติ หลังจากนั้นเซลล์ที่เกิดใหม่ทั้ง 2 เซลล์ จะยืดตัวแล้วดัน

ออกไปในทางเดียวกัน แล้วจึงทำการแบ่งเซลล์ต่อไปอีกให้แขนงสั้นๆ ชนกันและชะงักการเจริญเติบโต ทำให้มีลักษณะเป็นรูปตัว V คว่ำ

2.2.6.2 การแตกแขนงเทียม การแตกแขนงแบบนี้พบเฉพาะในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเท่านั้น เกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์ในเส้นสายแบ่งตัวตามปกติให้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ ผนังเซลล์ส่วนที่ชนกันจะโค้งมน หลังจากนั้นเซลล์ใหม่ทั้ง 2 เซลล์หรือเพียงเซลล์เดียวจะทำการแบ่งตัวเกิดเป็นแขนงเทียมคู่ (false branch in pair) การเกิดแขนงเทียมนี้แขนงที่เกิดใหม่อาจดันชีทที่หุ้มติดไปด้วยหรืออาจแทงทะลุ ชีท ออกไปทำให้เกิดมีรอยขาดของชีทเดิม เรียกรอยนี้ว่า โอเครีย (ocrea)

2.2.7 การสืบพันธุ์ (reproduction)

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเท่านั้น การสืบพันธุ์ที่พบได้แก่

2.2.7.1 การแบ่งเซลล์เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์แบบทวีคูณ

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเซลล์เดียวที่มีชีทหุ้ม เมื่อมีการแบ่งเซลล์หลาย ๆ ครั้ง จะทำให้เห็นเป็นกลุ่มเซลล์อยู่รวมภายในชีทเดียวกัน หลังจากนั้นจึงจะหลุดออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่เป็นกลุ่มเซลล์หรือโคโลนี เมื่อมีการแบ่งเซลล์จะทำให้ขนาดของกลุ่มเซลล์ใหญ่ขึ้น ต่อมาจึงหลุดออกเป็นกลุ่มเซลล์ย่อย ๆ (fragmentation)

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่เป็นเส้นสาย การแบ่งเซลล์จะทำให้ทรัยโคมยืดยาวออก และเมื่อถูกกระทบกระเทือนจะขาดเป็นท่อน แต่ละท่อนสามารถเจริญเป็นทรัยโคมใหม่ต่อไป ถ้าเป็นพวกที่มีเฮเทอโรซีสต์ การขาดท่อนมักเกิดตรงรอยต่อระหว่างเฮเทอโรซีสต์กับเซลล์ที่อยู่ติดกัน สำหรับพวกที่ไม่มีเฮเทอโรซีสต์อาจมีเซลล์ตาย ซึ่งเป็นจุดอ่อนทำให้เกิดการขาดท่อนตรงเซลล์ตายนี้ ในกรณีที่มีชีทหนาและเหนียวหุ้มอยู่ เมื่อเกิดมีเซลล์ตายมาก ๆ จะเห็นกลุ่มเซลล์ท่อนสั้น ๆ หรือฮอร์โมโกนเกิดอยู่ภายในชีทมีจำนวนมากมาย ฮอร์โมโกนเหล่านี้จะถูกผลักดันให้หลุดออกจาก ชีท แล้วจึงสร้างชีทใหม่และเจริญเติบโตเป็นเส้นสายใหม่ต่อไป

2.2.7.2 การสร้างสปอร์ สปอร์ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวมีดังนี้

เอนโดสปอร์ (endospore) หมายถึงสปอร์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยการแบ่งโปรโตพลาสต์ออกเป็น 2 ส่วน หรือหลาย ๆ ส่วน แต่ละส่วนเมื่อหลุดออกจากผนังเซลล์เดิมจะงอกเป็นต้นใหม่ต่อไป

เอกโซสปอร์ (exospore) หมายถึงสปอร์ที่เกิดขึ้นโดยการตัดแบ่งที่ส่วนปลายของเซลล์ออกมา อาจมีจำนวนเพียง 1 หรือหลายๆ สปอร์เรียงต่อกัน พบเฉพาะสกุล *Chamaesiphon*

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวแบ่งเป็น 2 ประเภท ดังนี้ คือ ปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมี

2.3.1 ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่

แสง (light)

แสงเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงและการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว การเจริญเติบโตจะถูกยับยั้งถ้าได้รับความเข้มแสงมากเกินไป ถ้าศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงที่สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวได้รับและการสังเคราะห์แสง พบว่าการสังเคราะห์แสงจะเพิ่มขึ้น เมื่อได้รับความเข้มแสงเพิ่มขึ้น และจากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อความเข้มแสงถึงระดับอิ่มตัว Watt (1969) กล่าวว่าการปลดปล่อยสารประกอบประเภทคาร์บอนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์แสง เปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มแสงด้วย โดยที่ความเข้มแสงสูง ๆ จะไปยับยั้งการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์แสง

แสงมีผลต่อการเกิด photoinhibition และ photoinactivation ในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวโดยทั้ง 2 กระบวนการขึ้นอยู่กับความเข้มแสงและคุณภาพของแสงหรือคลื่นแสงในช่วงต่าง ๆ ทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง โดยปรากฏการณ์ photoinhibition จะเกิดขึ้นเมื่อมีความเข้มแสงประมาณ 2,000 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ส่วนคุณภาพแสงหรือช่วงคลื่นแสงต่าง ๆ ทั้งคลื่นแสงเหนือม่วงหรืออัลตราไวโอเลต (ultraviolet) และคลื่นแสงที่ตาสามารถมองเห็นได้ (visible light) มีผลต่อการเกิด photoinhibition เช่นกัน โดยเฉพาะรังสีอัลตราไวโอเลตมีผลโดยตรงต่อกรดนิวคลีอิกซึ่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ สำหรับ photoinactivation เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวเคมี โดยพบว่าคลื่นแสงสีฟ้าสามารถทำลายเอนไซม์ ribulose biphosphate (RuBP) carboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงทำให้การสังเคราะห์แสงลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าแสงสีฟ้ายังทำลายไซโตโครมได้อีก (Sokawa และ Hase, 1968)

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่อาศัยอยู่บริเวณที่ได้รับความเข้มแสงสูง เช่น อาศัยอยู่ตามหินหรือดิน ซึ่งภายใต้สภาพเหล่านี้สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวจำเป็นต้องมีกลไกเพื่อป้องกันอันตรายจากแสงที่ได้รับ กลไกการป้องกันของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว เช่น การเคลื่อนหนีแสงเพื่อหลีกเลี่ยงจากแสงที่มีความเข้มแสงสูง หรือการสร้างสารประกอบที่ใช้ในการดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลตเพื่อป้องกันแสงที่จัดเกินไปไม่ให้เป็นอันตรายต่อรงควัตถุสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว ได้แก่ แคโรทีนอยด์ และนอกจากนี้ยังมี scytonemin ซึ่งเป็นรงควัตถุที่พบอยู่ภายในชีทสามารถละลายได้ในไขมันและสามารถดูดซับคลื่นแสงได้ในช่วงความยาวคลื่นกว้างตั้งแต่ 280 ถึง 450 นาโนเมตร และ mycosporine-like-amino acid ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่มีสี ละลายได้ในน้ำ

สามารถดูดซับคลื่นแสงในช่วงแคบกว่า scytonemin คือ ระหว่าง 310 ถึง 334 นาโนเมตร (Garcia และ Castenhoz, 1991,1993)

อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมต่าง ๆ ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวโดย อุณหภูมิมีผลต่อโครงสร้างขององค์ประกอบภายในเซลล์โดยเฉพาะโปรตีนและไขมัน นอกจากนั้น อุณหภูมิยังมีอิทธิพลร่วมกับอัตราการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ซึ่งอุณหภูมิไปมีผลต่อพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาเหล่านี้ (Richmond, 1986)

Sato และ Murata (1980) กล่าวว่าอุณหภูมิเป็นหนึ่งในปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่สุดที่มีผลต่อองค์ประกอบของกรดไขมัน จากการทดลองย้าย *Anabaena variabilis* จากอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียสไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส พบว่าเพียง 10 ชั่วโมงแรกการสังเคราะห์กรดไขมันของ *A. variabilus* ลดลง และเมื่อย้ายจากอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียสเช่นเดิม พบว่าภายใน 5 ชั่วโมงหลังจากย้ายมีการสังเคราะห์กรดไขมันเพิ่มขึ้น

ความเป็นกรดเป็นด่าง (hydrogen ion concentration)

ความเป็นกรดเป็นด่างมีผลต่อกระบวนการทางชีววิทยา ผลต่อประจุไฟฟ้าที่ผนังเซลล์ การถ่ายเทประจุที่พลาสมาเมมเบรน และเกี่ยวข้องกับศักย์ไฟฟ้าที่เซลล์เมมเบรน ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวหลาย ๆ ชนิด ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเพาะเลี้ยงระหว่าง 7.0 ถึง 10.0 มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แสง เนื่องจากไบคาร์บอเนตไอออนละลายได้มากที่สุดที่ช่วงระดับความเป็นกรดเป็นด่างนี้จึงสามารถใช้ HCO_3^- เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์แสง ทำให้สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้สูงที่สุดในช่วงความเป็นกรดเป็นด่างนี้ (Coleman และ Colman, 1981)

ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีผลต่อการละลายของเกลือและสารประกอบต่าง ๆ (Cook, 1965) ซึ่งการละลายของเกลือและสารประกอบต่าง ๆ อาจเป็นพิษหรือไปยับยั้งปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้ความเป็นกรดเป็นด่างยังมีผลต่อการละลายของโลหะหลายชนิด ถ้าความเป็นกรดเป็นด่างเพิ่มขึ้นอาจทำให้จุลธาตุบางตัวไม่ละลายได้

ความเค็มและแรงดันออสโมติก (salinity and osmotic effect)

การสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่อาศัยในน้ำจืดจะถูกยับยั้งถ้าย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่มีความเค็มสูงหรือมีค่าแรงดันออสโมติกสูง (Batterton และ van Baalen, 1971) ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นมีอิทธิพลต่ออัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวมากกว่าตัวเพิ่มแรงดันออสโมติกตัวอื่น ๆ

2.3.2 ปัจจัยทางเคมี

การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวขึ้นอยู่กับธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มธาตุอาหารหลัก (macronutrient) และกลุ่มธาตุอาหารรอง (micronutrient) ธาตุอาหารหลักเป็นธาตุอาหารที่ใช้สำหรับสร้างโมเลกุลซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ในปริมาณมาก ธาตุอาหารหลักโดยทั่วไปประกอบด้วยคาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และโพแทสเซียม ส่วนธาตุอาหารรองเป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวต้องการใช้ปริมาณน้อย มักมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร ธาตุอาหารรองเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลที่จำเป็น เช่น เอนไซม์ซึ่งเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตหรือเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลของเอนไซม์ที่สำคัญบางชนิด หรือจำเป็นสำหรับเป็นตัวเร่งของเอนไซม์

2.3.2.1 ธาตุอาหารหลัก ประกอบด้วยธาตุต่อไปนี้

ออกซิเจน (oxygen)

ถึงแม้ว่าออกซิเจนไม่ได้ถูกพิจารณาว่าเป็นธาตุอาหาร แต่ออกซิเจนเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับโครงสร้างและกระบวนการเมแทบอลิซึม ธาตุนี้เป็นองค์ประกอบของสารประกอบอินทรีย์เกือบทั้งหมดในเซลล์ และโดยปกติออกซิเจนจะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในปฏิกิริยาออกซิเดชัน สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวสามารถใช้โมเลกุลของออกซิเจนได้โดยตรงจากบรรยากาศหรือที่ละลายอยู่ในน้ำ ในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวบางชนิดพบว่าออกซิเจนมีผลต่อการสังเคราะห์แสงและการตรึงไนโตรเจน โดยการยับยั้งจะเริ่มปรากฏขึ้นเมื่อปริมาณออกซิเจนในบรรยากาศลดต่ำลง (Fay, 1992)

คาร์บอน (carbon)

คาร์บอนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวจากการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่าประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว คือ คาร์บอน (Kaplan และคณะ, 1986) สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวต้องการอนินทรีย์คาร์บอนในการสังเคราะห์แสง เช่นเดียวกับพืช แต่ปริมาณคาร์บอนในอากาศบางครั้งไม่เพียงพอกับความต้องการ เนื่องจากปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอยู่ในอากาศมีค่าต่ำเกินไป คือ มีเพียง 0.03 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Becker, 1994) สำหรับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวนั้นมักใช้ในรูปของอากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์หรือให้ในรูปคาร์บอเนตหรือไบคาร์บอเนตโดยอยู่ในรูปของเกลือ การที่คาร์บอนจะอยู่ในรูปใดขึ้นกับระดับความเป็นกรดเป็นด่าง เช่น ในรูปของเกลือไบคาร์บอเนตเมื่อความเป็นกรดเป็นด่างมีค่าระหว่าง 7 ถึง 9 หรืออยู่ในรูป

ของเกลือคาร์บอเนตเมื่อความเป็นกรดเป็นด่างมีค่าสูงกว่า 9.5 ขึ้นไป และคาร์บอนจะอยู่ในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อน้ำมีความเป็นกรดเป็นด่างประมาณ 5

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวในอาหารเลี้ยงที่มีระบบบัฟเฟอร์ไม่เหมาะสม เมื่อสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวใช้คาร์บอนไดออกไซด์หรือไบคาร์บอเนตอย่างรวดเร็วในการเจริญเติบโต จะทำให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างในอาหารมีค่าสูงขึ้น เนื่องมาจากมีการปลดปล่อยไฮดรอกไซด์ไอออนลงในอาหาร

ไนโตรเจน (nitrogen)

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญ สำหรับการสร้างชีวมวลสัดส่วนของไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 7-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นในการผลิต เซลล์ 1 กรัมในอาหาร 1 ลิตร ปริมาณโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ต่ำสุดที่สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวต้องการคือ 500-600 มิลลิกรัมต่อลิตร (Vonshak, 1986) สารประกอบไนโตรเจนทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ในจุลสาหร่ายหลายชนิดรวมทั้งสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวด้วย และนอกจากนี้สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวยังสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสามารถเปลี่ยนจากแก๊สไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียในกระบวนการรีดักชันโดยใช้เอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นตัวช่วย

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวสามารถใช้แอมโมเนียและไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้โดยแอมโมเนียถูกนำไปใช้ได้เร็วกว่าไนเตรต เนื่องจากแอมโมเนียเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการรีดักชันของไนเตรต ในบางครั้งแอมโมเนียอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการยับยั้งแบบย้อนกลับซึ่งทำให้สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวใช้ไนเตรตได้ลดลง ส่วนไนไตรต์สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้เหมือนกัน แต่มีข้อเสียคือที่ความเข้มข้นของไนไตรต์ที่สูงจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตทำให้ไม่นิยมใช้

การใช้ไนเตรตและแอมโมเนียมีความสัมพันธ์กับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเป็นอย่างมากเมื่อใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวสามารถถูกยับยั้งได้ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียประมาณ 1 มิลลิโมล (Morris, 1978)

สำหรับแหล่งของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ยูเรีย (urea) เอไมด์ (amide) กลูตามีน (glutamine) แอสพาราจีน (asparagine) และกรดอะมิโนต่าง ๆ เช่น ไกลซีน (glycine) เป็นต้น

ถ้าสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวและสาหร่ายอื่น ๆ ขาดธาตุไนโตรเจนจะมีผลทำให้รงควัตถุในการสังเคราะห์แสงลดลง ซึ่งทำให้การสังเคราะห์แสงลดลงไปด้วย (Allen, 1969) Canto de Loura (1994) กล่าวว่าสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวสามารถนำสารประกอบไนโตรเจนที่เก็บสะสมไว้มาใช้ได้ จากการทดลองนำ *Oscillatoria splendida* ไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน พบ

ว่ารงควัตถุไฟโคไซยานินถูกสลายไปเป็นไนโตรเจนที่สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวสามารถใช้ได้ ทำให้ปริมาณไฟโคไซยานินลดลงอย่างเห็นได้ชัด และปริมาณไฟโคไซยานินจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอีกเมื่อเติมไนโตรเจนลงในอาหาร และนอกจากนี้ยังมีการสะสมของแป้งและไขมันเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน

ฟอสฟอรัส (phosphorus)

ฟอสฟอรัสเป็นหนึ่งในธาตุอาหารหลัก ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว เพราะมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการถ่ายเทพลังงานและกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (Talling, 1962)

ชนิดของฟอสฟอรัสที่สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวต้องการ ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปสารอนินทรีย์มากกว่า เช่น $H_2PO_4^-$ หรือ HPO_4^{2-} อย่างไรก็ตามการดูดซึมสารประกอบฟอสเฟตของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวและสาหร่ายอื่น ๆ มีปัจจัยหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ความเป็นกรดเป็นด่าง ความเข้มข้นของโซเดียมไอออน โปแตสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน หรือโลหะหนักบางชนิดในอาหาร และความแตกต่างของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวแต่ละชนิด

เมื่อสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวหรือสาหร่ายอื่น ๆ ขาดธาตุฟอสฟอรัส ลักษณะอาการจะคล้ายคลึงกับการขาดธาตุไนโตรเจน คือ ปริมาณโปรตีน คลอโรฟิลล์ เอ อาร์เอ็นเอ (RNA) และดีเอ็นเอ (DNA) มีแนวโน้มลดลง แต่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตกลับมีปริมาณเพิ่มขึ้น และมีการสะสมของไซยาโนไฟซีน (cyanophycine) ในเซลล์ที่ขาดฟอสเฟตมากขึ้นด้วย นอกจากนี้รูปร่างภายนอกของเซลล์สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว เช่น รูปร่างและขนาดของเซลล์หรือทรัยโคมมีการเปลี่ยนแปลงด้วย และจากการศึกษาของ Prieto (1997) พบว่าเซลล์ที่ขาดฟอสเฟตเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่มีฟอสเฟตจะสามารถดูดซึมฟอสเฟตได้ในปริมาณที่สูงและเร็วกว่าเซลล์ที่ไม่ขาดฟอสเฟตทั้งในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสงภายใต้สภาพมีออกซิเจน แต่ในสภาพที่ขาดออกซิเจน แสงจำเป็นต่อการดูดซึมฟอสเฟต

ซัลเฟอร์ (sulfur)

ซัลเฟอร์เป็นธาตุที่จำเป็น สำหรับสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเพราะซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นได้แก่ เมไทโอนีน (methionine) ซีสตีน (cystine) และซีสเตอีน (cysteine) วิตามินต่าง ๆ และซัลโฟลิปิด (sulfolipid) เป็นต้น โดยปกติซัลเฟอร์ที่สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวและสาหร่ายอื่น ๆ ใช้จะอยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ แต่มีสาหร่ายบางชนิดสามารถใช้ซัลเฟอร์ในรูปอินทรีย์สาร เช่น กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบเป็นแหล่งของซัลเฟอร์ได้

แคลเซียม (calcium)

บทบาทของแคลเซียม ต่อสรีรวิทยาและการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามมีการยอมรับกันว่าแคลเซียมเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นแต่ต้องการในปริมาณน้อยกว่าธาตุอาหารหลักอื่น ๆ ซึ่งแคลเซียมอาจใช้ในรูปสารประกอบรวมกับแร่ธาตุตัวอื่น ๆ

โซเดียมและโพแทสเซียม (sodium and potassium)

โซเดียมเป็นแร่ธาตุที่จำเป็น สำหรับสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวและสาหร่ายบางชนิดเท่านั้น แต่ถ้ามีปริมาณสูงอาจเป็นพิษต่อสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวได้ นอกจากนี้โซเดียมยังช่วยในการเปลี่ยนโมเลกุลไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียในการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวได้ โซเดียมและโพแทสเซียมมีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกันจึงสามารถใช้แทนกันได้ สำหรับโพแทสเซียมจำเป็นสำหรับสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวและสาหร่ายทุกชนิด เนื่องจากโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์หลายชนิด ภายใต้สภาพการขาดโพแทสเซียมการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แสงลดลงแต่การหายใจจะสูงขึ้น

แมกนีเซียม (magnesium)

แมกนีเซียมจำเป็นสำหรับสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวและสาหร่ายทุกชนิด เพราะเป็นองค์ประกอบของรงควัตถุที่ใช้สังเคราะห์แสงคือ คลอโรฟิลล์ และมีบทบาทต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ของเซลล์

2.3.2.2 ธาตุอาหารรอง ประกอบด้วยธาตุดังต่อไปนี้

เหล็ก (iron)

เหล็กเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมเพราะเป็นองค์ประกอบของไซโตโครมต่าง ๆ และนอกจากนี้เหล็กยังมีบทบาทสำคัญต่อการดูดซึมไนโตรเจนและกระบวนการสังเคราะห์แสง เนื่องจากมีผลต่อการสังเคราะห์รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงได้แก่ ซี–ไฟโคไซยานิน และคลอโรฟิลล์ เอ (Oquist, 1971) และเฟอร์ริดอกซิน (ferredoxin) ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง ระบบที่หนึ่ง (photosystem I) เหล็กเป็นธาตุที่มักจะตกตะกอนในสารละลาย ฉะนั้นจึงต้องใส่สารที่ป้องกันการตกตะกอนเรียกว่า คีเลเตอร์ หรือ chelating agent เหล็กที่ใช้อาจอยู่ในรูปของสารประกอบ เช่น $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ แต่สารประกอบเหล็กนี้จะดูดน้ำทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ ฉะนั้นจึงนิยมใช้สารประกอบพวกเหล็กอีดีทีเอ (FeEDTA) แทนเพราะมีคุณสมบัติคงรูปดีกว่า

โบรอน (Boron)

โบรอนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับสาหร่ายบางชนิด เช่น สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวและไดอะตอมโดยเฉพาะไดอะตอมที่อาศัยอยู่ในน้ำเค็ม แต่ธาตุนี้ไม่จำเป็นสำหรับสาหร่ายสีเขียว

แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี (manganese, copper and zinc)

แมงกานีส ทองแดง และสังกะสีเป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง รวมทั้งเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเอนไซม์อีกหลายชนิด ถ้าขาดธาตุเหล่านี้จะทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง แต่ถ้ามีมากเกินไปจะเป็นพิษต่อสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวและสาหร่ายชนิดอื่น ๆ

โมลิบดินัม วาเนเดียม โคบอลท์และนิกเกิล (molybdenum, vanadium, cobalt and nickel)

โมลิบดินัมมีบทบาทสำคัญต่อการตรึงไนโตรเจนในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวและยังเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ช่วยในการสังเคราะห์แสง วาเนเดียมเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดอื่น ๆ และสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวบางชนิด วาเนเดียมสามารถใช้ทดแทนโมลิบดินัม ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ในการตรึงไนโตรเจน โคบอลท์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของวิตามินบี 12 ซึ่งสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายและสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวหลายชนิด ถ้าสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวขาดโคบอลท์จะทำให้การเจริญเติบโตลดลง 20 ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ การมีปริมาณนิกเกิลถึงแม้ความเข้มข้นเพียงเล็กน้อยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายบางชนิดได้ แต่ Van Baalen และ O' Donnel (1978) พบว่านิกเกิลเป็นธาตุที่จำเป็นต่อสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวบางชนิด ได้แก่ *Oscillatoria* sp. ไดอะตอม และสาหร่ายสีเขียว

เซเลเนียม (selenium)

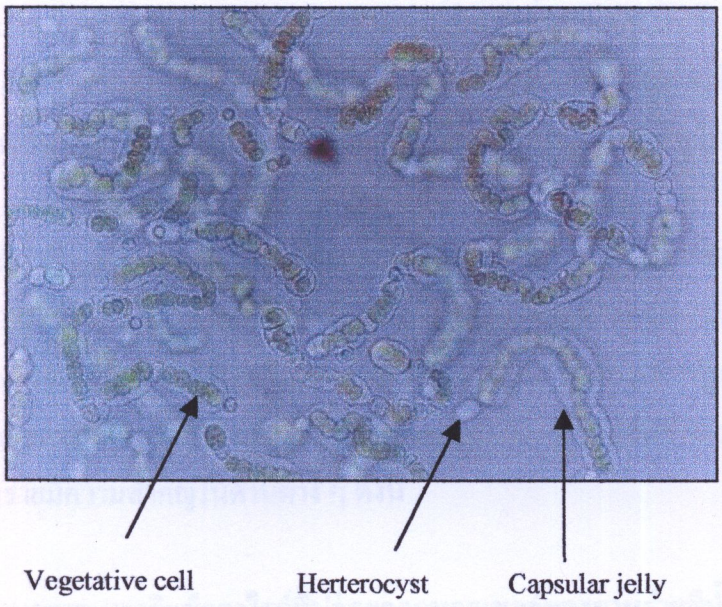
บทบาทของเซเลเนียมต่อสาหร่ายชนิดอื่น ๆ และสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าในแหล่งน้ำปริมาณของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับปริมาณของเซเลเนียม แต่ในสาหร่ายชนิดอื่น ๆ ไม่พบความสัมพันธ์นี้

2.4 ลักษณะของสาหร่ายเห็ดลาบ (*Nostoc commume*)

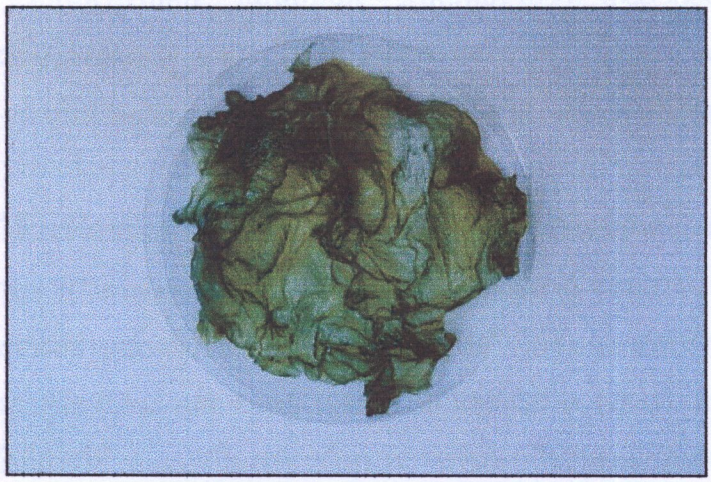
N. commune เป็นสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ มีลักษณะของทัลลัส (thallus) ประกอบด้วยเซลล์ที่มีแคปซูลเจลใส (hyaline capsular jelly) ห่อหุ้มรวมตัวกันอย่างหนาแน่น (firm) และพันกันยุ่งเหยิง (entangled) มีลักษณะนุ่มหรือแน่นทำให้มีลักษณะผิวคล้ายแผ่นหนัง สามารถสร้างกลุ่มเซลล์ได้ทั้งขนาดเล็กและใหญ่ ทรัยโคมมีความกว้าง 5-7 ไมครอน เซลล์รูปถัง (barrel-shaped) ถึงค่อนข้างกลม ขนาดกว้าง 6.69 ไมครอน ยาว 8.05 ไมครอน เฮทเทอโรซีสต์ (heterocyst) รูปร่างค่อนข้างกลม กว้างประมาณ 7.25 ไมครอน ดังภาพที่ 2.1

ลักษณะเด่นของ *N. commune* คือ สามารถสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์แล้วปล่อยออกนอกเซลล์ได้ (extracellular polysaccharide) ในลักษณะคล้ายเมือกที่ปล่อยออกทุกทิศทุกทางหรืออยู่ในรูปแคปซูลเจล (capsular jelly) ห่อหุ้ม

สาหร่ายเห็ดลาบ มีลักษณะเป็นแผ่นวุ้นแบนบางหนาประมาณ 1.0 มิลลิเมตร มีสีตั้งแต่สีน้ำเงินแกมเขียวจนถึงสีเหลือง ซึ่งคล้ายเห็ดหูหนูสีเขียวที่ขึ้นบนดิน ดังภาพที่ 2.2 ขนาดของแผ่นจะแตกต่างกันไปขึ้นกับสถานที่ที่พบ หากเป็นพื้นที่ที่มีน้ำขังแฉะอยู่นาน สาหร่ายที่พบจะมีลักษณะเป็นแผ่นขนาดใหญ่ ส่วนสาหร่ายเห็ดลาบแห้งจะมีลักษณะหดตัวเป็นแผ่นแข็ง สีน้ำตาลถึงดำ มีลักษณะขรุขระ ชาวบ้าน อ.นาเชือก จ. มหาสารคาม นิยมเก็บไปทำลาบ จึงได้ชื่อประจำท้องถิ่นว่า "เห็ดลาบ" ในฤดูฝน เมื่อเกิดฝนตกจะทำให้สาหร่ายที่ในหน้าร้อนหดตัวเป็นแผ่นบางกรอบ คล้ายกระดาษ (ซึ่งเป็นระยะพักตัว, resting stage) ดูดซับน้ำฝนขยายตัวเป็นแผ่นวุ้นบาง ไม่มีรสชาติ มีเนื้อนิ่มหยุ่นแต่กรอบ คล้ายสาหร่ายทะเล *Undaria pinnatifida* หรือ Wakame ที่นิยมบริโภคในญี่ปุ่น อย่างไรก็ตามสาหร่ายเห็ดลาบมีคุณสมบัติที่ดีกว่า คือ ไม่มีกลิ่นคาว ทำให้ชาวบ้านนิยมเก็บไปบริโภคเป็นประจำทุกปีในฤดูฝนซึ่งเป็นเพียงฤดูกาลเดียวเท่านั้นที่สาหร่ายชนิดนี้จะแพร่และขยายพันธุ์ได้



ภาพที่ 2.1 สาหร่ายเห็ดลาบ (*N. commume*) ใต้กล้องจุลทรรศน์ (x 400)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะแผ่นวุ้นบางของสาหร่ายเห็ดลาบ (*N. commume*) ที่เก็บจากป่าดูนลำพัน

2.5 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว

การสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของเซลล์แบคทีเรีย โดยทั่วไปแล้วเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมโดยตรง (Dudman, 1977) ดังนั้นหน้าที่หลักในการสร้างแคปซูลคือการรักษาสภาพเซลล์แบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง การสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของจุลินทรีย์รวมทั้งสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว มีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์จากความเครียดในสิ่งแวดล้อมและจากสภาวะที่เป็นภัยอื่น ๆ

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ (Harada, 1985; Slodki, 1987; Sutherland, 1987; Zevenhuizen, 1987) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวแบ่งได้ 3 กลุ่ม (Painter, 1983) คือ เก็บไว้ภายในเซลล์ (storage) นำไปใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ (cell envelope) และการปล่อยออกนอกเซลล์ (exocellular polysaccharide) ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายมีความสำคัญในด้านต่าง ๆ ดังนี้

2.5.1 บทบาทของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว

การศึกษามากมายจะเน้นความสามารถของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวบางชนิดที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ภาวะเครียดเพื่อทนแล้งหรือเพื่อลดกิจกรรมของน้ำ (water activity) เพื่ออยู่ในทะเลทรายหรือสภาพแวดล้อมที่มีความเค็ม นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ยังมีบทบาทเป็นสารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น แอนติไบโอติก แอนติบอดี แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ฟาจ (phage) ฟาโกไซติก เซลล์ (phagocytic cell) เป็นต้น ผลิตสารเคลือบผิวหน้า (surfactants) อาหารของโปรโตซัวและยังเกิดเป็น biofilm บนผิวหน้าของแข็งอีกด้วย (Costerton และคณะ, 1981;1987 และ Whitfield, 1988)

การใช้ประโยชน์จาก *Nostoc* มีรายงานโดยสมาชิกของคณะสำรวจขั้วโลกใต้ของเครือจักรภพอังกฤษ (Commonwealth Transantarcic Expendition) ระหว่างปี 1955-1958 พบว่ามี *Nostoc* แพร่กระจายอย่างกว้างขวางตั้งแต่เหนือเส้นรุ้งที่ 60^{0} ใต้ขึ้นมา รวมทั้งมีการทดลองบริโภคเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหาร (Lund และ Lund, 1995) Lem และ Glick (1985) และ Chu และ Tsang (1988) รายงานว่ามีการใช้ *Nostoc* เป็นอาหารในประเทศจีนมาเป็นเวลานานมาก เช่น *Spilulina* เป็นแหล่งของวิตามินบี 12 รวมทั้งวิตามินบี 1 บี 2 และในบางชนิดสามารถผลิตวิตามิน เอ โปรตีนที่มีอยู่ใน *Spilulina* บางชนิด ง่ายต่อการย่อยและกรดอะมิโนที่มีอยู่จะเหมือนกับที่มีในอาหาร เช่น ไข่ถั่วเหลือง ยิ่งกว่านั้นสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวยังผลิตสารประกอบทางเคมี เช่น phycobilliprotein phosphorescent dyes ยาและวัคซีน (Gudin และ Thepenier, 1986; Ramus และ Jones (eds.), 1988)

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวบางชนิดสามารถคงความมีชีวิตได้เป็นเวลานานหลายร้อยปี และสามารถกลับมาเจริญเติบโตและสร้างกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ภายหลังการคืนสภาพ โดยการดูดน้ำกลับเข้าไปในเซลล์ (rehydration) (Dodds และคณะ, 1995) Lund และ Lund (1995) ราย

งานว่า *N. commune* ที่แกะจากเฮอร์บาเรียม (herbarium) อายุ 107 ปี ยังคงความมีชีวิตอยู่รอดได้ ทั้งนี้สัณนิษฐานว่าคุณสมบัติดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับสารพอลิแซ็กคาไรด์ หรือสารไกลโคคอนจูเกต (glycoconjugates) ที่ผลิตโดยสาหร่ายเช่นเดียวกับในกรณีของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (Huang และคณะ, 1998)

Nostoc บางชนิดยังใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งและโรคเก๊าต์ ในขณะที่ Hoppe (1979); Bloor และ England (1989); de Caire และคณะ (1987, 1990) รายงานการค้นพบสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์อย่างกว้างขวางทั้งจากสารสกัดเซลล์และอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ Hori และคณะ (1994) รายงานว่า *N. commune* สามารถลดโคเลสเตอรอลนี้น่าจะมาจาก "ใยอาหาร" (dietary fiber) ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ ในตำราแพทย์แผนจีนมีการนำ *N. commune* และ *N. sphaeroides* มาใช้ในการบำบัดโรคตาบอดในเวลากลางคืน แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก ตลอดจนอาการเจ็บป่วยที่ไม่รุนแรงต่าง ๆ

Takenaka และคณะ (1997) วิจัยพบว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนของ *N. flagelliforme* มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก (antitumor) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากองค์ประกอบหลักของสารพอลิแซ็กคาไรด์

สาหร่ายในสกุล *Nostoc* สามารถแพร่กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในที่แห้งแล้ง เช่น ทะเลทราย โกเบหรือที่หนาวเย็น เช่น สถานที่ที่เรียกว่า "Polar Deserts" ในขั้วโลกใต้ Lazaroff (1973); Abdelahad และ Bazzichelli (1989) ได้ทำการศึกษาวงจรชีวิตการสร้างกลุ่มเซลล์ ตลอดจนลักษณะสัณฐานวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปสัณฐานในวงจรชีวิตของ *Nostoc* (polymorphic life cycle)

Hill และคณะ (1994) ได้ศึกษา *N. commune* โดยนำมาผึ่งให้แห้ง ศึกษาลักษณะทางด้านชีวเคมีและโครงสร้างสารพวก glycan ซึ่งอยู่ที่ชีทและปลดปล่อยออกมา องค์ประกอบส่วนใหญ่ประกอบด้วยแคลเซียม/ซิลิกา เมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์พบว่าประกอบด้วย กลูโคส เอน-อะซีติลกลูโคซามีน (*N*-acetylglucosamine) กลูโคซามีน แมนโนส (glucosamine mannose) และกาแลคโตซามีน (galactosamine) ในอัตราส่วน 3.1: 1.4: 1: 0.1: 0.06 ตามลำดับ และในส่วนที่ละลายในไขมันได้ประกอบด้วยทรีฮาโลส (trehalose) และซูโครส ต่อมาในปี 1997 ได้ศึกษา *N. commune* สายพันธุ์ CHEN สร้างพอลิแซ็กคาไรด์มาปกป้องเนื้อเยื่อ (membrane) เพื่อป้องกันเซลล์ถูกทำร้าย มีความทนแล้งและสามารถดูดซับน้ำกลับมายังเซลล์ได้

Mazor และคณะ (1996) ศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวบางสายพันธุ์ที่แยกได้จากทะเลทราย Negev ประเทศอิสราเอล พบว่าพอลิเมอร์มีบทบาทสำคัญในการรักษาความชุ่มชื้นในทะเลทรายของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่เกาะกันเป็นแผ่นแข็งเป็นเวลานานหลายเดือน ซึ่งได้รับน้ำเพียงแหล่งเดียวเป็นครั้งคราวจากน้ำค้างตอนเช้า

Dodds และคณะ (1995) ได้รายงานว่าความหนาแน่นของเมือกของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวหลายสายพันธุ์ ทำให้สาหร่ายมีการใช้อาหารน้อยกว่าสาหร่ายที่ไม่มีเมือก

Fattom และ Shilo (1984) ได้ศึกษาสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่มีการเจริญเติบโตแบบยึดเกาะ (benthic blue-green algae) ปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์ มีลักษณะเป็น hydrophobic

Bar-Or และ Shilo (1987) ศึกษา *Phormidium* J-1 พบว่ามีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่น้ำตาล (non-sugar) เป็นองค์ประกอบ สังเคราะห์ sulfated heteropolysaccharide ชื่อว่า emulcyan ซึ่งมีกรดไขมันและโปรตีนเป็นองค์ประกอบด้วย โดยมีระดับของ hydrophobic แปรผันกับโมเลกุลขนาดใหญ่ ต่อมาในปี 1988 และ 1989 ได้ศึกษา *Phormidium* J-1 และสาหร่ายสีน้ำเงินที่เจริญเติบโตแบบยึดเกาะ ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปล่อยออกนอกเซลล์พบว่ามีส่วนร่วมในการจับตัวของอนุภาคดิน (co-flocculation) เกิดเป็นเม็ดดินได้ดียิ่งขึ้น

Prosperi (1994) ได้ศึกษา *N. cordubensis* สร้างเมือกหนารอบเฮตเทโรซีสต์ สามารถป้องกันกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) จากออกซิเจนได้

Reddy และคณะ (1996) ได้ศึกษา *Cyanothece* BH68 เจริญบนอาหารวุ้น พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่รอบกลุ่มเซลล์ ป้องกันออกซิเจนจากบรรยากาศและพอลิแซ็กคาไรด์ยังสามารถจับกับธาตุเหล็กและแคลเซียมซึ่งธาตุทั้งคู่มีความสำคัญในการตรึงไนโตรเจน

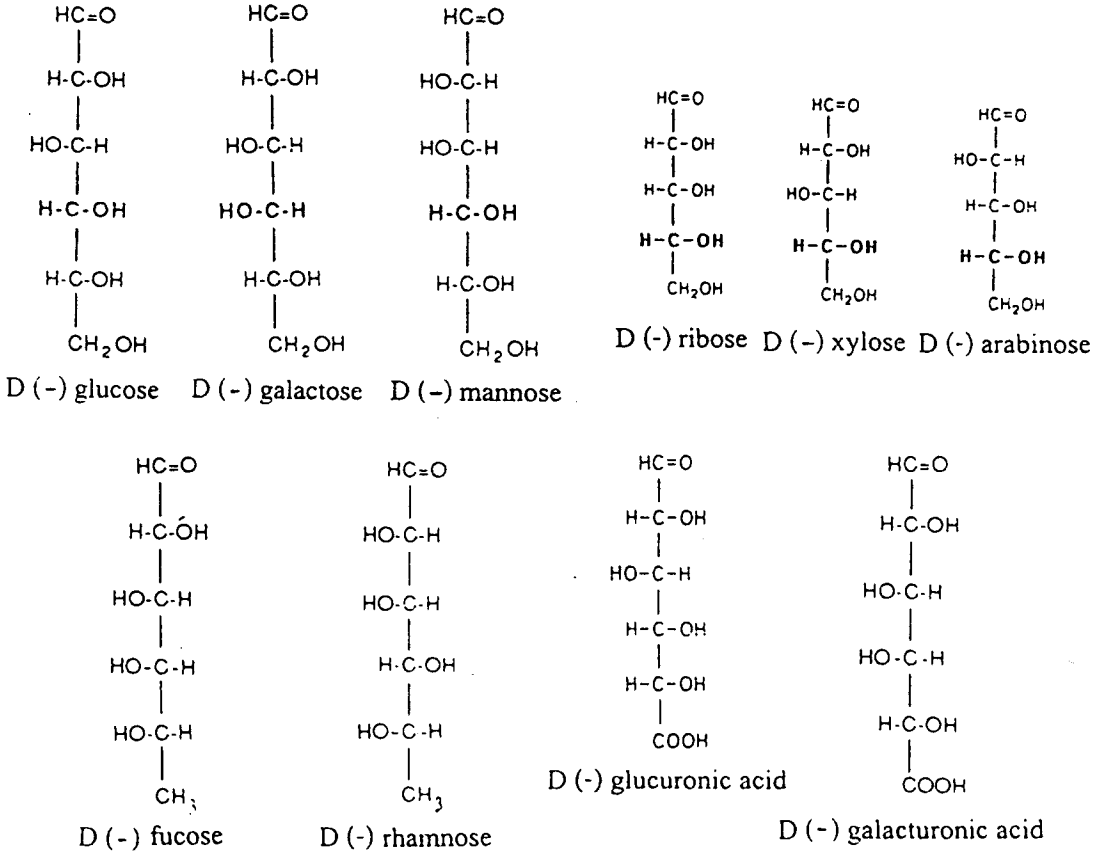
Parker และคณะ (1996) ศึกษา *Microcystis flos-aquae* C3-40 แคปซูลรอบเซลล์มีการสะสมเหล็กและแมงกานีส ซึ่งเป็นโลหะที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวบางชนิดมีชีวิตสัมพันธ์หรือแบบพึ่งพากับพืชชั้นสูง โดย Robin และคณะ (1986) ได้ศึกษา *Anabaena azollae* ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ เกาะที่ผิวใบต้นเฟิร์น (*Azolla filiculoides*) เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต

Gantar และคณะ (1995) ศึกษาสายพันธุ์ *Nostoc* ที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปล่อยออกนอกเซลล์รอบทรัยโคม เกาะกับรากของข้าวสาลี ซึ่งต้นข้าวสาลีจะได้รับไนโตรเจน เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตเช่นกัน

2.5.2 องค์ประกอบของน้ำตาลจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว

ตั้งแต่ปี 1955 สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวหลายชนิด มีรายงานว่าสามารถสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ ปัจจุบันมีประมาณ 70 สายพันธุ์ที่ศึกษาว่ามีการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์ ส่วนใหญ่จะศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิเมอร์ ซึ่งทุกการศึกษาจะเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ (water-soluble released polysaccharide) อยู่ในลำดับ Chroococcales Oscillatoriales Nostocales และ Stigonematales ดังตารางที่ 2.1-2.3 น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ที่พบในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวมีทั้งหมด 10 ชนิด คือ น้ำตาลกลุ่มเฮกโซส (hexose) ได้แก่ กลูโคส (glucose) กาแลคโตส (galactose) และแมนโนส (mannose) น้ำตาลกลุ่มเพนโตส (pentose) ได้แก่ ไรโบส (ribose) ไซโลส (xylose) และอะราบิโนส (arabinose) น้ำตาลกลุ่ม คือออกซีเฮกโซส (deoxyhexose) ได้แก่ ฟูโคส (fucose) และแรมโนส (rhamnose) น้ำตาลกลุ่มกรดเฮกโซส (acid-hexose) ได้แก่ กรดกลูคิวโรนิค (glucuronic acid) และกรดกาแลคทิวโรนิค (galacturonic acid)



ภาพที่ 2.3 สูตรโครงสร้างโมเลกุลน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

ที่มา : Hassan (1988)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวลำดับ Chroococcales

ชนิด	กระบวนการย่อย	น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (อัตราส่วนโมลาร์)												อ้างอิง
		Ara	Fuc	Gal	Glc	Man	Rha	Rib	Xyl	GalA	GlcA	UrA	Others	
Aphanocapsa halophytica MN11	A,B	-	26.5	1.5	12.5	7.5	1.0	-	1.5	-	-		-	Sudo และคณะ (1995)
Anacystis nidulans	C	-	-	1	4.7	1.4	-	-	-	-		-	-	Sangar และ Dugan (1972)
Chroococcus minutus B 41.79	ns	5.1	4.6	9.5	19.1	10.6	10.0	-	10.7	1.0	2.8		b	Fischer และคณะ (1997)
Cyanothece sp. CA 3	D	9.2	2.0	-	1.4	tr	1.0	-	-	+	+	66.8	-	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. CE 4	D	0.4	0.3	tr	1.3	-	1.0	-	0.5	+	-	80.1	-	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. CE 9	D	-	1.1	0.3	2.8	0.7	1.0	-	-	+	-	35.7	-	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. CH 1	D	-	3.1	1.4	-	0.6	1.0	-	0.9	+	-	27.4	-	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. ET 2	D	5.8	1.5	1.4	1.3	0.8	1.0	-	-	+	+	63.1	-	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. ET 5	D	-	2.1	2.2	3.1	1.8	1.0	-	3.3	+	+	29.4	-	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. IR 20	D	-	1.5	0.1	0.1	2.3	10.0	0.1	-	-	+	9.8	-	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. PCC 8801	D	-	0.2	0.6	1.0	0.2	1.2	-	0.9	+	+	35.0	-	c
Cyanothece sp. PE 13	D	-	3.8	11.6	22	5.9	1	0.3	5.9	-	+	20.9	-	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. PE 14	D	6.1	0.2	-	0.5	0.3	0.1	-	-	+	+	21.7	-	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. TI 4	D	-	2.7	1.2	2.9	0.4	1	-	0.7	-	+	58.2	-	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. TP 5	D	0.4	1.2	-	0.9	-	1	-	0.3	+	+	40.4	-	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. TP 10	D	1.8	0.8	-	0.6	0.1	1.0	-	-	+	+	31.3	-	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. VI 22	D	-	1.8	0.2	2.8	1.0	1.0	-	1.8	-	+	40.8	-	De Philippis และคณะ (1998)

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชนิด	กระบวนการย่อย	น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (อัตราส่วนโมลาร์)												อ้างอิง
		Ara	Fuc	Gal	Glc	Man	Rha	Rib	Xyl	GalA	GlcA	UrA	Others	
Cyanothece sp. VI 13	D	-	1.5	0.1	2.0	0.5	1.0	-	1.5	+	+	32.1	-	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. 16Som2	E	-	1.6	2.4	6.8	4.8	-	-	2.9	2.0	1.0		-	De Philippis และคณะ (1993)
Cyanothece sp. 16Som2	D	-	1.0	0.1	1.8	0.4	1.0	-	1.2	+	+	20.6	-	De Philippis และคณะ (1998)
Gloeothece sp. PCC 6909	F	-	-	4.2	4.9	2.6	1.6	-	1.0		-	2.4[d]	e	Tease และคณะ (1991)
Microcystis aeruginosa K 3A	ns	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-		-	f
Microcystis flos-aquae C3-40	G,H	-	-	1.0	1.0	3.0	3.0	-	2.0	43.0			-	Plude และคณะ (1991)
Synechocystis sp. PCC 6714[g]	I	5.5	2.1	6.0	34.8	3.8	2.8	-	2.8			16.7	h	Panoff และคณะ (1988)
Synechocystis sp. PCC 6803[g]	I	-	6.0	1.0	6.7	3.9	3.6	-	3.5			16.4	i	Panoff และคณะ (1988)

Ara = arabinose; Fuc = fucose; Gal = galactose; Glc = glucose; Man = mannose; Rha = rhamnose; Rib = ribose; Xyl = xylose; GalA = galacturonic acid; GlcA = glucuronic acid; UrA = uronic acid + = มี - = ไม่มี ns = ไม่เจาะจง tr = ปริมาณเล็กน้อย A = 2 N TFA (trifluoroacetic acid) ที่ 100°C นาน 6-12 ชม. B = 4 N HCl ที่ 100°C นาน 6-12 ชม. C = 2 N TFA 121°C นาน 2 ชม. D = 2 N TFA ที่ 121°C นาน 45 นาที E = 2 N TFA ที่ 120°C นาน 10 และ 60 นาที F = 1 N HCl ที่ 100°C นาน 10 ชม. G = 0.5, 1, 2 N H_2SO_4 ที่ 100°C (ไม่ระบุเวลา) H = 2 N H_2SO_4 ที่ 121°C (ไม่ระบุเวลา) I = 2 N HCl ที่ 100°C นาน 2 ชม a = คิดจากเปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด b = deoxyhexose, 6-deoxy-2-O-methylhexose, 2-O-methylhexose, 3-O-methylhexose, glucosamine c = ไม่ได้ตีพิมพ์ d = แสดงเป็นอัตราส่วนโมลาร์ e = 2-O-methylhexose f = Nagakawa และคณะ (1987) ใน Morvan และคณะ (eds.) (1997) g = องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จากการเพาะเลี้ยงอายุน้อย (15 วัน) และการเพาะเลี้ยงอายุมาก (2 เดือน) h = 3-O-methylpentose, glucosamine, galactosamine i = 3-O-methyldeoxyhexose, 4-O-methylhexose, methylhexose, glucosamine, galactosamine

ที่มา : De Philippis และ Vincenzini (1998)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวลำดับ Oscillatoriales

ชนิด	กระบวนการย่อย	น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (อัตราส่วนโมลาร์)												อ้างอิง
		Ara	Fuc	Gal	Glc	Man	Rha	Rib	Xyl	GalA	GlcA	UrA	Others	
Lyngbya confervoides S9g	A	tr	tr	17.8	40.2	3.5	tr	-	tr			38.6	a	Gloaguen และคณะ (1995)
Microcoleus sp. (2 strains)	B	-	+	+	+	+	+	-	-			-	-	Mazor และคณะ (1996)
Oscillatoria amphibia PCC 7105	A	tr	tr	16.0	33.0	21.7	4.5	-	12.3			6.7	b	Gloaguen และคณะ (1995)
Oscillatoria corallinae CJ1	A	5.1	1.7	15.0	29.6	15.6	3.4	-	4.0			24.2	a	Gloaguen และคณะ (1995)
Oscillatoria sp.[c]	C	-	5.4	9.9	18.3	8.0	-[d]	4.7[d]	5.5	1.0	1.0		e	Bender และคณะ (1994)
Phormidium ectocarpi C86	A	-	-	3.1	34.7	23.2	tr	-	8.0			29.9	a	Gloaguen และคณะ (1995)
Phormidium ectocarpi K5	A	tr	tr	12.6	36.6	10.9	1.8	-	7.3			28.7	f	Gloaguen และคณะ (1995)
Phormidium ectocarpi ME3	A	tr	tr	4.1	59.1	8.7	2.7	-	6.5			18.9	-	Gloaguen และคณะ (1995)
Phormidium ectocarpi N182	A	-	tr	4.1	52.1	15.2	-	-	tr			28.7	-	Gloaguen และคณะ (1995)
Phormidium ectocarpi PCC 7375	A	tr	7.8	8.3	25.8	8.1	2.6	-	3.2			41.5	a	Gloaguen และคณะ (1995)
Phormidium foveolarum[g]	D,E,F	1.0	2.0	4.0	8.0	2.0	2.3	-	1.5	+	+		-	Matulewicz และคณะ (1984)
Phormidium foveolarum C52	A	0.6	0.5	3.4	43.0	15.3	1.5	-	5.5			29.4	f	Gloaguen และคณะ (1995)
Phormidium foveolarum MEU	A	1.7	7.0	28.2	37.7	12.0	2.8	-	3.8			0.5	f	Gloaguen และคณะ (1995)
Phormidium minutum D5	A	-	0.9	34.8	33.6	11.2	tr	-	1.1			17.1	f	Gloaguen และคณะ (1995)
Phormidium minutum NB5	A	5.0	-	7.2	32.7	18.0	tr	-	9.5			24.4	f	Gloaguen และคณะ (1995)
Phormidium minutum RT6	A	18.9	6.0	7.4	19.1	12.7	1.1	-	12.0			20.1	b	Gloaguen และคณะ (1995)
Phormidium sp. CCAP1463/4	A	2.1	tr	13.4	49.2	7.1	6.7	-	7.4			13.0	a	Gloaguen และคณะ (1995)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

ชนิด	กระบวนการย่อย	น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (อัตราส่วนโมลาร์)												อ้างอิง
		Ara	Fuc	Gal	Glc	Man	Rha	Rib	Xyl	GalA	GlcA	UrA	Others	
Phormidium sp. CCAP1464/3	A	tr	-	10.5	57.4	4.1	tr	-	1.6			26.1	b	Gloaguen และคณะ (1995)
Phormidium sp.[g]	D,E,F	1.0	2.0	2.0	4.0	2.0	2.5	-	1.5	+	+	9.0[h]	-	Matulewicz และคณะ (1984)
Phormidium sp. J-1	G	-	-	0.5	-	2.0	1.0	-	-			34.0[h]	-	Bar-Or และ Shilo (1987)
Phormidium sp. PNG91	A	2.5	2.1	12.9	30.3	22.0	3.5	tr	13.6			tr	f	Gloaguen และคณะ (1995)
Phormidium sp. 90-14/1	A	tr	5.8	9.4	39.9	29.2	tr	-	9.4			3.0	f	Gloaguen และคณะ (1995)
Spirulina platensis[i]	H	-	0.7	2.7	2.0	tr	0.3	-	1.3	+	+	40.0[h]	l	Filali และคณะ (1993)
Spirulina platensis[m]	I	-	-	+	-	-	+	-	+	-	20.0[h]		n	Tseng และ Zhao (1994)

Ara = arabinose; Fuc = fucose; Gal = galactose; Glc = glucose; Man = mannose; Rha = rhamnose; Rib = ribose; Xyl = xylose; GalA = galacturonic acid; GlcA = glucuronic acid; UrA = uronic acid; + = มี - = ไม่มี ns = ไม่เจาะจง tr = ปริมาณเล็กน้อย

A = 2 N HCl ที่ 100^0 C นาน 2 ชม. B = 3 N HCl ที่ 100^0 C นาน 4 ชม. C = 2 N TFA ที่ 121^0 C นาน 2 ชม. D = 90% กรดอะซีติก E = 72% กรดซัลฟูริก F = 2 N TFA ที่ 95^0 C นาน 16 ชม. G = 2 N TFA ที่ 120^0 C นาน 2 ชม. H = 4 N TFA ที่ 100^0 C นาน 4 ชม. I = 4 N กรดซัลฟูริก ที่ 100^0 C นาน 6 ชม. a = ไม่ทราบชนิดน้ำตาล (อาจเป็นน้ำตาลที่มีหมู่เมทิลเกาะ) b = hexosamine c = การเพาะเลี้ยงที่ไม่ปลอดเชื้อ d = ไม่แน่นอน (อาจจะเป็นไรโบสหรือราฟิโนส) e = ไม่ทราบชนิดน้ำตาลและน้ำตาลที่มีกรดอะมิโนเกาะ f = hexosamine และไม่ทราบชนิดของน้ำตาล (อาจเป็นน้ำตาลที่มีหมู่เมทิลเกาะ) g = พอลิแซ็กคาไรด์จากแคปซูลสกัดด้วยน้ำร้อน ที่ 100^0 C นาน 3 ชม. h = เปอร์เซ็นต์ของคาร์โบไฮเดรททั้งหมด i = พอลิแซ็กคาไรด์จากแคปซูลสกัดด้วยบัฟเฟอร์ ที่ 100^0 C นาน 20 นาที l = ไม่ทราบชนิดของน้ำตาลที่มีหมู่เมทิลเกาะและเป็นกรดยูโรนิคหรือไม่ m = พอลิแซ็กคาไรด์จากแคปซูลสกัดด้วยน้ำ (ได้ 3 fraction ที่มีองค์ประกอบเหมือนกันยกเว้นส่วนหนึ่งที่ไม่พบกรดยูโรนิค) n = ไม่ทราบชนิดน้ำตาล

ที่มา : De Philippis และ Vincenzini (1998)

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวลำดับ Nostocales และ Stigonematales

ชนิด	กระบวนการย่อย	น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (อัตราส่วนโมลาร์)												อ้างอิง
		Ara	Fuc	Gal	Glc	Man	Rha	Rib	Xyl	GalA	GlcA	UrA	Others	
Anabaena cylindrica CCCAP1403/2	A	1.0	-	1.0	5.0	-	1.0	-	4.0	-	4.0		-	Bishop และคณะ (1954)
Anabaena cylindrica	B	-	tr	1.0	8.7	4.7	-	-	4.7			-	-	Dunn และ Wolk (1970)
Anabaena flos-aquae A37	C	-	-	-	88.0	-	-	3.0	39.0	-	1.0		-	Moore และTischer (1964,1965)
Anabaena flos-aquae A37[a]	D	-	-	-	8.0	-	-	-	1.0			-	-	Wang และ Tischer (1973)
Anabaena flos-aquae A37[b]	D	-	-	-	6.0	-	-	1.0	1.0			10.0	-	Wang และ Tischer (1973)
Anabaena sp. C5	E	-	+	+	+	+	-	-	-			51.5[c]	-	Ganta และคณะ (1995)
Anabaena sp. 10C	F	-	1.0	1.0	2.5	1.5	1.0	-	3.1	-	1.7[c]		d	Lama และคณะ (1996)
Cyanospira capsulata ATCC 43193	G	1.0	1.0	-	1.0	1.0	-	-	-	2.0	-		-	Vincenzini และคณะ (1990)
Nostoc calcicola 79WA01	H	1.0	2.8	3.8	5.9	1.7	1.0	-	6.1	3.0	2.8		-	Flaibani และคณะ (1989)
Nostoc commune UTEX584[e]	H	1.6	1.7	6.5	2.0	1.3	1.0	-	2.8	4.0	6.7		-	Flaibani และคณะ (1989)
Nostoc insulare 54.79	ns	22.9	11.1	0.2	53.2	2.9	1.0	-	0.2	3.6	25.3		-	Fischer และคณะ (1997)
Nostoc linckia f. *muscorum*	ns	+	-	+	+	-	+	-	+			+	-	f
Nostoc sp. PCC 7423	I	-	0.5	4.2	10.0	1.7	0.1	-	4.0	-	+	18.8[c]	-	g
Nostoc sp. PCC 7936	I	-	0.6	11.0	10.0	8.0	-	-	-	-	+	51.1[c]	-	g
Nostoc sp. WV2	G	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+		-	De Philippis และคณะ (1995)

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

ชนิด	กระบวนการย่อย	น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (อัตราส่วนโมลาร์)												อ้างอิง
		Ara	Fuc	Gal	Glc	Man	Rha	Rib	Xyl	GalA	GlcA	UrA	Others	
Nostoc sp. 221[b]	L	-	-	-	1.0	-	-	-	1.0	-	1.2		-	Mehta และ Vaidya (1978)
Nostoc sp.2S9B	E	-	1.0	-	2.0	1.0	-	-	-	-	1.0		-	Ganta และคณะ (1995)
Nostoc sp.	ns	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+		i	l
Nostoc sp.	C	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+		-	Moore และ Tischer (1965)
Mastigocladus laminosus	M	+	+	+	+	+	+	-	+			+	-	Morvan และคณะ (1997)

Ara = arabinose; Fuc = fucose; Gal = galactose; Glc = glucose; Man = mannose; Rha = rhamnose; Rib = ribose; Xyl = xylose; GalA = galacturonic acid; GlcA = glucuronic acid; UrA = uronic acid; + = มี - = ไม่มี ns = ไม่เจาะจง tr = ปริมาณเล็กน้อย

A = 2.5 % กรดซัลฟูริค ที่ 97^0 C นาน 24 ชม. B = 2 N กรดซัลฟูริคที่ 110^0 C นาน 1 ชม. C = 1 N กรดซัลฟูริคที่ 100^0 C นาน 6 ชม. D = 1 N กรดซัลฟูริคที่ 100^0 C นาน 2 ชม.

E = 1 N กรดซัลฟูริคที่ 100^0 C นาน 18 ชม. F = 0.5 หรือ 2 N TFA ที่ 80^0 C นาน 16 ชม. G = 2 N TFA ที่ 120^0 C นาน 45 นาที และ 3 ชม. H = 1 N กรดซัลฟูริคที่ 98^0 C นาน 12 ชม.

I = 2 N TFA ที่ 120^0 C นาน 45 นาที L = 2.5 % กรดซัลฟูริค ที่ 100^0 C นาน 24 ชม. M = เมทานอล/1 N กรดไฮโดรคลอริค ที่ 80^0 C นาน 24 ชม. a = มีสภาพเป็นกลาง

b = มีสภาพเป็นกรด c = เปอร์เซ็นต์ของคาร์โบไฮเดรททั้งหมด d = ไม่ทราบว่าเป็นกรดยูโรนิคหรือไม่ e = พอลิแซ็กคาไรด์จากแคปซูลสกัดด้วย 0.1 M EDTA ที่ 22^0 C 24 ชม.

f = Kokyrsta และ Chekoi (1972) ใน Mehta และ Vaidya (1978) g = ไม่ได้ตีพิมพ์ h = สกัดด้วยน้ำร้อน i = ไม่ทราบชนิดน้ำตาล l = Hough และคณะ (1952) ใน Mehta และ Vaidya (1978)

ที่มา : De Philippis และ Vincenzini (1998)

Huang และคณะ (1998) ศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างกลุ่มเซลล์ของ *Nostoc* ทั้ง 3 ชนิดได้แก่ *N. commune, N. sphaeroides* และ *N. flagelliforme* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติและที่ได้จากการเพาะเลี้ยง พบว่าองค์ประกอบหลักของสารพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างกลุ่มเซลล์ของ *Nostoc* ทั้ง 3 ชนิดที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ ได้แก่ กลูโคส ไซโลส และกาแลคโตส ในสัดส่วน 2:1:1 โดยประมาณ ทั้งยังพบว่ามีแมนโนสในระดับต่ำและมีความแปรปรวนระหว่างชนิด และพบว่าเฉพาะใน *N. flagelliforme* เท่านั้นที่มีอะราบิโนส ส่วนองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากอาหารเพาะเลี้ยงเหลวและจากเซลล์สาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยง พบว่ามีความซับซ้อนมากกว่าตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติ และมีความแปรปรวนระหว่างชนิด

2.5.3 ปัจจัยในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว มีลักษณะเป็นแคปซูลหรือเมือกที่ติดกับเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้นั้นน่าจะเกี่ยวกับผิวด้านนอกของชั้นเมือก เมื่อพิจารณาสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยน อาจจะเกิดขึ้นขณะปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ สังเกตใน *C. capsulata* และ *Cyanothece* 16Som2 ความหนาของแคปซูลรอบเซลล์ยังคงมีอยู่เกือบคงที่ตลอดการเจริญเติบโต เนื่องจากมีการสร้างแล้วปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์สู่อาหารเพาะเลี้ยง (Vincenzine และคณะ, 1990 และ De Philippis และคณะ, 1993) ดังนั้นกระบวนการสังเคราะห์และปล่อยพอลิเมอร์เกิดขึ้นเหมือนกันมากที่อัตราเดียวกัน ในทางตรงกันข้ามสาหร่ายสีแดงขนาดเล็ก *Pormidium* และ *Rhodella* มีความหนาของแคปซูลเพิ่มขึ้นเมื่ออายุการเพาะเลี้ยงมากขึ้น (Ramus, 1972 และ Dubinsky และคณะ, 1988)

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ของสาหร่าย *A. halophytica S. platensis* และ *C. capsulata* มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แปรผันโดยตรงกับการผลิตชีวมวล ดังนั้นพอลิเมอร์อาจเป็นเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) (Sudo และคณะ, 1995; Filali และคณะ, 1993; Vincenzini และคณะ, 1990) ในการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch) อัตราจำเพาะของการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์คงที่ (มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อวัน) และยังคงมีแคปซูลหนาตลอดการเพาะเลี้ยง (Vincenzini และคณะ, 1990)

Vincenzini และคณะ (1990) อธิบายกลไกการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์จากการเกิดความสมดุลของกลไกที่ซับซ้อน (complex dynamic equilibium) ระหว่างกระบวนการที่แตกต่างกันของการยืดยาวของทริโคม (trichome elongation) และการงอกของอะคีนีต (akenete germination) การสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์เกี่ยวข้องกับการเกิดแคปซูลโดยตรง ในทางตรงกันข้าม การขาดของทริโคมและอะคีนีตเป็นสาเหตุของการปล่อยพอลิเมอร์ลงสู่อาหารเพาะเลี้ยง

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวชนิดอื่น ๆ ที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในเมทาบอไลต์ระยะทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่น *Cyanothece* BH68K จะปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วงการเจริญสุดท้ายของการเจริญระยะเอ็กโปเนนเชียล (exponential phase) (Redy และคณะ, 1996) ส่วน *Phormidium* J-1 *A. flos-aquae* A37 และ *A. cylindrica* 10C มีผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้เกิดขึ้นขณะเจริญเติบโต โดยมีอัตราผลผลิตสูงสุด เริ่มจาก late exponential หรือ stationary phase (Fattom และ Shilo, 1984; 1985; Moore และ Tischer, 1964; Tischer และ Davis,1971; Lama และคณะ, 1996) ในทางตรงกันข้ามสายพันธุ์ *Nostoc* มีอัตราการสังเคราะห์และการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ในการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น (young culture) (Mehta และ Vaidya, 1978)

สายพันธุ์ต่าง ๆ ของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ในแต่ละวัน ดังตารางที่ 2.4 *C. capsulata* ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 116 มิลลิกรัมต่อลิตรจากบ่อเปิด (open pond) และให้ 144 มิลลิกรัมต่อลิตรในถังหมัก (fermentor) (De Philippis และคณะ, 1991; 1995) ขณะที่สาหร่ายสีแดงขนาดเล็ก *Porphiridium* ปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีหมู่ซัลเฟตเกาะอยู่ด้วยประมาณ 55-75 มิลลิกรัมต่อลิตรในบ่อเปิดขนาด 2.5 ตารางเมตรในแต่ละวัน (Vonshak และคณะ 1985) หรือ 133 มิลลิกรัมต่อลิตรในบ่อเปิดขนาด 1 ตารางเมตร (Arad, 1988) ขณะที่ *Botryococcus braunii* ผลิต 130-145 มิลลิกรัมต่อลิตรในคอลัมน์ขนาด 1 ลิตร (Lupi และคณะ, 1991)

ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยการสังเคราะห์แสงจะให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ต่ำกว่าจุลินทรีย์ขนาดเล็กที่ผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ เช่น *Xanthomonas campestris* สามารถผลิต xanthan gum ได้ 7-10 กรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน (Linton และคณะ, 1991) แต่สาหร่ายมีข้อได้เปรียบบางประการทางเศรษฐศาสตร์และสิ่งแวดล้อม คือ ประการแรกสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวสามารถนำสารตั้งต้นกลับมาใช้ใหม่และสารตั้งต้นมีราคาถูก เนื่องจากสาหร่ายสังเคราะห์แสงได้และหลายสายพันธุ์ที่ตรึงไนโตรเจนได้ ประการที่สอง สาหร่ายหลาย ๆ สายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตในน้ำกร่อยหรือน้ำเสียได้ ประการที่สาม มีความเป็นไปได้ที่จะใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรม ประการสุดท้าย ได้สารประกอบที่มากกว่าหนึ่งชนิด เป็นผลผลิตที่หลากหลายเกิดขึ้นในสาหร่ายขนาดเล็ก (Thepenier และคณะ, 1988)

ตารางที่ 2.4 สายพันธุ์สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในแต่ละวัน

ชนิด	วิธีเพาะเลี้ยง และระยะเวลา (วัน)	ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ละลายน้ำได้ (มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน)	แหล่งอ้างอิง
A. halophytica MN11	ฟลาสก์ 4 ลิตร อายุ 20 วัน	32.0	Sudo และคณะ (1995)
A. nidulans	ฟลาสก์ 3 ลิตร อายุ 21 วัน	20.0	Sanger และ Dugan (1972)
C. minutus B 41.79	ฟลาสก์ 8 ลิตร อายุ 39 วัน	12.7	Fischer และคณะ (1997)
C. minutus B 41.79	ถังหมัก 250 ลิตร อายุ 50 วัน	8.6	Fischer และคณะ (1997)
Cyanothece BH68K	ฟลาสก์ 2 ลิตร อายุ 16 วัน	8.0	Reddy และคณะ (1996)
Cyanothece sp. CA 3	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	19.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. CE 4	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	43.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. CE 9	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	67.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp.CH 1	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	60.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. ET 2	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	38.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. ET 5	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	19.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. IR 20	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	80.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. PE 13	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	62.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. PE 14	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	47.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

ชนิด	วิธีเพาะเลี้ยง และระยะเวลา (วัน)	ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ละลายน้ำได้ (มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน)	แหล่งอ้างอิง
Cyanothece sp. TP5	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	17.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. TP 10	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	27.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. VI 13	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	21.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. VI 22	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	20.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. 16Som2	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 8 วัน	25.0[a]	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. 16Som2	ฟลาสก์ 0.5 ลิตร อายุ 21 วัน	29.0	De Philippis และคณะ (1993)
Synechocystis sp. PCC 6803	ไม่ได้ระบุ อายุ 90 วัน	3.0	Panoff และคณะ (1988)
Synechococcus sp. BG0011	ฟลาสก์ 4 ลิตร อายุ 30 วัน	33.3	Phlips และคณะ (1989)
A. cylindrica 10C	ถังหมัก 1 ลิตร อายุ 21 วัน	15.0	Lama และคณะ (1996)
A. flos-aquae A37	ฟลาสก์ 1 ลิตร อายุ 7 วัน	36.0[b]	Wang และ Tischer (1973)
A. flos-aquae A37	ฟลาสก์ 1 ลิตร อายุ 12 วัน	20.0	Tischer และ Davis (1971)
A. flos-aquae A37	คอลัมน์ไพเร็ก 2 ลิตร อายุ 12 วัน	46.4	Moore และ Tischer (1964)
Anabaena sp. C5	ฟลาสก์ 10 ลิตร อายุ 30 วัน	4.7	Ganta และคณะ (1995)
C. capulata ATCC 43193	บ่อเปิด 6 ลิตร อายุ 30 วัน	116.0	De Philippis และคณะ (1991)
C. capulata ATCC 43193	ถังหมัก 3 ลิตร อายุ 21 วัน	144.0	De Philippis และคณะ (1995)

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

ชนิด	วิธีเพาะเลี้ยง และระยะเวลา (วัน)	ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ละลายน้ำได้ (มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน)	แหล่งอ้างอิง
N. insulare 54.79	ฟลาสก์ 8 ลิตร อายุ 52 วัน	47.0	Fischer และคณะ (1997)
N. insulare 54.79	ถังหมัก 12 ลิตร อายุ 70 วัน	18.4	Fischer และคณะ (1997)
Nostoc sp.	คอลัมน์ไพเร็ก 2 ลิตร อายุ 12 วัน	34.6	Moore และ Tischer (1964)
Nostoc sp. 221	ฟลาสก์ 0.25 ลิตร อายุ 20 วัน	45.4	Mehta และ Vaidya (1978)
Nostoc sp. 2S9B	ฟลาสก์ 10 ลิตร อายุ 30 วัน	1.4	Ganta และคณะ (1995)

a = คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ b = การเจริญที่มีการเติมกลูโคส

ที่มา : De Philippis และ Vincenzini (1998)

การกระตุ้นการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เหมาะสม ซึ่งการศึกษาส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับผลของการขาดไนโตรเจน แต่อย่างไรก็ตามการตอบสนองของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวบางสายพันธุ์ไม่ได้มีผลต่อภาวะขาดไนโตรเจน เช่น *A. nidulan* และ *Cyanothece* หลายชนิด ปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ภายใต้ภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด (Sangar และ Dugan,1972; De Philippis และคณะ 1993; 1998) *A. cylindrica* และ *A. flos-aquae* ผลิตพอลิเมอร์ออกมามากขึ้นกับแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ (Lama และคณะ, 1996; Tischer และ Davis, 1971) ส่วน *Synechocystis Cyanothece* บางสายพันธุ์ *C. capsulata* และ *Phormidium* การขาดไนโตรเจนไม่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แล้วปล่อยออกนอกเซลล์ (Panoff และคณะ, 1988; De Philippis และคณะ, 1998; De Philippis และคณะ, 1996; Fattom และ Shilo, 1984)

ในบางกรณีผลจากการขาดสารอาหารหรือพารามิเตอร์ในการเจริญมีผลต่อการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น ปริมาณแสง ความเข้มข้นของเกลือ ความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น *Cyanothece* 16 Som2 มีการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์เพิ่มขึ้นภายใต้การขาดฟอสฟอรัสแต่ไม่มีผลกับการขาดแมกนีเซียม แคลเซียมหรือโพแทสเซียม รวมทั้งเกลือที่มีความเข้มข้นถึง 2 โมลาร์ (De Philippis และคณะ, 1993) *Phormidium* J-1 เลี้ยงในสภาวะอาหารที่ขาดแคลเซียมแต่ไม่ขาดฟอสฟอรัสหรือซัลเฟต ปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติสมานตะกอน (bioflocculant) กับอนุภาคของดิน (Fattom และ Shilo, 1984) *C. capsulata* ขาดแมกนีเซียมแต่ไม่ขาดแคลเซียมหรือฟอสเฟต จะกระตุ้นการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ (De Philippis และคณะ, 1991) *A. cylindrica* 10C หากขาดฟอสฟอรัส หรือมีการเติมอะซิเตท (acetate) โพรไพโอเนท (propionate) วาเลอเรท (valerate) ซิเตรท (citrate) หรือกลูโคสลงในอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้ลดผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ (Lama และคณะ, 1996)

ส่วนอิทธิพลของแสงต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ ศึกษาจาก *C. capsulata* และ *Synechococcus* BG0011 เพาะเลี้ยงภายใต้แสงต่อเนื่อง (continuous light) ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์มากกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้วงจรแสงสว่าง-มืด (light-dark cycle) (De Philippis และคณะ, 1995; Phlips และคณะ, 1989) ส่วน *Nostoc* PCC 7413 เพาะเลี้ยงแบบกะ ในสูตรอาหาร BG-11 ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบและให้ความเข้มแสงสูง 160 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่ามีการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ถึง 1.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบและให้ความเข้มแสงต่ำที่ 70 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (Otero และ Vincenzine, 2003)

2.5.4 คุณสมบัติและความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวส่วนใหญ่ยังไม่ได้มีการศึกษาถึงลักษณะทางกายภาพ โครงสร้างและคุณสมบัติในด้านความหนืด (rheological) เพื่อกำหนดคุณภาพที่เหมาะสมสำหรับใช้ในทางอุตสาหกรรมและเป็นแนวทางในการนำพอลิเมอร์ไปประยุกต์ใช้ (Sutherland, 1994; 1996; Atkins, 1986; Crescenzi, 1994; Roberts, 1995 และ Rehm และ Valla, 1997) ลักษณะส่วนใหญ่ที่น่าสนใจทางอุตสาหกรรมของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ สรุปได้ดังนี้ คือ ความหนืดของสารละลาย ความสามารถเกิดรูปเจลที่มีความยืดหยุ่นได้ดี มีอิมัลชั่นที่เสถียร เป็นต้น รวมถึงโครงสร้างและองค์ประกอบมวลโมเลกุลที่สูง (Shepherd และคณะ, 1995) ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 มวลโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว

ชนิด	มวลโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	วิธีการวิเคราะห์	อ้างอิง
C. minutus B 41.79	1200-1600	GPC	Fischer และคณะ (1997)
Oscillatoria sp.	200	GPC	Bender และคณะ (1994)
Phormidium J-1	1200	GPC	Bar-Or และ Shilo (1987)
S. platensis	81-98	GPC	Tseng และ Zhao(1994)
A. circularis PCC 6720	>1200	GPC	Bar-Or และ Shilo (1987)
C. capsulata ATCC 43193	1400-1900	LALLS; GPC	Vincenzini และคณะ (1993) Cesàro และคณะ (1990)
N. insulare 54.79	540-1300	GPC	Fischer และคณะ (1997)

GPC = gel permeation chromatography; LALLS = low angle laser light scattering

ที่มา : De Philippis และ Vincenzini (1998)

ลักษณะสำคัญอีกประการหนึ่งที่ช่วยสนับสนุนความหนืดของสารละลาย คือ คุณสมบัติทางเคมีและเคมีกายภาพของพอลิเมอร์ที่มีเปปไทด์มากมาย (polypeptide moiety) หรือส่วนที่ไม่ใช่แซ็กคาไรด์ เช่น สารอินทรีย์ (กลุ่มอะซีติล ไพรูวิล ซัคซินิล) หรือสารอนินทรีย์ (กลุ่มซัลเฟตหรือฟอสเฟต) (Sutherland, 1994) ดังตารางที่ 2.6

Marra และคณะ (1990) ศึกษา *C. capsulata* พบว่ามีองค์ประกอบของกรดอะมิโนอยู่มาก ได้แก่ ไกลซีน อะลานีน วาลีน ลิวซีน ไอโซลิวซีน ฟีนิลอะลานีน แสดงถึงความเป็น hydrophobic ของโมเลกุลขนาดใหญ่ ปกติจะมีปริมาณกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 1-3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ การเอาโปรตีนออกจากพอลิเมอร์ จะลดความหนืดของสารละลาย

Guntar และคณะ (1995) ศึกษา *Nostoc* sp. 2S9B สกัดเอาโปรตีนออกจากพอลิเมอร์จะทำให้ลดความสามารถของการเกาะยึด (adhesive capacity) ของพอลิแซ็กคาไรด์กับรากข้าวสาลี (*Triticum vulgare* L.) ดังนั้นโปรตีนจึงมีความสำคัญต่อสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ตรึงไนโตรเจนได้ในการเกาะกับรากพืช

แต่เดิมมีการศึกษาพบว่าเฉพาะเซลล์ยูคาริโอตที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปล่อยออกนอกเซลล์และมีหมู่ซัลเฟตเกาะอยู่ด้วย ซึ่งหมู่ซัลเฟตเกิดขึ้นใน กอลไจ แอปพาราทัส (Golgi apparatus) (Ramus และ Groves, 1972; Evans และคณะ, 1974; Ramus และ Robins, 1975; Gudin และ Thepenier, 1986) แต่ใน 10 ปีที่ผ่านมาความคิดนี้ได้เปลี่ยนไปเนื่องจากมีสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวหลายชนิดที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ แยกได้จากทั้งแหล่งน้ำจืดและแหล่งน้ำเค็มหรือเค็มมาก พบว่ามีหมู่ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ ดังตารางที่ 2.6 กลุ่มฟอสเฟตจะพบในพอลิเมอร์ที่ได้จากแบคทีเรีย และในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้จึงเป็นที่น่าสนใจเนื่องจากมีความสำคัญทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา (Sutherland, 1990) ยับยั้งเชื้อไวรัส (Hasui และคณะ, 1995 และ Witvrouw และ De Clercq, 1997) และเนื้องอก (Itoh และคณะ, 1993 และ Riou และคณะ, 1996) นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการเกิดการสมานตะกอน (flocculating) ของอนุภาคดิน (Bar-or และ Shilo; 1987) สารอินทรีย์กลุ่มไพรูวิล และอะซีติล (ตารางที่ 2.6) นี้จะพบบ่อย ขณะที่กลุ่มซัคซินิล พบเฉพาะในแคปซูลพวกสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ได้จากน้ำพุร้อน (Gloaguen และคณะ, 1996) การที่มีสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์ ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์มีความซับซ้อนและหลากหลาย พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความเข้มของประจุสูง เช่น มีกรดยูโรนิค ซัลเฟตหรือฟอสเฟต ไพรูวิล คีตัล (ketal) สามารถจับกับโลหะที่เป็นพิษได้ซึ่งใช้ในการบำบัดน้ำเสีย (Lem และ Glick, 1985; Kaplan และคณะ, 1987; Bender และคณะ, 1994; Gloaguen และคณะ, 1996)

ตารางที่ 2.6 กลุ่มแทนที่และปริมาณโปรตีนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว

ชนิด	กลุ่มแทนที่ (ร้อยละน้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้)			โปรตีน (ร้อยละน้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้)	อ้างอิง
	อะซีเตท	ไพรูเวท	ซัลเฟต		
A. halophytica MN11	nd	nd	11.9	10.3	Sudo และคณะ (1995)
C. minutus B 41.79	nd	nd	nd	3.2	Fischer และคณะ (1997)
Cyanothece sp. CA 3	0.62	2.72	tr	nd	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. CE 4	0.66	0.36	tr	nd	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. CE 9	-	1.17	tr	nd	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. CH 1	0.52	1.04	tr	nd	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. ET 2	4.2	2.28	-	nd	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. ET 5	2.5	0.39	-	nd	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. IR 20	0.75	2.11	+	nd	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. PCC 8801	1.40	0.50	nd	nd	a
Cyanothece sp. PE 13	-	2.08	tr	nd	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. PE 14	0.32	0.17	tr	nd	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. TI 4	0.98	1.37	tr	nd	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. TP 5	-	1.10	+	nd	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. TP 10	nd	3.86	+	nd	De Philippis และคณะ (1998)

ตารางที่ 2.6 (ต่อ)

ชนิด	กลุ่มแทนที่ (ร้อยละน้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้)			โปรตีน (ร้อยละน้ำหนักแห้ง พอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้)	อ้างอิง
	อะซีเตท	ไพรูเวท	ซัลเฟต		
Cyanothece sp. VI 13	-	0.34	+	nd	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. VI 22	0.55	0.23	+	nd	De Philippis และคณะ (1998)
Cyanothece sp. 16Som2	-	-	+	1.4	De Philippis และคณะ (1993,1998)
Gloeothece sp. PCC 6909	nd	nd	13.8	6.2	Tease และคณะ (1991)
M. aeruginosa K3A	nd	nd	nd	+	b
M. flos-aquae C3-40	nd	nd	nd	-	Plude และคณะ (1991)
Synechocystis sp. PCC 6714[c]	nd	-	1.2	20.0	Panoff และคณะ (1988, 1989)
Synechocystis sp. PCC 6803[c]	nd	-	1.0	40.0	Panoff และคณะ (1988, 1989)
Microcoleus sp. (2 strains)	nd	nd	nd	6.0	Mazor และคณะ (1996)
Phormidium sp.	nd	nd	-	13.0	Matulewicz และคณะ (1984)
Phormidium sp. J-1	nd	nd	1.6	4.4	Bar-Or และ Shilo (1987)
S. platensis[d]	nd	nd	5.0	nd	Filali และคณะ (1993)
A. circularis PCC 6720	nd	nd	-	-	Bar-Or และ Shilo (1987)
A. cylindrica	nd	nd	nd	5.0[e]	Dunn และ Wolk (1970)
A. cylindrica 10C	nd	nd	+	nd	Lama และคณะ (1996)

ตารางที่ 2.6 (ต่อ)

ชนิด	กลุ่มแทนที่ (ร้อยละน้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้)			โปรตีน (ร้อยละน้ำหนักแห้ง พอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้)	อ้างอิง
	อะซีเตท	ไพรูเวท	ซัลเฟต		
Anabaena sp. C5	-	-	-	0.6	Gantar และคณะ (1995)
C. capsulata ATCC 43193	-	1.5	-	2.0	Vincenzini และคณะ (1990, 1990)
N. calcicola 79WA01	nd	nd	nd	7.9	Flaibani และคณะ (1989)
N. commune UTEX584	nd	nd	nd	16.7	Flaibani และคณะ (1989)
N. insulare 54.79	nd	nd	nd	3.5	Fischer และคณะ (1997)
Nostoc sp. PCC 7423	12.9	3.2	nd	nd	a
Nostoc sp. PCC 7936	3.1	5.9	nd	nd	a
Nostoc sp. 2S9B	-	-	-	2.8	Ganta และคณะ (1995)

nd = ไม่ได้ตรวจสอบ + = พบ (ไม่ระบุปริมาณ) - = ไม่พบ tr = มีปริมาณเล็กน้อย

a = ไม่ได้ตีพิมพ์ b = Nakagawa และคณะ (1987) ใน Plude และคณะ (1991) c = องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จากการเพาะเลี้ยงแบบกะอายุน้อย (15 วัน) และอายุมาก (2 เดือน)

d = พอลิแซ็กคาไรด์จากแคปซูลสกัดด้วยบัฟเฟอร์ที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที e = มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ

ที่มา : De Philippis และ Vincenzini (1998)

กลุ่มที่มีประจุในพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ มีความสามารถจับกับโมเลกุลของน้ำ จึงเกิดความหนืดขึ้นในสารละลาย *Synechococus* BG0011 ปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกมา ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีความหนืดเพิ่มขึ้นขณะเจริญเติบโต (Phlips และคณะ, 1989) ในทางตรงกันข้าม *C. capsulata* มีแคปซูลรอบทรัยโคมจะให้ความหนืดอย่างมีนัยสำคัญของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะการเจริญในช่วงแรก (De Philippis และคณะ, 1991)

การศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ในปัจจุบันยังมีน้อย ทำให้ขาดข้อมูลทางเทคโนโลยีและการนำพอลิเมอร์ไปประยุกต์ใช้ จึงทำให้มีการจดสิทธิบัตรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว มีน้อย ดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 สิทธิบัตรของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้

ปี คศ.	เลขที่ สิทธิบัตร	ประเทศ	เนื้อหา	สายพันธุ์
1989	4,826,624	สหรัฐอเมริกา	ไบโออิมัลซิไฟเออร์ (bioemulsifyer)	*Phormidium* spp.
1990	4,894,161	สหรัฐอเมริกา	สมานตะกอน (bioflocculant) ของอนุภาคดิน	*Phormidium* spp.
1992	4,370,098	ญี่ปุ่น	ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์อย่างต่อเนื่องบนอาหารวุ้น (agar-agar substitute)	*Spirulina platensis*
1993	5,049,491	ญี่ปุ่น	ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณสูง	*Aphanocapsa halophytica*
1993	5,250,201	สหรัฐอเมริกา	ดันน้ำมันปิโตรเลียมขึ้นจากชั้นใต้ดิน	*Phormidium* spp.
1994	6,040,880	ญี่ปุ่น	ผลิตเครื่องสำอาง ทำให้ผิวขาว มีความเสถียรและความปลอดภัย	*Aphanocapsa* spp.

ที่มา : Borowitzka (1998)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 แหล่งสาหร่ายเห็ดลาบ

สาหร่ายเห็ดลาบ (*N. commune*) แยกจากตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติของป่าดูนลำพัน อ.นาเชือก จ. มหาสารคาม

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี	ของ Agilent Technologies	รุ่น 6890 N
เครื่องตรวจสอบ (Mass Selective Detector)	ของ Agilent Technologies	รุ่น 5973 N
เครื่องหมุนเหวี่ยง	ของ Sorvall	รุ่น SS-33
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	ของ Mettler Toledo	รุ่น MP 225
เครื่องชั่งแบบละเอียด	ของ Sartorius	รุ่น LA 230S
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	ของ Hewlett Packard	รุ่น 8453
เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน	ของ Büchi	รุ่น R-124
เครื่องแห้งแข็ง (freezed drier)	ของ Edwards	รุ่น EF 03
หม้อนึ่งความดัน	ของ Tomy	รุ่น SS-325
ตู้อบไมโครเวฟ	ของ Sanyo	รุ่น EM-N2
ตู้ถ่ายเชื้อ	ของ Bioharzard	รุ่น BHA 36M
ตู้อบเครื่องแก้ว	ของ Heraeus	รุ่น 5060EK
กล้องจุลทรรศน์	ของ Olympus	รุ่น BH-2
โถระเหยแห้งสุญญากาศ	ของ BEL-ART	

ตาข่ายกรองแพลงก์ตอน (plankton net) ขนาด 108 ไมครอน

ถังคาร์บอย (carboy) สำหรับเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียขนาดความจุ 10 ลิตร ของ Nalgene

จานเพาะเลี้ยงแก้วขนาด 150x25 มิลลิเมตร ของ Anumbra

จานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 90x10 มิลลิเมตร ของ Sterilin

ถุงไดอะไลซิส (cellulose tube 12000-14000 molecular cut off) ของ VISKASE

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่าง ๆ ได้แก่ บีกเกอร์ ปิเปต กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ ขวดวัดปริมาตร หลอดทดลอง แท่งแก้วคน กรวยกรอง กรวยแยก กระดาษกรอง Whatman (GFC) ผ้ากอซ กระดาษอลูมิเนียม หลอดปั่นเหวี่ยง

3.3 สารสำหรับเตรียมอาหารและเคมีภัณฑ์

กรดบอริก (H_3BO_3) ของ Merck Co.,Ltd.

(Borric acid)

กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ของ Lab – Scan Asia Ltd.

(Sulfuric acid)

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของ Merck Co.,Ltd.

(Sodium nitrate)

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ของ Merck Co.,Ltd.

(Sodium carbonate)

โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) ของ Merck Co.,Ltd.

(Sodium molybdate dihydrate)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของ Merck Co.,Ltd.

(Sodium chloride)

ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSo_4 \cdot 7H_2O$) ของ Merck Co.,Ltd.

(Zinc sulfate heptahydrate)

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ของ Merck Co.,Ltd.

(Calcium chloride)

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของ Merck Co.,Ltd.

(Calcium chloride dihydrate)

โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) ของ Analyticals Carlo Erba

(Cobaltouse choloride hexahydrate)

โคบอลต์ไนเตรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) ของ Fluka chemical Co.,Ltd.

(Cobalt (II) nitrate hexahydrate)

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSo_4 \cdot 5H_2O$) ของ Merck Co.,Ltd.

(Coppersulphate pentahydrate)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของ Merck Co.,Ltd.

(di-Potassium hydrogen phosphate (anhydrous))

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) ของ Merck Co.,Ltd.

(di-Potassium hydrogen phosphate trihydrate)

ไตรฟลูออโรอะซิติค แอซิด ($C_2HF_3O_2$) ของ Fluka chemical Co.,Ltd.

(Trifluoroacetic acid : TFA)

ไตรเมทิลคลอโรไซเลน (C_3H_9ClSi) ของ Fluka chemical Co.,Ltd.

(Trimethylchlorosilane)

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของ Merck Co.,Ltd.

(Magnesium sulphate heptahydrate)

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 2H_2O$) ของ Merck Co.,Ltd.

(Magnesium sulphate dihydrate)

แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) ของ Farmitalia Carlo Erba

(Manganese (II) chloride)

ไพริดีน ($C_5H_5N_5$) ของ Merck Co.,Ltd.

(Pyridine)

เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ของ Fluka Chemical Co.,Ltd.

(Ferrous sulfate heptahydrate)

เอทิลีนไดเอมีนเตตร้าอะซีติก แอซิด ของ Fluka Chemical Co.,Ltd.

($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$)

(Ethylene diamine tetraacetic acid: EDTA)

ไฮดรอกซิลแอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_2OH \cdot HCl$) ของ Ajex Finechem

(Hydroxylammonium chloride)

เฮกซะเมทิลไดซิลาเซน ($C_6H_{19}NSi_2$) ของ Fluka Chemical Co.,Ltd.

(Hexamethyldisilazane : HMDS)

แมนนิทอล $CH_2(OH)(CHOH_4)CH_2OH$ ของ Anala R

D (-) Manitol

กาแลคโตส ($C_6H_{12}O_6$) ของ Sigma Chemical Co.,Ltd.

D (-) Galactose (Mr 180.2)

ฟรุกโตส ($C_6H_{12}O_6$) ของ Sigma Chemical Co.,Ltd.

D (-) Fructose (Mr 180.2)

แมนโนส ($C_6H_{12}O_6$) ของ Fluka Chemical Co.,Ltd.

D (-) Mannose (Mr 180.2)

กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) ของ Sigma Chemical Co.,Ltd.

D (-) Glucose anhydrous (Mr 180.2)

กรดกลูคิวโรนิค ($C_6H_{10}O_7$) ของ Sigma Chemical Co.,Ltd.

D (-) Glucuronic acid (Mr 194.1)

กรดกาแลคทิวโรนิค ($C_6H_{10}O_7 \cdot H_2O$) ของ Fluka Chemical Co.,Ltd.

D (+) Galacturonic acid (Mr 212.16)

ไซโลส ($C_5H_{10}O_5$) ของ Sigma Chemical Co.,Ltd.

D (+) Xylose (Mr 150.1)

ฟูโคส ($C_6H_{12}O_5$) ของ Nacalai tesque, inc.

L (-) Fucose (Mr 164.16)

ไรโบส ($C_5H_{10}O_5$) ของ Sigma Chemical Co.,Ltd.

D(-) Ribose (Mr 150.1)

แรมโนส ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) ของ Fluka Chemical Co.,Ltd.

L (+) Rhamnose monohydrate (Mr 182.18)

อะราบิโนส ($C_5H_{10}O_5$) ของ Sigma Chemical Co.,Ltd.

D (-) Arabinose (Mr 150.1)

3.4 วิธีการวิจัย

3.4.1 การเตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์

3.4.1.1 ตัวอย่างสาหร่ายจากแหล่งธรรมชาติ

เก็บ *N. commune* จากแหล่งธรรมชาติ ป่าดูนลำพัน อ.นาเชือก จ.มหาสารคาม ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง ล้างเซลล์ให้สะอาดปราศจากทรายด้วยน้ำเกลือ น้ำประปาและล้างน้ำสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปทำแห้งแข็ง (freezed dried)

3.4.1.2 ตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในอาหารเหลว

นำเซลล์สาหร่าย *N. commune* ที่แยกได้สายพันธุ์เดี่ยวแล้ว (ปราศจากรา โปรโตซัวและสาหร่ายสายพันธุ์อื่น ๆ) จากศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เพาะเลี้ยงในอาหาร BGA (ในสภาพการตรึงไนโตรเจน) และ BG-11 (ในสภาพที่ไม่มีการตรึงไนโตรเจน) (ภาคผนวก ก) ในถังคาร์บอย (carboy) ปริมาตร 8 ลิตร บ่มภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ด้วยอัตราการไหล 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 20 วัน จะได้สาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตในลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ทรงกลม ห่อหุ้มของเหลวหนืดอยู่ภายในกลุ่มเซลล์ แยกตัวเซลล์จากอาหารเพาะเลี้ยง (culture broth) โดยกรองผ่านตาข่ายแพลงก์ตอนขนาด 108 ไมครอน ล้างเซลล์ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แบ่งกลุ่มเซลล์สาหร่ายออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นกลุ่มเซลล์ทรงกลมที่มีของเหลวหนืดภายในนำไปทำแห้งแข็ง ส่วนที่สอง นำกลุ่มเซลล์สาหร่ายจากการเพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหาร จิ้มด้วยเข็มเพื่อให้กลุ่มเซลล์ที่ห่อหุ้มของเหลวหนืดแตกก่อนปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จะได้ของเหลวหนืดและส่วนของเซลล์สาหร่าย แยกทั้งสองส่วนด้วยการกรองผ่านตาข่ายแพลงก์ตอนขนาด 108 ไมโครเมตร แล้วนำส่วนที่เป็นเฉพาะของเหลวหนืด ทำแห้งแข็ง ส่วนอาหารเพาะเลี้ยง นำไปกรองผ่าน glass-fiber filter ด้วยกระดาษกรอง Whatman (เบอร์ GFC) แล้วนำมาลดปริมาตรลงด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้เหลือปริมาตรประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำแห้แข็ง

3.4.1.3 ตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายบนอาหารวุ้น

เขี่ยเซลล์สาหร่าย *N. commune* ที่แยกได้สายพันธุ์เดี่ยวแล้ว จาก ศจล. วว. ลงบนอาหารวุ้น BGA BGA+N (BGA ดัดแปลงโดยการเติม $NaNO_3$) BG-11 และ BG-11-N (BG-11 ดัดแปลงโดยไม่เติม $NaNO_3$) (ภาคผนวก ก) ในจานเพาะเลี้ยงแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร สูง 25 มิลลิเมตร ปิดขอบจานเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม บ่มภายใต้แสงไฟฟลูออเรส

เซนต์ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน จะได้เซลล์ที่มีการเจริญเติบโตในลักษณะเป็นก้อนวุ้นคล้ายเยลลี่ ล้างเซลล์ทั้งหมดให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไปทำแห้งแข็ง ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ที่อยู่บนอาหารวุ้น นำไปทำแห้งแข็ง เช่นกัน

3.4.2 การตรวจสอบเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากสาหร่าย

จากส่วนของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นที่มีแหล่งไนโตรเจน ในสูตรอาหาร BGA+N และ BG-11 พบว่ามีการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย จึงเป็นข้อสงสัยว่าสารพอลิแซ็กคาไรด์อาจมาจากการปล่อยออกนอกเซลล์แบคทีเรีย จึงได้ทำการทดสอบ โดยเขี่ยสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร BGA-NaCl (BGA ดัดแปลงโดยไม่เติมโซเดียมครอไรด์) BG-11 และ NA (Nutrient Agar) ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร สูง 10 มิลลิเมตร แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วสังเกตผลทุกวัน

3.4.3 การศึกษาเบื้องต้นอัตราการเจริญของสาหร่ายเห็ดลาบ

ชั่งสาหร่ายเห็ดลาบหนัก 0.2 กรัมน้ำหนักสด นำมาเพาะเลี้ยงโดยการเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารวุ้น BGA BGA+N (ดัดแปลงโดยการเติม $NaNO_3$) BG-11 และ BG-11-N (BG-11 ดัดแปลงโดยไม่เติม $NaNO_3$) ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร สูง 10 มิลลิเมตร ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างสาหร่ายทุกวัน โดยนำมวลสาหร่ายที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ผึ่งมวลให้แห้งน้ำ จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักสด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.4 การศึกษาเบื้องต้นสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ออกจากเซลล์ กลุ่มเซลล์ของสาหร่าย ส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ อาหารเพาะเลี้ยง และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ (Huang และคณะ, 1998)

3.4.4.1 การสกัดด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซนต์

นำพอลิแซ็กคาไรด์แห้งจากรูปแบบที่แตกต่างกัน คือ แผ่นสาหร่ายจากธรรมชาติ จากกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะเป็นก้อนวุ้นคล้ายเยลลีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นจากกลุ่มเซลล์ทรงกลมที่มีของเหลวหนืดภายใน จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในของกลุ่มเซลล์สาหร่าย ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว และจากอาหารเพาะเลี้ยงเหลว มาสกัดด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยใช้เอทานอล 40 มิลลิลิตรต่อกรัมสาหร่ายแห้งจากแหล่งธรรมชาติและ 100 มิลลิลิตรต่อกรัมแห้งจากกลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงและจากส่วนเฉพาะ

ของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงใช้เอทานอล 40 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์ นำมาสกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้เวลาในการสกัด 3 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ กวนตลอดเวลาที่สกัดแล้วกรองสารละลายผ่าน glass-fiber filters นำสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้งหมดมารวมกัน หาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956) (ภาคผนวก ข) จากนั้นทำไดอะไลซ์ ในน้ำกลั่น 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส นำไปทำแห้งแข็ง

3.4.4.2 การสกัดด้วยน้ำร้อน

วิธีการสกัดเหมือนกับข้อ 3.4.4.1 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็นน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำร้อน 100 มิลลิลิตรต่อกรัมสาหร่ายแห้ง ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ ที่ทำแห้งแข็ง ใช้น้ำร้อน 100 มิลลิลิตรต่อกรัมพอลิแซ็กคาไรด์แห้ง

3.4.4.3 การสกัดด้วย EDTA 0.1โมลาร์

วิธีการสกัดเหมือนกับข้อ 3.4.4.1 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น EDTA 0.1 โมลาร์ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้ EDTA 40 มิลลิลิตรต่อกรัมสาหร่ายแห้ง

3.4.5 การเตรียมสารมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลใช้วิธีสารมาตรฐานภายใน (internal standard) โดยใช้ แมนนิทอล (manitol) เป็นสารมาตรฐานภายใน

สูตรที่ 1 สำหรับวิเคราะห์น้ำตาล 9 ชนิด ได้แก่ ฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค (ดัดแปลงจาก Sweeley และคณะ, 1963)

เตรียม stock solution โดยชั่งแมนนิทอล 10 มิลลิกรัม เติม 2 มิลลิลิตร ไซลิเลติง เอเจนต์ (sililating agent ในอัตราส่วนของ เฮกซะเมทิลไดซิลาเซน : ไตรเมทิลคลอโรไซเรน :ไพริดีน เท่ากับ 2 : 1 : 10) ให้ความร้อนเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ ด้วยการนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จะได้ความเข้มข้น $5x10^3$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งน้ำตาลมาตรฐาน ฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค อย่างละ 1 มิลลิกรัมลงในแต่ละขวด พร้อมทั้งชั่งน้ำตาลดังกล่าวอย่างละ 1 มิลลิกรัม ผสมลงในขวดเดียวกัน จากนั้นเติม 1 มิลลิลิตร ไซลิเลติง เอเจนต์ ให้ความร้อนด้วยการนึ่งในหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

สูตรที่ 2 สำหรับวิเคราะห์น้ำตาลอะราบิโนสและแรมโนส

(ดัดแปลงจาก Morvai และคณะ, 1991 และ Molnàr-Perl และ Horvàth, 1997)

เตรียม stock solution ชั่งแมนนิทอล 10 มิลลิกรัม เติม 1 มิลลิลิตร ไพริดีน (ที่มี 2.5 กรัม ไฮดรอกซิลแอมโมเนียมคลอไรด์ ใน 100 มิลลิลิตร) ให้ความร้อนด้วยการนึ่งในหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม 0.9 มิลลิลิตร เฮกซะเมทิลไดซิลาเซน และ 0.1 มิลลิลิตร กรดไตรฟลูออโรอะซิติก ให้ความร้อนด้วยการนึ่งในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จะได้ความเข้มข้น $5x10^3$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งน้ำตาลมาตรฐาน อะราบิโนสและแรมโนส อย่างละ 1 มิลลิกรัมลงในแต่ละขวด พร้อมทั้งชั่งน้ำตาลดังกล่าวอย่างละ 1 มิลลิกรัม ผสมในขวดเดียวกัน เติม 1 มิลลิลิตร ไพริดีน (ที่มี 2.5 กรัม ไฮดรอกซิลแอมโมเนียมคลอไรด์ ใน 100 มิลลิลิตร) ให้ความร้อนด้วยการนึ่งในหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม 0.9 มิลลิลิตร เฮกซะเมทิลไดซิลาเซน และ 0.1 มิลลิลิตร กรดไตรฟลูออโรอะซิติก ให้ความร้อนด้วยการนึ่งในหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.4.6 การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาล

3.4.6.1 วิเคราะห์น้ำตาล 9 ชนิด (ดัดแปลงจาก Sweeley และคณะ, 1963)

ชั่งสารตัวอย่างที่บดละเอียด 5 มิลลิกรัม เติม 0.5 มิลลิลิตร 6 โมลาร์ เมทานอล ในกรดไฮโดรคลอริก ให้ความร้อนเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ด้วยการนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม 1 มิลลิลิตร ไซลิเลติง เอเจนต์ นึ่งในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที กรองสารตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman (GFC)

3.4.6.2 วิเคราะห์น้ำตาลอะราบิโนสและแรมโนส

(ดัดแปลงจาก Morvai และคณะ, 1991 และ Molnàr-Perl และ Horvàth, 1997)

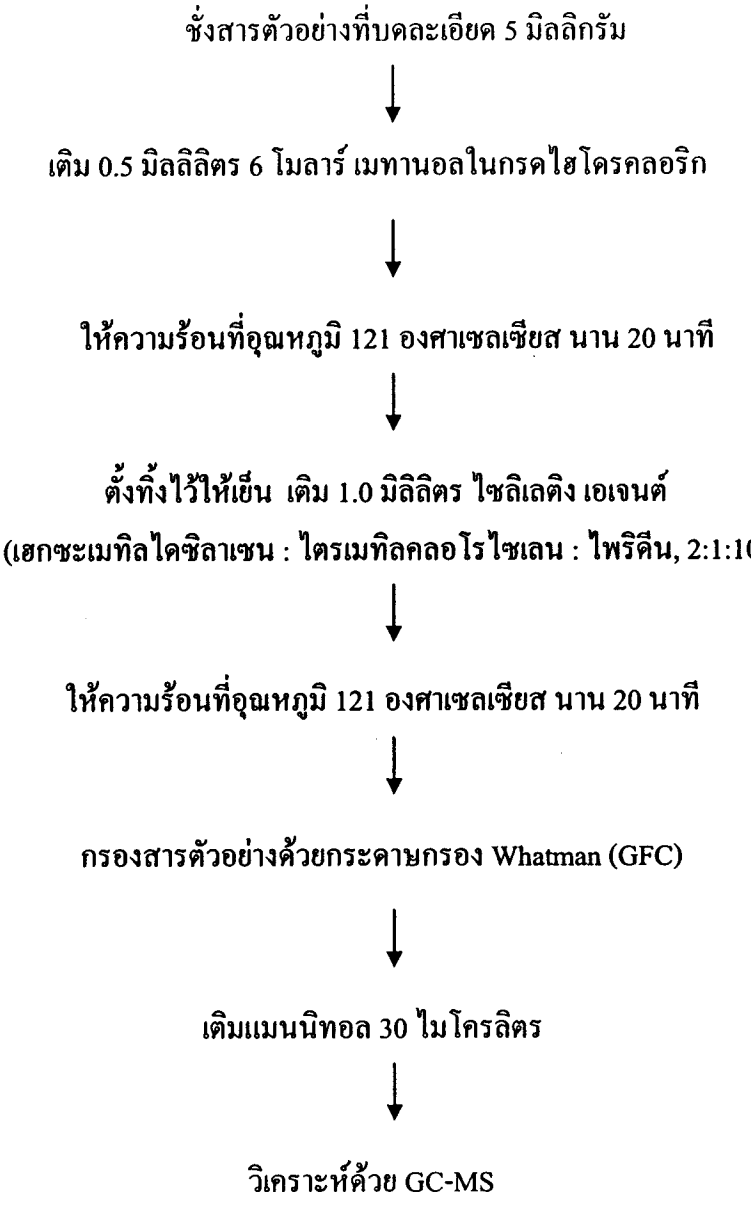
ชั่งสารตัวอย่างที่บดละเอียด 5 มิลลิกรัม เติม 0.5 มิลลิลิตร 6 โมลาร์ เมทานอล ในกรดไฮโดรคลอริก ให้ความร้อนด้วยการนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม 0.5 มิลลิลิตร ไพริดีน (ที่มี 2.5 กรัม ไฮดรอกซิลแอมโมเนียมคลอไรด์ ใน 100 มิลลิลิตร) นึ่งในหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม 0.9 มิลลิลิตร เฮกซะเมทิลไดซิลาเซน และ 0.1 มิลลิลิตร กรดไตรฟลูออโรอะซิติก นึ่งในหม้อนึ่งความดันอีกครั้งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที กรองสารตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman (GFC)

3.4.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลด้วยแก๊สโครมาโทรกราฟี

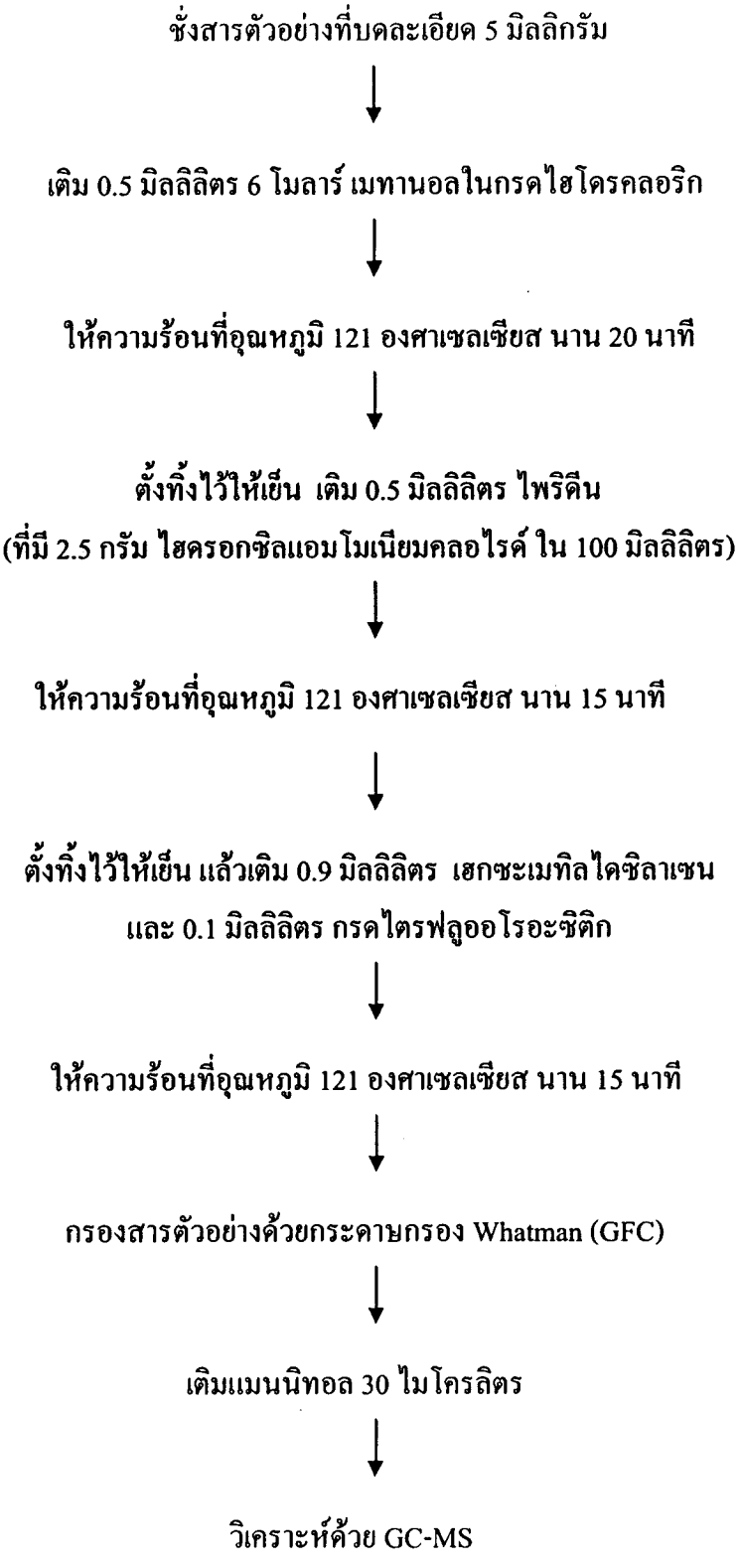
(ดัดแปลงจาก Morvai และคณะ, 1991)

การหาปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิด จะใช้วิธีสารละลายมาตรฐานภายใน โดยการเติม 30 ไมโครลิตร แมนนิทอล จาก stock solution ลงในสารละลายน้ำตาลมาตรฐานผสม 100 ไมโครลิตร และในสารตัวอย่าง โดยใช้ เฮกซะเมทิลไดซิลาเซน เป็นสารละลายเจือจาง ใส่ในขวดที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทรกราฟี โดยมีสภาวะการวิเคราะห์สารตัวอย่าง ดังนี้

คอลัมน์	Dimethylpolysiloxane (J&W Scientific)
ความยาว	30 เมตร
เส้นผ่านศูนย์กลาง	0.25 มิลลิเมตร
ความหนาของฟิล์ม	0.25 ไมโครเมตร
แก๊สพา	ฮีเลียม (50 มิลลิลิตรต่อนาที)
เครื่องตรวจสอบ	Mass Selective Detector
อัตราการไหล	1 มิลลิลิตรต่อนาที
อุณหภูมิ	180 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 200 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที



ภาพที่ 3.1 ไดอะแกรมแสดงการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค ที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์



ภาพที่ 3.2 ไดอะแกรมแสดงการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลอะราบิโนสและแรมโนส ที่มีในพอลิแซ็กคาไรด์

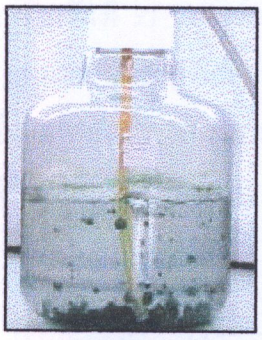
บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 ตัวอย่างสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์

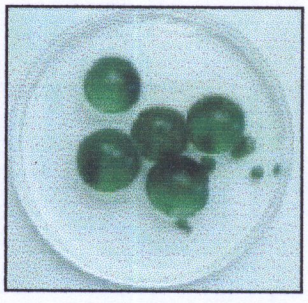
สาหร่ายเห็ดลาบที่เก็บจากป่าดูนลำพัน อ.นาเชือก จ.มหาสารคาม ซึ่งเป็นแหล่งธรรมชาติ มีลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง เมื่อนำสาหร่ายเซลล์เดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (BGA และ BG-11) พบว่าสาหร่ายมีลักษณะกลุ่มเซลล์เป็นทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 1.2 เซนติเมตร มีของเหลวหนืดอยู่ภายในกลุ่มเซลล์ ดังภาพที่ 4.1 สาหร่ายเห็ดลาบนั้นมีคุณสมบัติในการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์ จึงทำการเก็บน้ำอาหารเพาะเลี้ยง แล้วนำน้ำอาหารเพาะเลี้ยง ลดปริมาตรลง พบว่าน้ำเพาะเลี้ยงมีความข้นเหนียว ส่วนการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น (BGA BGA+N BG-11 BG-11-N) การเจริญของเซลล์มีลักษณะเป็นก้อนวุ้นคล้ายเยลลี่ สาหร่ายมีการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์อยู่บนอาหารวุ้น มีลักษณะข้นเหนียว สีขาวขุ่น และพบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ BG-11 และ BGA+N มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย เห็นสีของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ มีสีเหลือง ดังภาพที่ 4.2

4.2 การทดสอบเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากสาหร่าย

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นที่มีแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหาร BGA+N และ BG-11 พบว่ามีการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย จึงได้ทำการเขี่ยสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีการปนเปื้อนลงบนอาหาร BGA-NaCl (BGA ดัดแปลงโดยไม่เติมโซเดียมคลอไรด์) BG-11 และ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ได้ดี แต่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BGA-NaCl และ BG-11 ได้เล็กน้อย อย่างไรก็ตามไม่ปรากฏว่ามีการสร้างสารพอลิแซ็กคาไรด์บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบแต่อย่างใด จึงเป็นการยืนยันว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่เกิดขึ้นนั้นผลิตโดยสาหร่ายเห็ดลาบ

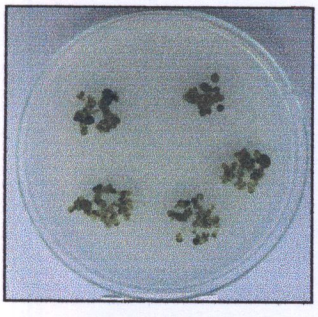


ก

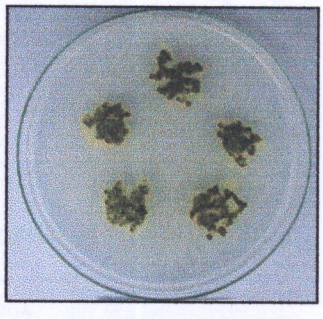


ข

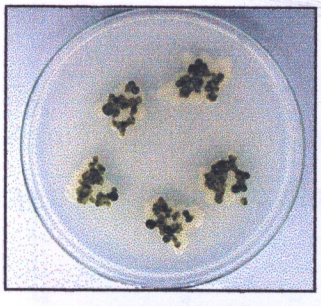
ภาพที่ 4.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเห็ดลาบในอาหารเหลว ในถังคาร์บอย (ก.) และลักษณะกลุ่มเซลล์เป็นทรงกลม มีของเหลวหนืดอยู่ภายในกลุ่มเซลล์ (ข.)



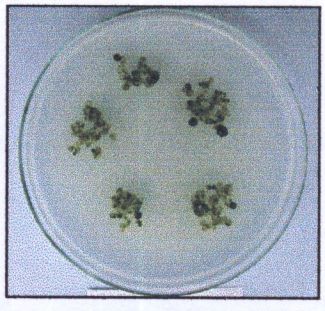
ก



ข



ค

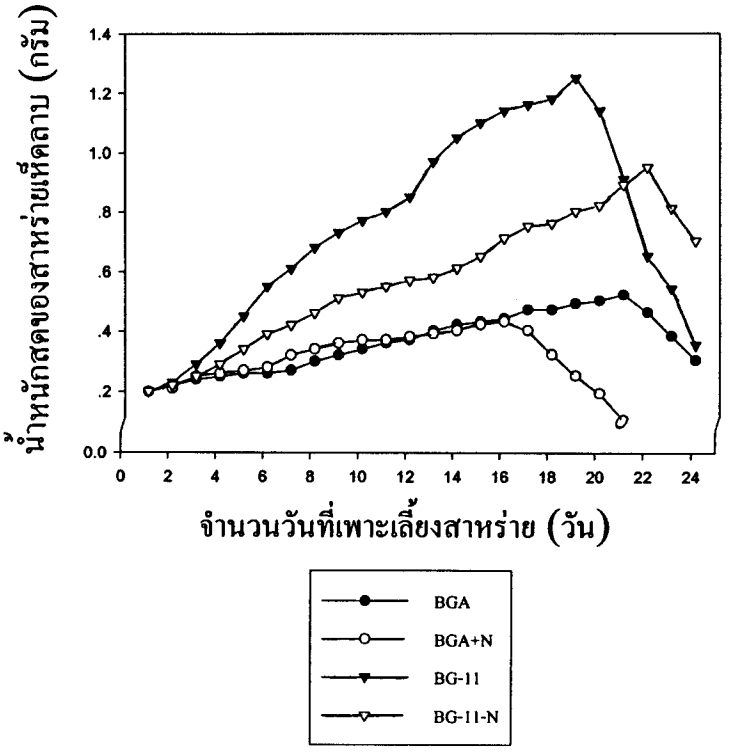


ง

ภาพที่ 4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายเห็ดลาบบนอาหารวุ้นสูตร BGA ที่ไม่มีแบคทีเรีย (ก.) สูตร BGA+N (BGA ดัดแปลงโดยเติม $NaNO_3$) ที่มีแบคทีเรีย (ข.) สูตร BG-11 ที่มีแบคทีเรีย (ค.) และสูตร BG-11-N (BG-11 ดัดแปลงโดยไม่เติม $NaNO_3$) ที่ไม่มีแบคทีเรีย (ง.)

4.3 การศึกษาเบื้องต้นอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย

จากการทดลองนำสาหร่ายเห็ดลาบหนัก 0.2 กรัมเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น BGA BGA+N BG-11 และ BG-11-N ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร สูง 10 เซนติเมตร พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดในวันที่ 21 16 19 และ 22 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.3 มีน้ำหนักสูงสุด 0.52 0.43 1.25 และ 0.85 กรัมคิดเป็นน้ำหนักเพิ่มขึ้นประมาณ 2.60 2.15 6.25 และ 4.75 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น ตามลำดับ หลังจากผ่านวันที่สาหร่ายมีอัตราการเจริญสูงสุดแล้ว สาหร่ายมีลักษณะสีเหลืองซีด กลุ่มเซลล์เริ่มเหี่ยวลง



ภาพที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของสาหร่ายเห็ดลาบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรต่าง ๆ กับจำนวนวันที่เพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาพที่ตรึงไนโตรเจน จะใช้อาหารสูตร BGA การเจริญเติบโตของสาหร่ายเห็ดลาบบนอาหารวุ้น สูตร BGA และ BGA+N มีค่าใกล้เคียงกัน จึงเลือกสูตร BGA ในการศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป เนื่องจากไม่ต้องเติมไนโตรเจนลงในสูตรอาหาร เป็นการประหยัดต้นทุน สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาพที่ไม่ตรึงไนโตรเจน ใช้อาหารสูตร BG-11 ซึ่งให้น้ำหนักมวลสาหร่ายมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนสูตร BG-11-N จึงเลือกใช้สูตร BG-11 ในการศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

4.4 ปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้

เมื่อทำการเตรียมตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ จากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ และจากอาหารเพาะเลี้ยงเหลว นำมาสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำร้อน เอทานอล 80 เปอร์เซนต์ และ EDTA 0.1 โมลาร์ แสดงผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากแหล่งสาหร่ายต่าง ๆ

ตัวอย่างจาก	สูตรอาหาร	ลักษณะ	พอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)		
			น้ำร้อน	เอทานอล	EDTA
ธรรมชาติ		แผ่นแบนบาง	12.18±0.24	10.40±1.17	9.33±1.40
อาหารวุ้น	BGA	กลุ่มเซลล์เป็นก้อนวุ้นคล้ายเยลลี	53.03±1.59	29.52±1.01	10.74±0.61
		EPS	79.48±1.53	nd	nd
	BGA+N	กลุ่มเซลล์เป็นก้อนวุ้นคล้ายเยลลี	14.00±1.30	27.54±1.71	9.28±0.59
	BG-11		42.62±0.63	15.80±1.18	22.78±0.81
	BG-11-N		45.40±1.86	24.74±0.86	22.99±0.97
อาหารเหลว	BGA	กลุ่มเซลล์+ ของเหลวหนืด	35.80±0.97	21.99±0.74	9.98±0.37
		อาหารเพาะเลี้ยงเหลว	nd	41.74±0.91	nd
		เฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์	20.88±0.87	nd	nd
	BG-11	กลุ่มเซลล์+ ของเหลวหนืด	30.08±1.09	20.61±0.50	19.07±0.19
		อาหารเพาะเลี้ยงเหลว	nd	36.78±0.67	nd
		เฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์	18.57±0.74	nd	nd

EPS = Exopolysaccharides

nd = not determined

ผลการทดลองพบว่าส่วนใหญ่การใช้น้ำร้อนสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างกลุ่มเซลล์จากธรรมชาติ จากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารวุ้นและอาหารเหลว ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าการสกัดด้วย เอทานอลและ EDTA ดังนั้นจึงเลือกใช้เฉพาะน้ำร้อนในการสกัดเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ (EPS) บนอาหารวุ้น

พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติที่สกัดด้วยน้ำร้อนให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าที่สกัดด้วยเอทานอลและ EDTA โดยให้ปริมาณเท่ากับ 12.18 10.40 และ 9.33 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งสาหร่าย ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับ

ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่านัยสำคัญเท่ากับ 0.05 พบว่า การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำร้อน เอทานอล และ EDTA ไม่ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อนให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าที่สกัดด้วยเอทานอลและ EDTA โดยให้ปริมาณ 53.03 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำร้อนสูงกว่าสูตรอาหาร BG-11-N BG-11 และ BGA+N ตามลำดับ ส่วนพอลิแซ็คคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ (EPS) จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นสูตร BGA พบว่ามีพอลิแซ็กคาไรด์สูงถึง 79.48 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารที่ปล่อยออกนอกเซลล์ คิดเป็น 1.50 เท่าของกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อน ในขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์คิดเป็น 1.90 และ 2.16 เท่า เมื่อเทียบกับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายลงสู่อาหารเพาะเลี้ยงเหลวทั้งสูตร BGA และ BG-11 ตามลำดับ แสดงว่าสาหร่ายที่สภาวะการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น มีการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร BGA+N สกัดด้วยเอทานอลให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อน และ EDTA โดยให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 27.54 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร BGA BG-11 และ BG-11-N ที่สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร BG-11 และ BG-11-N ที่สกัดด้วยน้ำร้อนจะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและ EDTA เช่นเดียวกัน โดยมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 42.62 และ 45.40 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งของเหลวหนืดที่อยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อนให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและ EDTA โดยให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 35.80 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงเหลวสูตร BGA ที่สกัดด้วยเอทานอล มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 41.74 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารที่ปล่อยออกนอกเซลล์ พอลิแซ็กคาไรด์จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 20.88 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากการทดลองพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ มีปริมาณน้อยกว่าอาหารเพาะเลี้ยงเหลว แสดงว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยเซลล์สาหร่ายส่วนใหญ่จะถูกปลดปล่อยมากกว่าสะสมอยู่ภายในปล่อยออกนอกเซลล์ลงสู่อาหารเพาะเลี้ยง

พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งของเหลวหนืดที่อยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร BG-11 สกัดด้วยน้ำร้อนให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและ EDTA เช่นเดียวกับสูตรอาหารเหลว BGA โดยให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 30.08 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงเหลวสูตร BG-11 มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 36.78

มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารที่ปล่อยออกนอกเซลล์ พอลิแซ็กคาไรด์จากเฉพาะส่วนของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 18.57 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งของเหลวหนืดที่อยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่สกัดด้วยน้ำร้อน เอทานอล และ EDTA ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเทียบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งของเหลวหนืดที่อยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อนและ EDTA และจากอาหารเพาะเลี้ยงเหลวที่สกัดด้วยเอทานอล ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่นกัน พอลิแซ็กคาไรด์จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ มีปริมาณน้อยกว่าอาหารเพาะเลี้ยงเหลว แสดงว่า เซลล์สาหร่ายมีการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์ เช่นเดียวกับอาหารเหลวสูตร BGA ในการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยลงสู่อาหารเพาะเลี้ยงเหลวทั้ง BGA และ BG-11 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงจากอาหารวุ้น สูตร BGA BGA+N BG-11 และ BG-11-N พร้อมทั้งจากอาหารเหลวสูตร BGA และ BG-11 ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่เก็บมาจากธรรมชาติ เนื่องจากสาหร่ายที่ขึ้นตามสภาพธรรมชาตินี้อยู่ในแหล่งดินเค็ม ไม่ค่อยมีสารอาหารที่สมบูรณ์ ต้องรักษากระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ให้คงความมีชีวิตรอด จึงให้ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Dodds และคณะ, 1995)

จากการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติ กลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้น สูตร BGA ที่ไม่มีการเติมไนโตรเจน จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำร้อนในปริมาณที่มากกว่าสูตรอาหาร BGA+ N ที่มีการเติมไนโตรเจน ให้ค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าสาหร่ายมีการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ในสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมไนโตรเจนมากกว่าสูตรที่มีการเติมไนโตรเจน ส่วนปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร BG-11-N ที่ไม่มีการเติมไนโตรเจน สกัดด้วยน้ำร้อน และสูตร BG-11 ที่มีการเติมไนโตรเจน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าสามารถเลือกเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร BG-11 หรือ BG-11-N ก็ได้ ซึ่งให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ไม่แตกต่างกัน

พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้น สูตร BGA กับสูตร BG-11 ที่สกัดด้วยน้ำร้อน เอทานอล และ EDTA ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้น และในอาหารเหลวสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อน เทียบกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้น และในอาหารเหลวสูตร BG-11 ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้น และในอาหารเหลวสูตร BGA ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้น และในอาหารเหลวสูตร BG-11 ส่วนใหญ่การใช้ EDTA สกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้น และจากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งของเหลวหนืดที่อยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ให้ปริมาณพอลิแซ็กคา

ไรด์ต่ำกว่าน้ำร้อน และเอทานอล ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติความมีขั้ว (polarity) น้อยกว่าน้ำและเอทานอล

จากการทดลองสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แล้วปล่อยออกนอกเซลล์ลงสู่อาหารเพาะเลี้ยง คิดเป็น 52.11 มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน ซึ่งให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้มากกว่าการศึกษาของ Fischer และคณะ (1997) ได้ศึกษา *N. insulare* 54.79 ในฟลาสก์ขนาด 8 ลิตร อายุ 52 วัน ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 47.00 มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน ส่วนสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แล้วปล่อยออกนอกเซลล์ลงสู่อาหารเพาะเลี้ยง คิดเป็น 42.53 มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน ซึ่งให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้มากกว่าการศึกษาของ Fischer และคณะ (1997) ศึกษา *N. insulare* 54.79 ในถังหมัก 12 ลิตร อายุ 70 วัน ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 18.40 มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน Gunta และคณะ (1995) ศึกษา *Nostoc* sp. 2S9B ในฟลาสก์ขนาด 10 ลิตร อายุ 30 วัน ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 1.40 มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน Moore และ Tischer (1964) ศึกษา *Nostoc* sp. ในคอลัมน์ไพเร็กซ์ 2 ลิตร อายุ 12 วัน ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 34.60 มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน แต่การศึกษาของ Mehta และ Vaidya (1978) ศึกษา *Nostoc* sp. 221 ในฟลาสก์ขนาด 0.25 ลิตร อายุ 20 วัน ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 45.4 มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ที่ผ่านมากับที่เคยศึกษามาแล้วสรุปได้ดัง ตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ที่ศึกษาครั้งนี้กับรายงานผลการศึกษาที่ผ่านมา

ชนิด	วิธีเพาะเลี้ยง และระยะเวลา (วัน)	ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ละลายน้ำได้ (มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน)	แหล่งอ้างอิง
N. commune	อาหารสูตร BGA ถังคาร์บอย 8 ลิตร อายุ 20 วัน	52.11	การศึกษานี้
N. commune	อาหารสูตร BG-11 ถังคาร์บอย 8 ลิตร อายุ 20 วัน	42.53	การศึกษานี้
N. insulare 54.79	ฟลาสก์ 8 ลิตร อายุ 52 วัน	47.00	Fischer และคณะ (1997)
N. insulare 54.79	ถังหมัก 12 ลิตร อายุ 70 วัน	18.40	Fischer และคณะ (1997)
Nostoc sp.	คอลัมน์ไพเร็ก 2 ลิตร อายุ 12 วัน	34.60	Moore และ Tischer (1964)
Nostoc sp. 221	ฟลาสก์ 0.25 ลิตร อายุ 20 วัน	45.40	Mehta และ Vaidya (1978)
Nostoc sp. 2S9B	ฟลาสก์ 10 ลิตร อายุ 30 วัน	1.40	Ganta และคณะ (1995)

4.5 ผลการวิเคราะห์น้ำตาลในสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทรกราฟี

4.5.1 ผลการวิเคราะห์น้ำตาลมาตรฐาน

การวิเคราะห์น้ำตาลที่เตรียมในรูปอนุพันธ์ไตรเมทิลไซลิล (Trimethylsilyl, TMS) จะมีความอยู่ตัวที่อุณหภูมิสูง เมื่อนำน้ำตาลมาตรฐานทำปฏิกิริยากับไซลิเลติง เอเจนต์ ตามสูตรที่ 1 ข้อ 3.4.5 แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี (Agilent Technologies, 6890N) มีเครื่องตรวจวัดเป็น mass selective (Agilent Technologies, 5973N) แบบ Electron Ionization ตามสภาวะการวิเคราะห์ข้อ 3.4.7 พบว่าน้ำตาลมาตรฐาน อะราบิโนส แรมโนส ฟูโคส ไซโลส ไรโบส กาแลคโตส กลูโคส แมนนิทอล กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค มีค่า Retention time เท่ากับ 3.75 3.76 4.33 4.73 5.28 6.50 6.97 7.23 9.50 10.50 นาที ตามลำดับ ส่วนแมนโนสและฟรุคโตส จะมีค่า Retention time 2 ค่า กล่าวคือ แมนโนสมีค่า Retention time ที่ 5.67 และ 7.37 นาที ส่วนฟรุคโตส มีค่า Retention time เท่ากับ 5.91 และ 7.54 นาที แสดงว่า สารมาตรฐานของน้ำตาลทั้งสองนี้ มีรูปสเตอริโอไอโซเมอร์ (sterioisomer) (Bleton และคณะ, 1996)

เนื่องจากน้ำตาลมาตรฐานอะราบิโนสและแรมโนส มีค่า Retention time ที่ให้เคียงกันมาก จึงปรับสถานการวิเคราะห์โดยการเปลี่ยนอุณหภูมิ ลดอัตราการไหลของแก๊สพา เป็นต้น พบว่าค่า Retention time ที่ได้ยังมีค่าใกล้เคียงกัน จึงทำการเปลี่ยนไซลิเลติง เอเจนต์ ใหม่ทำตามสูตรที่ 2 ของข้อ 3.4.5 แล้วฉีดเข้าเครื่องตามสภาวะเดิม พบว่าสามารถแยกน้ำตาลทั้งสองชนิดได้ดียิ่งขึ้นโดย น้ำตาลอะราบิโนส มีค่า Retention time เท่ากับ 4.96 และ 5.09 นาที ส่วนน้ำตาล แรมโนสมีค่า Retention time เท่ากับ 5.82 และ 6.01 นาที

4.5.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

ปริมาณน้ำตาลจากสารตัวอย่างต่าง ๆ คำนวณจากเทคนิคสารมาตรฐานภายใน (internal standard) โดยใช้แมนนิทอล เป็นสารมาตรฐานภายใน การวิเคราะห์น้ำตาลในสารตัวอย่างใช้ค่า Retention time และการตรวจสเปคตรัมที่ตรงกับน้ำตาลมาตรฐาน ซึ่งสเปคตรัม เทียบจาก Library ของ Wiley7n.l การวิเคราะห์จะใช้พื้นที่ใต้กราฟในการคำนวณหาปริมาณน้ำตาล

การคำนวณปริมาณน้ำตาล แมนโนส ฟรุคโตส อะราบิโนส และแรมโนส ซึ่งมีรูปสเตอริโอไซเมอร์ ให้คำนวณโดยการรวมพื้นที่ใต้กราฟ (Niessen, 2001) ได้ค่าน้ำตาลเป็นอัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลแต่ละชนิดเทียบกับน้ำตาลแมนโนสจากสาหร่ายที่เก็บจากธรรมชาติ สกัดด้วยน้ำร้อน การวิเคราะห์ผลทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS Version 11 วิธี Duncan' s Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่านัยสำคัญ เท่ากับ 0.05

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหารที่แตกต่างกันและใช้ตัวทำละลาย น้ำร้อน เอทานอล 80 เปอร์เซนต์ และ EDTA 0.1 โมลาร์ สกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาล จากการทดลองพบว่าตัวอย่างสาหร่ายทุกชนิดให้องค์ประกอบน้ำตาล 11 ชนิด ได้แก่ ฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค อะราบิโนส แรมโนส แต่มีปริมาณของอัตราส่วนโมลาร์ที่แตกต่างกันไปดังตารางที่ 4.4 สาหร่ายเห็ดลาบที่เก็บจากธรรมชาติ แล้วสกัดด้วยน้ำร้อน ให้ไซโลสในอัตราส่วนโมลาร์มากที่สุด เท่ากับ 31.06 การสกัดด้วยเอทานอลและ EDTA ให้ฟรุคโตสในอัตราส่วนโมลาร์มากที่สุด เท่ากับ 35.05 และ 27.46 ตามลำดับ การสกัดด้วยน้ำร้อนจะให้อัตราส่วนโมลาร์ของฟูโคส ไซโลส ไรโบส กาแลคโตส กรดกาแลคทิวโรนิค อะราบิโนส มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล และการสกัดด้วยเอทานอลจะให้อัตราส่วนโมลาร์ของฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส อะราบิโนส แรมโนส มากกว่าการสกัดด้วย EDTA

กลุ่มเซลล์จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA สกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอล ให้ฟรุคโตสในอัตราส่วนโมลาร์มากที่สุด เท่ากับ 47.22 และ 32.15 ตามลำดับ รองลงมาเป็นไซโลส เท่ากับ 34.32 และ 23.18 ตามลำดับ ส่วนการสกัดด้วย EDTA ให้กลูโคสในอัตราส่วนโมลาร์ มากที่สุด เท่ากับ 21.80 รองลงมาเป็นไรโบส เท่ากับ 19.77 การสกัดด้วยน้ำร้อน จะให้อัตราส่วนโมลาร์น้ำตาล ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค อะราบิโนส ที่มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล

กลุ่มเซลล์จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร BGA+N สกัดด้วยน้ำร้อน และเอทานอล ให้ฟรุคโตสในอัตราส่วนโมลาร์มากที่สุด เท่ากับ 20.77 และ 20.09 ตามลำดับ แต่การสกัดด้วยเอทานอลมีอัตราส่วนโมลาร์ของไซโลส ไรโบส แมนโนส กาแลคโตส กลูโคส กรดกลูคิวโรนิค มากกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อน ส่วนการสกัดด้วย EDTA ให้ไรโบสในอัตราส่วนโมลาร์สูงที่สุด เท่ากับ 22.91 รองลงมาเป็นกรดกาแลคทิวโรนิค เท่ากับ 12.08 การสกัดด้วยเอทานอลให้อัตราส่วนโมลาร์ของฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส กาแลคโตส กลูโคส กรดกลูคิวโรนิค มากกว่าการสกัดด้วย EDTA

พอลิแซ็คคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร BGA สกัดด้วยน้ำร้อน พบว่ามีอัตราส่วนโมลาร์น้ำตาลทุกชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA เดียวกันที่สกัดด้วยน้ำร้อน ได้แก่น้ำตาล ฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค อะราบิโนส แรมโนส เพิ่มขึ้นเท่ากับ 3.03 1.69 4.83 3.33 1.78 1.66 6.69 1.78 3.29 1.25 1.14 เท่า ตามลำดับ

กลุ่มเซลล์จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ปริมาณของอัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาล 11 ชนิด ที่มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA+N ที่สกัดด้วยน้ำร้อนได้แก่น้ำตาล ฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค อะราบิโนส และแรมโนส ส่วนการสกัดด้วยเอทานอล ให้น้ำตาล 6 ชนิด ที่มี

ปริมาณของอัตราส่วนโมลาร์มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA+N ได้แก่ น้ำตาลฟูโคส ไซโลส ฟรุคโตส กรดกาแลคทิวโรนิค อะราบิโนส และ แรมโนส การสกัดด้วย EDTA ให้น้ำตาล 9 ชนิด ที่มีปริมาณของอัตราส่วนโมลาร์มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA+N ได้แก่ ฟูโคส ไซโลส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค อะราบิโนสและแรมโนส ดังนั้น การเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA ให้ปริมาณของอัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลต่าง ๆ มากกว่าสูตร BGA+N ส่วนตัวทำละลายที่ใช้สกัดกลุ่มเซลล์ที่มีของเหลวหนืดอยู่ภายในและพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ พบว่าส่วนใหญ่สารสกัดน้ำร้อนสามารถสกัดปริมาณน้ำตาลได้มากกว่าเอทานอล และ EDTA ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้น BGA จึงเป็นการประหยัดต้นทุนที่ไม่ต้องเติมไนโตรเจนลงในสูตรอาหาร การใช้ตัวทำละลายน้ำร้อน ที่มีราคาถูกและยังได้ปริมาณน้ำตาลที่มากกว่าเอทานอลและ EDTA อีกด้วย

กลุ่มเซลล์จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร BG-11 สกัดด้วยน้ำร้อน และ EDTA ให้ฟรุคโตสในอัตราส่วนโมลาร์สูงที่สุด เท่ากับ 47.52 และ 25.92 ตามลำดับ การสกัดด้วยน้ำร้อนจะให้อัตราส่วนโมลาร์ของ ฟูโคส ไซโลส ไรโบส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค อะราบิโนส และแรมโนส ที่มากกว่าเอทานอล การสกัดด้วยเอทานอล ให้อัตราส่วนโมลาร์น้ำตาลไรโบสสูงที่สุดเท่ากับ 20.82 การสกัดด้วย น้ำร้อนให้อัตราส่วนโมลาร์ของไซโลส ไรโบส ฟรุคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค มากกว่าการสกัดด้วย EDTA

กลุ่มเซลล์จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร BG-11-N สกัดด้วยน้ำร้อน และเอทานอล ให้ไซโลสในอัตราส่วนโมลาร์มากที่สุด เท่ากับ 33.23 และ 27.31 ตามลำดับ ส่วนการสกัดด้วย EDTA จะให้อัตราส่วนโมลาร์ของฟรุคโตส มากที่สุด เท่ากับ 42.78 ในการสกัดด้วยน้ำร้อน จะให้อัตราส่วนโมลาร์น้ำตาลฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส กรดกลูคิวโรนิค ที่สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและ EDTA

กลุ่มเซลล์จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร BG-11-N สกัดด้วยน้ำร้อน ให้น้ำตาล 5 ชนิด ที่มีปริมาณของอัตราส่วนโมลาร์มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BG-11ได้แก่ น้ำตาลฟูโคส ไซโลส แมนโนส กาแลคโตส กรดกลูคิวโรนิค การสกัดด้วยเอทานอล ให้น้ำตาล 6 ชนิด ที่มีปริมาณอัตราส่วนโมลาร์มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BG-11 ได้แก่ น้ำตาลฟูโคส ไซโลส แมนโนส กลูโคส อะราบิโนสและแรมโนส ส่วนการสกัดด้วย EDTA ให้น้ำตาล 6 ชนิด ที่มีปริมาณอัตราส่วนโมลาร์มากกว่ากลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BG-11 ได้แก่ น้ำตาลไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค ดังนั้นสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BG-11-N เหมาะที่จะนำมาเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลมากกว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นสูตร BG-11

กลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งมีของเหลวหนืดอยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร BGA สกัดด้วยน้ำร้อน เอทานอล และ EDTA ให้ฟรุคโตสในอัตราส่วนโมลาร์มากที่สุด เท่ากับ 37.25 18.93 และ 8.49 ตามลำดับ การสกัดด้วยน้ำร้อน จะให้อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลไซโลส ไรโบส ฟรุคโตส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค ที่มากกว่าที่สกัดด้วยเอทานอล การสกัดด้วยเอทานอลจะให้อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส ที่มากกว่าสกัดด้วย EDTA

กลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งมีของเหลวหนืดอยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร BG-11 สกัดด้วย น้ำร้อน ให้ไรโบส ในอัตราส่วนโมลาร์มากที่สุด เท่ากับ 39.85 รองลงมาเป็นฟรุคโตส เท่ากับ 33.13 ส่วนการสกัดด้วยเอทานอล ให้ไซโลสในอัตราส่วนโมลาร์มากที่สุด เท่ากับ 26.25 รองลงมาเป็นกรดกาแลคทิวโรนิค เท่ากับ 16.61 ส่วนสารสกัดด้วย EDTA ให้ไรโบสในอัตราส่วนโมลาร์มากที่สุด เท่ากับ 17.25 การสกัดด้วยน้ำร้อนจะให้อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส อะราบิโนส และแรมโนส มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล การสกัดด้วยเอทานอลจะให้อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลฟูโคส ไซโลส ฟรุคโตส กาแลคโตส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค มากกว่าการสกัดด้วย EDTA

สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเพาะเลี้ยงเหลว สูตร BGA ให้อัตราส่วนโมลาร์น้ำตาลไรโบสมากที่สุดเท่ากับ 48.89 รองลงมาเป็นฟรุคโตส และกรดกาแลคทิวโรนิค เท่ากับ 26.30 และ 24.96 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเหลว สูตร BG-11 ให้ไรโบสในอัตราส่วนโมลาร์มากที่สุด เท่ากับ 45.97 รองลงมาเป็นฟรุคโตสและกรดกาแลคทิวโรนิค เท่ากับ 38.01 และ 24.13 ตามลำดับ สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเพาะเลี้ยงเหลว สูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อนให้อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส กลูโคส กรดกลูคิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค อะราบิโนส และแรมโนส มากกว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่สกัดด้วยน้ำร้อนเช่นกัน

สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ จากอาหารเหลว สูตร BGA สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ไรโบสในอัตราส่วนโมลาร์ มากที่สุด เท่ากับ 32.47 รองลงมาเป็นไซโลส เท่ากับ 28.38 อัตราส่วนโมลาร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเฉพาะส่วนของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ที่ห่อหุ้มที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA เทียบกับอาหารเพาะเลี้ยงเหลว สูตร BGA พบว่ามีอัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาล ฟูโคส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค และแรมโนส น้อยกว่าในอาหารเพาะเลี้ยงเหลว แสดงว่าสาหร่ายมีการปล่อยน้ำตาลเหล่านี้ออกสู่อาหารเพาะเลี้ยงมากกว่าเก็บไว้ในของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ที่ห่อหุ้ม ส่วนสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ที่ห่อหุ้มจากอาหารเหลว สูตร BG-11 ให้ฟรุคโตสในอัตราส่วนโมลาร์ มากที่สุด เท่ากับ 23.13 รองลงมาเป็นไรโบส เท่ากับ 16.18 อัตราส่วนโมลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ทรงกลมที่เพาะเลี้ยงใน

BG-11 เทียบกับอาหารเพาะเลี้ยงเหลว สูตร BG-11 พบว่ามีอัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลฟูโคส ไซโลส ไรโบส ฟรุคโตส กรดกาแลคทิวโรนิค น้อยกว่าอาหารเพาะเลี้ยงเหลว แสดงว่ามีการปล่อยน้ำตาลเหล่านี้ ออกสู่อาหารเพาะเลี้ยงมากกว่าเก็บไว้ภายในกลุ่มเซลล์ที่ห่อหุ้ม เช่นกัน

เมื่อวิเคราะห์สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูง กับตัวทำละลาย น้ำร้อน เอทานอลและ EDTA ในทางสถิติ พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA สกัดด้วยน้ำร้อน หรือเอทานอล อาหารวุ้นสูตร BG-11-N สกัดด้วยน้ำร้อน และในอาหารเหลว สูตร BG-11 สกัดด้วยน้ำร้อน ให้อัตราส่วนโมลาร์น้ำตาลที่สูงกว่าสูตรอื่น ๆ และการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นยังให้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ซึ่งนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาล พบว่ามีปริมาณอัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลมากกว่า 1 เท่าตัว เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นสูตร BGA อีกทั้งยังสามารถเก็บเกี่ยวพอลิแซ็กคาไรด์ได้ง่ายกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งต้องนำไปลดปริมาตรน้ำ เป็นการเสียเวลาและค่าใช้จ่ายสูง

พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ จากกลุ่มเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้น จากกลุ่มเซลล์ที่มีของเหลวหนืดอยู่ภายในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์สาหร่าย และจากอาหารเพาะเลี้ยงเหลวแล้วใช้ตัวทำละลาย น้ำร้อน เอทานอล และ EDTA สกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ มาวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลพบว่าทุกตัวอย่าง ให้องค์ประกอบน้ำตาล 11 ชนิด ได้แก่ ฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค อะราบิโนส และแรมโนส แต่มีปริมาณของอัตราส่วนโมลาร์ที่แตกต่างกันไป น้ำตาลที่มีอัตราส่วนโมลาร์มากที่สุดจากตัวอย่างสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ สรุปดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่มีมากที่สุดจากตัวอย่างสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ

น้ำตาล	ปริมาณ (อัตราส่วนโมลาร์)	ตัวอย่างและสูตรอาหาร (ตัวทำละลาย)
ฟูโคส	13.53	อาหารเพาะเลี้ยงเหลว BGA (เอทานอล)
ไซโลส	34.32	กลุ่มเซลล์+ของเหลวหนืด จากอาหารวุ้น BGA (น้ำร้อน)
ไรโบส	48.89	อาหารเพาะเลี้ยงเหลว BGA (เอทานอล)
แมนโนส	10.20	อาหารเพาะเลี้ยงเหลว BGA (เอทานอล)
ฟรุคโตส	47.52	กลุ่มเซลล์+ของเหลวหนืด จากอาหารวุ้น BG-11 (น้ำร้อน)
กาแลคโตส	16.69	กลุ่มเซลล์+ของเหลวหนืด จากอาหารเหลว BG-11-N (เอทานอล)
กลูโคส	30.59	กลุ่มเซลล์+ของเหลวหนืด จากอาหารวุ้น BG-11-N (EDTA)
กรดกาแลคทิวโรนิค	24.96	อาหารเพาะเลี้ยงเหลว BGA (เอทานอล)
กรดกลูคิวโรนิค	5.23	อาหารเพาะเลี้ยงเหลว BGA (เอทานอล)
อะราบิโนส	5.55	เฉพาะของเหลวหนืดภายใน จากอาหารวุ้น BGA (น้ำร้อน)
แรมโนส	10.11	กลุ่มเซลล์+ของเหลวหนืด จากอาหารวุ้น BGA (เอทานอล)

ตารางที่ 4.4 อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

ตัวอย่างจาก	สูตรอาหาร	สารสกัด	สภาพ	อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาล										
				ฟูโคส	ไซโลส	ไรโบส	แมนโนส	ฟรุคโตส	กาแลคโตส	กลูโคส	กรดกาแลคทิวโรนิค	กรดกลูคิวโรนิค	อะราบิโนส	แรมโนส
ธรรมชาติ	-	น้ำร้อน	แผ่น	9.06±0.90	31.06±1.60	12.93±0.70	1.00±0.00	12.61±0.93	9.60±1.16	0.88±0.08	11.63±0.70	0.24±0.13	2.74±0.41	1.10±0.17
		เอทานอล		2.38±0.16	16.96±0.08	12.45±1.17	9.74±0.11	35.05±1.63	1.21±0.13	6.19±0.65	7.08±0.46	0.51±0.40	1.29±0.10	2.36±0.26
		EDTA		1.92±0.12	11.75±0.84	7.58±0.89	1.99±0.03	27.46±1.91	1.13±0.12	12.35±1.31	13.11±0.83	1.52±0.36	1.11±0.21	0.93±0.09
อาหารวุ้น	BGA	น้ำร้อน	กลุ่มเซลล์	7.91±0.52	34.32±2.00	9.98±0.71	6.83±0.12	47.22±3.28	14.16±1.49	4.15±0.45	19.32±1.21	2.04±0.03	5.09±0.07	7.60±0.51
		เอทานอล		8.59±0.55	23.18±1.23	8.61±0.30	6.62±0.01	32.15±0.34	6.34±0.75	7.35±0.71	10.15±0.74	0.43±0.13	4.56±0.69	10.11±0.49
		EDTA		7.38±0.48	11.01±0.65	19.77±0.51	7.16±0.11	18.57±1.27	4.53±0.48	21.80±2.34	13.28±1.19	0.55±0.31	2.43±0.39	6.73±0.72
		น้ำร้อน	EPS	23.93±1.18	58.13±0.64	48.19±0.99	22.77±1.91	84.04±1.25	23.49±1.73	27.78±0.95	34.35±1.92	6.72±0.61	7.00±0.59	8.70±0.90
	BGA+N	น้ำร้อน	กลุ่มเซลล์	6.39±0.43	7.85±0.46	8.11±0.60	2.33±0.05	20.77±1.88	2.62±0.27	1.29±0.14	7.34±0.48	0.75±0.10	1.74±0.21	3.86±0.06
		เอทานอล		4.31±0.28	17.24±1.12	28.02±1.91	7.94±0.09	20.09±2.49	10.73±1.17	11.80±1.23	2.14±0.24	1.95±0.12	0.43±0.18	2.38±0.37
		EDTA		1.30±0.09	7.66±0.55	22.91±1.11	3.12±0.03	9.85±0.72	2.80±0.31	2.93±0.30	12.08±0.74	1.60±0.09	2.14±0.26	3.51±0.34
	BG-11	น้ำร้อน	กลุ่มเซลล์	1.21±0.08	23.99±1.88	34.33±1.87	2.43±0.10	47.52±1.25	8.31±1.00	14.29±1.37	18.58±1.16	0.26±0.12	1.46±0.17	1.51±0.17
		เอทานอล		1.09±0.07	6.36±0.48	20.82±1.04	3.22±0.06	7.12±0.77	1.48±0.15	1.32±0.14	3.64±0.22	1.35±0.08	0.58±0.06	1.19±0.10
		EDTA		12.77±0.80	21.62±1.48	7.99±1.11	3.24±0.02	25.92±1.73	9.68±1.10	1.04±0.10	12.51±1.23	0.42±0.14	3.83±0.07	2.33±0.33
	BG-11-N	น้ำร้อน	กลุ่มเซลล์	11.13±0.71	33.23±2.32	20.62±0.85	6.96±0.07	22.91±1.50	12.04±1.31	6.59±0.67	7.38±0.61	1.08±0.24	0.20±0.15	1.02±0.18
		เอทานอล		1.12±0.07	27.31±2.10	6.90±0.44	4.52±0.10	6.42±0.95	16.69±1.70	1.46±0.16	2.51±0.15	0.57±0.17	2.67±0.17	1.96±0.14
		EDTA		5.89±0.39	18.69±1.38	14.35±1.01	6.16±0.10	42.78±3.66	3.53±0.37	30.59±3.32	24.46±1.11	0.97±0.10	1.36±0.26	0.86±0.23

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

ตัวอย่างจาก	สูตรอาหาร	สารสกัด	สภาพ	อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาล										
				ฟูโคส	ไซโลส	ไรโบส	แมนโนส	ฟรุคโตส	กาแลคโตส	กลูโคส	กรดกาแลคทิวโรนิค	กรดกลูคิวโรนิค	อะราบิโนส	แรมโนส
อาหารเหลว	BGA	น้ำร้อน	กลุ่มเซลล์+ของเหลวหนืด	6.91±0.45	24.63±1.79	10.77±0.65	2.28±0.03	37.25±2.51	3.31±2.38	8.18±0.87	12.83±0.5	3.57±0.37	1.10±0.26	1.85±0.12
		เอทานอล		11.21±1.89	8.13±0.81	7.19±2.33	8.41±1.28	18.93±1.27	8.05±0.70	13.90±3.13	3.66±0.11	0.24±0.09	3.30±0.24	4.47±0.49
		EDTA		6.20±0.72	7.11±0.04	6.45±0.99	6.56±0.62	8.49±0.56	5.57±0.27	3.60±0.63	3.75±0.63	0.35±0.18	3.80±0.17	5.91±0.51
		เอทานอล	อาหารเพาะเลี้ยง	13.53±0.71	23.54±1.43	48.89±2.16	10.2±0.67	26.30±1.36	1.00±0.07	5.03±0.30	24.96±0.50	5.23±0.31	5.30±0.11	3.78±0.47
		น้ำร้อน	เฉพาะของเหลวหนืดภายใน	6.99±0.38	28.38±1.33	32.47±1.89	3.11±0.06	23.63±0.85	11.24±0.64	15.61±0.32	13.89±1.25	2.24±0.27	5.55±0.11	2.98±0.38
	BG-11	น้ำร้อน	กลุ่มเซลล์+ของเหลวหนืด	4.20±0.27	15.62±1.07	39.85±2.35	6.32±0.28	33.13±2.48	10.07±1.14	7.73±0.40	9.84±0.35	1.17±0.17	1.09±0.24	1.17±0.12
		เอทานอล		11.07±0.70	26.25±1.80	10.61±0.65	1.92±0.01	14.79±0.21	7.21±0.40	1.19±0.12	16.61±0.51	3.06±0.10	0.48±0.23	0.73±0.10
		EDTA		9.45±0.58	6.09±0.38	17.25±0.50	2.30±0.01	3.99±0.86	4.02±0.50	9.48±0.87	3.66±0.33	0.50±0.08	3.59±0.29	1.72±0.18
		เอทานอล	อาหารเพาะเลี้ยง	8.82±0.43	23.07±1.29	45.97±2.67	3.35±2.58	38.01±1.94	9.18±0.67	3.81±0.28	24.13±1.67	1.70±0.42	4.12±0.17	2.84±0.22
		น้ำร้อน	เฉพาะของเหลวหนืดภายใน	2.82±0.13	10.15±0.54	16.18±0.74	4.51±0.03	23.13±1.15	7.39±0.56	13.40±1.01	14.84±0.28	3.45±0.21	5.38±0.33	6.56±0.63

การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย "สาหร่ายเห็ดลาบ" ด้วยเครื่อง GC-MS คำนวณจากเทคนิคสารมาตรฐานภายใน โดยใช้แมนนิทอลเป็นสารมาตรฐานภายใน การคำนวณเป็นอัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลแต่ละชนิดเทียบจากน้ำตาลแมนโนสจากสาหร่ายที่เก็บจากธรรมชาติ สกัดด้วยน้ำร้อน

สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายเห็ดลาบที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารวุ้นสูตร BGA กับ BG-11 ทั้งที่มีและไม่มีไนโตรเจน จากอาหารเพาะเลี้ยงเหลวสูตร BGA กับ BG-11 และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA พบว่าให้องค์ประกอบน้ำตาล 11 ชนิด ได้แก่ ฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค อะราบิโนส และแรมโนส นั้นมีความแตกต่างจาก การศึกษาของ Huang และคณะ (1998) พบว่า *N. commune* ที่เก็บจากธรรมชาติมีองค์ประกอบน้ำตาลเพียง 4 ชนิด คือไซโลส แมนโนส กาแลคโตส กลูโคส ส่วนสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง ที่มีไนโตรเจนและไม่มีไนโตรเจน ให้องค์ประกอบน้ำตาล 8 ชนิด ได้แก่ ฟูโคส ไซโลส แมนโนส กาแลคโตส กลูโคส กรดกลูคิวโนนิค อะราบิโนส แรมโนส ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจากสูตรที่มีไนโตรเจน (EPS+N) พบว่ามีน้ำตาล ฟูโคส ไซโลส แมนโนส กาแลคโตส กลูโคส กรดกลูคิวโนนิค อะราบิโนส ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจากสูตรที่ไม่มีการเติมไนโตรเจน (EPS) พบน้ำตาลไซโลส แมนโนส กาแลคโตส กลูโคส อะราบิโนส สาหร่าย *N. flagelliforme* ที่เก็บจากธรรมชาติ พบน้ำตาลไซโลส แมนโนส กาแลคโตส กลูโคส อะราบิโนส ส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีและไม่มีไนโตรเจน พบแมนโนส กาแลคโตส กลูโคส และกรดกลูคิวโรนิค เหมือนกัน พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจากสูตรที่มีและไม่มีไนโตรเจน พบแมนโนส กาแลคโตส และกลูโคส เหมือนกัน แต่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์จากสูตรที่ไม่มีไนโตรเจน จะพบไซโลส และกรดกลูคิวโรนิค อีกด้วย ส่วน *N. sphaeroides* ทั้งจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะพบไซโลส แมนโนส กาแลคโตส และกลูโคส เหมือนกัน แต่จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวทั้งที่มีและไม่มีไนโตรเจนนั้นยังพบ ฟรุคโตส และแรมโนส ด้วย

จากการทดลองสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA และ BG-11-N ที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าในอาหารเหลวสูตร BGA+N และ BG-11 ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากสภาวะที่ไม่มีไนโตรเจน เป็นสภาวะที่กระตุ้นการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เหมาะสม ซึ่งการศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับผลของการขาดไนโตรเจน แต่อย่างไรก็ตามการตอบสนองของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวบางสายพันธุ์ไม่ได้มีผลต่อภาวะขาดไนโตรเจน เช่น *A. nidulan* และ *Cyanothece* หลายชนิด ปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ภายใต้ภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด (Sangar และ Dugan,1972; De Philippis และคณะ 1993; 1998) *A. cylindrica* และ *A. flos-aquae* ผลิตพอลิเมอร์ออกมามากขึ้นกับแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ (Lama และคณะ, 1996; Tischer และ Davis, 1971) ส่วน *Synechocystis Cyanothece* บางสายพันธุ์ *C. capsulata* และ *Phormidium* การขาดไนโตรเจนไม่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แล้วปล่อยออกนอกเซลล์ (Panoff และคณะ, 1988; De Philippis และคณะ, 1998; De Philippis และคณะ, 1996; Fattom และ Shilo, 1984)

De Philippis และคณะ (2000) ศึกษา *Nostoc* PCC 25 สายพันธุ์ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของ *Nostoc* ทุกสายพันธุ์เป็น complex anionic heteropolymer ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 6-9 ชนิด ในทุกสายพันธุ์ พบกลูโคสและฟูโคส มี 24 สายพันธุ์ พบกาแลคโตส แมนโนส และแรมโนส และ 7 สายพันธุ์ ที่พบไรโบส ซึ่งมีรายงานน้อยมากที่พบไรโบสในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ และในปี 1995 ศึกษา *Nostoc* sp. WV2 พบน้ำตาลไซโลส กาแลคโตส กลูโคส แรมโนส กรดกลูคิวโรนิค และกรดกาแลคทิวโรนิค

Fischer และคณะ (1997) และ Flaibani และคณะ (1989) ศึกษา *N. insulare* 54.79 *N. calcicola* 79WA01 และ *N.commune* UTEX584 พบน้ำตาลฟูโคส ไซโลส แมนโนส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค อะราบิโนส และแรมโนส แต่ไม่พบไรโบส

Ganta และคณะ (1995) ศึกษา *Nostoc* sp. 2S9B พบน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ ฟูโคส แมนโนส กลูโคส และกรดกลูคิวโรนิค

Mehta และ Vaidya (1978) ศึกษา *Nostoc* sp. 221 พบน้ำตาลเพียง 3 ชนิด ได้แก่ ไซโลส กลูโคส และกรดกลูคิวโรนิค

Moore และ Tischer (1965) ศึกษา *Nostoc* sp. พบน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ ฟูโคส กลูโคส กรดกลูคิวโรนิค และอะราบิโนส

เมื่อเทียบผลการศึกษาที่ผ่านมากับผลการศึกษาในครั้งนี้ สรุปได้ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบองค์ประกอบของน้ำตาลจาก *N. commune* ที่ศึกษาในครั้งนี้กับรายงานผลการศึกษาที่ผ่านมา

สายพันธุ์	สภาพ	อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาล											อ้างอิง
		ฟูโคส	ไซโลส	ไรโบส	แมนโนส	ฟรุคโตส	กาแลคโตส	กลูโคส	กรดกาแลคทิวโรนิค	กรดกลูคิวโรนิค	อะราบิโนส	แรมโนส	
N. commune	ธรรมชาติ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	การศึกษานี้
	อาหารวุ้น +N[a]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	อาหารวุ้น[b]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	อาหารเหลว+N[c]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	อาหารเหลว[d]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	EPS[e]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
N. commune	ธรรมชาติ	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	Huang และคณะ (1998)
	อาหารเหลว+N[c]	+	+	-	tr	-	+	+	-	+	+	+	
	อาหารเหลว[d]	+	+	-	tr	-	+	+	-	+	+	+	
	EPS+ N[f]	+	+	-	tr	-	+	+	-	+	+	-	
	EPS[e]	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	
N. flagelliforme	ธรรมชาติ	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	Huang และคณะ (1998)
	อาหารเหลว+N[c]	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	
	อาหารเหลว[d]	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	
	EPS+N[f]	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	
	EPS[e]	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	
N. sphaeroides	ธรรมชาติ	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	Huang และคณะ (1998)
	อาหารเหลว+N[c]	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	
	อาหารเหลว[d]	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

สายพันธุ์	สภาพ	อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาล											อ้างอิง
		ฟูโคส	ไซโลส	ไรโบส	แมนโนส	ฟรุคโตส	กาแลคโตส	กลูโคส	กรดกาแลคทิวโรนิค	กรดกลูคิวโรนิค	อะราบิโนส	แรมโนส	
N. insulare 54.79	อาหารเหลว	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	Fischer และคณะ (1997)
Nostoc sp. WV2	ns	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	De Philippis และคณะ (1995)
Nostoc sp.2S9B	อาหารเหลว	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	Ganta และคณะ (1995)
N.calcicola 79WA01	ns	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	Flaibani และคณะ (1989)
N.commune UTEX584	ns	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	Flaibani และคณะ (1989)
Nostoc sp. 221	อาหารเหลว	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Mehta และ Vaidya (1978)
Nostoc sp.	อาหารเหลว	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	Moore และ Tischer (1965)

tr = ปริมาณเล็กน้อย ns = ไม่ได้ระบุ + = พบชนิดน้ำตาล - = ไม่พบชนิดน้ำตาล

a = อาหารเพาะเลี้ยงวุ้นที่มีการเติมไนโตรเจน

b = อาหารเพาะเลี้ยงวุ้นที่ไม่มีการเติมไนโตรเจน

c = อาหารเพาะเลี้ยงเหลวที่มีการเติมไนโตรเจน

d = อาหารเพาะเลี้ยงเหลวที่ไม่มีการเติมไนโตรเจน

e = พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ได้จากอาหารเพาะเลี้ยงเหลวที่ไม่มีการเติมไนโตรเจน

f = พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ได้จากอาหารเพาะเลี้ยงเหลวที่มีการเติมไนโตรเจน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เมื่อนำสาหร่ายเห็ดลาบที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง สาหร่ายสายพันธุ์เดี่ยวเพาะที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นซึ่งมีการเจริญเติบโตในลักษณะเป็นก้อนวุ้นคล้ายเยลลี และที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร BGA และ BG-11 ซึ่งมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ทรงกลมห่อหุ้มของเหลวหนืดอยู่ภายในกลุ่มเซลล์ มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำร้อน เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ และ EDTA 0.1 โมลาร์ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ สกัดด้วยน้ำร้อนให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล และEDTA เท่ากับ 12.18 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งสาหร่าย พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อนให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล และEDTA เท่ากับ 53.08 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งสาหร่าย พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BGA+N สกัดด้วยเอทานอล ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อน และEDTA เท่ากับ 27.54 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งสาหร่าย พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BG-11 และ BG-11-N สกัดด้วยน้ำร้อนให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล และEDTA เท่ากับ 42.62 และ 45.40 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งสาหร่าย ตามลำดับ พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งมีของเหลวหนืดอยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA กับ BG-11 สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล และEDTA เท่ากับ 35.80 และ 30.08 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งสาหร่าย ตามลำดับ สำหรับส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์จากอาหารเหลวสูตร BGA กับ BG-11 สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 20.88 และ 18.57 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งสาหร่าย ตามลำดับ

จากการศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ (EPS) จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นสูตร BGA สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 79.48 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารที่ปล่อยออกนอกเซลล์ ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ลงสู่อาหารเพาะเลี้ยงเหลวจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร BGA และ BG-11 ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 41.74 และ 36.78 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารที่ปล่อยออกนอกเซลล์ ตามลำดับ ดังนั้นหากต้องการปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มาก ๆ จึงควรเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นแล้วเก็บพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ อีกทั้งยังเป็นการง่ายต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตและประหยัดต้นทุนที่ไม่ต้องลดปริมาตรของน้ำ

จากการศึกษาสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA และ BG-11 ในถังคาร์บอยขนาด 8 ลิตร อายุ 20 วัน ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ เท่ากับ 52.11 และ 42.53 มิลลิกรัมพอลิแซ็กคาไรด์ต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ

จากการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติ ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายที่เก็บจากธรรมชาติ สกัดด้วยน้ำร้อน เอทานอล 80 เปอร์เซนต์ และ EDTA 0.1 โมลาร์ ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ใกล้เคียงกัน กลุ่มเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นสูตร BGA ที่ไม่มีการเติมไนโตรเจน ที่สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าอาหารสูตร BGA+N ดัดแปลงโดยการเติมไนโตรเจน ($NaNO_3$) ส่วนกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BG-11-N ดัดแปลงโดยไม่เติมไนโตรเจน ($NaNO_3$) และสูตร BG-11 มีการเติมไนโตรเจน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใกล้เคียงกัน

การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร BGA BG-11 BG-11-N และจากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งมีของเหลวหนืดอยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA กับ BG-11 ที่สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล และ EDTA ยกเว้นกลุ่มเซลล์จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร BGA+N ที่สกัดด้วยเอทานอล ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อน การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นและในอาหารเหลวสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร BG-11

เมื่อทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ จากกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเยลลี จากกลุ่มเซลล์ทรงกลมที่มีของเหลวหนืดอยู่ภายในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์สาหร่าย จากอาหารเพาะเลี้ยง และจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์บนอาหารวุ้น ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำร้อน เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ และ EDTA 0.1 โมลาร์ มาวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี เครื่องตรวจสอบชนิด mass selective detector พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ และทุกการเพาะเลี้ยงให้องค์ประกอบน้ำตาลเช่นเดียวกันทั้ง 11 ชนิด ได้แก่ ฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค อะราบิโนส และแรมโนส ในปริมาณที่แตกต่างกันไป

จากการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยง สูตรอาหารและตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการผลิตและสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายเห็ดลาบ เพื่อศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาล พบว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อน เป็นสภาวะเพาะเลี้ยง สูตรอาหารและตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการผลิตและสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ เพื่อให้ได้ปริมาณองค์ประกอบของน้ำตาลมากที่สุด

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลจากพอลิแซ็กคาไรด์จากแหล่งเพาะเลี้ยงต่าง ๆ นั้นมีองค์ประกอบของน้ำตาลถึง 11 ชนิด แสดงถึงลักษณะของโครงสร้างที่มีความซับซ้อน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษามวลโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ เพื่อใช้ในการประกอบกับโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์

และควรมีการศึกษาคุณสมบัติด้านความหนืด สำหรับใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ทำให้เกิดอิมัลชัน เกิดรูปเจลที่มีความยืดหยุ่น เกิดความหนืดของสารละลาย อุตสาหกรรมการเกษตร ทำให้เกิดโครงสร้างดินที่ดีจากการรวมตัวของอนุภาคเม็ดดิน อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง การจับตัวของแป้งเสถียรขึ้น ทำให้ผิวขาว อุตสาหกรรมปิโตรเลียม ใช้ดันน้ำมันให้ขึ้นจากพื้นใต้ดิน เป็นต้น ยังเป็นแนวทางในการนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปประยุกต์ใช้ เนื่องจากสาหร่ายเห็ดลาบมีคุณสมบัติในการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์ สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ง่าย โดยไม่ต้องทำให้เซลล์แตก จึงเป็นการประหยัดต้นทุนการผลิต

บรรณานุกรม

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2537. สาหร่าย. กรุงเทพ ฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abdelahad, N and Bazzichelli, G. 1989. Ultrastructure and development of "coccoid cells" of *Nostoc commune* (Cyanophyta). **Br. J. Phycol.** 24:217-222.

Allen, M.M. and Smith, A.J. 1969. Nitrogen cholorosis in blue-green algae. **Arch. Microbiolo.** 69(114): 45-48.

Antarikanonda, P.., Berndt, H., Mayer, F. 1980. Hydrogen: a new inhibitor of photosynthesis in the blue-green alga (Cyanobacterium) *Anabaena* sp. TA.1. **J. Archive Microbiol.** 145: 1-10.

Arad, S.M. 1988. **Production of sulphated polysaccharides from red unicellular algae.** *In*: Algal biotechnology (stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. and Christiaen, D., Eds.) pp. 65-87. Elsevier, London.

Atkins, E.D.T. 1986. Biomolecular structures of naturally occurring carbohydrate polymers. **Int. J. Biol. Macromol.** 8: 323-329.

Bar-Or, Y., Kessel, M. and Shilo, M. 1989. **Mechanisms for release of the benthic cyanobacterium *Phormidium* strain J-1 to water column.** *In*: Microbial mats-physiological ecology of benthic microbial communities (Cohen, Y. and Rosenberg, E., Eds.) pp. 214-218. American society for microbiology, Washington DC.

Bar-Or, Y. and Shilo, M. 1987. Characterization of macromolecular flocculants produced by *Phormidium* sp. Strain J-1 and by *Anabaenopsis circularis* PCC 6720. **Appl Environ. Microbiol.** 53: 2226-2230.

_____ 1988. The role of cell-bound flocculannnts in coflocculation of benthic cyanobacteria with clay particles. **FEMS Microbiol. Ecol.** 53: 169-174.

Batterton, J.C. J. and van Baalen, C. 1971. Growth responses of blue-green algae to sodium cholride concentration. **Arch. Microbiol.** 76: 151-165.

Becker, E.W. 1994. **Microalgae : Biotechnology and Microbiology.** 1st ed. Great Britain : Cambridge University Press.

Bender, J., Rodriguez-Eaton, S., Ekanemesang, U.M. and Phillips, P. 1994. Characterization of metal-binding bioflocculants produced by the cyanobacterial component of mixed microbial mats. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 2311-2315.

Bishop, C.T., Adams, G.A. and Hughes, E.O. 1954. A polysaccharide from the blue-green alga, *Anbabaena cylindrica*. **Can. J. Chem.** 32: 999-1003.

Blenton, J., Meganelle, P., Sansoulet, J., Goursaud, S. and Tchapla, A. 1996. Characteization of neutral sugars and uronic acids after methanolysis and trimethylsilylatioon of recognition of plant gums. **J. Chromtograp. A.** 720:27-49.

Bloor, S. and England, R. R. 1989. Antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. **J. Appl. Phycol.** 1:367-372.

Bogorad, L. 1975. Phycobiliproteins and complementary chromatic adaption. **Ann. Rev. Plant Physiolo.** 26: 369-401.

Bold, H.C. and Michael, J.W. 1978. **Introduction to the Algae.** New Jersy : Prentice-Hall Inc.

Borowitzka, M.A. 1998. "Patent". **J. Appl. Phycol.** 1: 385.

Canto de Loura, I., Dubaco, J.P. and Thomas, K.C. 1987. The effect of nitrogen deficiency on pigments and lipids of Cyanobacteria. **Plant Physiol.** 83: 838-843.

Cesàro, A., Liut, G., Bertocchi, C., Navarini, L. and Urbani, R. 1990. Physicochemical properties of the exocellular polysaccharide from *Cyanospira capsulata*. **Int. J. Biol. Macromol.** 12: 79-84.

Chu, H.J. and Tsang, C.T. 1988. Research and utilization of cyanobacteria in China: a report. **Arch. Hydrobiol. Suppl.** 80:1-4.

Coleman, J.R. and Colman, B. 1981. The Effect of pH on photosynthesis and inorganic carbon accumulation in blue-green alga in photosynthesis IV. in Akoyunoglou, G. **Regulation of Carbon Metabolism.** Philadelphia : Balabam International Science Services.

Cook, J.R. 1965. Influence of light on acetate utilization in green *Euglena*. **Plant Cell Physiolo.** 71: 177-184.

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. and Marrie, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu. Rev. Microbiol.** 41: 435-464.

Costerton, J.W., Irvin, R.T. and Cheng, K.J. 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annu. Rev. Microbiol.** 35: 299-324.

Crescenzi, V. 1994. Polysaccharide science and technology: development and trends. **Trends Protein Sci.** 2: 104-109.

de Caire, G.Z., de Cano, M.S., Mule, M.C.Z., de Halperin, D.R. and Galvagno, M. 1987. Action of cell-free extracts and extracellular products of *Nostoc muscorum* of growth of *Sclerotinia sclerotiorum.* **Phyton.** 47:43-46.

De Philippis, R., Margheri, M.C., Materassi, R. and Vincenzini, M. 1998. Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers. **Appl. Envirom. Microbiol.** 64: 1130-1132.

De Philippis, R., Margheri, M.C., Pelosi, E. and Ventura, S. 1993. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. **J. Appl. Phycol.** 5: 387-394.

De Philippis, R., Margheri, M.C.,Sili, C. and Vincenzini, M. 1995. Cyanobacteria: arpomising group of exocellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae. **Carbohydr. Res.** 190: 235-248.

De Philippis, R., Sili, C., Tassinato, G., Vincenzini, M. and Materassi, R. 1991. Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by *Cyanospira capsulata.* **Biores. Technol.** 38: 101-104.

Desikachary. 1959. **Cyanophyta.** New Delhi: Indian Council of Agricultural Research.

Dodds, W.K., Gudder, D.A. and Mollenhauer, D. 1995. The ecology of *Nostoc.* **J. Phycol.** 31:2-18.

Dubinsky, O., Lerental, Y.B., Christiaen, D., Glaser, R., Barak, Z. and Arad, S.M. 1988. **Production and characterization of polysaccarides in the unicellular red alga *Thodella reticulata.*** *In*: Algal biotechnology (Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. and Christiaen, D., Eds.). Elsevier, London. pp.451-461.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 28:350-356.

Dudman, W.F. 1977. **The role of surface polysaccharides in natural enviromnents.** *In*: Surface carbohydrates of the prokaryotic cell (Sutherland, I.W., ED.). Academic Press, New York. pp. 357-414.Desikachary, T.V. 1959. **Cyanophyta.** New Delhi : Indian Council of Agricultural Research.

Dunn, J.H. and Wolk, C.P. 1970. Composition fo the cellular envelopes of *Anabaena cylindrica.* **J. Bacteriol.** 130: 153-158.

Evans, L.V., Callow, M.E., Percival, E. and Fareed, V. 1974. Studies on the synthesis and composition of extracellular mucilage in the unicellular red alga *Rhodella*. **J. Cell Sci.** 16: 1-21.

Fay, P. 1973. The Heterocyst. 238-259. *in* Carr, N.G. and Whitton, B.A. **The Biology of Blue-Green Algae.** Berkeley : University California Press.

_____ 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbiol. Rev.** 50(2) : 340-373.

Fattom, A. and Shilo, M. 1984. Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 47: 135-143.

_____ 1984. *Phormidium* J-1 bioflocculant : production and activity. **Arch. Microbiol.** 139: 421-426.

Filali , M.R., Cormet, J.F., Fontaine, T., Fournet, B. and Dubertret, G. 1993. Production, isolation and preliminary characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biotechnol. Lett.** 15: 567-572.

Fischer, D., Schlosser, U.G. and Pohl, P. 1997. Exopolysaccharide production by cyanobacteria grown in closed photobioreactors and innobilized using white cotton towelling. **J. Appl. Phycol.** 9: 205-213.

Flaibani, A., Olsen, Y. and Painnter, T.J. 1989. Polysaccharides in desert reclamation: composition of exocellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae. **Carbohydr. Res.** 190: 235-248.

Fogg, G.E. 1994. Growth and heterocyst production in *Anabaena cylindrica* Lemm. **New phyco.** 43: 164-175.

Fogg, G.E., Steward, W.D.P., Fay, P. and Walsby, A.E. 1974. **The Blue-Green algae.** 2nd ed. London : Academic Press.

Fritsch, F.E. 1945. **The Structure and Reproduction of the Algae Volume II.** The University Press: Cambridge.

Gantar, M., Rowell, P., Kerby, N.W. and Sutherland, I.W. 1995. Role of extracellular polysaccharide in the colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) roots by N_2-fixing cyanobacteria. **Biol. Fertil. Soils.** 19: 41-48.

Garcia-Pichel, F. and Castenholz, R.W. 1991. Characterization and biological implication of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. **J. Phycol.** 27: 395-409.

_____ 1993. Occurrence of UV absorbing, Mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. **Appl. And Env. Microbiol.** 59(1): 163-169.

Glazer, A.N. 1987. Phycobilisomes : Assembly and Attachment. 69-94. *in* Fay, P. and van Baalen, C. **The Cyanobacteria.** Amsterdam : Elsevier/Science Publishers.

Gloaguen, V., Morvan, H. and Hoffmann. L. 1995. Released and capsular polysaccharides of *Oscillatoriaceae* (Cyanophyceae, Cyanobacteria). **Alg. Studies.** 78: 53-69.

Gudin, C. and Thepennier, C. 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. **Adv. Biotechnol. Process.** 6:73-110.

Harada, T. 1985. Special bacterial polysaccharide and polysaccharides. **Biochem. Soc. Symp.** 48:97-116.

Harold, J.H. and Susanne, R.W. 1980. **Introduction and Guide to Marine Blue-Green Algae.** John Wiley & Suns: New York.

Hassan, S.K. 1988. Carbohydrate chemistry. Academic Press. London. 256 p.

Hasui, M., Matsuda, M., Okutani, K. and Shigeta, S. 1995. In vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Int. J. Biol. Macromol.** 17: 293-297.

Hill, D.R., Keenan, T.W., Helm, R.F., Potts, M., Crowe, L.M. and Crowe, J.H. 1997. Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion to membrane vesicles during desiccation. **J. Appl. Phycol.** 9:237-248.

Hill, D.R., Peat, A. and Potts, M. 1994. Biochemistry and structire of the glycan secreted by desiccation-tolerant *Nostoc commune* (Cyanobacteria). **Protoplasma.** 182: 126-148.

Hoppe, H.A. 1979. Marine algae and their products and constituents on pharmacy. in Hoppe, H.A., Levring, T. and Tanaka, Y. (Eds.) **Marine Algae in Pharmaceutical Science.** Vol. 1. Walter de gruyter, Berlin, p. 25-119.

Hori, K., Ishibashi, G. and Okita, T. 1994. Hypocholesterolemic effect of blue-geen alga. Ishikurage (*Nostoc commune*) in rats fed atherogenic diet. **Plant Foods Hum. Nutr.** 45:63-70.

Huang, A., Liu, Y., Paulsen, B.S. and Klaveness, D. 1998. Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with differennt colony morphologies:

comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharide from field colonies and suspension cultures. **J. Phycol.** 34:962-968.

Itoh, H., Noda, H., Amano, Zhuaug, C., Mizuno, T. and Ito, H. 1993. Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae. **Anticancer Res.** 13: 2045-2052.

Kaplan, D., Christiaen, D. and Arad, S.M. 1987. Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. **Appl. Environ. Microbiol.** 53: 2953-2956.

Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. and Aaronson, S. 1986. Algal Nutrition. 147-198. *in* Richmond, A. **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture.** CRC Press. Florida.

Kumar, K.D. 1990. **Introductory Phycology.** New Delhi : Affiliated East-West Press Private Limited.

Lama, L., Nicolaus, B., Calanfrelli, V., Manca, M.C., Romano, I. And Gambacorta, A. 1996. Effect of growth conditions on endo- and exopolymer biosynthesis in *Anabaena cylindrica* 10 C. **Phytochem.** 42: 655-659.

Lazaroff, N. 1973. Photomorphogenesis and nostocacean development. *In* Carr, N.G. and Whitton, B.A. (Eds.) **The Biology of Blue-Green Algae.** Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.279-319.

Lem, N.W. and Glick, B.R. 1985. Biotechnological uses of cyanobacteria. **Biotech. Advs.** 3:195-208.

Linton, J.D., Ash, S.G. and Huygrechts, L. 1991. **Microbial polysaccharides.** *In*: Biomaterials (Byrom, D.,Ed.). Stockton Press, New York. pp.215-216.

Lund, H.C. and Lund, J.W.G. 1995. **Freshwater algae their microscopic world explored.** Biopress Limited. England, p.234-237.

Lupi, F.M., Fermandes, H.M.L., Sa-Correia, I. And Novais, J.M. 1991. Temperature profiles of cellular growth and exopolysaccharide synthesis by *Botryococcus braunii* Kütz. UC58. **J. Appl. Phycol.** 3: 35-42.

Marra, M., Palmer, A., Ballio, A., Segre, A. and Slodki, M.E. 1990. Structural characterization of the exocellular polysaccharide from *Cyanospira capsulata*. **Carbohydr. Res.** 197: 338-344.

Matulewicz, C.M., Percival, E.E. and Weigel, H. 1984. Water-soluble polysaccharides of antarctic and cultured *Phormidium* species of Cyanophyceae. **Phytochemistry.** 23: 103-105.

Mazor, G., Kidron, G.J., Vonshak, A. and Abeliovich, A. 1996. The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbial crusts. **FEMS Microbiol. Ecol.** 21: 121-130.

Mehta, V.B. and Vaidya, B.S. 1978. Cellular and extracellular polysaccharides of the blue-green alga *Nostoc*. **J. Exp. Bot.** 29: 1423-1430.

Molnàr-Perl, I. and Horvàth, K. 1996. Simultaneous quantitation of Mono-, Di- and Trisaccharides as their TMS ether oxime derivatives by GC-MS. **Chromatographia.** 45: 1997

Moore, B.G. and Tischer, R.G. 1964. Extracellular polysaccharides of algae: effects on life-support systems. **Scicnce.** 145: 586-587.

Morris, I. 1968. **An Introduction to the Algae.** London : Hutchison & Co (Publishers) LTD.

_____ 1978. Nitrogen assimilation and protein synthesis. in Stewart, W.D.P. **Algal Physiology and Biochemistry.** Oxford : Blackwell Scientific.

Morvai, M., Molnàr-Perl, I. and Knausz, D. 1991. Simultaneous gas-liquid chromatographic determination of sugars and organic acids as trimethylsilyl derivatives in vegetables and strawberries. **J. Chromatogr.** 552: 337-344.

Morvan, H., Gloaguen, V., Vebret, L., Joset, F. and Hoffmann, L. 1997. Structure-function investigations on capsular polymers as a necessary step for new biotechnological applications: the case of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. **Plant Physilol. Biochem.** 35:671-683.

Oquist, G. 1971. Changes in pigment composition and photosynthesis induce by iron-deficiency in the blue-green alga *Anacystic nidulans*. **Phycol. Plant.** 25: 188.

Otero, A. and Vincenzini, M. 2003. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. **J. Biotechnol.** 102: 143-152.

Painter, T.J. 1983. Algal polysaccharides. In: The polysaccharides (Aspinall, G.O.,Ed), Vol. 2 Academic Press New York. pp. 195-285.

Panoff, J,M., Priem, B., Morvan, H. and Joset, F. 1988. Sulphated exopolysaccharides produced by two unicellular strains of cyanobacteria, *Synechocystis* PCC 6803 and 6714. **Arch. Microbiol.** 150: 558-563.

Panoff, J.M. and Joset, F. 1989. Selection by anion-exchange chromatography of exopolysaccharide matants of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 1452-1456.

Parker, D.L., Schram, B.R., Plude, J.L. and Moore, R.E. 1996. Effect of metal cations on the viscosity of a pectin-like capsular polysaccharide from the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 1208-1213.

Phlips, E.J., Zeman, C. and Hansen, p. 1989. Growth, Photosynthesis, nitrogen fixation and carbohydrate production by a unicellular cyanobacterium, *Cynechococus* sp. (Cyanophyta). **J. Appl. Phycol.** 1: 137-145.

Plude, J,L., Parker, D.L., Schommer, O.J., Timmerman, R.J., Hagstrom, S.A., Joers, J.M. andHnasko, R. 1991. Chemical characterization of polysaccharide from the slime layer of the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1696-1700.

Potts, M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. **Microbiol. Rev.** 58:755-805.

Prieto, B., Pardo, M.A., Garbisu, C., Llama, M.J. and Serra, J.L. 1997. Phosphate uptake by phosphorus-starved cells of the cyanobacterium *Phormidium larminosum*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13: 699-705.

Prosperri, C.H. 1994. A cyanophyte capable of fixing nitrogen under high levels of oxygen. **J. Phycol.** 30: 222-224.

Rai, A.N., Rao, V.V. and Singh, H.N. 1985. The biology fo cyanobacterial (blue green-algae) akinetes (spores). **J. plant Sci.** 1: 1-20.

Ramus, J. 1972. The production of extracellular polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium aerugineum*. **J. Phycol.** 8: 97-111.

Ramus, J. and Groves, S. 1972. Incorporation of sulfate into the capsular polysaccharide of the red alga *Porphyridium*. **J. Cell Biol.** 54: 399-407.

Ramus, J. and Jone, M.C. (eds.). 1988. Proceedings of the international workshop on polysaccharides from microalgae; **New Agroindustry.** Duke University, North Carolina, USA, 28 October-1 November.

Ramus, J. and Robins, D. 1975. The correlation of Golgi activity and polysaccharide secretion in *Porphyridium*. **J. Phycol.** 11: 70-74.

Reddy, K.J., Soper, B.W., Tang, J. and Bradley, R.L. 1996. Phenotypic variation in exopolysaccharide production in the marine, aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 12: 311-318.

Rehm, B.H. and Valla, S. 1997. Bacterial alginates: Biosynthesis and applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48: 281-288.

Richmond, A. 1986. **Cell response to enviromental factors.** 69-115. *In* Richmond, A. CRC handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press: Florida.

Riou, D., Colliec-Jouault, S., Pinczon du Sel, D., Bosch, S., Siabvoshian, S., Le Bert, V., Tomasoni, C., Sinquin, C., Durand, P. and Roussakis, C. 1996. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* againsrt a non-small-cell bronchopulmonary carcinomaline. **Anticancer Res.** 16: 1213-1218.

Roberts, IS. 1995. Bacterial polysaccharides in sickness and in health. **Microbiology.** 141: 2023-2031.

Robins, R.J., Hall, D.O., Shi, D.J., Turner, R.J. and Rhodes, M.J.C. 1986. Mucilage acts to adhere cyanobacteria and cultured plant cells to biological and inert surfaces. **FEMS Microbiol. Lett.** 34: 155-160.

Sangar, V.K. and Dugan, P.R. 1972. Polysaccaharide produced by *Anacystis nidulans*: its ecological implication. **Appl. Microbiol.** 24: 732-734.

Sato, N. and Murata, N. 1980. Temperature shift-induce responses in lipids in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*. **Biochem Biophy. Acta.** 619: 353.

Shepherd, R., Rockey, J., Sutherland, I.W. and Roller, S. 1995. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **J. Biotechnol.** 40: 207-217.

Slodki, M.E. 1987. **New bacterial polysaccharides.** *In* Industrial polysaccharides, eds. S.S. Stivala, V. Crescenzi & I.C.M. Dea. Gordon and Breach Science Publishers, New York, pp. 3-14.

Smith, G.M. 1951. **Manual of Phycology (An Introduction to the Algae and their Biology).** The Ronald Press Company: New York.

Sokawa, Y. and Hase, E. 1968. Supressive effect of light on the formation of DNA and on the increase of deoxythymidine monophosphate kinase in chlorella protothecoides. **J. Plant Cell Physiol.** 9: 461.

Stainer, R.Y. and Bazize, G. 1971. Purification and properties of unicelular blue-green algae (order Chlorococcales). **J. Bact. Review.** 35: 171-205.

Stewart, W. 1974. **Algal Physiology and Biochemi*stry*.** Berkeley : University California Press.

Sudo, H., Grant Burgess, K., Takemasa, H., Nakamura, N. and Matsunaga, T. 1995. Sulfated exopolysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytica*. **Curr. Microbiol.** 30:219-222.

Sutherland, I.W. 1985. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharide. **Ann. Rev. Microbiol.** 39:243-270.

_____ 1990. **Biotechnology of microbial polysaccharides.** Cambridege University Press. Cambridege.

Sweely, C.C., Bentley, R., Markita, M. and Wells, W.W. 1963. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivative of sugars and related substance. **J. Am. Chem.** 85: 2495-2498.

Takenaka, H.,Sumiya, T. and Ito, H. 1997. Effects of hot water extract prepared from *Nostoc flagelliforme* on macrophage activities in tumor-bearing mice. **Med. Biol.** 135:231-234. (In Japaneses)

Talling, J.F. 1962. **Freshwater Algae.** *In* Lewin, A. Physiology and Biochemistry of Algae.: Academic Press: New York.

Tease, B., Jurgens, U.J., Golecki, J.R., Heineich, U.R., Rippka, R. and Weckesser, J. 1991. Fine-structural and chemical analyses on inner and outer sheath of the cyanobacterium *Gloeothece* sp. PCC 6909. **Antonie van Leeuwenhoek.** 59:27-34.

Thepenier, C., Chaumont, D. andGudin, C. 1988. **Mass culture of *Porphyridium cruentum*: a multiproduct strategy for the biomass valorization.** *In*: Algal biotechnology (Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. and Christiaen, D., Eds.). Elsevier, London. pp. 413-420.

Tischer, R.G. and Davis, E.B. 1971. The effect of various nitrogen sources upon the production of exocellular polysaccharide by the blue-green alga *Anabaena flos-aquae* A-37. **J. Exp. Bot.** 22: 546-551.

Trainor, F.R. 1978. **Introductory Phycology.** John Wiley & Suns: New York.

Tseng, C.T. and Zhao, Y. 1994. Extraction, purification and identification of polysaccharides of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Cyanophyceae). **Alg. Studies.** 75: 303-312.

Van Baalen, C. and O' Donnell, R. 1978. Isolation of a nickel-dependent blue-green alga. **J. Gen. Microbiol.** 105: 351.

Venkataraman, G.S. 1957. A note on the occurrence of three-pored heterocyst in *Mastigocladus laminosus*. **Current Science.** 26: 254.

Vincenzini, M., De Philippis, R.,. Sili, C. and Materassi, R. 1990. Studies on exopolysaccharide release by diazotrophic batch cultures of *Cyanospira capsulata*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 34: 392-396.

_____ 1990. Stability of molecular and rheological properties of the exopolysaccharide produced by *Cyanospira capsulata* cultivated under different growth conditions. **J. Appl. Phyco.** 5:539-541.

Vonshak, A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae, 117-145. in Richmond, A. **CRC Handbook of Microalgal Mass Cuture.** Florida : CRC Press.

Vonshak, A., Cohen, Z. and Richmond, A. 1985. The feasibility of mass cultivation of *Porphiridium*. **Biomass.** 8: 13-25.

Wang, W.S. and Tischer, R.G. 1973. Study of the extracellular polysaccharides produced by a blue-green alga, *Anabaena flos-aquae* A-37. **Arch. Mikrobiol.** 91: 77-81.

Watt, W.D. 1969. Extracellular release of organic matter from two fresh water diatoms. **Ann. Botani.** 33: 427-437.

Whitfield, C. 1988. Bacterial extracellular polysaccharides. **Can. J. Microbiol.** 34: 415-420.

Witvrouw, M. ans De Clercq, E. 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **Gen. Pharmacol.** 29: 497-511.

Zevenhuizen, L.P.T.M. 1987. Production of exopolysaccharides by fast-growing rhizobia and agrobacteria. in **Industrial polysaccharide,** eds. S.A. Stivala, V. Crescenzi & I.C.M. Dea. Gordon and Breach Science Publishers, New York, pp. 45-68.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร BGA medium (Antarikanonda, 1980) สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีส่วนประกอบดังนี้

NaCl	0.070	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.380	กรัม
$CaCl_2$	0.080	กรัม
K_2HPO_4	0.600	กรัม
$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$	0.010	กรัม
Titriplex III	0.027	กรัม
H_3BO_3	0.003	กรัม
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.002	กรัม
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.008	กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0003	กรัม
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.00008	กรัม
$CoCl_2$	0.00002	กรัม
Deionized water	1000	มิลลิลิตร

พีเอช 7.5

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ สูตรอาหารแข็ง BGA เตรียมโดยการเติมผงวุ้น 15 กรัมต่อลิตร

สูตรอาหารแข็ง BGA+N เตรียมโดยการเติม $NaNO_3$ 1.5 กรัมต่อลิตร

2. สูตรอาหาร BG-11 Medium (Stainer และคณะ, 1971) สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีส่วนประกอบดังนี้

$NaNO_3$	1.500	กรัม
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.040	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.075	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.036	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.006	กรัม
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), disodium magnesium salt	0.001	กรัม
Na_2CO_3	0.020	กรัม
Trace metal mix A_5 (see below)	1.000	กรัม
Deionized water	1000	มิลลิลิตร

Trace metal mix A_5

H_3BO_3	2.860	กรัมต่อลิตร
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.810	กรัมต่อลิตร
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.222	กรัมต่อลิตร
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.390	กรัมต่อลิตร
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.079	กรัมต่อลิตร
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.049	กรัมต่อลิตร

พีเอช 7.4

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ สูตรอาหารแข็ง BG-11 เตรียมโดยการเติมผงวุ้น 15 กรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร BG-11-N เตรียมโดยไม่ใส่ $NaNO_3$

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-Sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956)

การเตรียมสารละลายฟีนอล 5%

ชั่งฟีนอล 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 95 กรัม ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 10 ถึง 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ แล้วเติมสารละลายฟีนอล 5 % 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 5 มิลลิลิตร โดยปล่อยให้กรดซัลฟูริคไหลลงบนผิวของสารละลายในหลอดทดสอบโดยตรงเพื่อให้มีการผสมที่ดีและรวดเร็ว อย่าปล่อยให้กรดซัลฟูริคไหลลงตามข้างหลอด ให้ระวังสารละลายในหลอดร้อน ห้ามเขย่าหลอด
4. ตั้งหลอดทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าให้เข้ากัน
5. นำหลอดวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 490 นาโนเมตร สำหรับการวิเคราะห์น้ำตาล hexose และ 480 นาโนเมตร

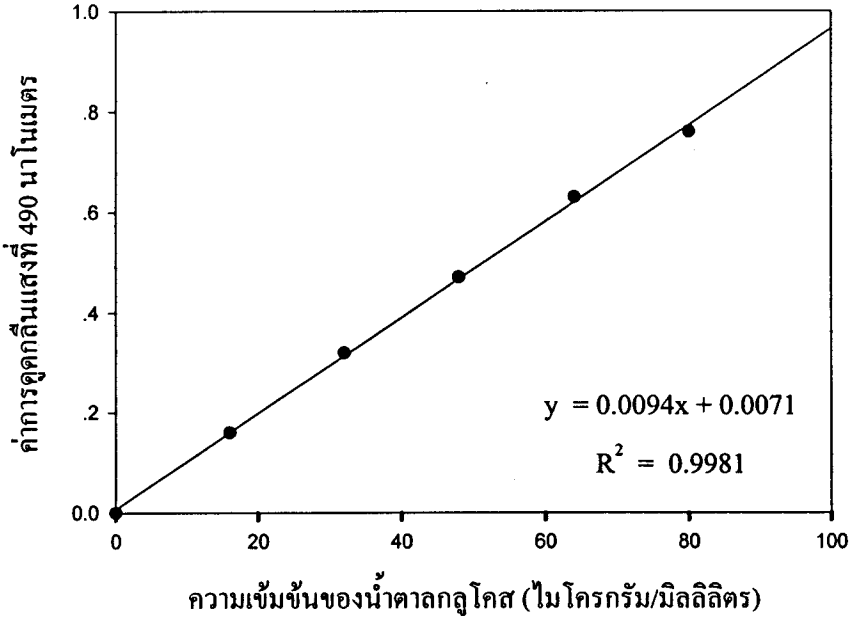
สำหรับ blank ให้เตรียมโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

สำหรับตัวอย่างเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง ให้นำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานตามชนิดของน้ำตาลที่ต้องการจะวิเคราะห์ในตัวอย่าง

การหาสมการของกราฟมาตรฐาน

1. เตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน stock solution โดยละลายน้ำตาล 0.04 กรัม ในขวดตวงปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร สารละลายน้ำตาลที่ได้นี้จะมีความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. เจือจาง stock solution ของสารละลายน้ำตาล ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาล 0 16 32 48 64 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. ทำต่อไปเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง
4. นำค่า absorbance ที่วัดได้กับค่าความเข้มข้นของน้ำตาลมาคำนวณหาสมการของกราฟมาตรฐานโดยวิธี linear regression

5. แทนค่า absorbance ของตัวอย่าง ในสมการของกราฟมาตรฐานจะได้ความเข้มข้นของน้ำตาล



ภาพภาคผนวก ข 1 แสดงกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

3. การคำนวณปริมาณน้ำตาล

คำนวณโดยใช้วิธีสารมาตรฐานภายใน (internal standard)

การหา m-factor = $(A_{in}/A_a) \times (W_a/W_{in})$

เมื่อ A_a และ A_{in} เป็นพื้นที่ใต้กราฟของสารตัวอย่างมาตรฐานและสารมาตรฐานภายใน ตามลำดับ

W_a และ W_{in} เป็นน้ำหนักของสารตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานภายใน ตามลำดับ

$$\% \text{ น้ำตาลตัวอย่าง} = (A_u/A_{in}) \times (W_{in}/W_u) \times (100/\text{m-factor})$$

เมื่อ A_u เป็นพื้นที่ใต้กราฟของสารที่จะวิเคราะห์

W_u เป็นน้ำหนักของสารที่จะวิเคราะห์

$$\text{โมลของน้ำตาลตัวอย่าง} = \frac{\% \text{ น้ำตาลตัวอย่าง}}{100} \times \frac{\text{น้ำหนักของน้ำตาลตัวอย่าง}}{\text{มวลโมเลกุลของน้ำตาลตัวอย่าง}}$$

$$\text{อัตราส่วนโมลาร์ (molar ratio)} = \frac{\text{โมลของน้ำตาลตัวอย่าง}}{\text{โมลของน้ำตาลที่ต้องการเปรียบเทียบ}}$$

ตัวอย่างการคำนวณ น้ำตาลฟูโคส จากสาหร่ายก็บจากธรรมชาติ สกัดด้วยน้ำร้อน ครั้งที่ 1

พื้นที่ใต้กราฟของน้ำตาลฟูโคสมาตรฐาน เท่ากับ 191561543

พื้นที่ใต้กราฟของแมนนิทอลมาตรฐาน เท่ากับ 14586723

พื้นที่ใต้กราฟของแมนนิทอลในตัวอย่าง เท่ากับ 14589052

พื้นที่ใต้กราฟของน้ำตาลฟูโคส เท่ากับ 5924815

น้ำหนักของน้ำตาลฟูโคส เท่ากับ 100 ไมโครกรัม

น้ำหนักของแมนนิทอล เท่ากับ 300ไมโครกรัม

น้ำหนักของสารตัวอย่าง เท่ากับ 5 มิลลิกรัม

มวลโมเลกุลของน้ำตาลฟูโคส เท่ากับ 164.16 กรัมต่อโมล

m-factor = (191561543/100) X(14586723/300)

= 39.4

% น้ำตาลฟูโคส = (5924815 X300 X100)/(14589052 X5000 X39.4)

= 0.08 (โดยน้ำหนัก)

โมลของน้ำตาลฟูโคส = (0.08 X0.005)/(100 X164.16)

= $2.37 X10^{-8}$

อัตราส่วนโมลาร์ = $2.37 X10^{-8}$ / $2.32 X10^{-9}$

= 8.12

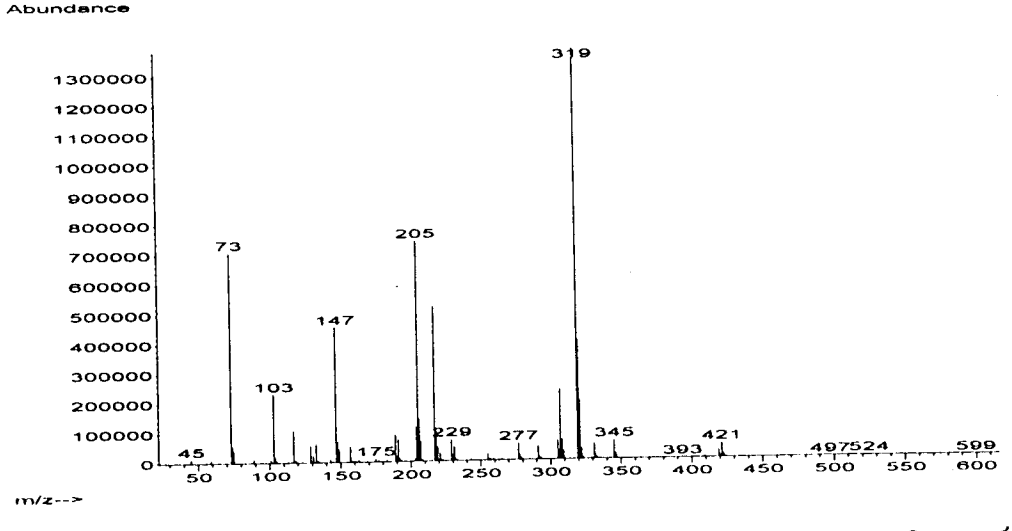
หมายเหตุ การเทียบอัตราส่วนโมลาร์ของสารตัวอย่าง เทียบกับแมนโนส จากสาหร่ายเก็บจากธรรมชาติ สกัดด้วยน้ำร้อน สูตรที่ 1 ครั้งที่ 1 มีโมล เท่ากับ $2.37 X 10^{-9}$ ตามการคำนวณดังที่กล่าวมาแล้ว

ภาคผนวก ค

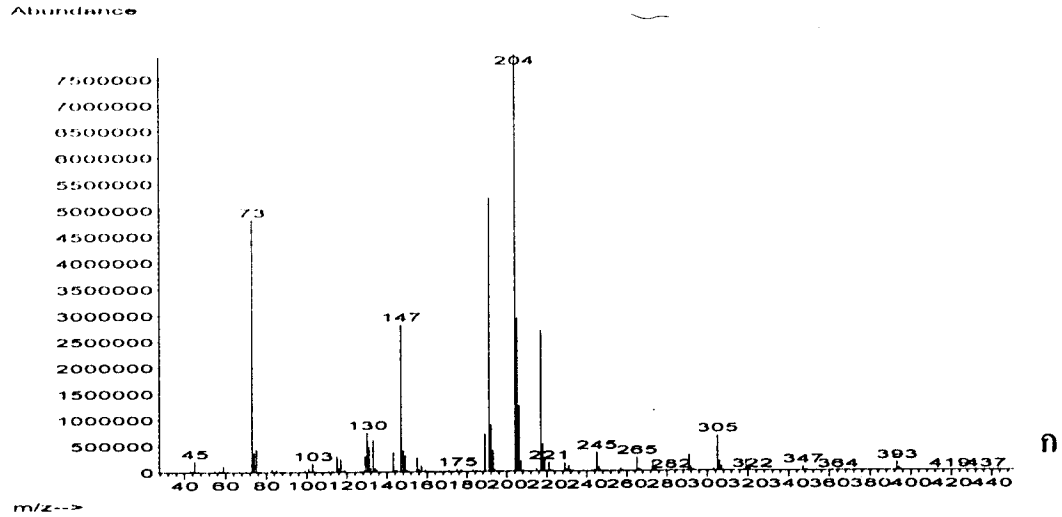
ข้อมูล

ตารางภาคผนวก ค1 ค่า Retention time ของน้ำตาลมาตรฐานวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทรกราฟี

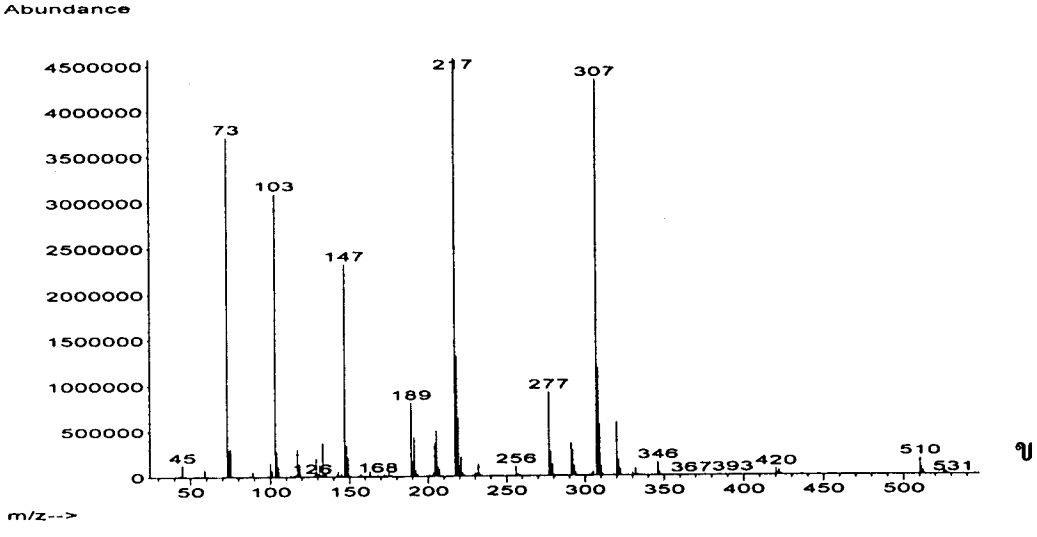
น้ำตาลมาตรฐาน	ค่า Retention time (นาที)
ฟูโคส	4.33
ไซโลส	4.73
ไรโบส	5.28
แมนโนส	5.67, 7.37
ฟรุคโตส	5.91, 7.54
กาแลคโตส	6.50
กลูโคส	6.97
แมนนิทอล	7.23
กรดกาแลคทิวโรนิค	9.50
กรดกลูคิวโรนิค	10.50
อะราบิโนส	4.96, 5.09
แรมโนส	5.82, 6.01



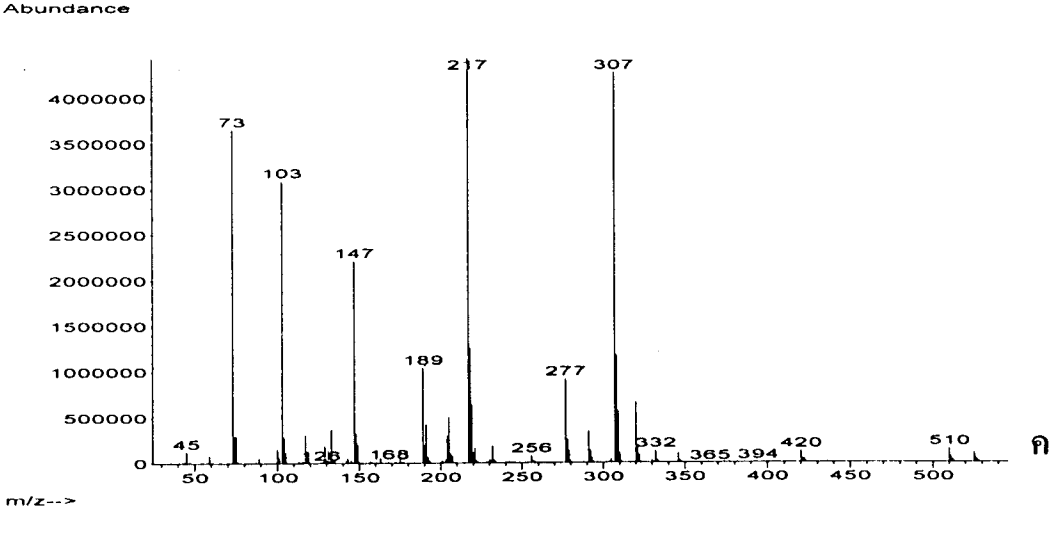
ภาพภาคผนวก ค1 สเปคตรัมของแมนนิทอล เป็นสารมาตรฐานภายในของการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทรกราฟี



ก

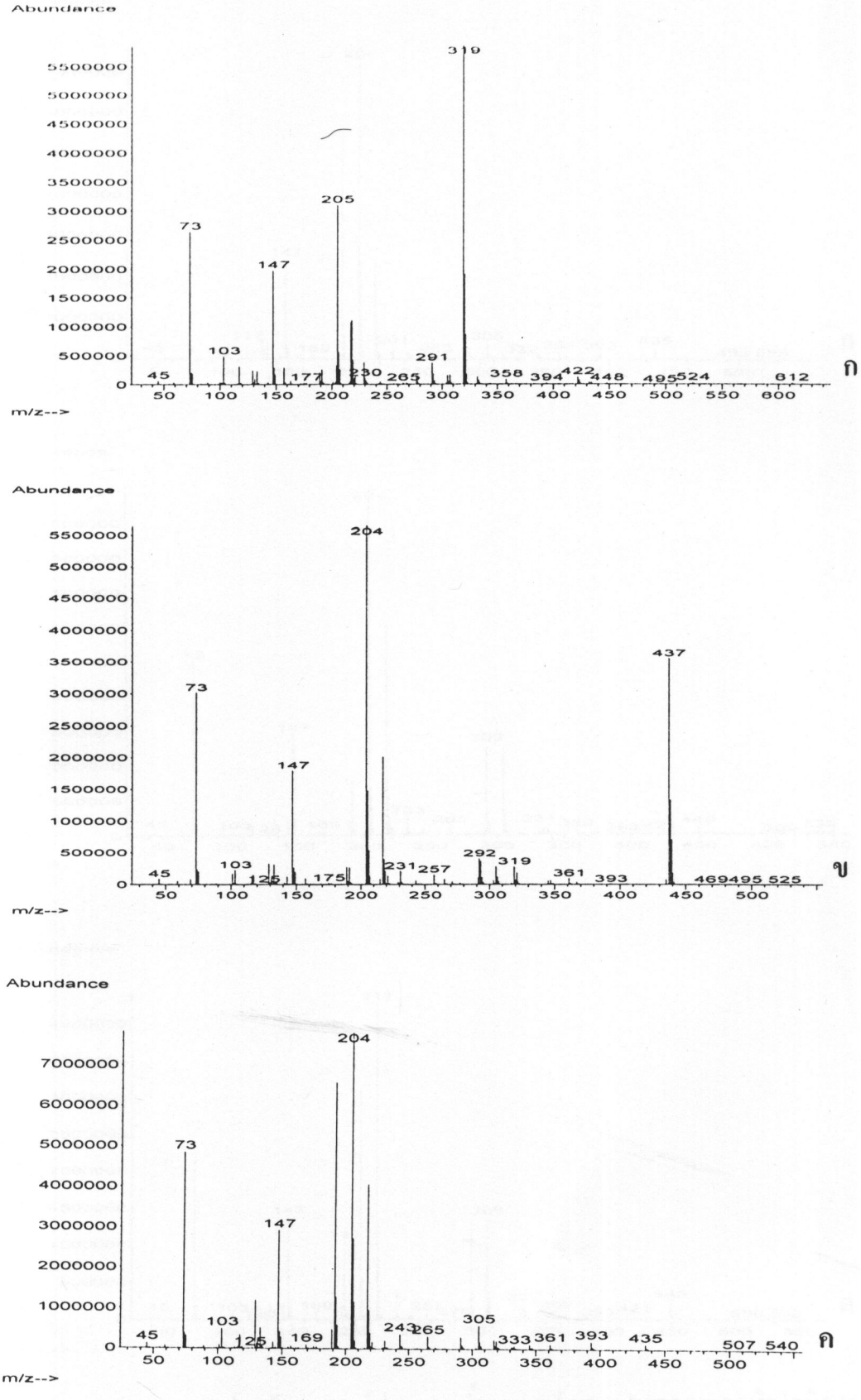


ข

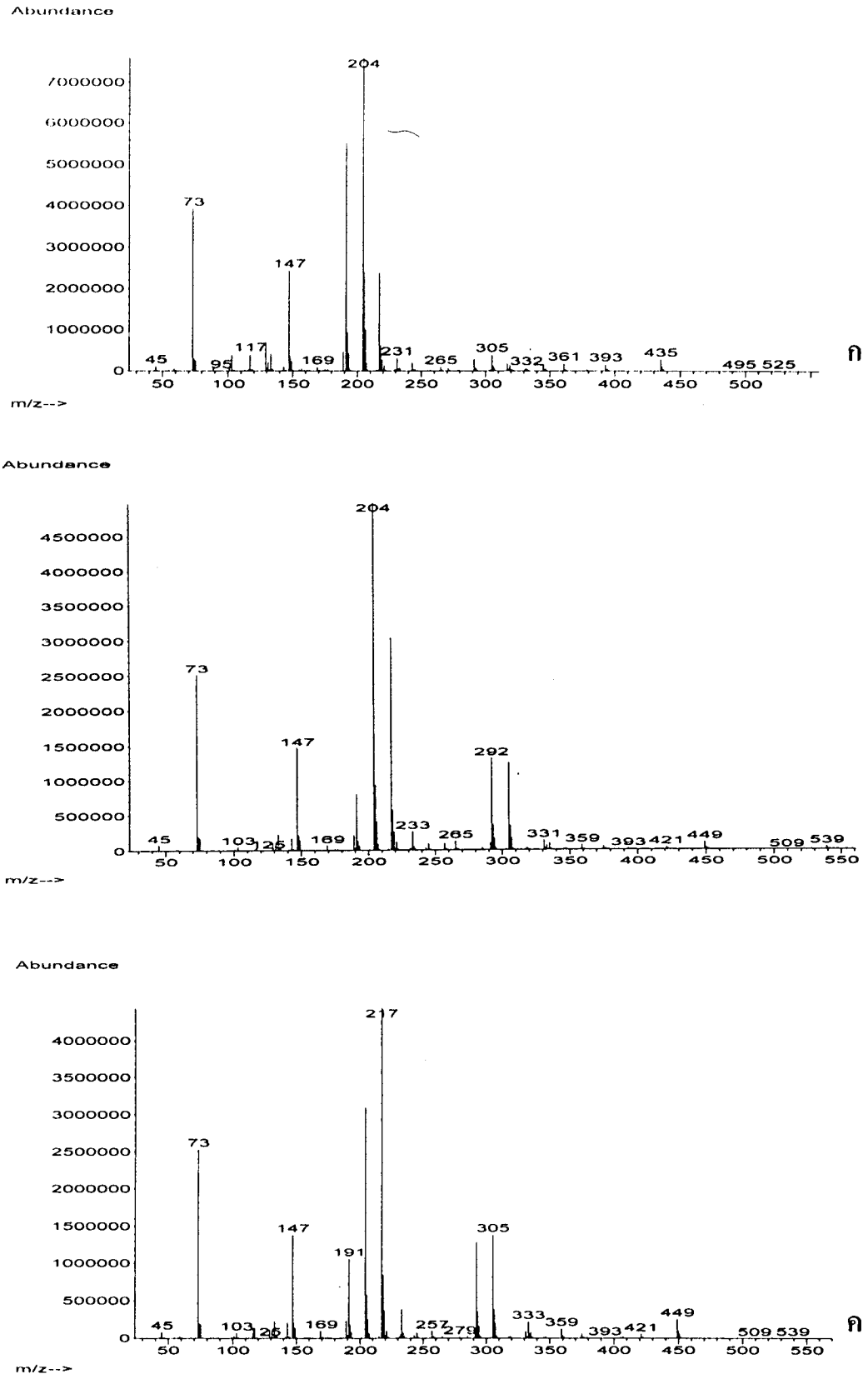


ค

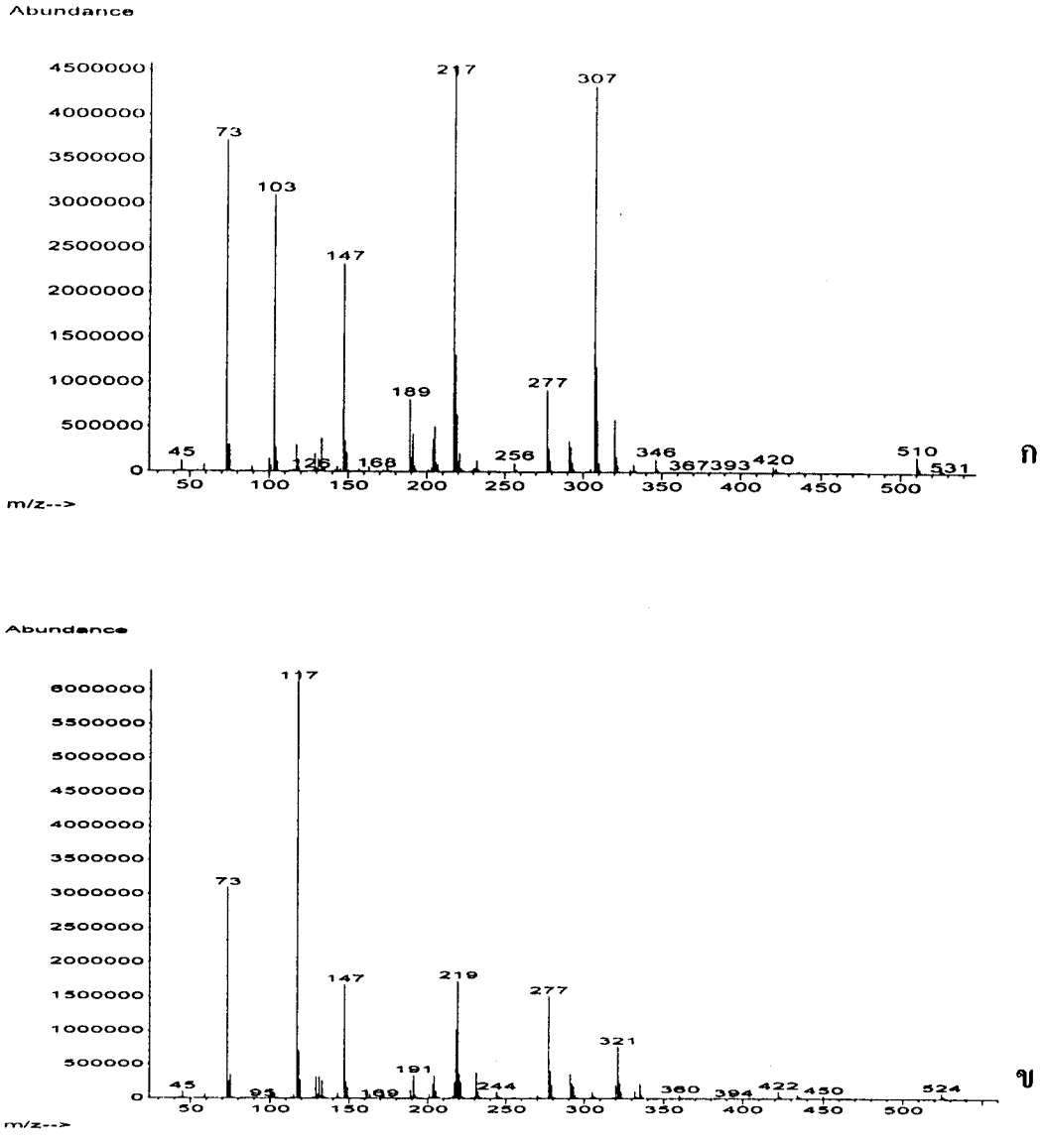
ภาพภาคผนวก ค2 สเปคตรัมขององค์ประกอบน้ำตาลฟูโคส (ก.) ไซโลส (ข.)ไรโบส (ค.) จากการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทรกราฟี



ภาพภาคผนวก ค3 สเปคตรัมขององค์ประกอบน้ำตาลแมนโนส (ก.) ฟรุคโตส (ข.) กาแลคโตส (ค.) จากการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทรกราฟี



ภาพภาคผนวก ค4 สเปคตรัมขององค์ประกอบน้ำตาลกลูโคส (ก.) กรดกาแลคทิวโรนิค (ข.) กรดกลูคิวโรนิค (ค.) จากการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทรกราฟี



ภาพภาคผนวก ค5 สเปคตรัมขององค์ประกอบน้ำตาลอะราบิโนส (ก.) แรมโนส (ข.) จากการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทรกราฟี

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนารินทร์ จันทร์สว่าง เกิดเมื่อวันที่ 29 มีนาคม 2522 ที่จังหวัดฉะเชิงเทรา สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี) จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีการศึกษา 2544

ได้รับทุนการศึกษาจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_646002 ในการทำวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทที่คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เป็นระยะเวลา 2 ปี

ปี 2546 จัดโปสเตอร์เสนอผลงานวิทยานิพนธ์ เรื่อง องค์ประกอบของน้ำตาลพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยสาหร่ายเห็ดลาบ (*Nostoc commune*, Cyanophyta) ในงาน การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 7 เมื่อวันที่ 12-16 ตุลาคม ที่จังหวัดเชียงใหม่