รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาปริมาณและการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินในสาหร่าย
สีเขียวแกมน้ำเงินและการผลิต heterologous protein
ของสารไฟโคไซยานินโดยใช้ระบบแบคทีเรีย

Determination of Phycocyanin, expression patterns of the Phycocyanin gene in Cyanobacteria and heterologous protein production of Phycocyanin using Bacterial system

ผู้วิจัย

รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, ชลี ไพบูลย์กิจกุล, มะลิวัลย์ คุตะโค,
กาญจนา สิทธิขันแก้ว และ วิรักษ์ วิสุทธิผล

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

รหัสโครงการ 2559A10803005

สัญญาเลขที่ 41/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาปริมาณและการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและการผลิต heterologous protein ของสารไฟโคไซยานินโดยใช้ระบบแบคทีเรีย

Determination of Phycocyanin, expression patterns of the Phycocyanin gene in Cyanobacteria and heterologous protein production of Phycocyanin using Bacterial system

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางรชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาบูรพา (60%)

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

นายชลี ไพบูลย์กิจกุล	คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี	(10%)
นางมะลิวัลย์ คุตะโค	คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี	(10%)
นางสาวกาญจนา สิทธิขันแก้ว	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ	(20%)
นายวิรักษ์ วิสุทธิผล	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ	(ที่ปรึกษา)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การศึกษาปริมาณและการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและการผลิต heterologous protein ของสารไฟโคไซยานินโดยใช้ระบบแบคทีเรีย ได้ผลงานวิจัยที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการเพิ่มมูลค่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเชิงพานิชย์ เพื่อผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งกำลังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 41/2559

ขอขอบคุณ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ และห้องปฏิบัติการไมโครอะเรย์แบบครบวงจร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ตลอดจนเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องที่ได้อำนวยความสะดวก และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

มีนาคม 2560

บทคัดย่อ

ไฟโคไซยานิน เป็นรงควัตถุประกอบสีน้ำเงิน ผลิตได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ประกอบด้วยองค์ประกอบหน่วยย่อย อัลฟา (PCC-α) และหน่วยย่อยเบต้า (PCC-β) ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากทางอุตสาหกรรมและเภสัชกรรม

ในการศึกษานี้ ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ในสภาวะแสงธรรมชาติ (1.36-1.68 กิโลลักซ์) และสภาวะแสงหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (2.55-3.49 กิโลลักซ์) ตลอดเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแสงธรรมชาติมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดและให้มวลชีวภาพสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (4.02±0.16 กรัมต่อลิตร, $p<0.05$) ในขณะที่สาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแสงฟลูออเรสเซนต์ให้มวลชีวภาพต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1.66±0.01 กรัมต่อลิตร, $p<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตไฟโคไซยานินในสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะที่ต่างกันพบว่า สาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแสงธรรมชาติให้ผลผลิตไฟโคไซยานินสูงที่สุด 3.70±1.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ($p<0.05$) และจากการศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดไฟโคไซยานินด้วยเทคนิค FT-IR พบหมู่ฟังก์ชันของโปรตีน-ลิพิด เอสเทอร์-กรดอะมิโน และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระ ในไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากธรรมชาติและแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ส่วนหมู่ฟังก์ชันของ Alphatic C-H stretching พบเฉพาะในไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากธรรมชาติเท่านั้น

นอกจากนี้ ได้ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *S. platensis* ทั้งหน่วยย่อยอัลฟา (PCC-α) และหน่วยย่อยเบต้า (PCC-β) ซึ่ง PCC-α มีขนาดนิวคลีโอไทด์เต็มยีนในส่วน ORF เป็น 489 คู่เบส แปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 162 กรดอะมิโน พบ Domain ที่สำคัญคือ phycobilisomes ณ ตำแหน่งอะมิโนที่ 7-162 และพบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ PCC-β ซึ่งมีขนาดนิวคลีโอไทด์ 354 คู่เบสแปลงเป็นกรดอะมิโน 118 อะมิโน พบตำแหน่ง Phycobilisome domain ที่ อะมิโนลำดับที่ 7-118 และจากการศึกษาผลกระทบของการให้แสงที่ต่างกัน คือจากหลอดฟลูโอเรสเซนต์และแสงจากธรรมชาติต่อการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินในระดับ mRNA ในสาหร่าย *S. platensis* พบว่าการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินจากการให้แสงจากหลอดฟลูโอเรสเซนต์ สูงกว่าการให้แสงจากธรรมชาติในทั้งหน่วยย่อยอัลฟา (PCC-α) และหน่วยย่อยเบต้า (PCC-β) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ ยังพบว่าในสภาวะการให้แสงที่เหมือนกันการแสดงออกของยีน PCC-α สูงกว่า PCC-β อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อีกด้วย

ผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า รูปแบบของแสงและความเข้มที่แตกต่างกันส่งผลต่อความสมดุลในการควบคุมการสังเคราะห์ยีนและแปลรหัสเป็นโปรตีนไฟโคไซยานิน โดยความเข้มแสงที่มากเกินไปหรือไม่เหมาะสมอาจกระตุ้นการสังเคราะห์ยีนที่มากเกินไป ในขณะที่สาหร่ายมีความเครียดจนเกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนดังกล่าวได้

Abstract

Phycocyanin is a characteristic light blue pigment-protein complex from the light-harvesting phycobiliprotein family, along with allophycocyanin and phycoerythrin. Phycocyanin consists of alpha-component (PCC-α) and beta subunits (PCC-β), which are extremely useful in industrial and pharmacutical sectors.

In this study, *Spirulina platensis* and marine *Spirulina* sp. were cultured under two different light sources, i.e., natural light (1.36-1.68 klx) and fluorescent light (2.55-3.49 klx) (24 hrs.) sources. The results showed that *S. platensis* cultured under natural light source had the highest growth as well as the highest biomass with the statistical significance (4.02±0.16 grams per liter, $p<0.05$). In contrast, marine *Spirulina* sp. cultured under fluorescent light source provided the lowest biomass with the statistical significance (1.66±0.01 grams per liter, $p<0.05$). Moreover, in terms of the productivity of Phycocyanin, *S. platensis* cultured under natural light source provided the highest amount of Phycocyanin (3.70±1.10 milligrams per milliliter, $p<0.05$). The composition of extracted Phycocyanin was investigated by using FT-IR analysis. The results present the functional groups of protein-lipid, esters-amino acids and presence of antioxidant enzyme in Phycocyanin extraction of *S. platensis* and marine *Spirulina* sp. cultured under natural light source and fluorescent light source. While the functional groups of Alphatic C-H stretching was found only in the Phycocyanin extraction of *S. platensis* and marine *Spirulina* sp. cultured under natural light source.

In addition, the nucleotide sequences of Phycocyanin transcripts, PCC-α and PCC-β, of *S. platensis* were investigated. The ORF region of PCC-α of *S. platensis* was 489 nucleotides which translated to 162 amino acid residues. The most important domain, phycobilisomes, was found at amino acid residues of 7 to 162. For PCC-β of *S. platensis*, the parcial ORF region was found with 354 nucleotides size, which translated to 118 amino acid residues. PhycobIlisomes domain was observed at amino acid residues of 7 to 118. Quantitative real-time PCR was used to identify the expression levels of PCC-α and PCC-β, of *S. platensis* cultured in different light sources. The expression levels of both PCC-α and PCC-β of *S. platensis* cultured under fluorescent light source were significantly higher than those of cultured under natural light source ($P <0.05$). Moreover, the expression level of PCC-α was significantly higher than that of PCC-β under the same light source conditions ($P <0.05$).

This research investigated that the different condition of lights and intensity affect to the balancing of gene regulations and protein translation of phycocyanin. Over or inappropriate light intensity may stimulate excessive gene synthesis, while *S. platensis* are acceptable stress until phycocyanin protein synthesis inhibition was occurred.

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ...... ก

บทคัดย่อภาษาไทย...... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ...... ค

สารบัญ...... ง

สารบัญภาพ ...... ฉ

สารบัญตาราง...... ญ

บทที่ 1 บทนำ...... 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา...... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย...... 2

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย...... 2

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย...... 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง...... 4

2.1 ชีววิทยาของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน...... 4

2.2 ไฟโคบิลิโซม (Phycobilisomes)...... 5

2.3 เทคนิคการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อใช้ในการทดลอง...... 9

2.4 เทคนิคทางอณูชีววิทยา...... 10

2.5 การแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ในแบคทีเรีย...... 14

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย...... 16

3.1 สถานที่ทดลอง...... 16

3.2 ส่าหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ใช้ในการทดลอง...... 16

3.3 วิธีการทดลอง...... 16

บทที่ 4 ผลการวิจัย...... 24

4.1 ผลของการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina* sp. 24

4.2 ค่าความเข้มแสงของการเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะแตกต่างกัน.... 30

4.3 การเปรียบเทียบน้ำหนักของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะแตกต่างกัน...... 32

4.4. ปริมาณไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะแตกต่างกัน......... 35

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

4.5 การศึกษาหน่วยย่อยของโปรตีนไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะแตกต่างกันโดยทำอิเลคโทรโพริซิส แบบ SDS-PAGE... 41

4.6 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง สารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะแตกต่างกัน.. 45

4.7 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลโดยใช้เทคนิค Fourier transforms spectra (FT-IR) 49

4.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มยีนของยีนไฟโคไซยานินในส่วนของแอลฟา และเบต้า และระดับการแสดงออกของยีน.. 60

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.. 73

5.1 การเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่เลี้ยงภายใต้แหล่งแสงที่แตกต่างกัน... 73

5.2 ปริมาณสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงภายใต้แหล่งแสงที่แตกต่างกัน.. 74

5.3 การศึกษาหน่วยย่อยของโปรตีนไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกันโดยการทำอิเลคโทรโพริซิส แบบ SDS-PAGE.................................... 75

5.4 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลโดยใช้เทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR)... 76

5.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มยีนของยีนไฟโคไซยานินในส่วนของแอลฟา และเบต้า และระดับการแสดงออกของยีน.. 76

5.6 สรุปผลการวิจัย (Conclusions)... 77

5.7 ข้อเสนอแนะ.. 78

5.8 คุณค่าและประโยชน์ของผลผลิตการวิจัย.. 79

5.9 แนวทางการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ และ/หรือพัฒนาต่อยอด........................... 79

5.10 ผลผลิต (Output) ที่เกิดขึ้นในช่วงที่ได้รับทุน.. 79

รายงานการเงิน.. 90

บรรณานุกรม.. 91

ภาคผนวก... 94

ประวัติผู้วิจัย... 104

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 *Spirulina* sp.. 4

2.2 *Synechocystis* sp.. 5

2.3 แบบจำลองการจัดเรียงของไฟโคไบลิโซม (Phycobilisome)........................... 5

2.4 ตำแหน่งการเกิดพันธะโควาเลนท์ระหว่างไบลินกับอะโพโปรตีนของ C-Phycocyanin.. 7

2.5 โครงสร้างการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานิน..................................... 7

2.6 กราฟการเจริญเติบโตของจุลชีพ... 10

2.7 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส........................ 12

2.8 ขั้นตอนหลักในการโคลนยีน.. 13

4.1 สาหร่าย *Spirulina platensis* ภายในห้องที่ศูนย์วิจัยณะเทคโนโลยีทางทะเล........... 25

4.2 สาหร่าย *Spirulina platensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า............ 25

4.3 การเจริญเติบดตของสาหร่าย *Spirulina platensis*...................................... 26

4.4 สาหร่าย *Spirulina sp.* สายพันธุ์น้ำเค็มภายในห้องที่ศูนย์วิจัยคณะเทคโนโลยีทางทะเล โดย ภาพ A คือสาหร่ายที่เลี้ยงในความเค็ม 15 ppt ภาพ B คือสาหร่ายที่เลี้ยงในความเค็ม 20 ppt 28

4.5 สาหร่าย *Spirulina sp.* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า........................ 28

4.6 การเจริญเติบดตของสาหร่าย *Spirulina sp.* สายพันธุ์เค็ม สาหร่ายที่เลี้ยงในความเค็ม 20 ppt สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าสาหร่าย ที่เลี้ยงในความเค็ม 15 ppt................ 29

4.7 ค่าความเข้มแสงของสาหร่าย *Spirulina platensis* ในสภาวะที่แตกต่างกัน.............. 30

4.8 ค่าความเข้มแสงของสาหร่าย *Spirulina sp.* สายพันธุ์น้ำเค็มในสภาวะที่แตกต่างกัน.. 31

4.9 บริเวณที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่ภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (A และ B) และภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ (C และ D)................................ 32

4.10 น้ำหนักเปียกสาหร่าย *Spirulina platensis* ในสภาวะที่แตกต่าง แท่งสีเทาเข้มแสดงถึงน้ำหนักทั้งหมดของสาหร่าย 3 ลิตร แท่งสีเทาอ่อนแสดงถึงน้ำหนักต่อลิตร (ตัวอักษรที่เหมือนกันบนแท่งสีเดียวกัน หมายถึงไม่มีค่าความแตกต่างทางด้านสถิติที่ค่า $p>0.05$).. 33

4.11 น้ำหนักเปียกสาหร่าย Spirulina sp. สายพันธุ์น้ำเค็มในสภาวะที่แตกต่าง แท่งสีเทาเข้มแสดงถึงน้ำหนักทั้งที่สามารถเก็บผลผลิตได้ แท่งสีเทาอ่อนแสดงถึงน้ำหนักของสาหร่ายต่อลิตร.. 35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.12 การเปรียบเทียบปริมาณของซีไฟโคไซยานิน ในสาหร่าย *Spirulina platensis* (สีขาว) และ *Spirulina* ***sp.*** สายพันธุ์น้ำเค็ม (สีเทา) ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากธรรมชาติและแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงค่าความแตกต่างทางด้านสถิติที่ค่า *p*>0.05)........ 35

4.13 ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่าย *Spirulina platensis* สภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (A) และสภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ (B)........ 36

4.14 การเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดชนิดต่างที่สกัดได้จาก สาหร่าย *Spirulina platensis* แท่งสีเข้มคือ สภาวะธรรมชาติ แท่งสีอ่อนคือสภาวะแสงจากหลอดไฟ........ 37

4.15 ปริมาณสารสกัดไฟโคไซยานิน ที่สกัดได้จากสาหร่าย *Spirulina sp.* สายพันธุ์น้ำเค็ม สภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (A) และสภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ (B)........ 38

4.16 การเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดชนิดต่างที่สกัดได้จาก สาหร่าย *Spirulina sp.* สายพันธุ์น้ำเค็ม แท่งสีเข้มคือ สภาวะธรรมชาติ แท่งสีอ่อนคือสภาวะแสงจากหลอดไฟ.... 40

4.17 รูปแบบโปรตีนไฟโคไซยานินของ *S. platensis* ที่ตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE...... 41

4.18 รูปแบบโปรตีนไฟโคไซยานินของ *Spirulina* sp. น้ำเค็ม ที่ตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE........ 43

4.19 น้ำหนักสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* หลังจากทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง........ 45

4.20 น้ำหนักสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* หลังจากนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า *p*<0.05).. 46

4.21 ตัวอย่างสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* หลังจากนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอแบบถ่ายภาพได้........ 46

4.22 น้ำหนักสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มหลังจากนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า *p*<0.05) 47

4.23 ตัวอย่างสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย Spirulina sp. สายพันธุ์น้ำเค็มหลังจากนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอแบบถ่ายภาพได้........ 48

4.24 การเปรียบเทียบน้ำหนักสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์หลังจากนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แท่งสีเข้ม คือ สาหร่าย S. platensis แท่งสีอ่อนคือ สาหร่าย Spirulina sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า p<0.05) 48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.25 ภาพแสดงผลการทดลองโดยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) ของสารสกัดไฟโคไซยานินในสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติ (ซ้ำที่ 1-3)	50
4.26 ภาพแสดงผลการทดลองโดยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) ของสารสกัดไฟโคไซยานินในสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (ซ้ำที่ 1-3)	52
4.27 ภาพแสดงผลการทดลองโดยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) ของสารสกัดไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากธรรมชาติ (ซ้ำที่ 1-3)	54
4.28 ภาพแสดงผลการทดลองโดยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) ของสารสกัดไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟ (ซ้ำที่ 1-3)	56
4.29 ภาพเปรียบเทียบแสดงผลการทดลองโดยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) ของสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติ (1-3) และที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟ (4-6)............	58
4.30 ภาพเปรียบเทียบแสดงผลการทดลองโดยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) ของสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติ (1-3) และที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟ (4-6)............	59
4.31 1.0% ethidium bromide-stained agarose gel แสดงคุณภาพอาร์เอ็นเอสาหร่าย *S. platensis* (A) และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (B) Lane M คือ marker, lane 1-3 (แสงจากหลอดไฟฟลูโอเรสเซนต์), Lane 4-6 (แสงจากธรรมชาติ) และคุณภาพจีโนมิกดีเอ็นเอสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (C) *S. platensis* (Lane1) และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (Lane 2)	62
4.32 1.5% ethidium bromide-stained agarose gel แสดงผล RT-PCR ในสาหร่าย *S. platensis* ด้วยคู่ไพรเมอร์ *QPCCA-F/QPCCA-R* (A), *QPCCB-F2/QPCCB-R2* (B) *และ Q16srRNA-F/Q16srRNA-R* (C) ตามลำดับ และ Lane M คือ marker, lane 1-3 (แสงจากหลอดไฟฟลูโอเรสเซนต์), Lane 4-6 (แสงจากธรรมชาติ)	63
4.33 ภาพการย้อม 1.5% agarose gel ด้วยสาร ethidium bromide ของแถบพีซีอาร์ยีน *PCC-*α ในสาหร่าย *S. platensis* ช่อง M คือ 100 bp marker, NC=Negative control............	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.34 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนในส่วน open reading frame (ORF) ของยีน *PCC-α* ในสาหร่าย *S. platensis* ส่วนที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งไพรเมอร์ และส่วนสีเทา คือ ตำแหน่ง Phycobillisome domain.. 64

4.35 1.5% agarose gel ย้อมด้วย Ethidium bromide เพื่อการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *PCC-β* ในสาหร่าย *S. platensis* จากคู่ไพรเมอร์ ORFPCCB-F/QPCCBR-2 (Lane 1), QPCCB-F2/QPCCB-R1 (Lane 2), และ คู่ไพรเมอร์ QPCCB-F1/ORFPCCB-R (Lane3), Lane M คือ 100 bp DNA Marker....................................... 66

4.36 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-β* ในสาหร่าย *S. platensis* จากคู่ไพรเมอร์ ORFPCCB-F/QPCCB-R2 (A) และ QPCCB-F2/QPCCB-R1 (B) ตามลำดับ ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งของไพรเมอร์ แถบสีเทา คือ ตำแหน่ง Phycobilisome domain.................. 67

4.37 กราฟมาตรฐานยีน *PCC-α* (A) *PCC-β* (B) และ 16s rRNA (C)................................ 70

4.38 กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน *PCC-α* ในสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะการให้แสงจากธรรมชาติ และแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ด้วยเทคนิค real time PCR.. 71

4.39 กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน *PCC-β* ในสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะการให้แสงจากธรรมชาติ และแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ด้วยเทคนิค real time PCR.. 72

5.1 ลักษณะของแถบโปรตีนในสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. *Phormidium* sp. และ *Lyngbya* sp. (Patel et al., 2004).. 75

สารบัญตาราง

ตารางที่ | หน้า

2.1 จำนวนไบลินต่อโมโนเมอร์ของโบลิโปรตีน...... 6

2.2 ข้อมูลของการแยกและการทำให้ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์ในสาหร่ายสไปรูลินา (Zhang and Chen, 1999) 8

2.3 ข้อดีและข้อเสียของการใช้เซลล์เจ้าบ้านต่างๆ...... 15

3.1 ไพรเมอร์ *PCC-* α และ *PCC-*β...... 21

4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis*...... 26

4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม...... 29

4.3 ค่าความเข้มแสงของสาหร่าย *Spirulina platensis* ในสภาวะที่แตกต่างกัน...... 30

4.4 ค่าความเข้มแสงของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มในสภาวะที่แตกต่าง...... 31

4.5 น้ำหนักเปียกสาหร่าย *Spirulina platensis* ในสภาวะที่แตกต่างกัน...... 33

4.6 น้ำหนักเปียกสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มในสภาวะที่แตกต่างกัน...... 34

4.7 ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina platensis*...... 36

4.8 ปริมาณไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina platensis* ตามสูตรการคำนวณของ Patel et al. (2005) 37

4.9 ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม...... 39

4.10 ปริมาณไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ตามสูตรการคำนวณของ Patel et al. (2005) 39

4.11 น้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนจากภาพที่ 4.17 ในการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *S. platensis*...... 42

4.12 น้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนจากภาพที่ 4.18 ในการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม...... 44

4.13 น้ำหนักสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* หลังจากทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง...... 45

4.14 น้ำหนักสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม หลังจากทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง...... 47

4.15 เลขคลื่นแสดงหมู่ฟังก์ชั่นของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติ...... 51

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.16 เลขคลื่นแสดงหมู่ฟังก์ชั่นของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์... 53

4.17 เลขคลื่นแสดงหมู่ฟังก์ชั่นของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากธรรมชาติ... 55

4.18 เลขคลื่นแสดงหมู่ฟังก์ชั่นของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟ.. 57

4.19 แสดงค่าความเข้มข้น และคุณภาพอาร์เอ็นเอของสาหร่ายสาหร่าย *S. platensis*..... 60

4.20 แสดงค่าความเข้มข้น และคุณภาพอาร์เอ็นเอของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม.. 61

4.21 แสดงค่าความเข้มข้น และดีเอ็นเอสายเดี่ยว (cDNA) ของสาหร่าย *S. platensis*....... 61

4.22 แสดงค่าความเข้มข้น และดีเอ็นเอสายเดี่ยว (cDNA) ของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม.. 61

4.23 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-*α ในสาหร่าย *S. platensis* กับข้อมูลในห้องสมุดยีนด้วยวิธี BlastX.. 65

4.24 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-*α ในสาหร่าย *S. platensis* กับข้อมูลในห้องสมุดยีนด้วยวิธี BlastN หรือ nucleotide Blast.. 65

4.25 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-*β ในสาหร่าย *S. platensis* จากคู่ไพรเมอร์ ORFPCCB-F/QPCCB-R2 กับข้อมูลในห้องสมุดยีนด้วยวิธี BlastX................... 68

4.26 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-*β ในสาหร่าย *S. platensis* จากคู่ไพรเมอร์ ORFPCCB-F/QPCCB-R2 กับข้อมูลในห้องสมุดยีนด้วยวิธี BlastN หรือ nucleotide Blast.. 68

4.27 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-*β ในสาหร่าย *S. platensis* จากคู่ไพรเมอร์ QPCCB-F2/QPCCB-R1 กับข้อมูลในห้องสมุดยีนด้วยวิธี BlastX....................... 69

4.28 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-*β ในสาหร่าย *S. platensis* จากคู่ไพรเมอร์ QPCCB-F2/QPCCB-R1 กับข้อมูลในห้องสมุดยีนด้วยวิธี BlastN หรือ nucleotide Blast.. 69

4.29 แสดงค่าระดับการแสดงออกของยีน PCC-α และ PCC-β ในสาหร่าย S. platensis ที่เลี้ยงในสภาวะการให้แสงจากธรรมชาติ และแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์..................... 72

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ซี-ไฟโคไซยานิน เป็นรงควัตถุประกอบสีน้ำเงิน ซึ่งจัดเป็นองค์ประกอบหลักของไฟโคบิลิน (phycobilin) ที่ผลิตได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทุกชนิด (วันเพ็ญ ภูติจันทร์, 2549) รงควัตถุประกอบประเภทนี้แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีกคือ ซี-แอลโลไฟโคไซยานิน (c-allophycocyanin) และ ซี-ไฟโคอิริทริน (c-phycoerythrin) ไฟโคบิลินมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง ละลายได้ดีในน้ำ ไฟโคบิลินแต่ละชนิดจะอยู่รวมกับโปรตีนอย่างใกล้ชิดมาก กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเรียกว่า ไฟโคบิลิโปรตีน ในสาหร่ายเกลียวทอง ซี-ไฟโคไซยานินจะอยู่รวมกับไฟโคบิลิโปรตีนชนิดอื่นๆ (ที่สำคัญคือ ซี-แอลโลไฟโคไซยานิน) กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้น เรียกว่า ไฟโคบิลิโซม (phycobilisomes) ซึ่งจะเกาะอยู่บนผิวด้านนอกของไทลาคอยด์ (thylakoid) ภายในไทลาคอยด์มีคลอโรฟิลด์เอบรรจุอยู่ ไฟโคบิลิโซมทำหน้าที่รับพลังงานรังสีจากแสงแล้วส่งให้แก่คลอโรฟิลล์เอ นอกจากนี้ไฟโคไซยานินในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินยังเป็นแหล่งสะสมไนโตรเจน ซึ่งจะทำหน้าที่ให้ธาตุไนโตรเจนแก่เซลล์สาหร่ายในยามที่ขาดแคลนธาตุอาหารไนโตรเจน (สุมาลี ดุลยอนุกิจ, 2535)

จากการศึกษาพบว่า ไฟโคไซยานินมีประโยชน์อย่างมากทางอุตสาหกรรมและเภสัชกรรม ด้วยคุณสมบัติของรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีสัน และทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถเปลี่ยนสีได้ (วันเพ็ญ ภูติจันทร์, 2549) จึงมีการนำสารสีที่สาหร่ายผลิตไปใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งใช้สารแต่งสีจากธรรมชาติแทนการใช้สารแต่งสีสังเคราะห์ เพื่อผสมในอาหาร ลิปสติก และอายไลเนอร์ (Leema et al., 2010) นอกจากคุณสมบัติที่ให้สีสันแล้ว ยังพัฒนามาใช้ในโรงงานเครื่องสำอาง และยา เนื่องจากมีคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และมีฤทธิ์ป้องกันเซลล์สมอง (neuroprotective) (Romey et al., 1998)

จากการที่ทำหน้าที่เป็นรงควัตถุประกอบ ทำให้ไฟโคบิลิโปรตีนมีปริมาณลดลงเมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Myers and Kratz (1955) พบว่า ไฟโคไซยานินจะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อมีแสงจำกัด นอกจากนี้ การผลิตไฟโคไซยานินตามธรรมชาติของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในแต่ละชนิดจะมีปริมาณไม่เท่ากันขึ้นกับความเข้มแสง คุณภาพแสง และเงื่อนไขการเจริญเติบโต โดยใน *Microchaete tenara* จะมีไฟโคไซยานินน้อยมาก แต่ใน *Oscillatoria* spp. จะพบในปริมาณมากกว่า (Smith, 1950) และมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณความต้องการในการใช้ประโยชน์จากไฟโคไซยานินในเชิงอุตสาหกรรม

จากความก้าวหน้าทางพันธุวิศวกรรม (recombinant technology) ทำให้มีการพัฒนาการผลิตโปรตีนโดยอาศัยแบคทีเรีย หรือสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำอื่นๆ (heterologous expression system) เพื่อใช้ประโยชน์ทั้งทางการแพทย์และทางอุตสาหกรรมมากขึ้น ซึ่งระบบการผลิตขึ้นอยู่กับเซลเจ้าบ้านที่เลือกใช้ เช่น bacteria expression system โดยเฉพาะใน *E. coli* เป็นระบบที่เป็นที่นิยมกันมากเพื่อผลิต heterologous protein เนื่องจากเป็นระบบที่มีขั้นตอนการทำงานที่ง่ายไม่ซับซ้อน เซลล์เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว แต่เนื่องจากแบคทีเรียไม่มีกระบวน post-translation modification เหมือนในยูคาริโอต

ทำให้ไม่สามารถใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการผลิตโปรตีนของยูคาริโอตที่จำเป็นต้องอาศัย post translation modification ได้ ส่วน yeast expression system เป็นระบบที่ถูกพัฒนาเพื่อมาทดแทนข้อด้อยของแบคทีเรียเนื่องจากยีสต์มีกระบวนการ post translation modification และการแสดงออกของ heterologous protein ในยีสต์อยู่ในระดับสูง อย่างไรก็ตาม กระบวนการ post translation modification ในยีสต์ไม่เหมือนกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทำให้ heterologous protein ที่ผลิตได้ยังไม่มีประสิทธิภาพเหมือนกับโปรตีนที่ผลิตจาก mammalian cell เอง (วัฒนา เชฐกุล และ สุดารัตน์ ดุลสวัสดิ์, 2548)

ในการศึกษานี้ จึงมุ่งเน้นเกี่ยวกับการกระตุ้นการผลิตไฟโคไซยานินในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ต่างชนิดกัน และตรวจสอบโดยใช้ปริมาณไฟโคบิลิโปรตีน และระดับการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานิน และนำข้อมูลที่ได้มาพัฒนาการผลิตสารไฟโคไซยานินโดยใช้ Bacteria expression system เพื่อให้สามารถผลิตไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้นเพียงพอกับความต้องการใช้ในเชิงอุตสาหกรรม ***ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 2 การสร้างศักยภาพและความสามารถเพื่อการพัฒนาทางเศรษฐกิจ***

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบปริมาณไฟโคไซยานินและระดับการแสดงออกของยีนในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน
2. เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มยีนของยีน ซี-ไฟโคไซยานิน
3. เพื่อพัฒนาการผลิตสารไฟโคไซยานินโดยใช้ bacteria expression system

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

คัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สนใจและทำให้บริสุทธิ์ สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแต่ละชนิด กระตุ้นการผลิตรงควัตถุประกอบสีน้ำเงินด้วยความเข้มแสงที่แตกต่างกัน ตรวจสอบปริมาณไฟโคบิลิโปรตีนด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานิน โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มยีนของไฟโคไซยานิน ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินด้วยวิธี quantitative real-time-PCR วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนโดยเปรียบเทียบกับยีนควบคุม (16s-23s rDNA) โคลนยีนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มยีนของยีน ซี-ไฟโคไซยานิน โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลในห้องสมุดยีน (Genbank; www.ncbi.nlm.nih.gov) ออกแบบขั้นตอนการผลิตสารไฟโคไซยานินโดยใช้ bacteria expression system และตรวจสอบความสำเร็จ

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ไฟโคไซยานินมีประโยชน์อย่างมากทางอุตสาหกรรมและเภสัชกรรม โดยมีการนำสารนี้ไปใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งใช้สารแต่งสีจากธรรมชาติแทนการใช้สารแต่งสีสังเคราะห์ นอกจากนี้ ไฟโคไซยานินมีคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และมีฤทธิ์

ป้องกันเซลล์สมอง (neuroprotective) ทำให้เป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์เป็นอย่างมาก การผลิตไฟโคไซยานินตามธรรมชาติของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในแต่ละชนิด จะมีปริมาณไม่เท่ากันขึ้นกับความเข้มแสง คุณภาพแสง และเงื่อนไขการเจริญเติบโต และมีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณความต้องการในการใช้ประโยชน์จากไฟโคไซยานินในเชิงอุตสาหกรรม

จากความก้าวหน้าทางอณูชีววิทยาและพันธุวิศวกรรม (recombinant technology) ทำให้มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับชีววทิยาเชิงลึกของสิ่งมีชีวิตมากขึ้น ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน สำหรับการผลิตไฟโคไซยานินในปริมาณมาก เพื่อใช้ประโยชน์ทั้งทางการแพทย์และทางอุตสาหกรรมที่มีความต้องการมากขึ้นในอนาคตได้

บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรีย (Blue green algae หรือ Cyanobacteria) เป็นพืชชั้นต่ำที่เรียกว่า โปรคาริโอต (Procaryote) ซึ่งจัดรวมอยู่กับพวกแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างจากแบคทีเรียคือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะมีคลอโรฟิลล์ เอ (Chloropyll A) จึงสามารถสังเคราะห์แสงได้และยังมีออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์แสง สาหร่ายกลุ่มนี้จะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เปลี่ยนสีของเซลล์ได้ สามารถขึ้นอยู่ทั่วทุกแห่งในโลก ทั้งน้ำจืด ทะเล และน้ำพุร้อน (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544) สาหร่ายพวกนี้มีความสามารถทนต่อสภาวะแห้งแล้ง เจริญได้ดีในน้ำที่มีสภาพเป็นกลางหรือด่างเล็กน้อย (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2549)

นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอาจขึ้นรวมอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่นได้ทั้งพืชและสัตว์ การจัดหมวดหมู่ทางอนุรมวิธานของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีหลายระบบ แต่ในที่นี้จะจัดแบ่งตามระบบของ Komarek et al. (2003) (อ้างถึงใน ยุวดี พีรพรพิศาล, 2549) โดยแบ่งออกเป็น 4 ออร์เดอร์ ซึ่งมีลำดับในการจัดหมวดหมู่ดังนี้

Division Cyanophyta

Class Cyanphyceae

Order 1 Chroococcales

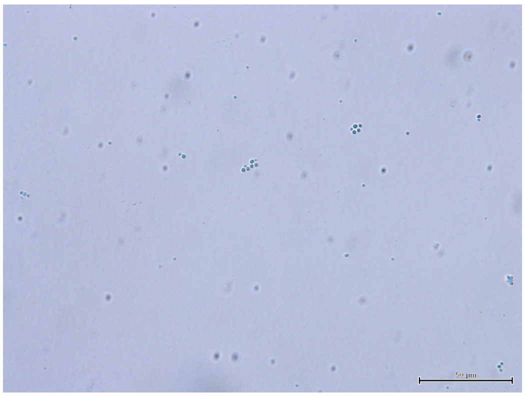
Order 2 Oscillatoriales

Order 3 Nostocales

Order 4 Stigonematales

ภาพที่ 2.1 *Spirulina* sp.

ที่มา : รวิวรรณ เริงจินดา (2558)

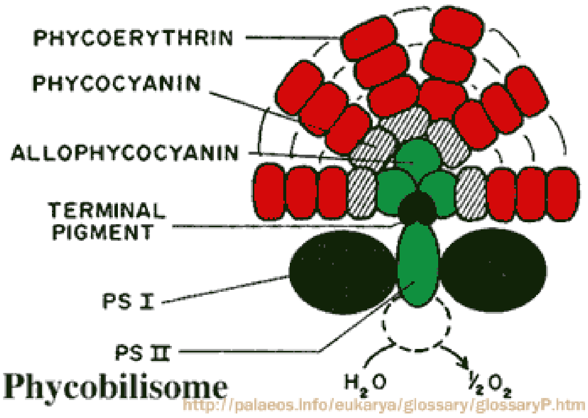


ภาพที่ 2.2 *Synechocystis* sp.

ที่มา : กนกนันท์ เอกบรรพต (2556)

2.2 ไฟโคบิลิโซม (Phycobilisomes)

ไฟโคไบลิโซมเป็นสารประกอบโปรตีนที่ทำหน้าที่เก็บพลังงานจากแสงแดดแล้วถ่ายเทพลังงานผ่านเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ (Thylakoid membrane) เข้าสู่ระบบสังเคราะห์แสงของเซลล์ ซึ่งพบได้ในพืชและสาหร่ายกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย โมเลกุลของไฟโคไบลิโซมประกอบด้วย ไบลิโปรตีน (Biliprotein) และสายโพลิเปปไทด์ที่เป็นตัวเชื่อมโยง (Linker polypeptide) (ราเชนทร์ ดวงศรี, 2552) (ภาพที่ 3) ไบลิโปรตีนเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสังเคราะห์รงควัตถุในไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) (Gantt, 1981) บิลิโปรตีนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำแนกได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) แอลโลไฟโคไซยานิน (Allophycocyanin) และไฟโคอิริธริน (Phycoerythrin) (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544)



ภาพที่ 2.3 แบบจำลองการจัดเรียงตัวของไฟโคไบลิโซม (Phycobilisome)

ที่มา : http://palaeos.info/eukarya/glossary/glossaryP.htm

2.2.1 คุณสมบัติของไฟโคไซยานิน (Phycocyanin)

ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin : PC) เป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่มีรงควัตถุเกาะอยู่บนโมเลกุล พบได้ทั่วไปในสาหร่ายคลาส *Cyanophyceae* เป็นสารสีฟ้า เรืองแสงได้และสามารถละลายน้ำได้ดี มีคุณสมบัติเป็นสารเพื่อโภชนะบำบัด (Nutraceutical) ในปัจจุบันไฟโคไซ-ยานินถูกใช้เป็นสีผสมอาหารและใช้เป็นตัวบ่งชี้(Marker)ในการตรวจสอบภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology Diagnostic Applications) (ราเชนทร์ ดวงศรี, 2552) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยทั่วไปไฟโคไซยานินจะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ในช่วงความยาวคลื่น 612 ถึง 620 นาโนเมตร และเมื่อเรืองแสงจะวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 636 ถึง 650 นาโนเมตร (Adir and Lerner, 2003)

ไฟโคไซยานินที่อยู่ในรูปโมโนเมอร์ ($\alpha\beta$) ไตรเมอร์ ($\alpha_3\beta_3$) หรือเฮกซะเมอร์ ($\alpha_6\beta_6$) จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน ส่วนอัลโลไฟโคไวยานิน และไฟโคอิริทรินจะมีสีฟ้าน้ำทะเลและสีชมพู เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงจะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 650 ถึง 655 นาโนเมตร และ 540 ถึง 570 นาโนเมตร ตามลำดับ (Viskari and Colyer, 2003)

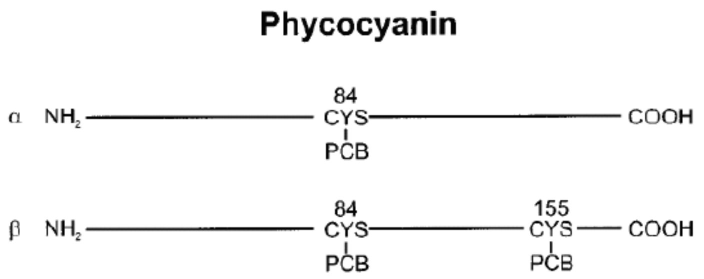
2.2.2 โมเลกุลของไฟโคไซยานิน

โดยทั่วไป โมเลกุลของไฟโคไซยานินจะรวมตัวอยู่ไตรเมอร์ เฮกซะเมอร์ และโอลิโกเมอร์ (Oligomers) แบบอื่นๆ สารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้ก่อตัวขึ้นจากโมโนเมอร์ ($\alpha\beta$-monomer) ของไฟโคไซยานิน ประกอบด้วยหน่วยย่อยอัลฟา (α-subunit) และหน่วยย่อยเบต้า (β-subunit) โดยที่หน่วยย่อยอัลฟา และหน่วยย่อยเบต้าแต่ละหน่วยจะมีไบลินเกาะอยู่กับกรดอะมิโนซิสเตอีนบนอะโพโปรตีนของหน่วยย่อย 1 และ 2 หมู่ ตามลำดับ (ตารางที่ 2.1) ที่ตำแหน่ง α_{84} ของหน่วยย่อยอัลฟาและที่ตำแหน่ง β_{84} และ β_{155} ของหน่วยย่อยเบต้า (ภาพที่ 2.4)

ตารางที่ 2.1 จำนวนไบลินต่อโมโนเมอร์ของโบลิโปรตีน

โปรตีน	โมโนเมอร์	จำนวนไบลิน/โมโนเมอร์
ไฟโคไซยานิน	α	1
	β	2
ไฟโคอิริทริน	α	2
	β	3
อัลโลไฟโคไซยานิน	α	1
	β	1

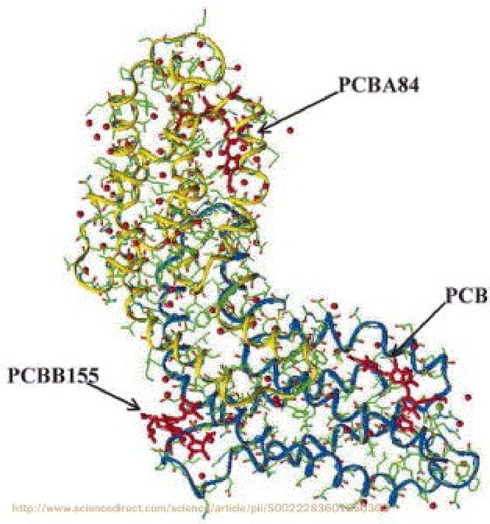
ที่มา : MacColl, 1998



ภาพที่ 2.4 ตำแหน่งการเกิดพันธะโควาเลนท์ระหว่างไบลินกับอะโพโปรตีนของ C-Phycocyanin

ที่มา : MacColl, 1998

หน่วยย่อยอัลฟาและหน่วยย่อยเบต้าของไฟโคไซยานินประกอบด้วยกรดอะมิโนเรียงต่อกัน 162 และ 172 หน่วย ตามลำดับ ทั้ง R-Phycocyanin และ C-Phycocyanin ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดเดียวกัน หน่วยย่อยทั้งสองของไฟโคไซยานินในโมโนเมอร์ ไตรเมอร์ และเฮกซะเมอร์ มีโครงสร้างตติยภูมิเป็นรูปทรงกลม (Globular) คล้ายกัน (ภาพที่ 5) เมื่อก่อรูปเป็นไตรเมอร์และเฮกซะเมอร์จะเกิดช่องว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 ถึง 4.5 นาโนเมตร โดยที่ตำแหน่ง β_{84} จะหันเข้าหาแกนกลางของช่องว่าง (ราเชนทร์ ดวงศรี, 2552)



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานิน

ที่มา : Adir et al. (2001)

2.2.3 การทำให้ไฟโคไซยานินบริสุทธ์

การทำให้ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์ทำได้หลายวิธี ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Zhang and Chen (1999) นำสาหร่ายสไปรูลิน่าเปรียบเทียบวิธีการแยกและทำให้ไฟโคไซยานินบริสุทธ์ระหว่างวิธีสกัดจากเซลล์ด้วยการแช่แข็ง (Freezing) วิธีการตะกอนด้วยแอมโมเนียซัลเฟต, ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography พบว่า absorbance ratio ของวิธี gel filtration chromatography มีค่าสูงสุดแสดงว่าไฟโคไซยานินมีความบริสุทธิ์สูงสุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ ผลที่ได้ตามตารางที่ 2.2

นอกจากนี้งานวิจัยของ Patel et al. (2005) นำสาหร่าย *Spirulina* sp., *Phormidium* sp. และ *Lyngbya* sp. ทำให้ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์ด้วยวิธีสกัดจากเซลล์ด้วยการแช่แข็ง (freezing), วิธีการตะกอนด้วยแอมโมเนียซัลเฟต, ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography ผลการทดลองพบว่าวิธีการทำให้บริสุทธิ์แบบ gel filtration chromatography ในสาหร่าย *Lyngbya* sp. มีค่า absorbance ratio สูงสุด เท่ากับ 4.59

ตารางที่ 2.2 ข้อมูลของการแยกและการทำให้ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์ในสาหร่ายสไปรูลินา (Zhang and Chen, 1999)

Method	Absorbance ratio	
	(A_{260}/A_{280}) C-phycocyanin	(A_{655}/A_{280}) Allophycocyanin
Cell extract	1.14	0.57
Precipitations with $(NH_4)_2SO_4$	3.10	1.10
DEAE-sepharose CL-6B	4.56	4.88
Sephadex G-100	5.06	5.34

2.2.4 สายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียที่มีการศึกษาเกี่ยวกับไฟโคไซยานิน

2.2.4.1 *Spirulina* sp.

Estrada et al. (2001) นำ *Spirulina platensis* ซึ่งมีไฟโคไซยานินมาทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าชิ้นส่วนที่มี Absorbance ratio สูงสุด จะมีการยับยั้งสูงสุดถึง 50.90% ผลการทดลองสรุปได้ว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารไฟโคไซยานินเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของสารต้านอนุมูลอิสระในชิ้นส่วนของสารสกัดจากสาหร่ายที่แตกต่างกัน ดังนั้นไฟโคบิลิโปรตีน เป็นส่วนประกอบสำคัญที่ต่อการตอบสนองของอนุมูลอิสระใน *S. platensis*

2.2.4.2 *Anabaena* sp.

He and Hader (2002) ตรวจสอบรูปแบบของ reactive oxygen species (ROS) และความเสียหายจากการออกซิเดชันของสาหร่าย *Anabaena* sp.ที่เหนี่ยวนำด้วยแสง UV-B พบว่า UV-B จะไปเหนี่ยวนำความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน, กระบวนการออกซิเดชันลิปิด, DNA ถูกทำลาย และกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลงอีกด้วย ดังนั้นความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้การอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตลดลง

Millick and Rai (1999) ศึกษาการตอบสนองของการต้านสารอนุมูลอิสระของสาหร่าย *Anabaena doliolum* ต่อทองแดง พบว่าความเข้มข้นของทองแดงต่างกัน ทำให้การผลิตแคโรทีนและเอนไซม์ที่ช่วยในการต้านอนุมูลอิสระจำพวก superoxide dismutase ในปริมาณที่ต่างกันด้วย

2.2.4.3 *Synechococcus* sp.

Hu et al. (2005) การเจริญเติบโตและระบบการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species (ROS), Glutathione (GSH), Malondialdehyde (MDA) และ Glutathione peroxidase (GSH-Px)) ของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus elogatus* ในการตอบสนองต่อ microcystin-RR ผลการทดลองพบว่าเมื่อสาหร่าย *Synechococcus* สัมผัสกับสาร microcystin ทำให้เจริญเติบโตช้าลง และพบว่าระบบการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระจะผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับชุดที่ไม่ได้สัมผัสสาร microcystin

2.2.4.4 *Nostoc* sp.

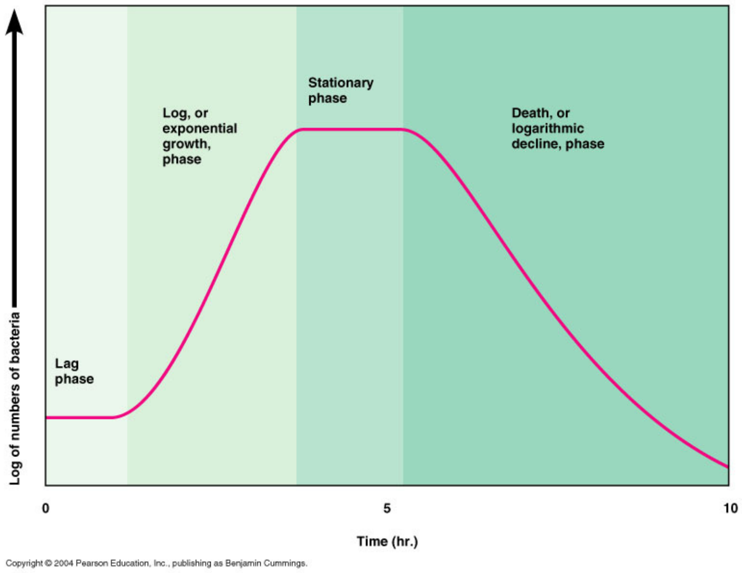
งานวิจัยของ Galhano et al. (2010) ทดสอบการสัมผัสสาร Molinate (Ordram) ของไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc muscorum* เพื่อสังเกตผลของสารต้านอนุมูลอิสระและชั้นกรดไขมัน ผลการทดลองพบว่า เมื่อสาร Molinate มีปริมาณเพิ่มขึ้น กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระลดลง โดยเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Ascorbate peroxidase (APX) และ Glutathione reductase (GR) จะลดลง

2.3 เทคนิคการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อใช้ในการทดลอง

ในการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อนำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอนั้น ไม่ต้องการเลี้ยงสาหร่ายในปริมาณที่มาก แต่จะเน้นและให้ความสำคัญกับการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งสามารถเลี้ยงในปริมาณที่น้อยได้ โดยการเลี้ยงที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์นี้คือการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในห้องปฏิบัติการประเภทการเลี้ยงระยะยาว (อรวรรณ หันชะนา, 2554)

การเลี้ยงสาหร่ายประเภทนี้เพื่อเก็บหัวเชื้อ (stock culture) ในห้องปฏิบัติการ เพื่อที่จะนำไปใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงครั้งต่อไป ดังนั้นอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงควรเป็นชนิดที่สามารถเลี้ยงสาหร่ายให้มีคุณภาพดีได้นาน และในการเลี้ยงประเภทนี้ยังเลี้ยงเพื่อผลิตเป็นอุตสาหกรรมอีกด้วย การเลี้ยงสาหร่ายสามารถแบ่งได้ 2 ประเภทคือ การเลี้ยงประเภทเก็บเกี่ยวครั้งเดียว (Batch culture) และการเลี้ยงประเภทต่อเนื่อง (Continuous culture) (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544) โดยการเลี้ยงประเภทเก็บเกี่ยวครั้งเดียวแล้วเก็บ

หัวเชื้อสาหร่ายไว้ทำการทดลอง โดยนำเซลล์สาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงจากระยะ stationary phase (ภาพที่ 6) ไปทำเยือกแข็ง (Frozen) โดยเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า -60°C เพื่อทำให้เซลล์สาหร่ายมีอัตราเมทาบอลิซึม (Metabolisms) ต่ำ ทำให้เซลล์มีอายุได้นาน 1 ปี (อรวรรณ หันชะนา, 2554)



ภาพที่ 2.6 กราฟการเจริญเติบโตของจุลชีพ

ที่มา : http://drozkanandmrscary.tumblr.com/

2.4 เทคนิคทางอณูชีววิทยา

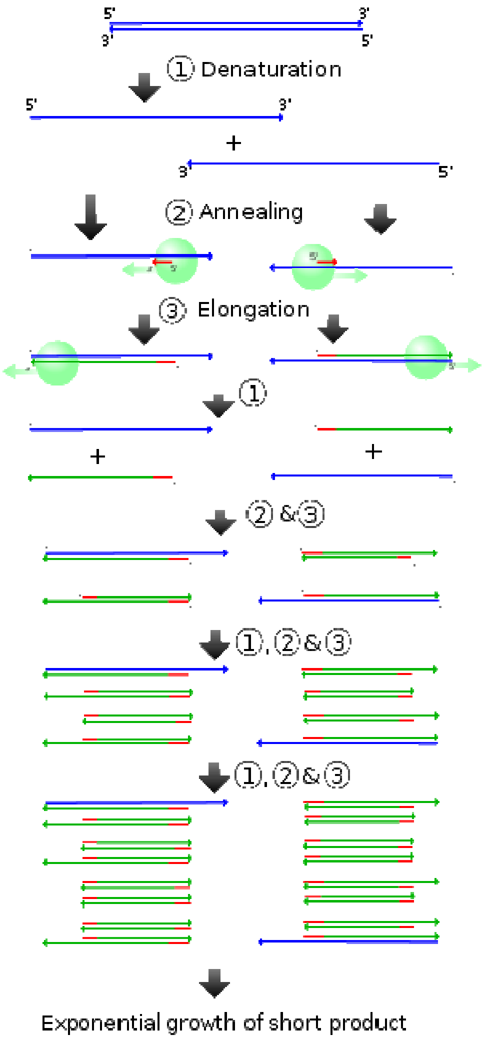
อณูชีววิทยา (Molecular Biology) เป็นการศึกษาในระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิต โดยเน้นศึกษาโครงสร้างของโมเลกุล, การทำงานของยีน (Gene) และโมเลกุลต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ความสัมพันธ์กันระหว่างดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีน ชีววิทยาเป็นสาขาที่มีความผสมผสานระหว่างชีววิทยาและเคมี โดยเฉพาะการรวมกันระหว่างสาขาพันธุศาสตร์ สาขาชีวเคมี และสาขาจุลชีววิทยา

2.4.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase chain reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase chain reaction) หรือ PCR เป็นเทคนิคที่คิดค้นโดย Kary Mullis แห่งบริษัทซีตัส (Cetus Coorporation) สหรัฐอเมริกา เมื่อปี 1983 ต่อมา Randall Saike และ Henry Erlich ได้นำเทคนิคนี้มาใช้และรายงานเป็นครั้งแรกในวารสาร Science ในปี 1985 (นวลฉวี เวชประสิทธิ์, 2549) พีซีอาร์ (PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA target) ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกันกับดีเอ็นเออื่น การทำพีซีอาร์ (PCR) คือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสซ้ำกันหลายๆ รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจำเป็นต้องมีไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์

จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3’ ในทิศทางเข้าหากัน ข้อกำหนดในการทำพีซีอาร์ (PCR) คือต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้นจะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5’ ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5’ ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่ง (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) (ภาพที่ 2.7)

หลักการของพีซีอาร์ (PCR) ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA poloymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่พีซีอาร์ สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ครั้งละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียน ต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ขั้นแรกเรียกว่า denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95°C ขั้นที่สองเรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน นิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส ขั้นที่ 3 เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอ็นไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน จากขั้นตอนที่ 1-3 นับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า (นวลฉวี เวชประสิทธิ์, 2549)



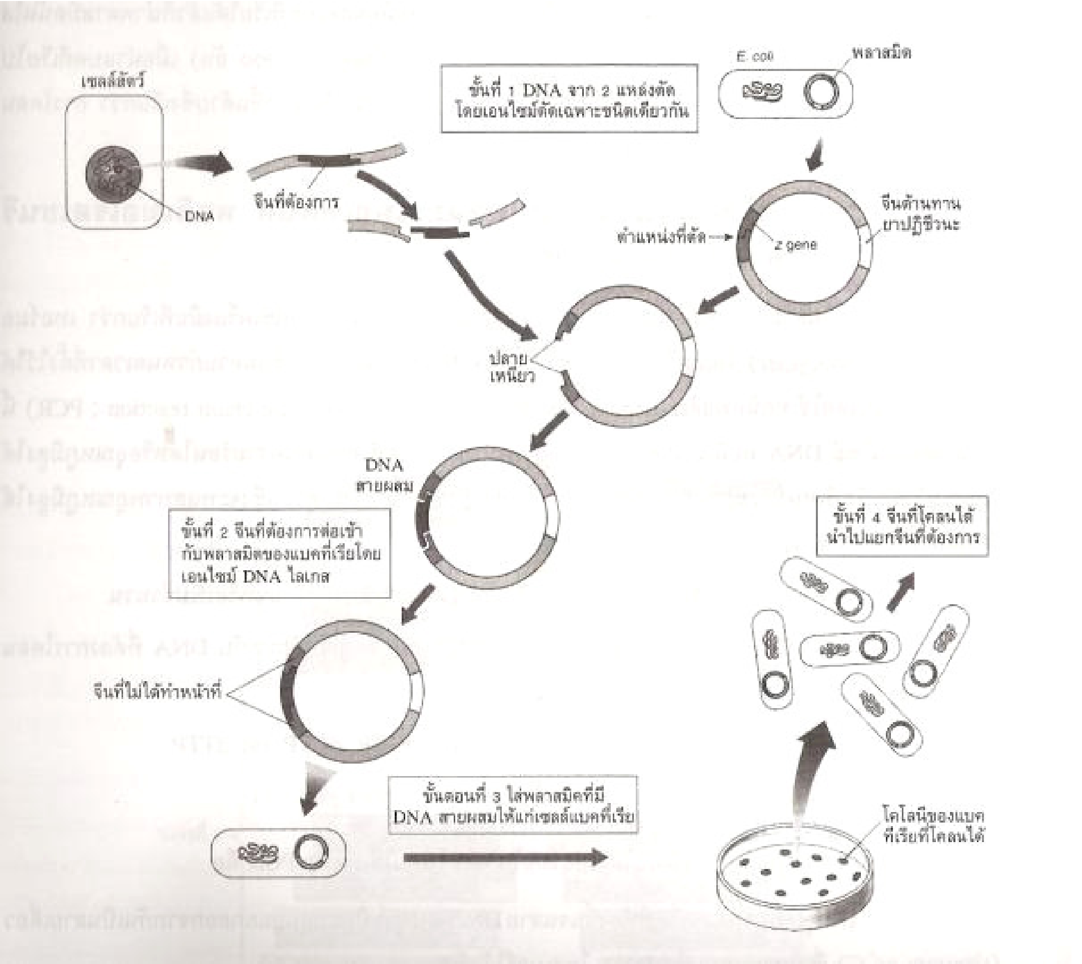
ภาพที่ 2.7 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (PCR)

ที่มา : http://en.wikipedia.org/

2.4.2 การโคลนยีน

การโคลนยีน (gene cloning, DNA cloning หรือ molecular cloning) หรือเทคโนโลยีการสร้างดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA technology) หมายถึงกระบวนการที่เคลื่อนย้ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่สนใจของสิ่งมีชีวิตหนึ่งเข้าไปยังสารพันธุกรรมที่สามารถจำลองตัวเองได้ (self-replicating genetic element) เช่น พลาสมิดของแบคทีเรีย แล้วชิ้นส่วนดีเอ็นเอ นั้นก็สามารถแพร่กระจายไปกับเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ได้ การสร้างดีเอ็นเอสายผสม ทำได้โดยการตัดหรือแยกยีนที่ต้องการศึกษามาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอ พาหะหรือเวคเตอร์ (vector) แล้วถ่ายโอนดีเอ็นเอ ที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ให้มีการเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอ จนมีปริมาณมากพอตามความต้องการในการนำไปใช้ในงานอื่นๆ ต่อไป เช่น การหาลำดับเบส การศึกษาการควบคุมการแสดงออกและหน้าที่ของยีนและของโปรตีนในเซลล์ การฝาก

ยีนลงในสิ่งมีชีวิตอื่นเพื่อให้มีการผลิตสารหรือแสดงลักษณะบางประการ (ภาพที่ 2.8) (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2548)



ภาพที่ 2.8 ขั้นตอนหลักในการโคลนยีน

ที่มา : http://fws.cc/udontham/index.php?topic=126.0

2.4.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ในระยะแรกๆ การหาลำดับดีเอ็นเอทำได้โดยการเติมสายนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลายสายที่เป็นคู่สม เป็นวิธีที่พัฒนาโดย Frederick Sanger เทคนิคนี้ใช้กัมมันตรังสีติดฉลากกับดีเอ็นเอที่ใช้เป็นไพรเมอร์และบ่มไว้ร่วมกับดีเอ็นเอที่เป็นแม่แบบที่ทำให้เสียสภาพเป็นสายเดี่ยว เช่นพลาสมิดที่มีโคลนดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับในหลอดที่ใช้ทำปฏิกิริยาที่มี deoxyribonucleotide 4 ชนิด และดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เนื่องจากพาหะพลาสมิดที่ใช้ในปัจจุบันถูกออกแบบให้มีลำดับที่จับของไพร-เมอร์ติดกับตำแหน่งในการโคลน ดังนั้นดีเอ็นเอโพลีเมอเรสสามารถใช้ขยายสายคู่สมจากปลายสาย 3’ ของไพรเมอร์ที่บ่มร่วมกับพลาสมิด และมีนิ

วคลีโอไทด์ดัดแปลงซึ่งเรียกว่า deoxyribonucleotide (ddNTP) ผสมรวมกับพาหะและไพรเมอร์ ddNTP แตกต่างจากนิวคลีโอไทด์ธรรมดา (dNTP) เพราะมีไฮโดรเจนจับกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของน้ำตาลดีออกซีไรโบส แทนที่จะเป็นไฮดรอกซิล (OH) เมื่อ ddNTP เข้าไปจับในสายดีเอ็นเอแล้ว สายดีเอ็นเอนั้นจะไม่สามารถขยายต่อไปได้เพราะไม่มีไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งปลาย 3’ ทำให้ไม่สามารถสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์กับนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่ด้วยเหตุนี้ทำให้สิ้นสุดการต่อสายนั้นต่อไป

แยกหลอดทำปฏิกิริยาเป็น 4 หลอด แต่ละหลอดประกอบด้วยพาหะ ไพรเมอร์ และนิว-คลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (dNTP) ในแต่ละหลอดจะมี ddNTP ปริมาณน้อยๆ หลอดละหนึ่งชนิด ขณะที่มีการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอเส้นใหม่จากไพรเมอร์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจะมีการสอดแทรก ddNTP เข้าไปแทนที่ dNTP แบบปกติโดยสุ่ม ทำให้การสังเคราะห์สายคู่สมหยุดลง เมื่อทำปฏิกิริยาต่อไปจะมี ddNTP ประกอบไปในทุกตำแหน่งในสายใหม่ที่สังเคราะห์ให้เกิดเป็นกลุ่มของชิ้นดีเอ็นเอที่มีความยาวแตกต่างกันและสิ้นสุดที่ ddNTP สายดีเอ็นจะถูกแยกบนโพลีอะครีลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเพียงนิวคลีโอไทด์ตัวเดียวได้ จากนั้นตรวจสอบชิ้นส่วนที่มีกัมมันตรังสีโดยออโตเรดิโอกราฟี (Autoradiography) แผนภาพออโตเรดิโอแกรม (Autoradiogram) ที่ได้อ่านจากปลายสายไปยังต้นสายและลำดับที่พิจารณาได้จะเป็นคู่สมกับลำดับที่เป็นแม่แบบในพาหะ (ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม, 2552)

2.5 การแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ในแบคทีเรีย

การแสดงออกของโปรตีนเป็นอีกเทคนิคหนึ่งทางพันธุวิศวกรรม เป็นการผลิตโปรตีนที่ต้องการศึกษาในเวคเตอร์ที่สนใจโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ด้วยการตัดต่อยีนเข้าเวคเตอร์และทำการย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ทั้งโปรคาริโอต เช่น *E. coli* หรือยูคาริโอต เช่น yeast, insect cell, mammalian cell เรียกโปรตีนที่ได้ว่าโปรตีนเชื่อมต่อหรือโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2543)

ตารางที่ 2.3 ข้อดีและข้อเสียของการใช้เซลล์เจ้าบ้านต่างๆ

เซลล์เจ้าบ้าน	ข้อดี	ข้อเสีย
1. *E. coli*	- ใช้ได้กับดีเอ็นเอทั่วไป - ควบคุมการแสดงออกของยีนได้ง่าย - ผลผลิตของโปรตีนสายผสมสูงถึง 50% ของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ - เจริญเติบโตง่าย - โปรตีนลูกผสมอยู่ในรูปของโปรตีนเชื่อมต่อ - ออกแบบให้มีการสร้างโปรตีนสายผสมออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ (extracellular)	- โปรตีนสายผสมไม่มี post-translational modification - คุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนต่างจากโปรตีนในธรรมชาติ - แบคทีเรียแกรมลบมี endotoxin สูง - ถ้ามีการแสดงออกมากเกินไป (over expression) จะเกิดการรวมตัวของโปรตีนในรูป inclusion bodies ทำให้แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ยาก
2. Yeast (*S. cerevisiae*)	- ไม่มี endotoxins - ไม่ทำให้เกิดโรคในคน - มีกระบวนการ glycosylation - นำไปใช้ในระบบ large scale ได้	- ควบคุมการแสดงออกของยีนได้ยาก - การใช้ดีเอ็นเอพาหะสำหรับยีสต์ยังยุ่งยากและไม่สะดวก - กระบวนการ glycosylation ไม่เหมือนในสัตว์
3. เซลล์แมลง (cultured in sect cells)	- baculovirus vector - มีกลไกในการสร้างโปรตีนได้หลายชนิดเหมาะสำหรับโปรตีนของยูคารีโอตชั้นสูง - ปลอดภัย เนื่องจากโปรตีนที่ผลิตจาก baculovirus ผ่าน FDA approved	- ขาดข้อมูลของกระบวนการ glycosylation -โปรตีนสายผสมมีแอคติวิตีไม่ถึง 100%
4.mammalian cell	-แอคติวิตีทางชีวภาพของโปรตีนเหมือนกับโปรตีนในธรรมชาติ -การเพาะเลี้ยงสามารถทำได้ในปริมาณมากๆ	- มีความยุ่งยากในการเพาะเลี้ยงเซลล์และราคาแพง - การเจริญเติบโตของเซลล์ช้า - พันธุกรรมของเซลล์ไม่เสถียรภาพ -ปริมาณโปรตีนสายผสมที่ได้มีปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่ทดลอง

ดำเนินงานวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเลคณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี และ ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ อาคาร สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โยธี กรุงเทพฯ

3.2 ส่าหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ใช้ในการทดลอง

1. *Spirulina platensis*

สาหร่าย *Spirulina platensis* ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

2. *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม

สาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่ใช้ในการทดลองนี้ แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในสินภิรมย์ฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี (พงศธร เจนจัดการ, 2558)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การทดลองที่ 1: การตรวจสอบปริมาณไฟโคบิลิโปรตีนในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสภาวะกระตุ้นที่แตกต่างกัน

3.3.1.1 การเก็บตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการทดลอง

เก็บตัวอย่างสาหร่ายโดยใช้ถุงลากแพลงก์ตอน (plankton net) เพื่อเก็บสาหร่ายที่ล่องลอยในมวลน้ำ (planktonic algae) และเก็บก้อนหินและหน้าดินเพื่อเก็บสาหร่ายกลุ่มที่อาศัยบริเวณผิวหน้าดิน (benthic algae) ตามแหล่งน้ำเค็มในจังหวัดจันทบุรี

3.3.1.2 การแยกสาหร่ายให้เป็นชนิดเดียวด้วยวิธี Single cell isolation และการทำให้สาหร่ายบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

แยกสาหร่ายจากตัวอย่างที่เก็บมาด้วยวิธี single cell isolation (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542) ดูดเซลล์สาหร่ายที่ต้องการ นำเซลล์สาหร่ายไปล้างในอาหารสูตร BG11 หรือกิลลาร์ด F/2 ที่หยดไว้ และล้างเซลล์ให้สะอาดอีกประมาณ 2-3 ครั้ง จึงดูดเซลล์ไปใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG11 หรือกิลลาร์ด F/2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปวางในที่มีแสงเพื่อให้สาหร่ายเติบโตภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ

เมื่อสาหร่ายมีการเติบโตนำมาเขี่ยลงบนอาหารแข็งสูตร BG11 หรือกิลลาร์ด F/2 ที่ผสมสารละลายยาปฏิชีวนะ เพื่อทำให้สาหร่ายปราศจากการปนเปื้อนแบคทีเรีย หลังจากที่สาหร่ายมีการเติบโตบนอาหารแข็งดังกล่าว ต้องย้ายโคโลนีสาหร่ายไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนอีกครั้ง โดยเขี่ยลงบนอาหารวุ้นสูตร BG11 หรือกิลลาร์ด F/2 ที่ผสมด้วยอาหารสูตร NA ลงในอาหารเหลวสูตร BG11 หรือกิลลาร์ด F/2 ที่บรรจุในหลอดทดลอง และจากนั้นจึงเลี้ยงขยายปริมาณในขวดรูปชมพู่เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการทดลองลำดับต่อไป

3.3.1.3 การจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาและฟลูโอเรสเซนส์ จดบันทึกลักษณะที่สำคัญ วัดขนาดของเซลล์ บันทึกภาพลักษณะของสาหร่าย และนำข้อมูลที่ได้ไปใช้จำแนกชนิดจุลสาหร่ายตามวินิจฉัยจากเอกสารอ้างอิง (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

3.3.1.4 การเลี้ยงสาหร่ายสีเขียมแกมน้ำเงินและสภาวะการเจริญเติบโต

เลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 (Allen, 1968) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อหัวเชื้อสาหร่าย 5 มิลลิลิตร) และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) ที่ความเค็ม 20 ppt ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อหัวเชื้อสาหร่าย 5 มิลลิลิตร) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ในห้องปฏิบัติการ เพื่อติดตามการเติบโตของสาหร่ายเป็นเวลา 15 และ 30 วัน ตามลำดับ เขย่าขวดสาหร่ายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องเขย่าสารภายในห้องปฏิบัติการและควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเติมอากาศตลอดเวลา

วัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* ด้วยวิธีการนับเส้นสาย (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540) โดยเก็บตัวอย่างสาหร่ายจากขวดรูปชมพู่โดยใช้ปิเปต จากนั้นใส่ตัวอย่างลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer) โดยนับจำนวนเส้นสายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม เนื่องจากสาหร่ายมีขนาดเล็ก จึงวัดการเจริญเติบโตโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักแห้ง อบกระดาษกรอง GF/C (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เก็บกระดาษกรองในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแห้งกระดาษกรอง จากนั้นกรองน้ำตัวอย่างด้วยกระดาษกรองที่เตรียมไว้ นำไปอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำกระดาษกรองมาใส่โถดูดความชื้นรอจนอุณหภูมิของกระดาษกรองเย็นและชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาผลต่างของน้ำหนัก เมื่อได้ทราบแนวโน้มการเจริญเติบของสาหร่ายจนถึงระยะเวลาที่สาหร่ายอยู่ในระยะทวีคูณ (log phase) นำสาหร่ายมาเลี้ยงในโหลแก้วขนาด 3 ลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ภายใต้สภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ และสภาวะให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ วัดค่าความเข้มแสงทุกวันระหว่างการทดลองในช่วงเวลา 11.00-12.00 น. และเก็บเซลล์สาหร่ายเพื่อหาปริมาณไฟโคไซยานินต่อไป

3.3.1.5 การสกัดไฟโคไซยานินและการตรวจวัดไฟโคไซยานิน

เก็บเซลล์สาหร่ายทั้ง 3 ความเข้มแสงในช่วง Log phase มาสกัดสารไฟโคไซยานินโดยประยุกต์จากเทคนิคของราเชนทร์ ดวงศรี (2552) และ Soni *et al.* (2006) โดยเก็บเซลล์สาหร่ายที่ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 15 นาที แขวนลอยในสารละลาย Na-phosphate buffer ก่อนนำสารแขวนลอยไปแช่แข็ง-ละลายที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 3 รอบ นำสารแขวนลอยที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 รอบต่อนาที และวัดสารสกัดไฟโคไซยานินโดยเทคนิคสเปกโทรโฟโตรมิตรีที่ความยาวคลื่น 620 และ 652 นาโนเมตร คำนวณตามสูตรของ Bennett and Bogorad (1973)

ปริมาณซี-ไฟโคไซยานิน (มก./มล.) = $[A620_{nm} - 0.474(A652_{nm})]/ 5.34$ สมการที่ 1

ปริมาณอัลโลไฟโคไซยานิน (มก./มล.) = $[A652_{nm} - 0.208(A620_{nm})]/ 5.09$ สมการที่ 2

3.3.1.6 การวิเคราะห์หน่วยย่อยของโปรตีนไฟโคไซยานินโดยการทำอิเลคโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE

การเตรียม 12% Running gel และ 5% Stacking gel

นำกระจกทั้งหมดมาประกอบให้มีความหนา 1.0 มิลลิเมตร เข้าด้วยตามตำแหน่งส่วนประกอบของเครื่องอิเลคโทรโพริซิส ตรวจสอบการรั่วของชุดกระจกที่เตรียมโดยใส่น้ำกลั่นลงไปในช่องว่างระหว่างกระจก สังเกตว่ามีการรั่วซึมของน้ำออกมาหรือไม่ ถ้าไม่มีให้เทน้ำออกให้หมด แล้วเตรียม 12% Running gel แล้วปิเปตดูดสารละลาย 12% Running gelใส่ลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกช้าๆ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ หยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวหน้าเจลเพื่อป้องกันผิวหน้าเจลไม่สม่ำเสมอ ทิ้งให้เจลแข็งตัวประมาณ 45-60 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างแผ่นเจลและน้ำที่คลุมแผ่นเจลอย่าชัดเจนแล้วจึงค่อยๆซับน้ำออก เตรียม 5% Stacking gel ปิเปตสารละลาย 5% Stacking gel ใส่ลงบน 12% Running gel อย่างช้าๆ ระมัดระวังอย่าให้มีฟองอากาศ วางหวีลงไปในช่องกระจก เพื่อทำให้เกิดเป็นช่อง สำหรับใส่สารตัวอย่าง ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ประมาณ 30 นาที

การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

นำตัวอย่างมาผสมกับ 2x dry และ Buffer นำไปต้มในน้ำเดือด ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีโดยเทียบทิวบ์ไว้บนฟิวเจอร์บอร์ด

การทำอิเลคโทรไฟริซิส และการย้อมสีโปรตีน

หลังจากเจลโพลีอะคลิลิไมด์แข็งตัวดีแล้ว ประกอบลงในเครื่องอิเลคโทรโพริซิส เติม 1x Running buffer ตรงกลางระหว่างกระจกสองข้าง ให้ถึงขอบกระจกด้านบนสุดทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที เพื่อดูการรั่ว นำตัวอย่างไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที โดยเสียบทิวบ์ตัวอย่างบนฟิวเจอร์บอร์ด หลังจากนั้นนำทิวบ์ที่ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส และ Marker มาละลายเสียบไว้บนน้ำแข็ง

ประมาณ 5 นาที ดึงหวีออกจากกเจล ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ โหลดตัวอย่างลงเจลโพลีอะคลิลาไมด์ และเติม 1x Running buffer ระหว่างกระจกให้ถึงขอบบนของกระจกและเติมลงในแชมเบอร์ให้ถึงคตลวด ปิดฝาแชมเบอร์ นำสายไฟมาต่อกับเครื่อง power supply ตั้งโปรแกรมโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ ประมาณ 150 นาที โดยสังเกตจากสีของสีโบรโมฟีนอลบลูจะเคลื่อนที่ไปเกือบสุดของล่างเจล จากนั้นนำเจลไปย้อมสี

นำเจลโพลีอะคลิลาไมด์ที่ได้ผ่านการทำอิเลคโทรโพริซิส แล้วแช่ในสารละลาย Fixtration แช่ทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นโดยแช่ครั้งละ 5 นาที ทำ 2 ครั้งแล้วย้อมสีโรตีนด้ย Staining Solution เป็นเวลา 12 นาที โดยใช้เครื่องเขย่าสาร (Orbital Shaker) เขย่าตลอดเวลา จากนั้นล้างเจลด้วย Destaining ล้างจนเห็นแถบสีของโปรตีนอย่างชัดเจน

การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

ทำการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยเปรียบเทียบระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนตัวอย่างกับโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนัก 10-250 กิโลดาลตัน โดยวัดระยะทาง (Migration distance) การเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนมาตรฐานแต่ละแถบ โดยใช้จุดกึ่งกลางของแต่ละแถบโปรตีนแล้วทำกราฟมาตรฐาน อ่านค่าน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนของตัวอย่างโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน

การตรวจสอบผลด้วยค่า Band intersity

วิเคราห์หาปริมาณของแถบโปรตีน โดยใช้โปรแกรมจากเครื่อง GEL DOC จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากโปรแกรมไปวิเคราะห์หาความแตกต่างของแถบโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

3.3.1.7 การใช้เทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR)

นำตัวอย่างสารไฟโคไซยานินที่ผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง มาทำการศึกษาหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของไฟโคไซยานินในสาหร่ายด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) (ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Nicolet iN10 Infrared Microscope) โดยผสมไฟโคไซยานินเข้ากับโพแทสเซียมโปรไมด์ (KBr) บดให้ละเอียดในโกร่งบดสาร ใส่ในแม่พิมพ์ตัวอย่างเพื่อทำการอัดเม็ด จากนั้นถอดออกตัวประกอบแม่พิมพ์ตัวอย่างจะติดอยู่กับแม่พิมพ์ (ลักษณะมีรูวงกลมตรงกลาง โดยตัวอย่างจะอยู่ในช่องตรงกลาง) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม OMNIC picta โดยเลือกความถี่ระหว่าง 4000-400 cm^{-1} และเลือกรูปแบบสเปกตรัมเป็น แบบ %Transmittance

3.3.1.8 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) เมื่อพบความแตกต่างจะทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.3.2 การทดลองที่ 2: หาลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มยีนของยีนไฟโคไซยานินในส่วนของแอลฟาและเบต้า และระดับการแสดงออกของยีน

3.3.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

นำตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในอาหารสูตร BG-11 หรือกิลลาร์ด F/2 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำ DEPC 1 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA)

เติม lysis buffer 400 μl (4M Urea, 0.2M Tris-HCL pH 8.0, 20mM NaCL 0.2M EDTA and 100 μl Proteinase K (stock solution 10mg/มิลลิลิตร)) ลงในตะกอนเวลล์ ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ pipette ดูดขึ้นลง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 55°c เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ดูดขึ้น - ลง ทุกๆ 10-15 นาที) เติม 1 มิลลิลิตร extraction buffer (3% CTAB, 1.4M NaCl, 20mM 0.1M Tris-HCl pH 8.0, 1% Sarkosyl และ 1% Mercaptoethanol) โดยอุ่น extraction buffer ที่อุณหภูมิ 55°c ผสมเบาๆ โดยการพลิกหลอดทดลองขึ้นลง จากนั้นบ่มที่ 55°c เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (พลิกหลอดขึ้นลงเบาๆ 4-5 ครั้ง ทุกๆ 10 นาที จากนั้นแบ่งสารออกเป็น 2 หลอด ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1 v/v) ในปริมาณ 2 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากันเบาๆ จนเห็นเป็นสีขาวของ emulsion จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10000xg เป็นเวลา 5 นาที ดูด 500 μl ลงหลอดใหม่ แล้วเติม 100% ethanol และ 3M sodium acetate (pH 5.2) ในปริมาณ 2 และ 0.1 เท่าของปริมาตรเดิม ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ -20°c, 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ice-cold ethanol (500 ไมโครลิตร) ทิ้งตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำ 50 ไมโครลิตร

การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA)

ใช้ชุดสกัด RNeasy plant Mini kit (QIAGEN, cat nos. 74903 และ 74904) โดยบดตะกอนเซลล์สาหร่าย (Freeze dried) 100 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ RLT ปริมาตร 450 ไมโครลิตร แล้วเขย่าแรงๆ ย้ายตัวอย่างลงใน QIAshredder spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นย้ายส่วนเหนือตะกอนลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม แอลกอฮอล์ (96-100%) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลงทันที ย้ายตัวอย่างลงใน RNesy Mini spin column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบ/นาที ทิ้งส่วนที่เป็นของเหลว เติม บัฟเฟอร์ RW1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงใน RNesy Mini spin column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งส่วนที่เป็นของเหลว เติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงใน RNesy Mini spin column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 วินาทีเติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงใน RNesy Mini spin column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม RNase free water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะอาร์เอ็นเอ

การสังเคราะห์ first strand cDNA จากอาร์เอ็นเอสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สร้าง first strand cDNA จากปริมาณ total RNA 1.5 µg ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยใช้ ImProm- II™ Reverse Transcription System Kit (Promega). ผสม 1.0 µg random primer กับ 1.5 µg total RNA และ DEPC-treated H_2O in ปริมาตรสุทธิ 5 µl. บ่มที่ 70 °C 5 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันที 5 นาที จากนั้นเติม 5x reaction buffer, $MgCl_2$, dNTP Mix, RNasin เติม 1 µl ของ ImProm- II™ Reverse transcriptase บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C 5 นาที, 42°C เป็นเวลา 90 นาที และ 70 °C 15 นาที วัดความเข้มข้น first strand cDNA ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260 nm และตรวจสอบด้วย 1.0% agarose gels.

3.3.2.2 การออกแบบไพล์เมอร์และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Quantitative Real time PCR

ออกแบบ open reading frame ไพรเมอร์ และ Quantitative Real time PCR ไพรเมอร์ ยีน *Phycocyanin subunit* α *(PCC-*α*)* และ Phycocyanin subunit β *(PCC-* β*)* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ *PCC-*α *(Spirulina subsalsa)* (ACCESSION No.WP_017305690) *และ (Spirulina subsalsa)* (ACCESSION No.WP_017305689) และ *16s rRNA* ไพรเมอร์ (ACCESSION No.Y18790)

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ *PCC-* α และ *PCC-*β

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสไพรเมอร์ (5'->>-3')	ขนาดที่คาดหวัง (bp)
ORFPCCA-F	ATg AAg ACC CCT ATC ACC gA	489
ORFPCCA-R	CTA gCT CAg AgC gTT gAT Ag	
QPCCA-F	ATT CCC TTA CAC CAC CCA AA	170
QPCCA-R	TAC CAC CAg AAA TCA ggC Ag	
ORFPCCB-F	ATg TTT gAC gCA TTT ACA Agg	591
ORFPCCB-R	CTA ggC AAC AgC AgC AgC Ag	
QPCCB-F1	AgT TAg ACg CTT TAT CCg CC	288
QPCCB-R1	CTT ggT Agg TTT CAC gCA gA	
QPCCB-F2	ACC gCA TCA CCA gCA ACT CT	127
QPCCB-R2	CgC AAA CAA gCA gCC ATA Cg	
Q16s rRNA-F	AgA ACC TTA CCA ggg CTT gA	135
Q16s rRNA-R	TAA gTC CCg CAA CgA gCg	

3.3.2.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ open reading frame ของ *PCC-* α และ *PCC-*β

End point RT-PCR

ใช้ 200 ng ของ first strand cDNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย RT-PCR ในปริมาตรสุทธิ 25 µl (TopTaq DNA Polymerase, QIAGEN) ประกอบด้วย 2.5 µl ของ 10x TopTaq PCR buffer, 2.5 µl ของ CoralLoad concentrate, 200µM dNTPs, 0.2 µM Specific prime และ 1U TopTaq DNA polymerase โดยใช้ รูปแบบPCR คือ 94 °C, 3 นาที 1 รอบ, 94 °C, 45 วินาที, 53 °C, 45 วินาที, 72 °C, 1 นาที 35 รอบ และ 72 °C, 7 นาที 1 รอบ สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *PCC-*α และ 94 °C, 3 นาที 1 รอบ, 94 °C, 43 °C, 45 วินาที, 72 °C, 1 นาที 5 รอบ ตามด้วย 94 °C, 3 นาที 1 รอบ, 94 °C, 55 °C, 45 วินาที, 72 °C, 1 นาที 35 รอบ และ 72 °C, 7 นาที 1 รอบ สำหรับการเพิ่มปริมาณ *PCC-*β

การทำชิ้น PCR product ให้บริสุทธิ์ และการเชื่อมต่อ PCR product เข้ากับ pGEM®-T Easy vector

ทำชิ้น PCR product ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Qiaquick Gel Extraction Kit (QIAGEN cat. No. 28706)

ทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับ the pGEM®-T Easy vector ในปริมาตรสุทธิ 10 µl ซึ่งประกอบด้วย 2x Rapid Ligation Buffer (60 mM Tris-HCl, pH 7.8, 20 mM $MgCl_2$, 20 mM DDT, 2 mM ATP and 10% PEG8000) 5 µl, 3 unit ของ T4 DNA ligase, 25 ng ของ pGEM®-T Easy vector และ 50 ng ของ ชิ้น DNA บ่มที่อุณหภูมิ 4 - 8 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้น ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *E.coli* JM 109 ด้วยวิธี ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42°C เลือก colony เดี่ยวที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ จากนั้นสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (MACROGEN, South Korea)

3.3.2.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PCC-* α และ *PCC-*β ในสภาวะการให้แสงจากธรรมชาติ และการให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์

สร้างกราฟมาตรฐานยีนเป้าหมาย *PCC-* α และ *PCC-*β และยีนควบคุม *16s rRNA* โดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 10^2 – 10^8 copy ในปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร (IQ™ SYBR Green Supermix, BioRAD) ที่ความเข้มข้นไพรเมอร์ 0.2 ไมโครโมลาร์ โดยใช้รูปแบบปฏิกิริยา real-time PCR คือที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที 1 รอบ, 95°C เป็นเวลา 15 วินาที, 55°C เป็นเวลา 30 วินาที, 72°C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และตามด้วย melting curve analysis ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที, 65°C เป็นเวลา 1 นาที และตามด้วย cooling ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 10 วินาที.

สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PCC-* α และ *PCC-*β และ *16srRNA* ใช้ดีเอ็นเอตั้งต้น คือ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จากตัวอย่างสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะการให้แสงธรรมชาติ และการให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (200 นาโนกรัม สำหรับยีนเป้าหมาย *PCC-* α และ *PCC-*β และ 5

นาโนกรัม สำหรับยีนควบคุม 16s rRNA) โดยใช้รูปแบบปฏิกิริยา real-time PCR เดียวกันกับการสร้างกราฟมาตรฐาน

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

คำนวนอัตราส่วนยีนเป้าหมาย และยีนควบคุม จากนั้นวิเคราะห์ทางสถิติ Independent T-Test ที่ค่าความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95%

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลของการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina* sp.

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม โดยจะทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงที่แตกต่างกันคือ ภายใต้สภาวะแสงจากธรรมชาติและสภาวะแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แบบแผง

4.1.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis*

จากการเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ต่อหัวเชื้อสาหร่าย 5 มิลลิลิตร) ทำการเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการจำนวน 3 ซ้ำ เพื่อติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis* เป็นเวลา 30 วัน เขย่าขวดสาหร่ายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องเขย่าสารภายในห้องปฏิบัติการควบคุมด้วยอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสตลอดเวลา (ภาพที่ 4.1) และลักษณะของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่ถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (ภาพที่ 4.2)

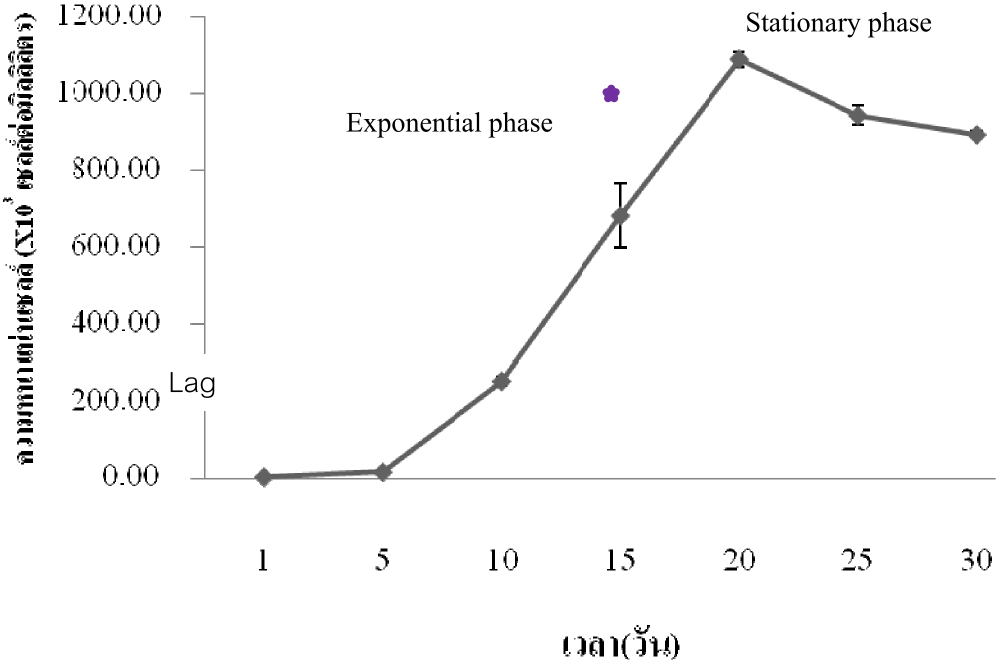
ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายมีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆ ในวันที่ 1 ของการทดลองสามารถนับจำนวนเซลล์สาหร่ายได้ 3.11×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วันที่ 5 ของการทดลองสามารถนับจำนวนเซลล์สาหร่ายได้ 15.56×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ 252.33×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วันที่ 15 ของการทดลองสามารถนับจำนวนเซลล์สาหร่ายได้ 681.44×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วันที่ 20 (วันที่มีจำนวนเซลล์สูงสุด) สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ 1090.11×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วันที่ 25 ของการทดลองสามารถนับจำนวนเซลล์สาหร่าย 942.33×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และในวันที่ 30 สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ 892.56×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่4.1) (ภาพที่ 4.3)

ภาพที่ 4.1 สาหร่าย *Spirulina platensis* ภายในห้องที่ศูนย์วิจัยคณะเทคโนโลยีทางทะเล

ภาพที่ 4.2 สาหร่าย *Spirulina platensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis*

วันที่เลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ (X 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	ขวดที่ 3	Mean ± STDEV
1	3.33	3.00	3.00	3.11 ± 0.19
5	18.33	17.67	10.67	15.56 ± 4.25
10	241.00	265.33	250.67	252.33 ±12.25
15	750.33	589.67	704.33	681.44 ± 82.74
20	1094.00	1108.00	1068.33	1090.11 ± 20.12
25	969.67	920.67	936.67	942.33 ± 24.99
30	893.67	900.33	883.67	892.56 ± 8.39



ภาพที่ 4.3 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis* (✿ คือ วันที่ 17 ของการเลี้ยง เวลาที่คาดว่าจะเก็บตัวอย่างมาทำการทดลองในส่วนต่อไป)

เมื่อได้ทราบแนวโน้มการเจริญเติบของสาหร่าย *Spirulina platensis* จนถึงระยะเวลาที่สาหร่ายเข้าสู่ระยะทวีคูณ ดังนั้นจึงนำสาหร่ายมาเลี้ยงอีกครั้งเพื่อเก็บเซลล์ในระยะทวีคูณ (Log phase) ไปหาปริมาณไฟโคไซยานินต่อไป โดยนำสาหร่ายมาเลี้ยงในโหลแก้วขนาด 3 ลิตรจำนวนอย่างละ 3 ซ้ำในภายใต้สภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ และสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วยวิธีนับเซลล์สำหรับสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำจืดเป็นระยะเวลา 17 วัน ตามลำดับ วัดค่าความเข้มแสง ทุกวัน และเก็บเซลล์สาหร่ายเพื่อหาปริมาณไฟโคไซยานินต่อไป

4.1.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม

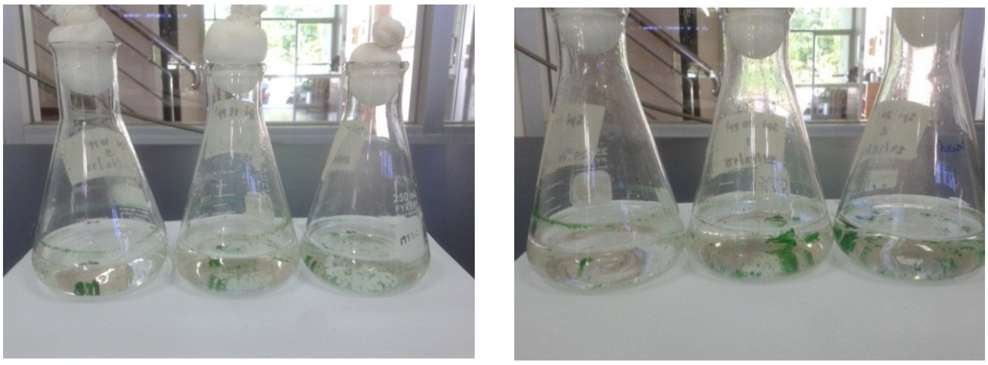
ลักษณะของสาหร่ายเป็นเส้นสาย มีความยาวขนาดเซลล์ประมาณ 15-30 ไมครอนอาจะพบหลุดเป็นท่อนเซลล์เดียวได้ เซลล์รูปทรงกระบอก ไม่มีซีท เส้นสายขดม้วน หรือแบบโค้งงอเป็นลูกคลื่นปลายเส้นสายไม่เรียวแหลม ผนังเซลล์ที่ต่อกันอาจจะไม่ชัดเจนปลายเซลล์โค้งมน (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2556) เชื้อสาหร่ายนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก พงษธร เจนจัดการ (2558) ได้ทำการจำแนกสาหร่ายชนิดนี้โดยจำแนกจากบ่อปลากะพงขาวในอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี

จากการเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ที่ความเค็ม 20 และ 15 ppt ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ต่อหัวเชื้อสาหร่าย 5 มิลลิลิตร) ทำการเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการจำนวนอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม เป็นเวลา 15 วัน เขย่าขวดสาหร่ายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องเขย่าสารภายในห้องปฏิบัติการควบคุมด้วยอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสตลอดเวลา (ภาพที่ 4.4) และลักษณะของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่ถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า (ภาพที่ 4.5)

ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายที่เลี้ยงในความเค็ม 15 ppt มีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆ ในวันที่ 5 ของการทดลองสามารถหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายได้ 0.60 กรัมต่อลิตร วันที่ 7 ของการทดลองสามารถหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายได้ 2.40 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการทดลองสามารถหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายได้ 16.03 กรัมต่อลิตร วันที่ 14 ของการทดลองสามารถหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายได้ 6.67 กรัมต่อลิตร และสาหร่ายที่เลี้ยงในความเค็ม 20 ppt มีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆ ในวันที่ 5 ของการทดลองสามารถหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายได้ 6.37 กรัมต่อลิตร วันที่ 7 ของการทดลองสามารถหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายได้ 21.10 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการทดลองสามารถหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายได้ 54.53 กรัมต่อลิตร วันที่ 14 ของการทดลองสามารถหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายได้ 35.57 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2) (ภาพที่ 4.6)

เมื่อได้ทราบแนวโน้มการเจริญเติบของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มจนถึงระยะเวลาที่สาหร่ายเข้าสู่ระยะทวีคูณ ดังนั้นจึงนำสาหร่ายมาเลี้ยงอีกครั้งเพื่อเก็บเซลล์ในระยะทวีคูณ (Log phase) ไป

หาปริมาณไฟโคไซยานินต่อไป โดยนำสาหร่ายมาเลี้ยงในโหลแก้วขนาด 3 ลิตรจำนวนอย่างละ 3 ซ้ำใน ภายใต้สภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ และสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วยวิธีนับเซลล์สำหรับสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มเป็นระยะเวลา 10 วันตามลำดับ วัดค่าความเข้มแสง ทุกวัน และเก็บเซลล์สาหร่ายเพื่อหาปริมาณไฟโคไซยานินต่อไป



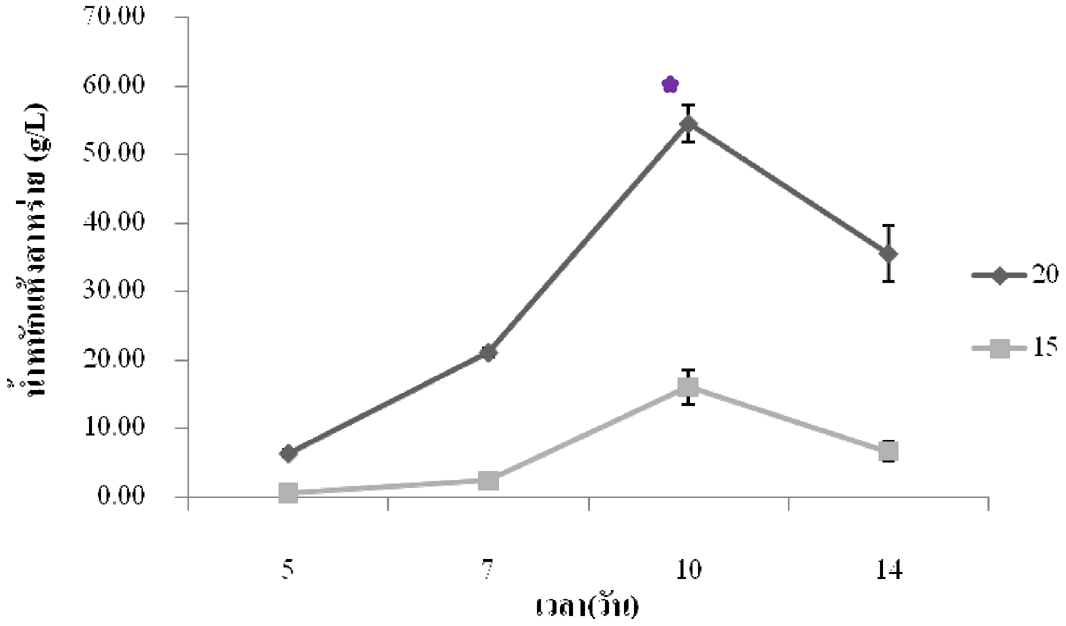
A **B**

ภาพที่ 4.4 สาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มภายในห้องที่ศูนย์วิจัยคณะเทคโนโลยีทางทะเล โดย ภาพ A คือสาหร่ายที่เลี้ยงในความเค็ม 15 ppt ภาพ B คือสาหร่ายที่เลี้ยงในความเค็ม 20 ppt

ภาพที่ 4.5 สาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม

ค่าความเค็ม (ppt) \ วันที่	น้ำหนักแห้งสาหร่าย (g/L)			
	5	7	10	14
20	6.3667	21.1000	54.5333	35.5667
15	0.6000	2.4000	16.0333	6.6667



ภาพที่ 4.6 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์เค็ม สาหร่ายที่เลี้ยงในความเค็ม 20 ppt สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในความเค็ม 15 ppt (✿ คือ วันที่ 10 ของการเลี้ยงที่ความเค็ม 20 ppt และเป็นช่วงเวลาที่คาดว่าจะเก็บตัวอย่างมาทำการทดลองในส่วนต่อไป)

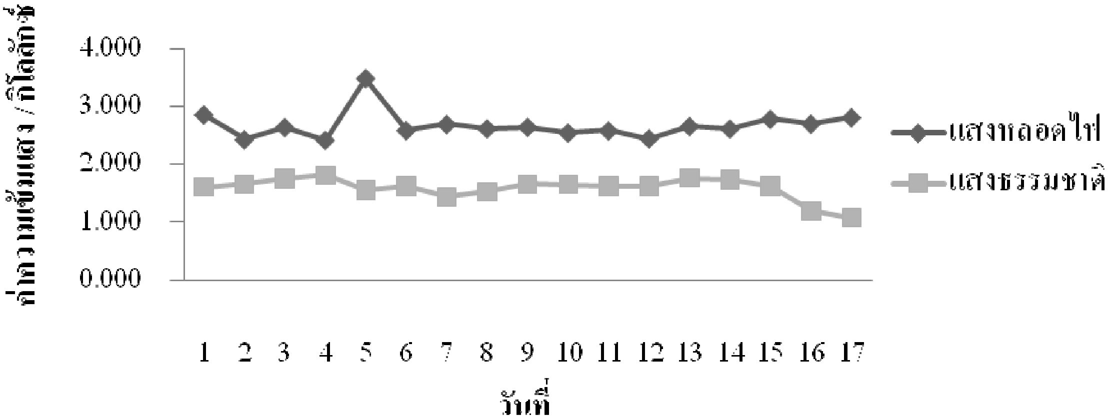
4.2 ค่าความเข้มแสงของการเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะแตกต่างกัน

4.2.1 ค่าความเข้มแสงของการเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis*

จากการเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* โดยให้ความเข้มแสงที่แตกต่างกันสามารถวัดค่าความเข้มแสงบริเวณสภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ โดยทำการวัดค่าความเข้มแสงช่วงเวลา 11.30 - 12.00 น. ของทุกวัน ได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 1.58±0.19 กิโลลักซ์ต่อวัน และสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ชนิดแผง ได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 2.68 ± 0.24 กิโลลักซ์ต่อวัน (ตารางที่ 4.3) (ภาพที่ 4.7)

ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มแสงของสาหร่าย *Spirulina platensis* ในสภาวะที่แตกต่างกัน

ค่าความเข้มแสง (กิโลลักซ์) / สภาวะ	วันที่					
	1	5	10	15	17	ค่าเฉลี่ย ± STDEV
แสงหลอดไฟ	2.86	3.49	2.55	2.78	2.81	2.68 ± 0.24
แสงธรรมชาติ	1.61	1.55	1.65	1.62	1.08	1.58 ± 0.19



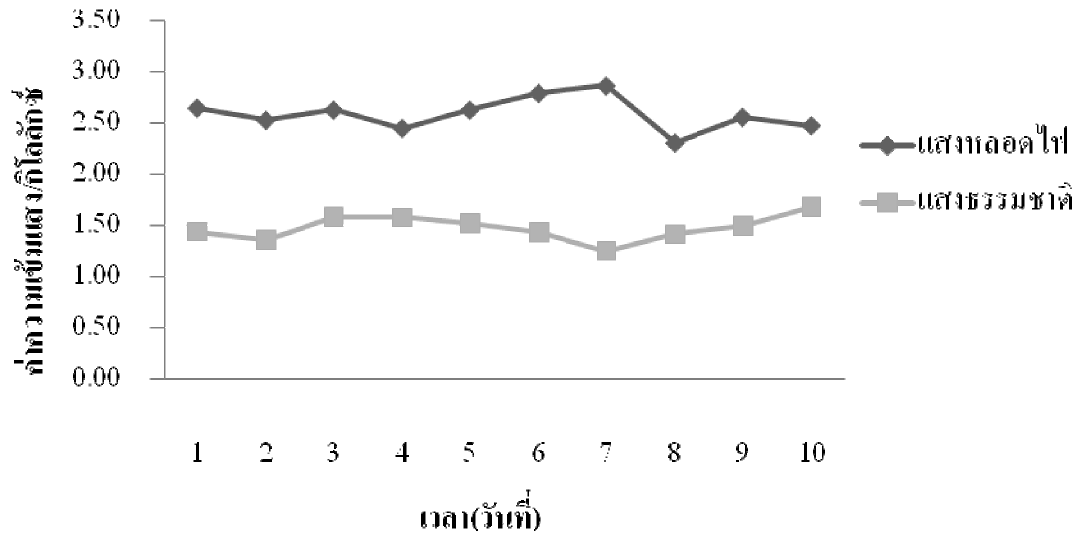
ภาพที่ 4.7 ค่าความเข้มแสงของสาหร่าย *Spirulina platensis* ในสภาวะที่แตกต่างกัน

4.2.2 ค่าความเข้มแสงของการเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม

จากการเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม โดยให้ความเข้มแสงที่แตกต่างกันสามารถวัดค่าความเข้มแสงบริเวณสภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ โดยทำการวัดค่าความเข้มแสงช่วงเวลา 11.30 - 12.00 น.ของทุกวัน ซึ่งทำการให้แสงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 1.47 ± 0.12 กิโลลักซ์ต่อวัน และสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ชนิดแผง ได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 2.58 ± 0.16 กิโลลักซ์ต่อวัน (ตารางที่ 4.4) (ภาพที่ 4.8)

ตารางที่ 4.4 ค่าความเข้มแสงของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มในสภาวะที่แตกต่าง

ค่าความเข้มแสง (กิโลลักซ์) / สภาวะ	วันที่					
	2	4	6	8	10	ค่าเฉลี่ย ± STDEV
แสงหลอดไฟ	2.52	2.44	2.79	2.30	2.47	2.58±0.16
แสงธรรมชาติ	1.36	1.58	1.43	1.41	1.68	1.47±0.12



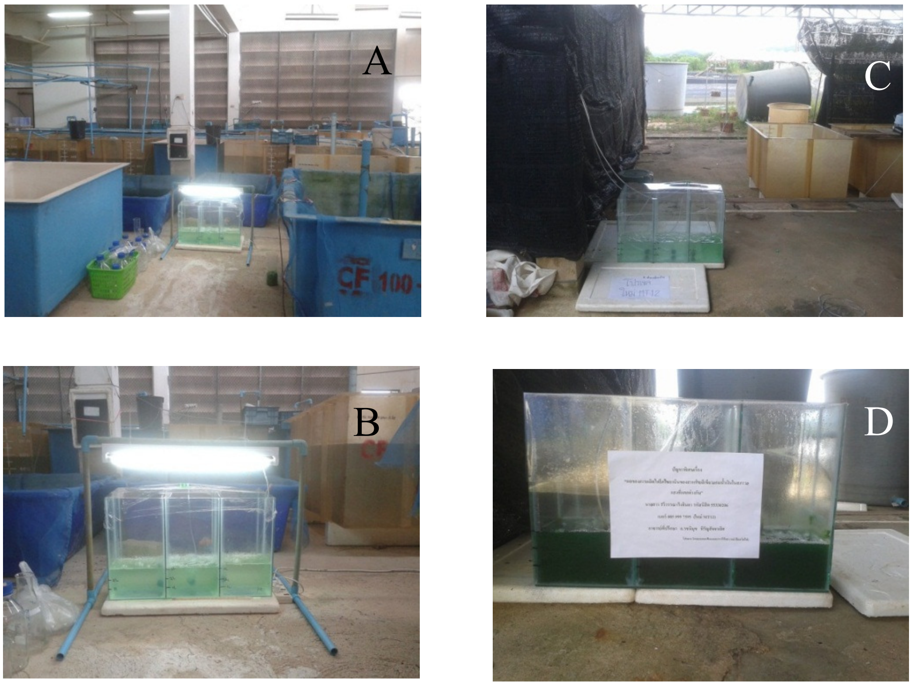
ภาพที่ 4.8 ค่าความเข้มแสงของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มในสภาวะที่แตกต่างกัน

4.3 การเปรียบเทียบน้ำหนักของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน

4.3.1 น้ำหนักของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน

จากการทดลองโดยเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11 ทั้งหมด 3 ลิตรจำนวน 3 ซ้ำ ในแต่ละสภาวะพบว่า ในสภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตดีกว่าในสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แบบแผง (ภาพที่ 4.9) โดยเมื่อทำการกรองผ่านถุงกรองแพลงตอนขนาด 16 ไมครอนในสภาวะที่ 1 พบว่าในแต่ละซ้ำได้น้ำหนักเปียกทั้งหมด 12.07 ± 0.49 กรัม ส่วนในสภาวะที่ 2 ได้น้ำหนักเปียกทั้งหมด 10.33 ± 1.01 กรัม (ตารางที่ 4.5) (ภาพที่ 4.10)

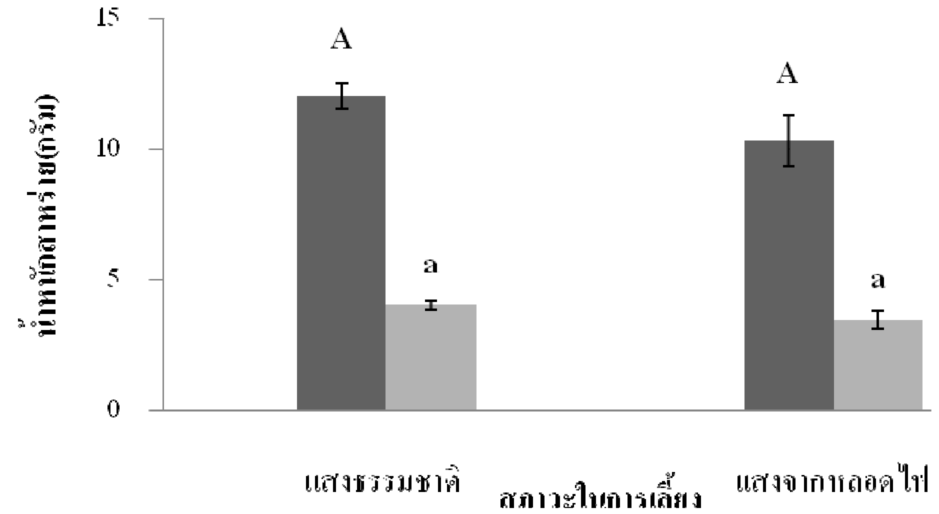
เก็บเซลล์สาหร่ายทั้งหมดในสภาวะแสงธรรมชาติและแสงจากหลอดไฟเพื่อหาน้ำหนักเปียกเฉลี่ยได้ดังนี้คือ 12.07 กรัมต่อ3ลิตร และ 10.33 กรัมต่อ3ลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำมาคำนวณหาความหนาแน่นใน 1 ลิตรพบว่ามีน้ำหนักเฉลี่ยดังนี้คือ 4.02 กรัมต่อลิตร และ 3.44 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกันแล้ว พบว่าในสภาวะที่เลี้ยงด้วยแสงธรรมชาติจะมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าในสภาวะให้แสง



ภาพที่ 4.9 บริเวณที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่สภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (A และ B) และสภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ (C และ D)

ตารางที่ 4.5 น้ำหนักเปียกสาหร่าย *Spirulina platensis* ในสภาวะที่แตกต่างกัน

สภาวะ	น้ำหนักสาหร่ายทั้งหมด (กรัม)				น้ำหนักสาหร่าย (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย ± STDEV	1	2	3	ค่าเฉลี่ย ± STDEV
แสงธรรมชาติ	12.11	11.56	12.54	12.07 ± 0.49	4.04	3.85	4.18	4.02±0.16
แสงหลอดไฟ	9.23	11.19	10.58	10.33 ± 1.01	3.08	3.73	3.53	3.44±0.34



ภาพที่ 4.10 น้ำหนักเปียกสาหร่าย *Spirulina platensis* ในสภาวะที่แตกต่าง แท่งสีเทาเข้มแสดงถึงน้ำหนักทั้งหมดของสาหร่ายต่อ 3 ลิตร แท่งสีเทาอ่อนแสดงถึงน้ำหนักของสาหร่ายต่อลิตร (ตัวอักษรที่เหมือนกันบนแท่งสีเดียวกัน หมายถึงไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $p>0.05$)

4.3.2 น้ำหนักของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่เลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน

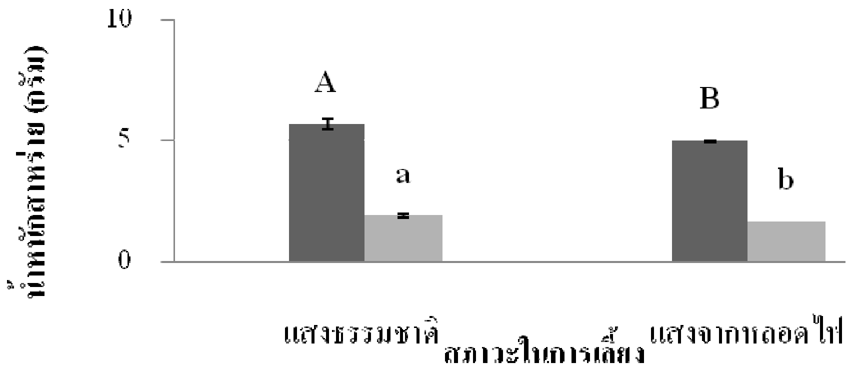
จากการทดลองโดยเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ F/2 ความเค็ม 20 ppt ทั้งหมด 3 ลิตรจำนวน 3 ซ้ำ ในแต่ละสภาวะพบว่า ในสภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตดีกว่าในสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แบบแผงใช้วิธีเดียวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์น้ำจืด โดยเมื่อทำการเก็บเซลล์สาหร่ายด้วยการปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน ในสภาวะที่ 1 พบว่าในแต่ละซ้ำได้น้ำหนัก

เปียกทั้งหมด 5.68 ± 0.19 กรัม ส่วนในสภาวะที่ 2 ได้น้ำหนักเปียกทั้งหมด 4.98 ± 0.02 กรัม (ตารางที่ 4.6) (ภาพที่ 4.11)

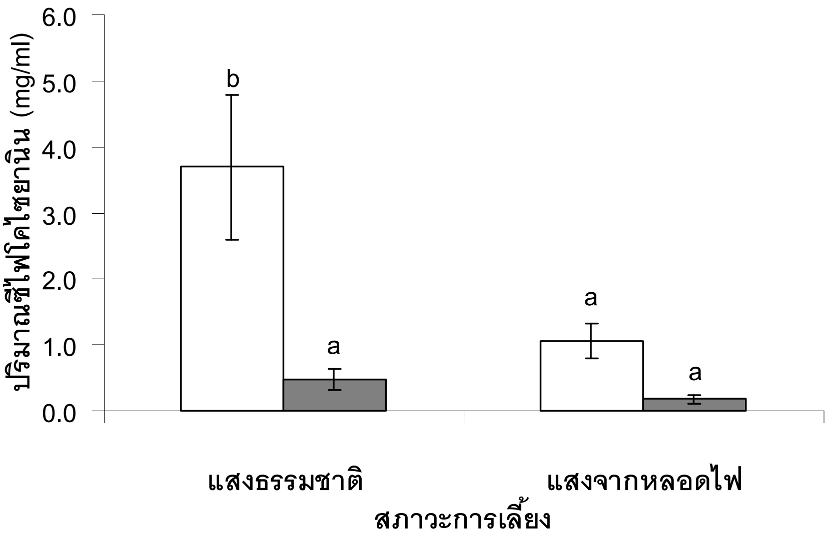
เก็บเซลล์สาหร่ายทั้งหมดในสภาวะแสงธรรมชาติและแสงจากหลอดไฟเพื่อหาน้ำหนักเปียกเฉลี่ยได้ดังนี้คือ 5.68 กรัมต่อ 3 ลิตร และ 4.98 กรัมต่อ 3 ลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำมาคำนวณหาความหนาแน่นใน 1 ลิตร พบว่ามีน้ำหนักเฉลี่ยดังนี้คือ 1.89 กรัมต่อลิตร และ 1.66 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกันแล้วพบว่าในสภาวะที่เลี้ยงด้วยแสงธรรมชาติจะมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าในสภาวะให้แสง (ภาพที่ 4.12)

ตารางที่ 4.6 น้ำหนักเปียกสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มในสภาวะที่แตกต่างกัน

น้ำหนักสาหร่าย / สภาวะ	น้ำหนักสาหร่ายทั้งหมด (กรัม)				น้ำหนักสาหร่าย (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย ± STDEV	1	2	3	ค่าเฉลี่ย ± STDEV
แสงธรรมชาติ	5.83	5.76	5.46	5.68 ± 0.19	1.94	1.92	1.82	1.89 ±0.06
แสงจากหลอดไฟ	5.00	4.97	4.97	4.98 ± 0.02	1.67	1.66	1.66	1.66 ±0.01



ภาพที่ 4.11 น้ำหนักเปียกสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มในสภาวะที่แตกต่าง แท่งสีเทาเข้มแสดงถึงน้ำหนักของสาหร่ายทั้งที่สามารถเก็บผลผลิตได้ แท่งสีเทาอ่อนแสดงถึงน้ำหนักของสาหร่ายต่อลิตร (ตัวอักษรที่เหมือนกันบนแท่งสีเดียวกัน หมายถึงไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า p>0.05)



ภาพที่ 4.12 การเปรียบเทียบปริมาณของซีไฟโคไซยานิน ในสาหร่าย *Spirulina platensis* (สีขาว) และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (สีเทา) ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากธรรมชาติและแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $p<0.05$)

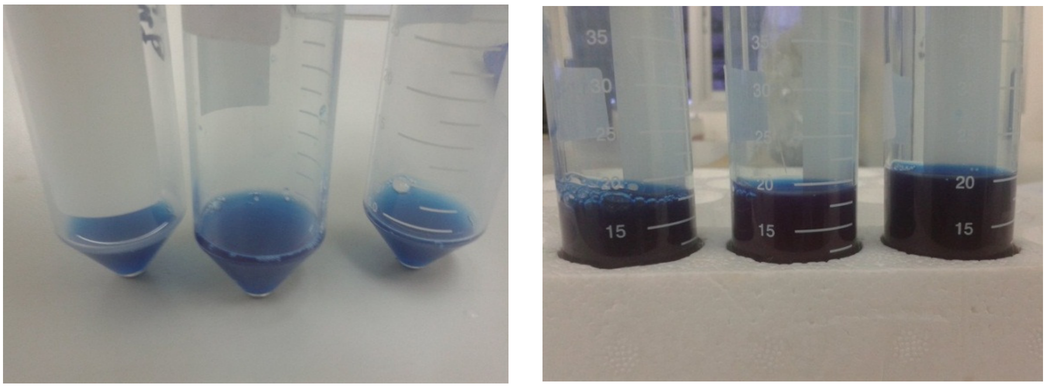
4.4 ปริมาณไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน

เก็บเซลล์สาหร่าย *Spirulina* sp. ทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติและสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่อยู่ในวันที่กำหนดไว้ นำมากรองผ่านผ้ากรองขนาด 16 ไมครอน และทำการสกัดด้วยประยุกต์เทคนิค จาก Siegelman et al. (1978) ชั่งน้ำหนักสาหร่ายที่ทำการกรองมาแล้วใส่ 0.05M Na-phosphate buffer pH 7.0 จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงไปเขย่าให้เข้ากันแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 6 ชั่วโมงและสลับไปที่อุณหภูมิห้องอีก 6 ชั่วโมง (ทำทั้งหมด 3 รอบ) และเก็บที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง ทำให้ตกตะกอนแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 รอบต่อนาที เวลา 20 นาที ที่ 15 องศาเซลเซียส กรองส่วนสีฟ้าออกแล้วนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงหลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณไฟโคไซยานิน

4.4.1 ปริมาณสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina platensis*

นำสารที่ได้จากการสกัดไฟโคไซยานิน (ภาพที่ 4.13) มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 615, 620, 652 และ 730 (ตารางที่ 4.7) หลังจากนั้นนำค่าที่วัดได้มาคำนวนตามสูตรเพื่อหาปริมาณไฟโคไซยานินตามสูตรของ

Patel et al. (2005) พบว่า ปริมาณการผลิตไฟโคไซยานินของสาหร่ายที่เลี้ยงไว้ในสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์มีปริมาณน้อยกว่าสาหร่ายที่ถูกเลี้ยงสภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ สาหร่ายที่สภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ ให้ปริมาณไฟไซยานิน 3.6905 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ให้ปริมาณไฟไซยานิน 1.0538 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.8) (ภาพที่ 4.14)



A B

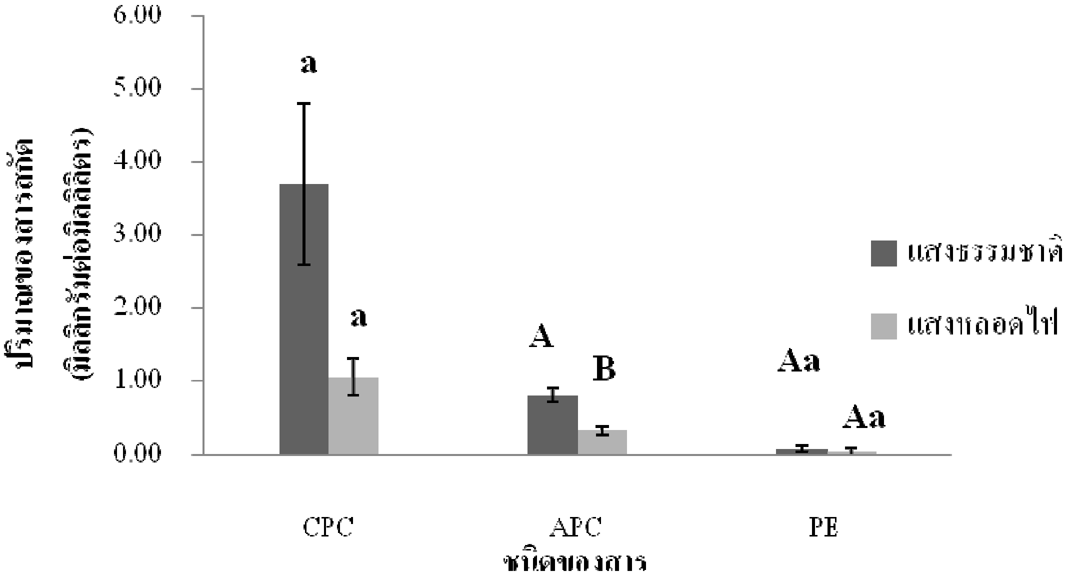
ภาพที่ 4.13 ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่าย *Spirulina platensis* สภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (A) และสภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ (B)

ตารางที่ 4.7 ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina platensis*

ค่าดูดกลืนแสง (นาโนเมตร)	ตัวอย่าง			ค่าเฉลี่ย ± STDEV
แสงธรรมชาติ	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
615 nm	22.000	19.300	34.300	25.200 ± 7.996
620 nm	20.800	19.300	32.200	24.100 ± 7.055
652 nm	9.100	8.000	13.900	10.333 ± 3.137
730 nm	0.600	0.400	2.600	1.200 ± 1.217
แสงจากหลอดไฟ				
615 nm	8.700	6.000	6.700	7.133 ± 1.401
620 nm	10.000	6.100	8.800	8.300 ± 1.997
652 nm	3.200	3.200	3.100	3.167 ± 0.058
730 nm	0.100	0.000	0.000	0.033 ± 0.058

ตาราง 4.8 ปริมาณไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina platensis* ตามสูตรการคำนวณของ Patel et al. (2005)

สารแต่ละชนิด	ปริมาณของสารแต่ละชนิด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย ± STDEV
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
CPC				
แสงธรรมชาติ	3.2594	2.8704	4.9418	3.6905 ± 1.1009
แสงหลอดไฟ	1.3376	0.8419	0.9818	1.0538 ± 0.2556
APC				
แสงธรรมชาติ	0.7954	0.7208	0.9246	0.8136 ± 0.1031
แสงหลอดไฟ	0.2576	0.3835	0.3352	0.3254 ± 0.0635
PE				
แสงธรรมชาติ	0.0592	0.0489	0.1253	0.0778 ± 0.0415
แสงหลอดไฟ	-0.0252	0.0879	0.0467	0.0365 ± 0.0572



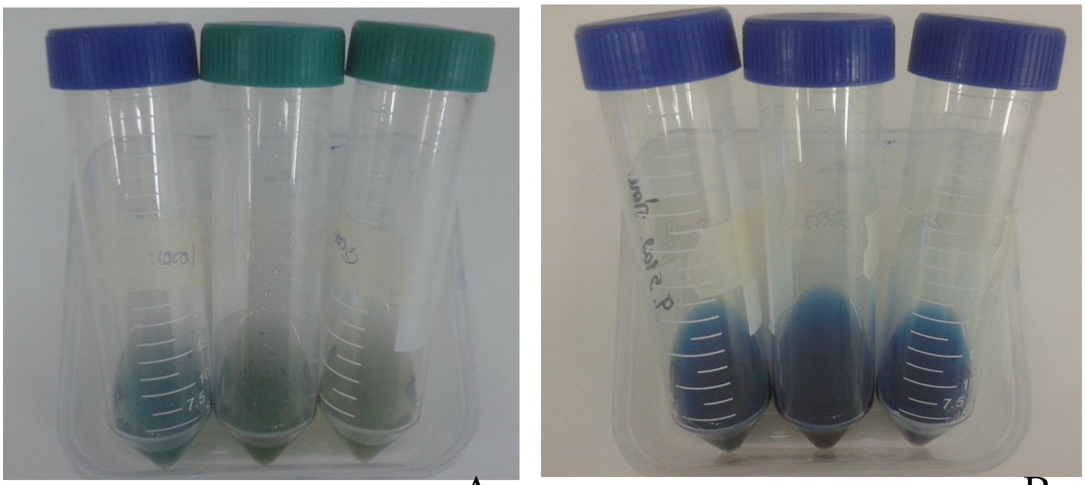
ภาพที่ 4.14 การเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดชนิดต่างที่สกัดได้จาก สาหร่าย *Spirulina platensis* แท่งสีเข้ม คือ สภาวะธรรมชาติ แท่งสีอ่อน คือสภาวะแสงจากหลอดไฟ

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกัน หมายถึง ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $p>0.05$

ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $p<0.05$

4.4.2 ปริมาณสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม

นำสารที่ได้จากการสกัดไฟโคไซยานิน (ภาพที่ 4.15) มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 615, 620, 652 และ 730 (ตารางที่ 4.9) หลังจากนั้นนำค่าที่วัดได้มาคำนวนตามสูตรเพื่อหาปริมาณไฟโคไซยานินตามสูตรของ Patel et al. (2005) พบว่า ปริมาณการผลิตไฟโคไซยานินของสาหร่ายที่เลี้ยงไว้ในสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์มีปริมาณน้อยกว่าสาหร่ายที่ถูกเลี้ยงสภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ สาหร่ายที่สภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ ให้ปริมาณไฟไซยานิน 0.4720 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ให้ปริมาณไฟไซยานิน 0.1745 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.10) (ภาพที่ 4.16)



A B

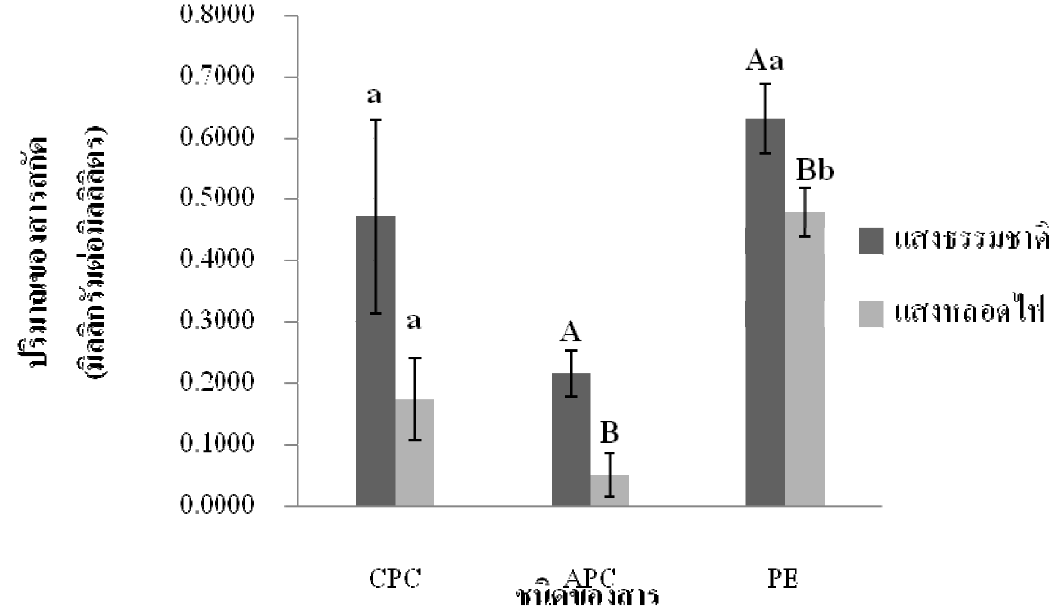
ภาพที่ 4.15 ปริมาณสารสกัดไฟโคไซยานิน ที่สกัดได้จาก สาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม สภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (A) และสภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ (B)

ตารางที่ 4.9 ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม

ค่าดูดกลืนแสง (นาโนเมตร)	ตัวอย่าง			ค่าเฉลี่ย ± STDEV
แสงธรรมชาติ	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
615	8.200	9.100	9.600	25.200 ± 7.996
620	8.200	8.900	9.500	24.100 ± 7.055
652	7.600	7.100	7.500	10.333 ± 3.137
730	5.800	5.400	5.600	1.200 ± 1.217
แสงจากหลอดไฟ				
615	5.400	5.900	5.900	7.133 ± 1.401
620	5.100	4.900	5.700	8.300 ± 1.997
652	5.000	4.800	5.400	3.167 ± 0.058
730	4.600	4.400	4.700	0.033 ± 0.058

ตาราง 4.10 ปริมาณไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ตามสูตรการคำนวณของ Patel et al. (2005)

สารแต่ละชนิด	ปริมาณของสารแต่ละชนิด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย ± STDEV
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
CPC				
แสงธรรมชาติ	0.2910	0.5433	0.5818	0.4720 ± 0.1580
แสงหลอดไฟ	0.1146	0.2457	0.1631	0.1745 ± 0.0663
APC				
แสงธรรมชาติ	0.2556	0.1828	0.2098	0.2161 ± 0.0368
แสงหลอดไฟ	0.0459	0.0173	0.0885	0.0506 ± 0.0358
PE				
แสงธรรมชาติ	0.6946	0.5858	0.6153	0.6319 ± 0.0562
แสงหลอดไฟ	0.4870	0.4359	0.5127	0.4785 ± 0.0391



ภาพที่ 4.16 การเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดชนิดต่างที่สกัดได้จาก สาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม แท่งสีเข้ม คือ สภาวะธรรมชาติ แท่งสีอ่อน คือสภาวะแสงจากหลอดไฟ

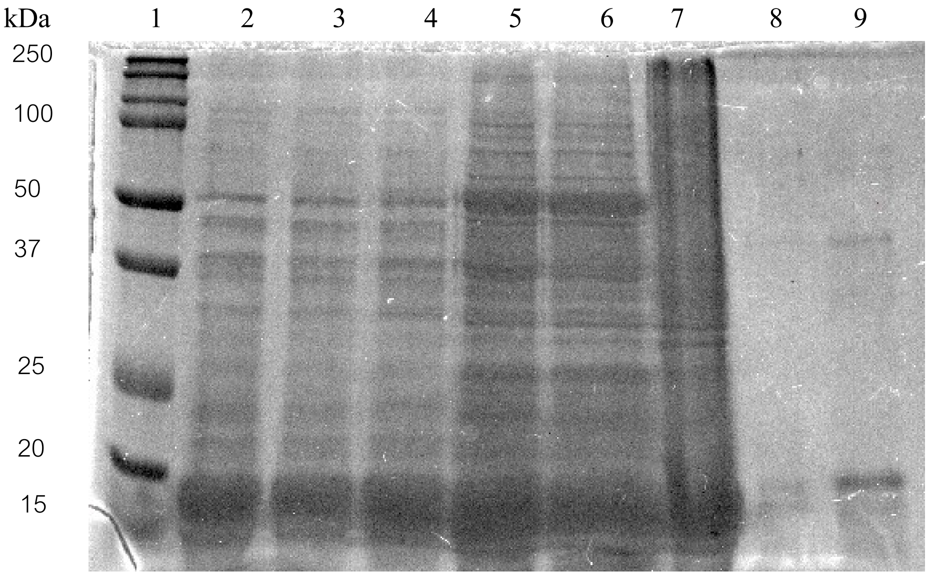
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกัน หมายถึ งไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $p>0.05$

ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $p<0.05$

4.5 การศึกษาหน่วยย่อยของโปรตีนไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกันโดยการทำอิเลคโทรโพริซิส แบบ SDS-PAGE

4.5.1 การศึกษาหน่วยย่อยของโปรตีนไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina platensis*

นำสารสกัดที่ได้มาทำการศึกษารูปแบบของโปรตีนไฟโคไซยานิน โดยใช้เทคนิคอิเลคโทรโพไรซิส แบบ SDS-PAGE ที่ 12% Running gel และ 5% Stacking gel (ภาพที่ 4.17) (ตารางที่ 4.11)



ภาพที่ 4.17 รูปแบบโปรตีนไฟโคไซยานินของ *S. platensis* ที่ตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE

Lane ที่ 1 คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน (Protein Marker)

Lane ที่ 2 คือ สารไฟโคไซยานินของ *S. platensis* ที่เลี้ยงในแสงหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (ซ้ำที่ 1)

Lane ที่ 3 คือ สารไฟโคไซยานินของ *S. platensis* ที่เลี้ยงในแสงหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (ซ้ำที่ 2)

Lane ที่ 4 คือ สารไฟโคไซยานินของ *S. platensis* ที่เลี้ยงในแสงหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (ซ้ำที่ 3)

Lane ที่ 5 คือ สารไฟโคไซยานินของ *S. platensis* ที่เลี้ยงในแสงธรรมชาติ (ซ้ำที่ 1)

Lane ที่ 6 คือ สารไฟโคไซยานินของ *S. platensis* ที่เลี้ยงในแสงธรรมชาติ (ซ้ำที่ 2)

Lane ที่ 7 คือ สารไฟโคไซยานินของ *S. platensis* ที่เลี้ยงในแสงธรรมชาติ (ซ้ำที่ 3)

Lane ที่ 8 คือ สารไฟโคไซยานินของ *Spirulina* sp. น้ำเค็มที่เลี้ยงในแสงหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (ซ้ำที่ 1)

Lane ที่ 9 คือ สารไฟโคไซยานินของ *Spirulina* sp. น้ำเค็มที่เลี้ยงในแสงธรรมชาติ (ซ้ำที่ 3)

ตารางที่ 4.11 น้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนจากภาพที่ 4.17 ในการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *S. platensis*

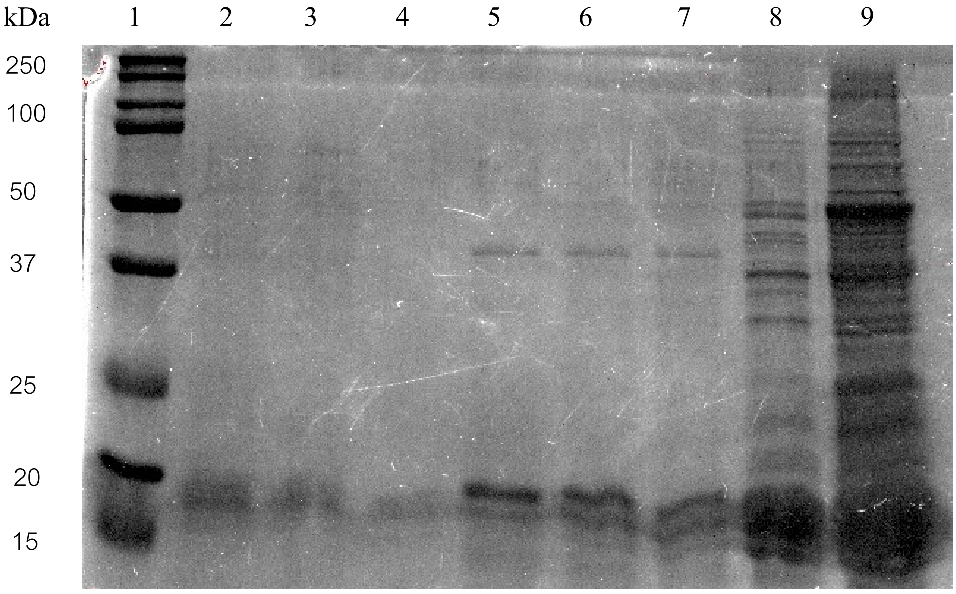
แถบที่	ขนาด (กิโลดาลตัน)	ตัวอย่าง							
		แสงหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์			แสงธรรมชาติ			*Spirulina* sp. น้ำเค็ม	
		2	3	4	5	6	7	8	9
1	250-76	-	-	-	-	-	-	-	-
2	75-74	-	-	-	-	+	-	-	-
3	73-70	-	-	-	+	-	-	-	-
4	65-60	-	-	-	-	+	-	-	-
5	59-51	-	-	-	+	+	-	-	-
6	50-48	+	+	+	+	+	-	-	-
7	47-44	+	+	+	-	-	-	-	-
8	43-40	-	-	-	-	-	-	-	+
9	39-33	+	+	+	+	+	-	-	-
10	32-30	+	+	+	+	+	+	-	-
11	29-26	+	+	+	+	+	+	-	-
12	25-20	+	+	+	+	+	-	-	-
13	19-15	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ : + พบ

- ไม่พบ

4.5.2 การศึกษาหน่วยย่อยของโปรตีนไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม

นำสารสกัดที่ได้มาทำการศึกษารูปแบบโปรตีนของไฟโคไซยานิน โดยใช้เทคนิคอิเลคโทรโฟไรซิสแบบ SDS-PAGE ที่ 12% Running gel และ 5% Stacking gel (ภาพที่ 4.18) (ตารางที่ 4.12)



ภาพที่ 4.18 รูปแบบโปรตีนไฟโคไซยานินของ *Spirulina* sp. น้ำเค็ม ที่ตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE

Lane ที่ 1 คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน (Protein Marker)

Lane ที่ 2 คือ สารไฟโคไซยานินของ *Spirulina* sp. น้ำเค็มที่เลี้ยงในแสงหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (ซ้ำที่ 1)

Lane ที่ 3 คือ สารไฟโคไซยานินของ *Spirulina* sp. น้ำเค็มที่เลี้ยงในแสงหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (ซ้ำที่ 2)

Lane ที่ 4 คือ สารไฟโคไซยานินของ *Spirulina* sp. น้ำเค็มที่เลี้ยงในแสงหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (ซ้ำที่ 3)

Lane ที่ 5 คือ สารไฟโคไซยานินของ *Spirulina* sp. น้ำเค็มที่เลี้ยงในแสงธรรมชาติ (ซ้ำที่ 1)

Lane ที่ 6 คือ สารไฟโคไซยานินของ *Spirulina* sp. น้ำเค็มที่เลี้ยงในแสงธรรมชาติ (ซ้ำที่ 2)

Lane ที่ 7 คือ สารไฟโคไซยานินของ *Spirulina* sp. น้ำเค็มที่เลี้ยงในแสงธรรมชาติ (ซ้ำที่ 3)

Lane ที่ 8 คือ สารไฟโคไซยานินของ *S. platensis* ที่เลี้ยงในแสงหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (ซ้ำที่ 1)

Lane ที่ 9 คือ สารไฟโคไซยานินของ *S. platensis* ที่เลี้ยงในแสงธรรมชาติ (ซ้ำที่ 3)

ตารางที่ 4.12 น้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนจากภาพที่ 4.18 ในการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม

แถบที่	ขนาด (กิโลดาลตัน)	ตัวอย่าง							
		แสงหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์			แสงธรรมชาติ			*Spirulina* sp. น้ำเค็ม	
		2	3	4	5	6	7	8	9
1	250-74	-	-	-	-	-	-	-	-
2	73-70	-	-	-	-	-	-	-	+
3	69--60	-	-	-	-	-	-	-	-
4	59-50	-	-	-	-	-	-	-	+
5	49-45	-	-	-	-	-	-	+	+
6	44-41	-	-	-	-	-	-	+	-
7	40-36	-	-	-	+	+	+	+	+
8	35-33	-	-	-	-	-	-	+	-
9	32-30	-	-	-	-	-	-	+	+
10	29-25	-	-	-	-	-	-	+	+
11	23-20	-	-	-	-	-	-	+	+
12	19-15	+	+	+	+	+	+	+	+

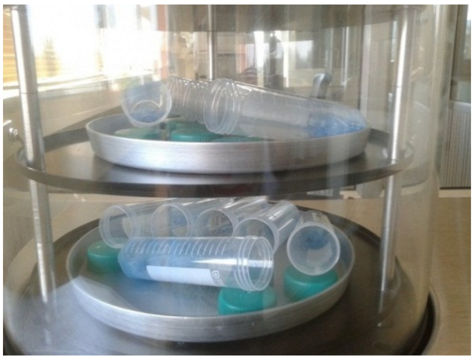
หมายเหตุ : + พบ

- ไม่พบ

4.6 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง สารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน

4.6.1 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง สารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis*

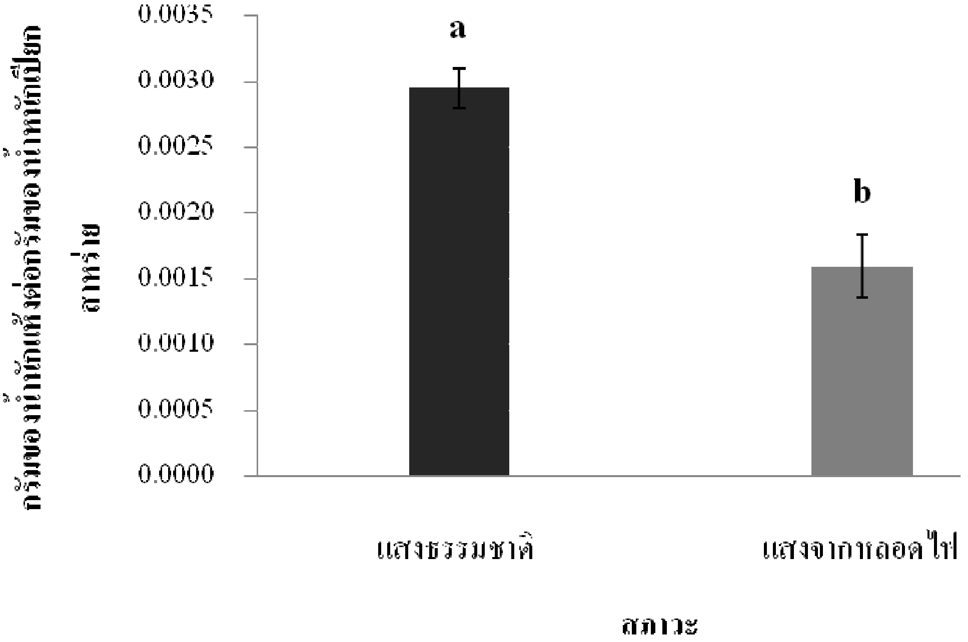
นำสารสกัดไฟโคไซยานินไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ภาพที่ 4.19) ปริมาตรหนึ่งมิลลิตร พบว่า สารสกัดไฟโคไซยานินที่ทำการเลี้ยงในสภาวะธรรมชาติ จำนวน 3 ตัวอย่างมีน้ำหนัก 0.0030, 0.0031 และ 0.0028 กรัมของน้ำนักแห้งต่อกรัมของน้ำหนักเปียกสาหร่าย ตามลำดับ ส่วนสารสกัดไฟโคไซยานินที่ทำการเลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ จำนวน 3 ตัวอย่างมีน้ำหนัก 0.0019, 0.0014, 0.0015 กรัมของน้ำนักแห้งต่อกรัมของน้ำหนักเปียกสาหร่าย ตามลำดับ (ตารางที่ 4.13) (ภาพที่ 4.20 และ 4.21)



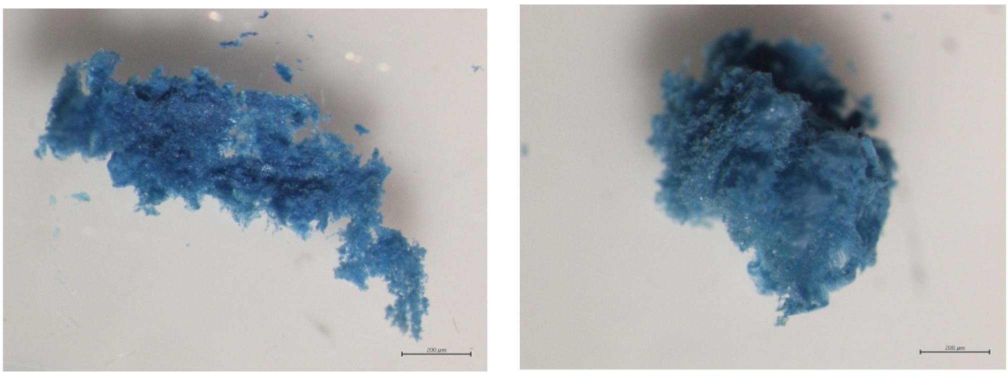
ภาพที่ 4.19 น้ำหนักสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* หลังจากทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ตารางที่ 4.13 น้ำหนักสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* หลังจากทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ภายใต้สภาวะ	น้ำหนักแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (กรัมของน้ำนักแห้งต่อกรัมของน้ำหนักเปียกสาหร่าย)			
	1	2	3	Mean ± STDEV
แสงธรรมชาติ	0.0030	0.0031	0.0028	0.003 ± 0.0002
แสงจากหลอดไฟ	0.0019	0.0014	0.0015	0.0016 ± 0.0002



ภาพที่ 4.20 น้ำหนักสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* หลังจากนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $p<0.05$)



ภาพที่ 4.21 ตัวอย่างสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* หลังจากนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอแบบถ่ายภาพได้

A คือ ตัวอย่างสารสกัดของสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติ

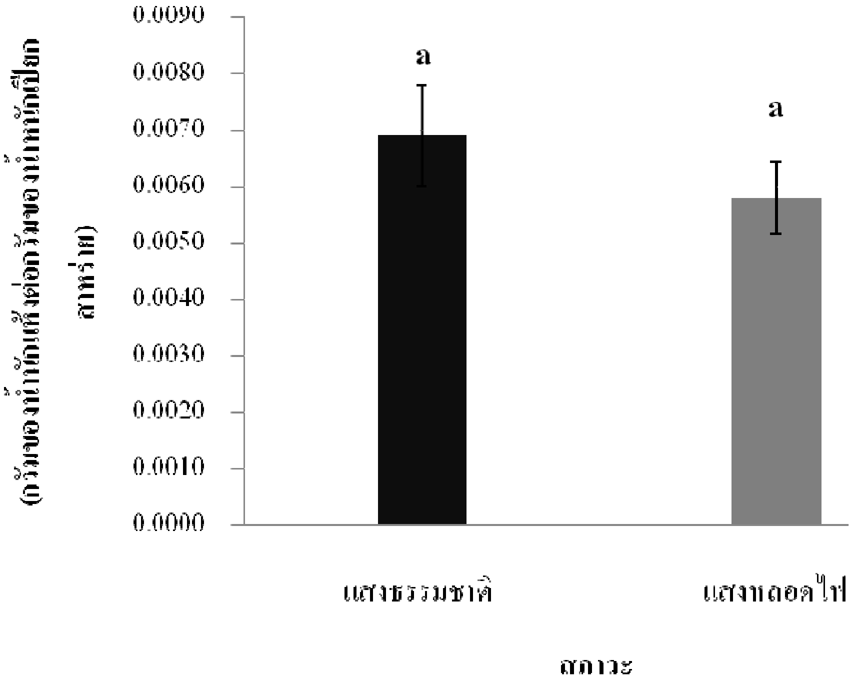
B คือ ตัวอย่างสารสกัดของสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์

4.6.2 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง สารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม

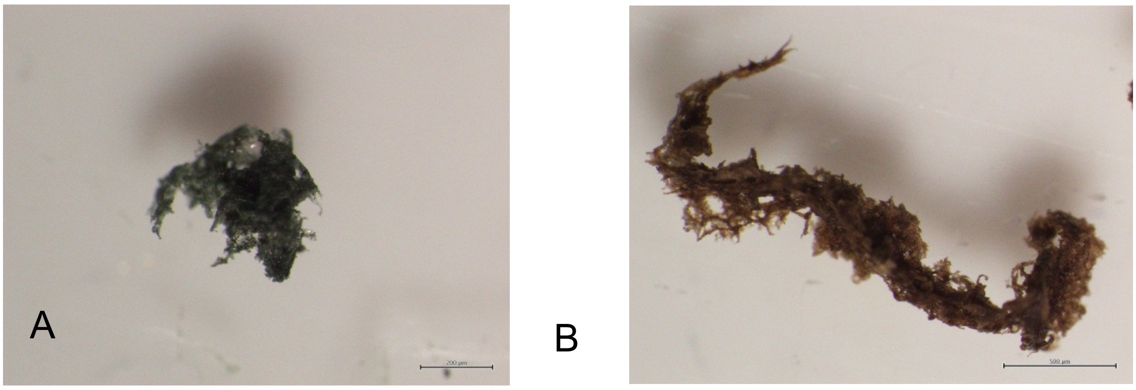
นำสารสกัดไฟโคไซยานินไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ปริมาตรหนึ่งมิลลิตร พบว่าสารสกัดไฟโคไซยานินที่ทำการเลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติ จำนวน 3 ตัวอย่างมีน้ำหนัก 0.0060, 0.0069, 0.0078 กรัมของน้ำนักแห้งต่อกรัมของน้ำหนักเปียกสาหร่าย ตามลำดับ ส่วนสารสกัดไฟโคไซยานินที่ทำการเลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟ จำนวน 3 ตัวอย่างมีน้ำหนัก 0.0062, 0.0061, 0.0050 กรัมของน้ำนักแห้งต่อกรัมของน้ำหนักเปียกสาหร่ายตามลำดับ (ตารางที่ 4.14) (ภาพที่ 4.22 และ 4.23)

ตารางที่ 4.14 น้ำหนักสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม หลังจากทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ภายใต้สภาวะ	น้ำหนักแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (กรัมของน้ำนักแห้งต่อกรัมของน้ำหนักเปียกสาหร่าย)			
	1	2	3	Mean ± STDEV
แสงธรรมชาติ	0.0060	0.0069	0.0078	0.0069 ± 0.0009
แสงจากหลอดไฟ	0.0062	0.0061	0.0050	0.0058 ± 0.0006



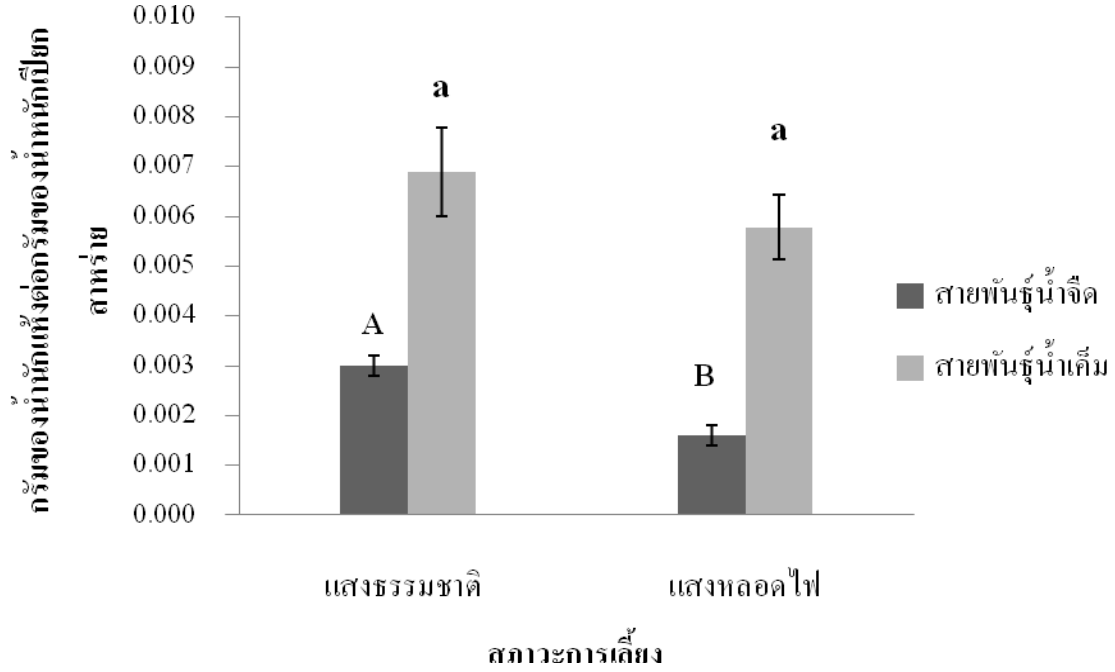
ภาพที่ 4.22 น้ำหนักสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม หลังจากนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $p<0.05$)



ภาพที่ 4.23 ตัวอย่างสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม หลังจากนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอแบบถ่ายภาพได้

A คือ ตัวอย่างสารสกัดของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติ

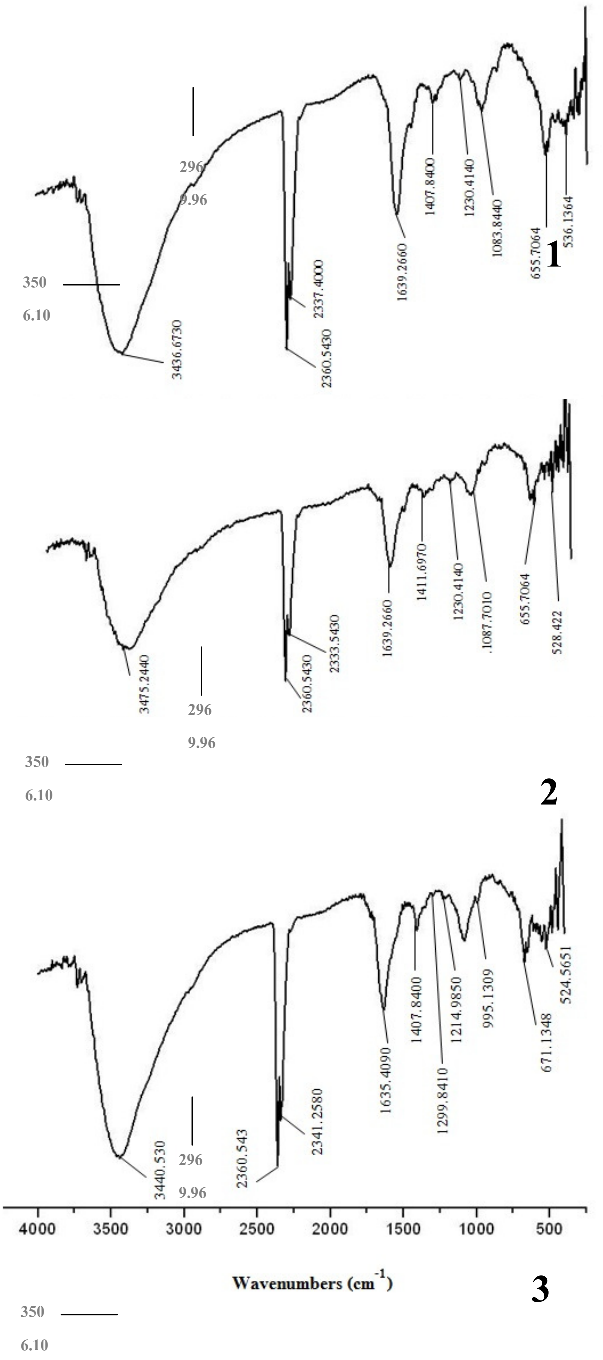
B คือ ตัวอย่างสารสกัดของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์



ภาพที่ 4.24 การเปรียบเทียบน้ำหนักสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ หลังจากนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แท่งสีเข้ม คือ สาหร่าย *S. platensis* แท่งสีอ่อน คือ สาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $p<0.05$)

4.7 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลโดยใช้เทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR)

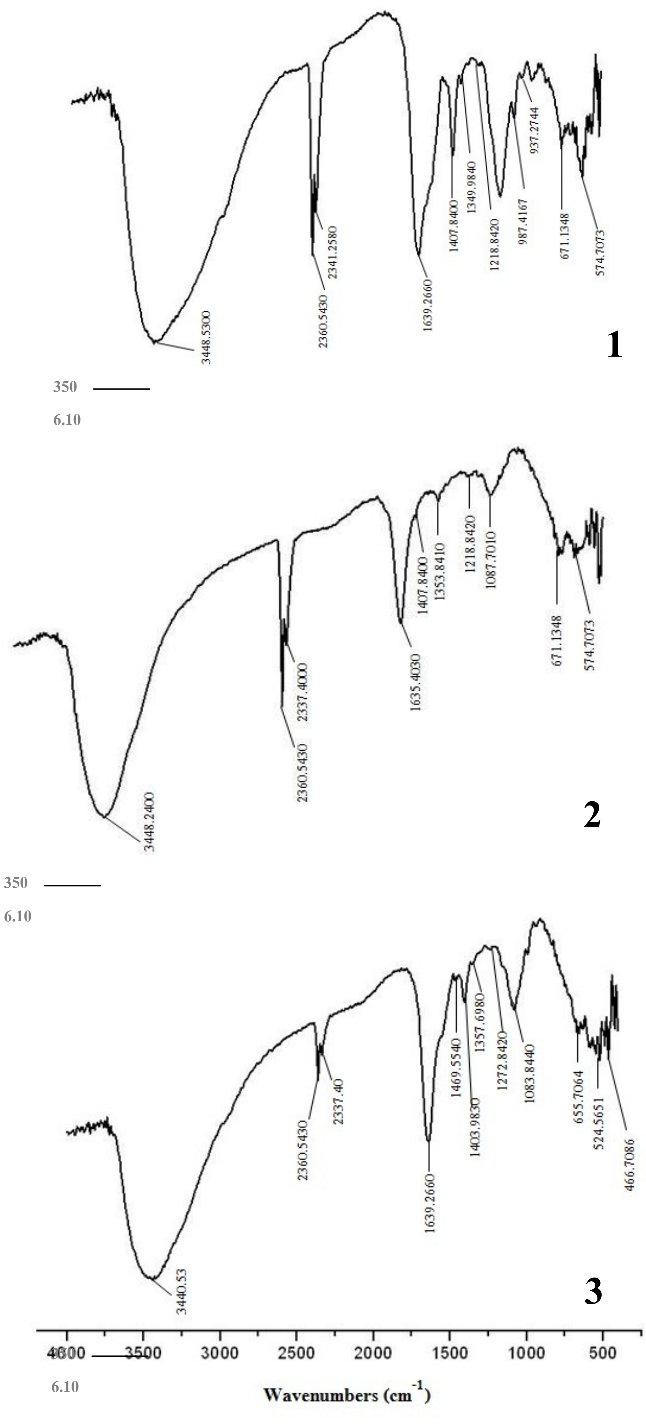
จากการศึกษาหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง ด้วยเทคนิค FT-IR โดยใช้ช่วงความถี่ระหว่าง 4000-400 cm^{-1} พบความถี่ในช่วง 3425–3440 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน N-H stretching ของ 2^{o} เอมีน (โปรตีนและลิพิด), ความถี่ในช่วง 2337-2360 cm^{-1} และ 1631-1639 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน C=O stretching (เอสเทอร์และกรดอะมิโน) และยังแสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน N-H bending ของ carbonyl β unsaturated ketone amide ความถี่ในช่วง 1403-1411 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน CH_2 bending ความถี่ในช่วง 1072-1087 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน C-H stretching ที่สมมาตร หรือเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระ และความถี่ในช่วง 655-671 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน S-O stretching ของกรดซัลโฟนิก โดยพบในไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากธรรมชาติและแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ส่วนความถี่ในช่วง 2875-2925cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน Alphatic C-H stretching พบเฉพาะในไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากธรรมชาติเท่านั้น (ภาพที่ 4.24 ถึง 4.29) (ตารางที่ 4.15 ถึง 4.18)



ภาพที่ 4.25 ภาพแสดงผลการทดลองโดยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) ของสารสกัดไฟโคไซยานินในสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติ (ซ้ำที่ 1-3)

ตารางที่ 4.15 เลขคลื่นแสดงหมู่ฟังก์ชั่นของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติ

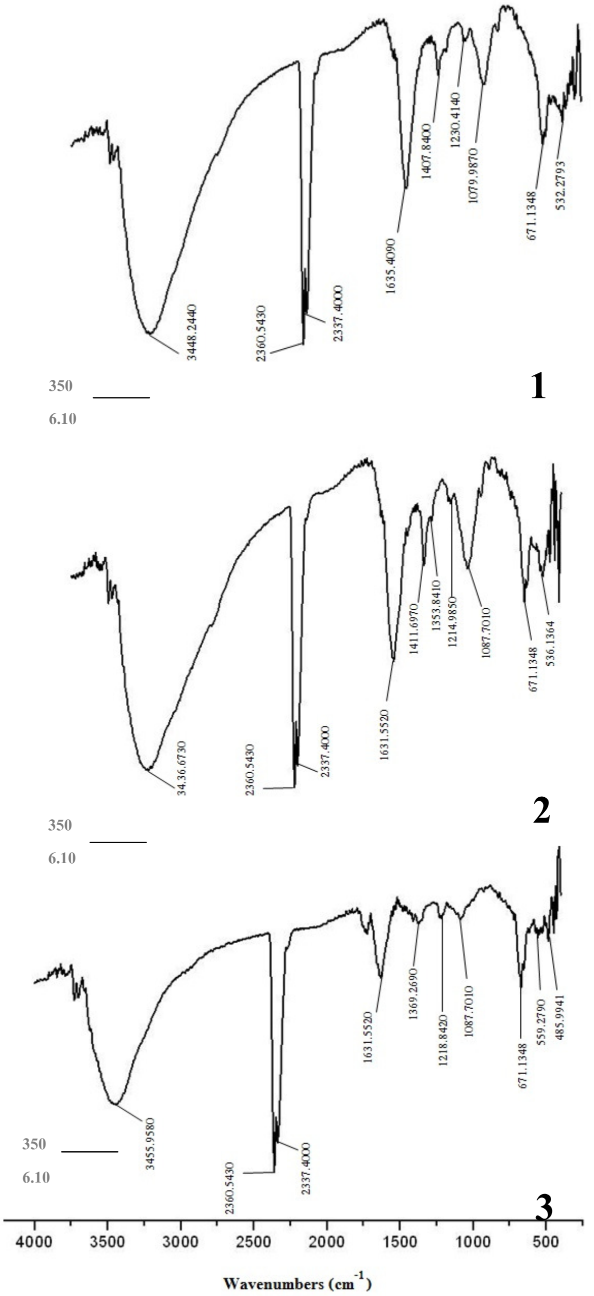
Frequency ranges (Cm^{-1})	Functional group	แสงธรรมชาติ		
		1	2	3
3560-3500	O-H stretching vibration presence of carbohydrate amino acid	3506.10	3506.10	3506.10
3500-3300	N-H stretching vibration presence of secondary amines (protein, lipid)	3436.67	3475.40	3440.53
2925-2875	Aliphatic C-H Stretching vibration	-	-	-
1750-2735	C=O Stretching vibration (esters and amino acids)	2360.54, 2337.40	2360.45, 2333.54	2360.54, 2341.25
1650-1580	N-H bending vibration Carbonyl □-unsaturated Keton aminde	1639.26	1639.26	1635.40
1435-1405	CH_2 bending vibration CH_2-CO- presence of carbonyl compounds	1407.84	1411.69	1407.84
1350-1260	C-O stretching, O-H bending vibration presence of alcohol	-	-	-
1300-1250	C-O asymmetric C-O-C Stretching presence of esters	-	-	-
1120-1030	Symmetric C-H Strerching vibration, presence of Antioxidant enzyme	1083.84	1087.70	1083.84
1080-1010	So_3 symmetric vibration presence of acid and RSo_3, ionic sulphonates	-	-	-
700-600	S-O Stretching vibration presence of sulphonic acid	655.70	655.70	671.13
620-490	C-I Stretching vibration presence of Iodocompound	536.13	528.42	524.56



ภาพที่ 4.26 ภาพแสดงผลการทดลองโดยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) ของสารสกัดไฟโคไซยานินในสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (ซ้ำที่ 1-3)

ตารางที่ 4.16 เลขคลื่นแสดงหมู่ฟังก์ชั่นของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์

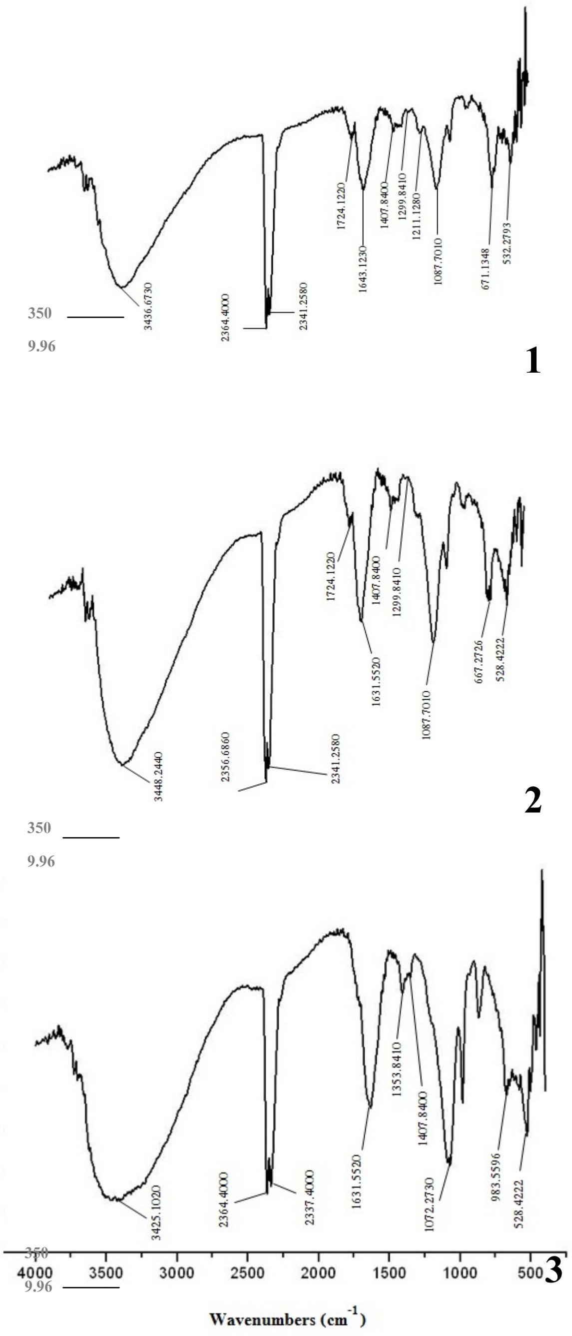
Frequency ranges (Cm^{-1})	Functional group	แสงจากหลอดไฟ		
		1	2	3
3560-3500	O-H stretching vibration presence of carbohydrate amino acid	3506.10	3506.10	3506.10
3500-3300	N-H stretching vibration presence of secondary amines (protein, lipid)	3448.53	3448.24	3440.53
2925-2875	Aliphatic C-H Stretching vibration	-	-	-
1750-2735	C=O Stretching vibration (esters and amino acids)	2360.54, 2360.54	2360.54, 2337.40	2360.54, 2337.40
1650-1580	N-H bending vibration Carbonyl □-unsaturated Keton aminde	1639.26	1635.40	1639.26
1435-1405	CH_2 bending vibration CH_2-CO- presence of carbonyl compounds	1407.84	1407.84	1403.98
1350-1260	C-O stretching, O-H bending vibration presence of alcohol	1349.98	1353.84	1357.69
1300-1250	C-O asymmetric C-O-C Stretching presence of esters	-	-	-
1120-1030	Symmetric C-H Strerching vibration, presence of Antioxidant enzyme	1083.84	1087.70	1083.84
1080-1010	So_3 symmetric vibration presence of acid and RSo_3, ionic sulphonates	-	-	-
700-600	S-O Stretching vibration presence of sulphonic acid	671.13	671.13	655.70
620-490	C-I Stretching vibration presence of Iodocompound	574.70	574.70	524.56



ภาพที่ 4.27 ภาพแสดงผลการทดลองโดยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) ของสารสกัดไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากธรรมชาติ (ซ้ำที่ 1-3)

ตารางที่ 4.17 เลขคลื่นแสดงหมู่ฟังก์ชั่นของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากธรรมชาติ

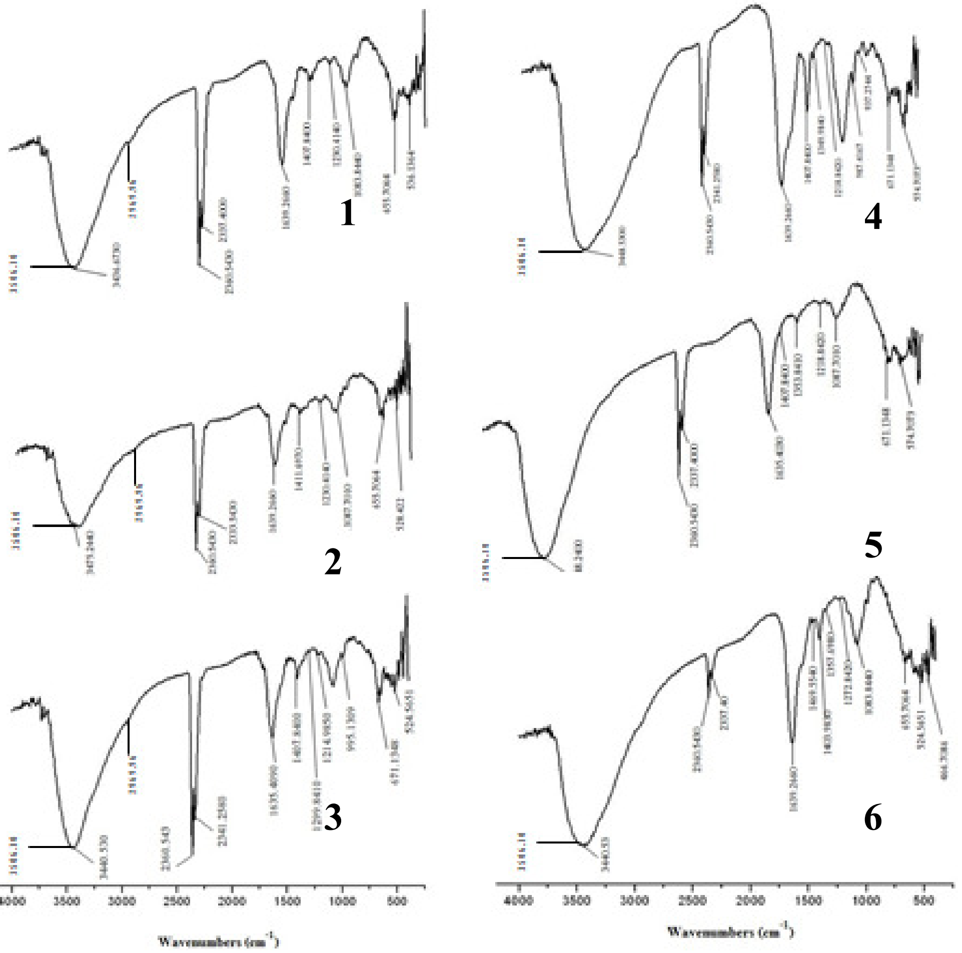
Frequency ranges (Cm^{-1})	Functional group	แสงจากธรรมชาติ		
		1	2	3
3560-3500	O-H stretching vibration presence of carbohydrate amino acid	3506.10	3506.10	3506.10
3500-3300	N-H stretching vibration presence of secondary amines (protein, lipid)	3448.24	3435.67	3455.95
2925-2875	Aliphatic C-H Stretching vibration	-	-	-
1750-2735	C=O Stretching vibration (esters and amino acids)	2360.54, 2337.40	2360.54, 2337.40	2360.54, 2337.40
1650-1580	N-H bending vibration Carbonyl □-unsaturated Keton aminde	1635.40	1631.55	1631.55
1435-1405	CH_2 bending vibration CH_2-CO-presence of carbonyl compounds	1407.84	1411.69	1369.26
1350-1260	C-O stretching, O-H bending vibration presence of alcohol	1353.84	1353.84	1353.84
1300-1250	C-O asymmetric C-O-C Stretching presence of esters	1230.41	1214.98	1218.84
1120-1030	Symmetric C-H Strerching vibration, presence of Antioxidant enzyme	1087.70	1087.70	1087.70
1080-1010	So_3 symmetric vibration presence of acid and RSo_3, ionic sulphonates	-	-	-
700-600	S-O Stretching vibration presence of sulphonic acid	671.13	671.13	671.13
620-490	C-I Stretching vibration presence of Iodocompound	532.27	536.13	559.27



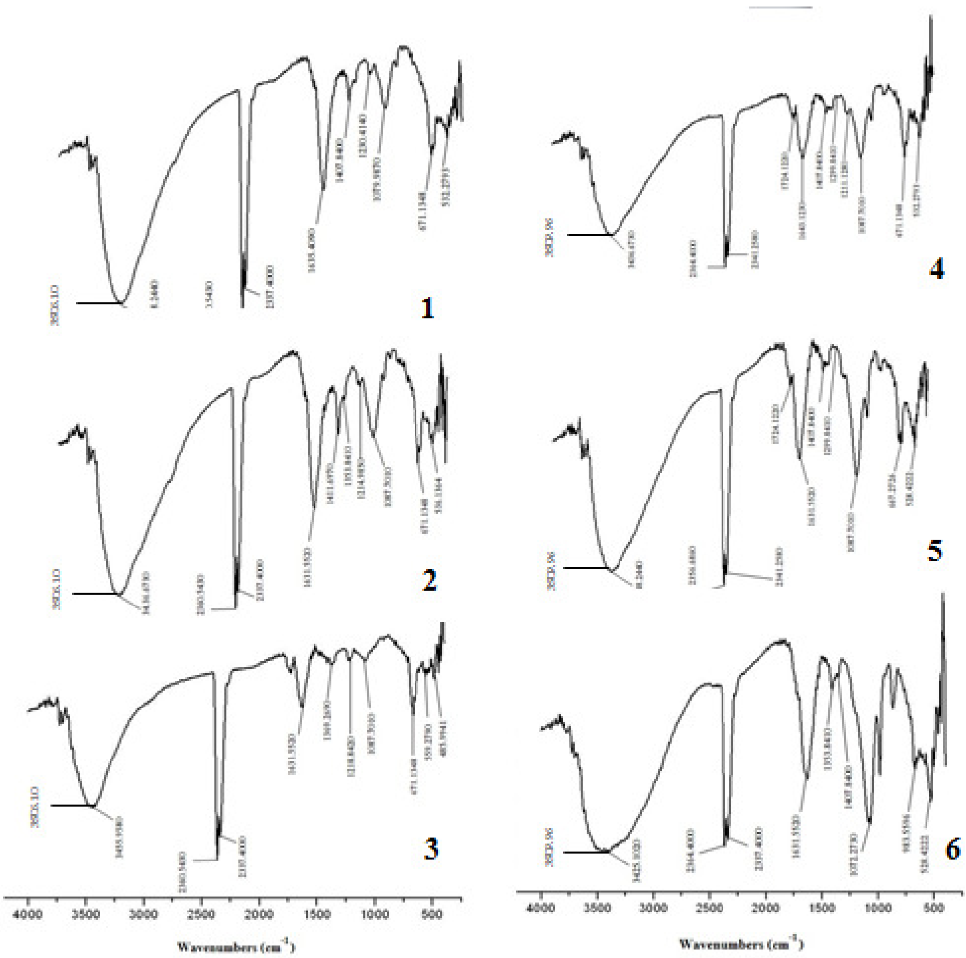
ภาพที่ 4.28 ภาพแสดงผลการทดลองโดยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) ของสารสกัดไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟ (ซ้ำที่ 1-3)

ตารางที่ 4.18 เลขคลื่นแสดงหมู่ฟังก์ชั่นของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟ

Frequency ranges (Cm^{-1})	Functional group	แสงจากหลอดไฟ		
		1	2	3
3560-3500	O-H stretching vibration presence of carbohydrate amino acid	3509.96	3509.96	3509.96
3500-3300	N-H stretching vibration presence of secondary amines (protein, lipid)	3436.67	3448.24	3425.10
2925-2875	Aliphatic C-H Stretching vibration	-	-	-
1750-2735	C=O Stretching vibration (esters and amino acids)	2364.40, 2341.25	2356.68, 2341.25	2364.40, 2337.40
1650-1580	N-H bending vibration Carbonyl □-unsaturated Keton aminde	1643.12	1631.55	1631.55
1435-1405	CH_2 bending vibration CH_2-CO- presence of carbonyl compounds	1407.84	1407.84	1407.84
1350-1260	C-O stretching, O-H bending vibration presence of alcohol	1299.84	1299.84	1311.41
1300-1250	C-O asymmetric C-O-C Stretching presence of esters	-	-	-
1120-1030	Symmetric C-H Strerching vibration, presence of Antioxidant enzyme	1087.70	1087.70	1072.27
1080-1010	So_3 symmetric vibration presence of acid and RSo_3, ionic sulphonates	-	-	-
700-600	S-O Stretching vibration presence of sulphonic acid	671.13	677.27	671.13
620-490	C-I Stretching vibration presence of Iodocompound	532.27	526.42	528.42



ภาพที่ 4.29 ภาพเปรียบเทียบแสดงผลการทดลองโดยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) ของสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติ (1-3) และที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟ (4-6)



ภาพที่ 4.30 ภาพเปรียบเทียบแสดงผลการทดลองโดยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) ของสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติ (1-3) และที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟ (4-6)

4.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มยีนของยีนไฟโคไซยานินในส่วนของแอลฟา และเบต้า และระดับการแสดงออกของยีน

4.8.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากสาหร่าย *S. platensis* และ สาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม

จากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากสาหร่าย *S. platensis* และ สาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม เมื่อตรวจสอบค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Nano drop พบว่ามีค่าความเข้มข้นและค่าความบริสุทธิ์ดังแสดงในตารางที่ 4.19-4.22 โดยอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ A260/A280 มีค่าประมาณ 1.6-1.8 ส่วนการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด แสดงให้เห็นปื้นเหนือโมเลกุลขนาดใหญ่ของอาร์เอ็นเอ (ภาพที่ 4.30B) โดยอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ A260/A280 มีค่าประมาณ 1.7 - 2.0

และจากการตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส พบว่าในสาหร่าย *S. platensis* (ภาพที่ 4.30A) แสดงให้เห็นว่าอาร์เอ็นเอพบสเมียร์เหนือโมเลกุลขนาดใหญ่และมีคุณภาพดี แต่สำหรับสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (ภาพที่ 4.30B) พบว่าอาร์เอ็นเอไม่พบสเมียร์เหนือโมเลกุลขนาดใหญ่ และมีคุณภาพต่ำ ส่งผลให้สาหร่าย *spirulina sp.* สายพันธุ์น้ำเค็ม ไม่สามารถผลิตดีเอ็นเอสายเดี่ยว (first strand cDNA) ที่มีคุณภาพได้ และผลการตรวจสอบคุณภาพจีโนมิกดีเอ็นเอแสดงในภาพ ภาพที่ 4.30C

ตารางที่ 4.19 แสดงค่าความเข้มข้น และคุณภาพอาร์เอ็นเอของสาหร่ายสาหร่าย *S. platensis*

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	A260	A280	A260/A280
แสงธรรมชาติ-1	1280.16	32.004	15.151	2.11
แสงธรรมชาติ-2	1280.01	32.175	15.263	2.11
แสงธรรมชาติ-3	1301.12	32.528	14.956	2.17
แสงหลอดไฟ-1	485.80	12.145	5.730	2.12
แสงหลอดไฟ-2	570.09	14.252	6.885	2.07
แสงหลอดไฟ-3	578.68	14.467	6.933	2.09

ตารางที่ 4.20 แสดงค่าความเข้มข้น และคุณภาพอาร์เอ็นเอของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม

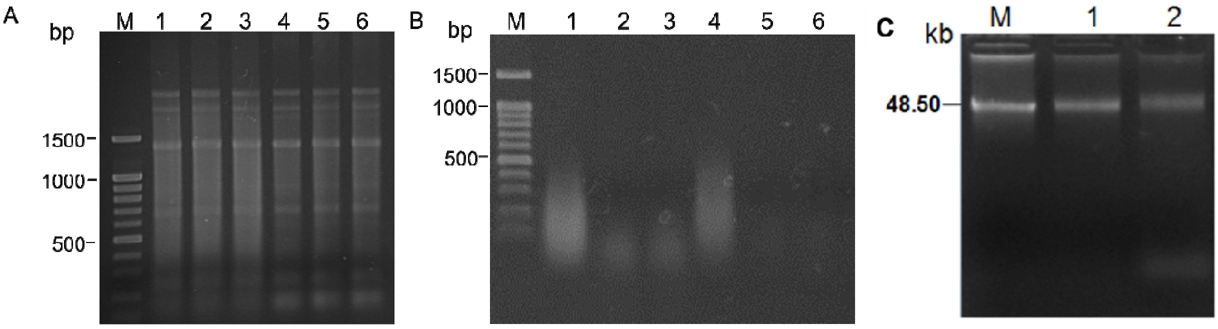
ตัวอย่าง	**ความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)**	**A260**	**A280**	**A260/A280**
แสงธรรมชาติ-1	483.23	12.806	9.002	1.422
แสงธรรมชาติ-2	386.04	9.651	6.751	1.429
แสงธรรมชาติ-3	368.4	9.210	6.345	1.451
แสงหลอดไฟ-1	480.88	12.022	9.211	1.305
แสงหลอดไฟ-2	358.4	8.961	7.501	1.194
แสงหลอดไฟ-3	321.36	8.034	7.463	1.076

ตารางที่ 4.21 แสดงค่าความเข้มข้น และดีเอ็นเอสายเดี่ยว (cDNA) ของสาหร่าย *S. platensis*

ตัวอย่าง	**ความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)**	**A260**	**A280**	**A260/A280**
แสงธรรมชาติ-1	722.02	21.879	13.505	1.62
แสงธรรมชาติ-2	774.59	23.472	14.4	1.63
แสงธรรมชาติ-3	676.23	20.491	12.49451	1.64
แสงหลอดไฟ-1	772.65	23.413	15.302	1.53
แสงหลอดไฟ-2	727.43	22.043	13.691	1.61
แสงหลอดไฟ-3	700.12	21.215	13.095	1.62

ตารางที่ 4.22 แสดงค่าความเข้มข้น และดีเอ็นเอสายเดี่ยว (cDNA) ของสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม

ตัวอย่าง	**ความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)**	**A260**	**A280**	**A260/A280**
แสงธรรมชาติ-1	1162.22	35.219	22.287	1.58
แสงธรรมชาติ-2	1476.63	44.746	31.203	1.43
แสงธรรมชาติ-3	967.04	29.304	17.864	1.64
แสงหลอดไฟ-1	1525.74	46.235	30.006	1.54
แสงหลอดไฟ-2	1145.17	34.702	22.871	1.52
แสงหลอดไฟ-3	1018.43	30.862	20.115	1.53

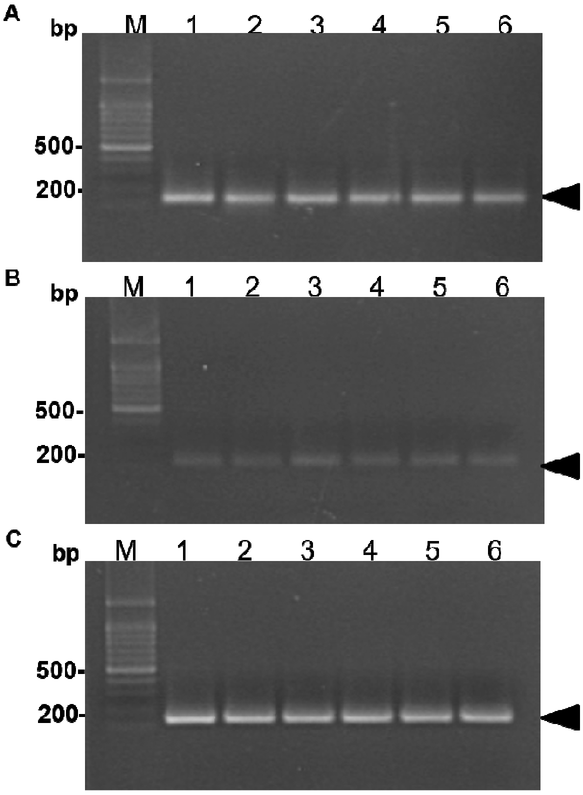


ภาพที่ 4.31 1.0% ethidium bromide-stained agarose gel แสดงคุณภาพอาร์เอ็นเอสาหร่าย *S. platensis* (A) และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (B) Lane M คือ marker, lane 1-3 (แสงจากหลอดไฟฟลูโอเรสเซนต์), Lane 4-6 (แสงจากธรรมชาติ) และคุณภาพจีโนมิกดีเอ็นเอสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (C) *S. platensis* (Lane1) และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (Lane 2)

4.8.2 RT-PCR และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ *Phycocyanin subunit alpha (PCC-α)* และ p*hycocyanin subunit beta (PCC-β)*

4.8.2.1 RT-PCR

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในส่วนของยีน *PCC-α*, *PCC-β* และยีนควบคุม 16s rRNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ *QPCCA-F/QPCCA-R QPCCB-F2/QPCCB-R2 และ Q16srRNA-F/Q16srRNA-R* ตามลำดับในสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม โดยใช้ cDNA ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม จากสาหร่าย *spirulina sp.* ที่ให้แสงจากหลอดฟลูโอเรสเซนต์และแสงจากธรรมชาติเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ พบว่าสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอตรงกับขนาดที่คาดไว้ในสาหร่าย สาหร่าย *S. platensis* (ภาพที่ 4.31) แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนจากคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวได้ในสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (ไม่ได้แสดงผล)

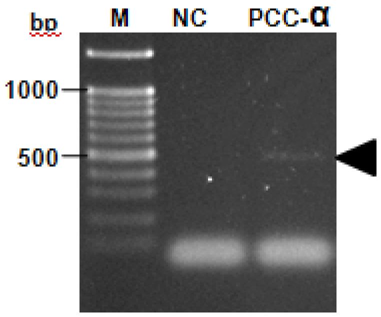


ภาพที่ 4.32 1.5% ethidium bromide-stained agarose gel แสดงผล RT-PCR ในสาหร่าย *S. platensis* ด้วยคู่ไพรเมอร์ *QPCCA-F/QPCCA-R* (A), *QPCCB-F2/QPCCB-R2* (B) *และ Q16srRNA-F/Q16srRNA-R* (C) ตามลำดับ และ Lane M คือ marker, lane 1-3 (แสงจากหลอดไฟฟลูโอเรสเซนต์), Lane 4-6 (แสงจากธรรมชาติ)

4.8.2.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ *Phycocyanin subunit alpha (PCC-α)* และ *Phycocyanin subunit beta (PCC-β)*

Phycocyanin subunit alpha (PCC-α)

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสาหร่าย *S. platensis* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ยีน *PCC-α* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ORFPCCA-F/ORFPCCA-R เพื่อตรวจสอบยีน *PCC-α* พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 489 คู่เบส (ภาพที่ 4.32) และจากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีการ BlastX พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับยีน *phycocyanin subunit alpha* ใน *Phormidium tenue* (*E-value* = 2e-111) จากลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถแปลงเป็นกรดอะมิโน 162 กรดอะมิโน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีขนาด 17.304 kDa พบ Domain ที่สำคัญคือ phycobilisomes ณ ตำแหน่งอะมิโนที่ 7-162



ภาพที่ 4.33 ภาพการย้อม 1.5% agarose gel ด้วยสาร ethidium bromide ของแถบพีซีอาร์ยีน *PCC-α* ในสาหร่าย *S. platensis* ช่อง M คือ 100 bp marker, NC=Negative control

```
ATGAAGACCCCTATCACCGAAGCTGTTGCAGCAGCCGATTCCCAAGGCCGTTTTCTGAGC 60
M  K  T  P  I  T  E  A  V  A  A  A  D  S  Q  G  R  F  L  S   20
GCCTCCGAACTGCAAGTGGCTTTTGGCCGTCTGCGTCAAGCCACCGCCGGTTTGGAAGCT 120
A  S  E  L  Q  V  A  F  G  R  L  R  Q  A  T  A  G  L  E  A   40
GCTAAAGCCCTGACCAACAAAGCAGATTCCCTCGTAAGCGGCGCTGCTCAAGCCGTTTAC 180
A  K  A  L  T  N  K  A  D  S  L  V  S  G  A  A  Q  A  V  Y   60
AACAAGTTCCCCTACACCACCCAAATGCAGGGCGCTAACTACGCCTCCGACGAGCGTGGC 240
N  K  F  P  Y  T  T  Q  M  Q  G  A  N  Y  A  S  D  E  R  G   80
AAAGCCAAGTGCGCCCGCGACATCGGCTACTACCTGCGGATGGTGACCTACTGCTGTGTG 300
K  A  K  C  A  R  D  I  G  Y  Y  L  R  M  V  T  Y  C  C  V   100
GCTGGCGGCACTGGCCCCATGGATGAGTACCTGATTGCTGGTCTCGATGAGATCAACAGC 360
A  G  G  T  G  P  M  D  E  Y  L  I  A  G  L  D  E  I  N  S   120
ACCTTCGAACTGTCCCCCAGCTGGTACGTGGAAGCTCTGAAGTACATCAAAGCTAACCAT 420
T  F  E  L  S  P  S  W  Y  V  E  A  L  K  Y  I  K  A  N  H   140
GGTCTGTCTGGCGATGCAGCCACCGAAGCCAACTCCTACATCGACTACGCTATCAACGCT 480
G  L  S  G  D  A  A  T  E  A  N  S  Y  I  D  Y  A  I  N  A   160
CTGAGCTAG 489
L  S  *   162
```

ภาพที่ 4.34 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนในส่วน open reading frame (ORF) ของยีน *PCC-α* ในสาหร่าย *S. platensis* ส่วนที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งไพรเมอร์ และส่วนสีเทา คือ ตำแหน่ง Phycobillisome domain

ตารางที่ 4.23 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-α* ในสาหร่าย *S. platensis* กับข้อมูลในห้องสมุดยีนด้วยวิธี BlastX

No.	Description	Closet species	E-value	Identity	Accession
1	phycocyanin subunit alpha	*Phormidium tenue*	2e-113	97%	WP_073606858.1
2	phycocyanin subunit alpha	*Nodosilinea nodulosa*	7e-113	96%	WP_017300753.1
3	phycocyanin subunit alpha	*Leptolyngbya* sp. PCC 6406	3e-109	94%	WP_008314438.1
4	phycocyanin subunit alpha	*Leptolyngbya* sp. KIOST-1	3e-106	90%	WP_035990438.1
5	phycocyanin subunit alpha	*Planktothrix tepida*	3e-105	90%	WP_072716936.1
6	phycocyanin subunit alpha	*Arthrospira platensis*	3e-103	86%	WP_006618345.1

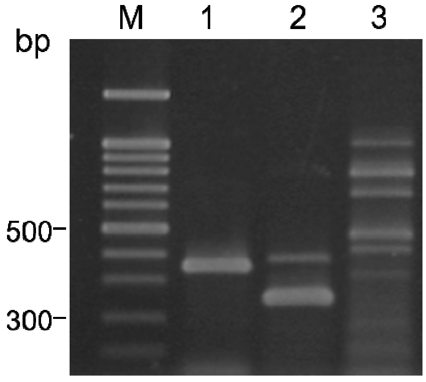
ตารางที่ 4.24 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-α* ในสาหร่าย *S. platensis* กับข้อมูลในห้องสมุดยีนด้วยวิธี BlastN หรือ nucleotide Blast

No.	Description	Closet species	E-value	Identity	Accession
1	phycocyanin alpha chain (cpcA) gene, partial cds	*Leptolyngbya sp. PCC 8913*	8e-147	97%	KJ708687.1
2	phycocyanin beta chain (cpcB) and phycocyanin alpha chain (cpcA) genes, complete cds	Arthrospira platensis CHM	1e-100	81%	KJ463715.1
3	phycocyanin beta chain (cpcB) and phycocyanin alpha chain (cpcA) genes, complete cds	Arthrospira platensis edz	1e-100	81%	HQ828098.1
4	phycocyanin alpha chain (cpcA) gene, partial cds	Leptolyngbya sp. PCC 9342	4e-100	88%	KJ708695.1
5	R-phycocyanin II beta subunit (rpcB) and R-phycocyanin II alpha subunit (rpcA) genes, complete cds	Synechococcus sp. A15-44	5e-99	81%	KF528820.1

Phycocyanin subunit beta (PCC-β)

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสาหร่าย *S. platensis* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ยีน *PCC-β* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ORFPCCB-F/ORFPCCB-R มีขนาด 591 คู่เบส พบว่าไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในส่วน ORF ได้ (ไม่ได้แสดงผล) จึงทำการพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอจากคู่ไพร์เมอร์ ORFPCCB-F/QPCCB-R1 (ขนาด 354 คู่เบส), คู่ไพรเมอร์ QPCCB-F2/QPCCB-R1 (ขนาด 231 คู่เบส), และคู่ไพรเมอร์ QPCCB-F1/ORFPCCB-R1 (ขนาด 395 คู่เบส) เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PCC-β* พบว่ามีเพียงคู่ไพรเมอร์ QPCCB-F2/QPCCB-R1 และ ORFPCCB-F/QPCCB-R1 ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ซึ่งมีขนาด 231 คู่เบส และ 354 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 4.34)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในห้องสมุดยีน (GenBank) พบว่าคู่ไพรเมอร์ ORFPCCB-F/QPCCB-R1 มีขนาด 354 คู่เบส (ภาพที่ 4.35A) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในห้องสมุดยีนด้วยวิธีการ BlastX พบว่าคล้ายกับยีน *phycocyanin subunit beta* ใน *Arthrospira platensis* (*E-value* = 1e-77) แปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 118 อะมิโน พบตำแหน่ง Phycobilisome domain ที่กรดอะมิโนลำดับที่ 7-118 ที่ค่า *E-value* = 7.9e-47 และจากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยคู่ไพรเมอร์ QPCCB-F2/QPCCB-R1 มีขนาด 231 คู่เบส (ภาพที่ 4.35B) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในห้องสมุดยีนพบว่าตรงกับยีน *phycocyanin beta subunit, partial* (*Spirulina subsalsa FACHB-351*) *E-value* = 8e-47 แปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 76 อะมิโน



ภาพที่ 4.35 1.5% agarose gel ย้อมด้วย Ethidium bromide เพื่อการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *PCC-β* ในสาหร่าย *S. platensis* จากคู่ไพรเมอร์ ORFPCCB-F/QPCCBR-2 (Lane 1), QPCCB-F2/QPCCB-R1 (Lane 2), และ คู่ไพรเมอร์ QPCCB-F1/ORFPCCB-R (Lane3), Lane M คือ 100 bp DNA Marker

A

```
ATGTTTGACGCATTTACAAGGGTGGTTTCTCAGGCTGATACTCGCGGCGAAATGCTGAGT   60
M  F  D  A  F  T  R  V  V  S  Q  A  D  T  R  G  E  M  L  S     20
ACAGCTCAAATCGATGCTCTGAGCCAAATGGTTGCTGAAAGCAACAAACGTTTGGATGCC   120
T  A  Q  I  D  A  L  S  Q  M  V  A  E  S  N  K  R  L  D  A     40
GTTAACCGCATTACTAGCAACGCTTCCACCATCGTTTCTAATGCTGCTCGTTCTTTGTTT   180
V  N  R  I  T  S  N  A  S  T  I  V  S  N  A  A  R  S  L  F     60
GCAGAGCAGCCCCAACTGATTGCTCCCGGTGGAAACGCCTACACCAGCCGTCGTATGGCT   240
A  E  Q  P  Q  L  I  A  P  G  G  N  A  Y  T  S  R  R  M  A     80
GCTTGCTTGCGTGACATGGAAATCATCCTGCGTTATGTTACCTACGCTGTGTTCGCTGGC   300
A  C  L  R  D  M  E  I  I  L  R  Y  V  T  Y  A  V  F  A  G     100
GACGCAGGTGTTCTCGAAGATCGTTGCTTGAACGGTCTGCGTGAAACCTACCAAG        355
D  A  G  V  L  E  D  R  C  L  N  G  L  R  E  T  Y  Q           118
```

B

```
ACCGCATCACCAGCAACTCTTCCACCATCGTTTCTAATGCTGCTCGTTCTTTGTTTGCAG   60
  R  I  T  S  N  S  S  T  I  V  S  N  A  A  R  S  L  F  A  E   20
AGCAGCCCCAACTGATTGCTCCCGGTGGAAACGCCTACACCAGCCGTCGTATGGCTGCTT  120
  Q  P  Q  L  I  A  P  G  G  N  A  Y  T  S  R  R  M  A  A  C   40
GCTTGCGTGACATGGAAATCATCCTGCGTTATGTTACCTACGCTGTGTTCGCTGGCGACG  180
  L  R  D  M  E  I  I  L  R  Y  V  T  Y  A  V  F  A  G  D  A   60
CAAGTGTTCTCGAAGATCGTTGCTTGAACGGTCTGCGTGAAACCTACCAAG           231
  S  V  L  E  D  R  C  L  N  G  L  R  E  T  Y  Q               76
```

ภาพที่ 4.36 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-β* ในสาหร่าย *S. platensis* จากคู่ไพรเมอร์ ORFPCCB-F/QPCCB-R2 (A) และ QPCCB-F2/QPCCB-R1 (B) ตามลำดับ ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งของไพรเมอร์ แถบสีเทา คือ ตำแหน่ง Phycobilisome domain

ตารางที่ 4.25 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-β* ในสาหร่าย *S. platensis* จากคู่ไพรเมอร์ ORFPCCB-F/QPCCB-R2 กับข้อมูลในห้องสมุดยีนด้วยวิธี BlastX

No.	Description	Closet species	E value	Identity	Accession
1	phycocyanin subunit beta	*Arthrospira platensis*	1e-77	97%	WP_006618344.1
2	phycocyanin beta chain	*Arthrospira erdosensis* ez	2e-77	97%	AEV40867.1
3	phycocyanin beta subunit	*Arthrospira platensis*	2eE-77	97%	CAA70295.1
4	phycocyanin beta chain	*Arthrospira platensis* edz	3e-77	97%	AEV40865.1
5	phycocyanin beta chain	*Arthrospira platensis*	1e-75	97%	ABD64607.1

ตารางที่ 4.26 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-β* ในสาหร่าย *S. platensis* จากคู่ไพรเมอร์ ORFPCCB-F/QPCCB-R2 กับข้อมูลในห้องสมุดยีนด้วยวิธี BlastN หรือ nucleotide Blast

No.	Description	Closet species	E value	Identity	Accession
1	phycocyanin beta chain (cpcB) and phycocyanin alpha chain (cpcA) genes, complete cds	*Arthrospira platensis* CHM	1e-169	98%	KJ463715.1
2	phycocyanin beta chain and phycocyanin alpha chain genes, complete cds	*Arthrospira maxima*	1e-169	98%	AF441177.1
3	phycocyanin beta chain (cpcB) and phycocyanin alpha chain (cpcA) genes, complete cds	*Arthrospira erdosensis* ez	1e-164	97%	HQ828099.1
4	phycocyanin beta subunit and phycocyanin alpha subunit genes, partial cds	*Spirulina* sp. FACHB440	3e-164	99%	AY244670.1
5	phycocyanin beta subunit and phycocyanin alpha subunit genes, partial cds	*Arthrospira platensis* FACHB439	3e-164	99%	AY244669.1

ตารางที่ 4.27 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-β* ในสาหร่าย *S. platensis* จากคู่ไพรเมอร์ QPCCB-F2/QPCCB-R1 กับข้อมูลในห้องสมุดยีนด้วยวิธี BlastX

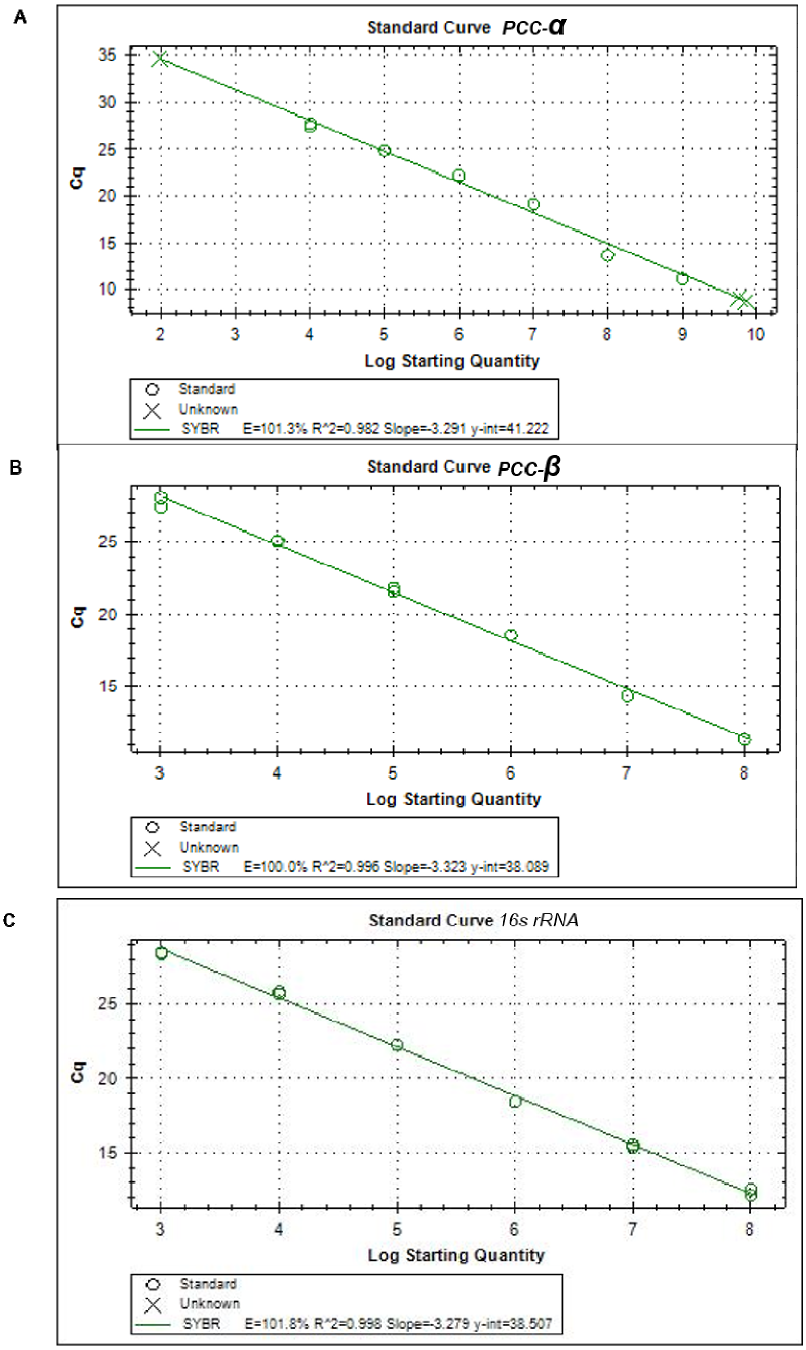
No.	Description	Closet species	E value	Identity	Accession
1	phycocyanin beta subunit	*Spirulina subsalsa* FACHB-351	9e-47	99%	AAP69765.1
2	phycocyanin subunit beta	*Arthrospira platensis*	1e-46	99%	WP_006618344.1
3	phycocyanin beta subunit	*Arthrospira platensis* FACHB-439	1e-46	99%	AAP69769.1
4	phycocyanin beta chain	*Arthrospira erdosensis* ez	4e-46	97%	AEV40867.1
5	phycocyanin beta subunit	*Arthrospira platensis*	5e-46	97%	CAA70295.1

ตารางที่ 4.28 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PCC-β* ในสาหร่าย *S. platensis* จากคู่ไพรเมอร์ QPCCB-F2/QPCCB-R1 กับข้อมูลในห้องสมุดยีนด้วยวิธี BlastN หรือ nucleotide Blast

No.	Description	Closet species	E value	Identity	Accession
1	phycocyanin beta chain (cpcB) and phycocyanin alpha chain (cpcA) genes, complete cds	*Arthrospira platensis* CHM	5e-106	98%	KJ463715.1
2	phycocyanin beta subunit and phycocyanin alpha subunit genes, partial cds	*Spirulina* sp. FACHB440	5e-106	98%	AY244670.1
3	phycocyanin beta chain and phycocyanin alpha chain genes, complete cds	*Arthrospira maxima*	5e-106	98%	AF441177.1
4	phycocyanin beta chain (cpcB) and phycocyanin alpha chain (cpcA) genes, complete cds	*Arthrospira erdosensis* ez	5e-101	96%	HQ828099.1
5	phycocyanin beta chain (cpcB) and phycocyanin alpha chain (cpcA) genes, complete cds	*Arthrospira platensis*	5e-101	96%	DQ406671.1

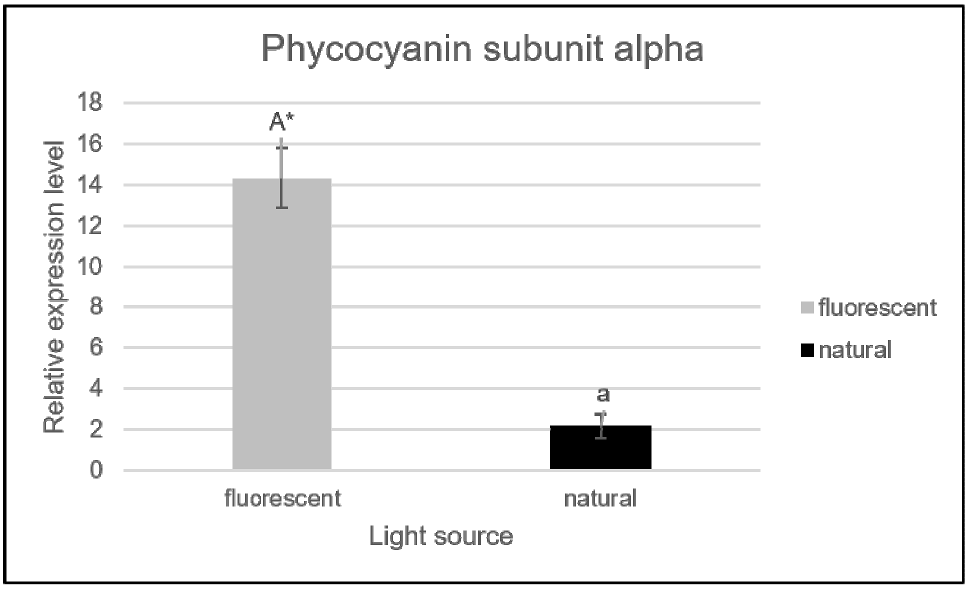
4.8.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PCC-α* และ *PCC-β* ในสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะการให้แสงแตกต่างกันด้วยเทคนิค Real-time PCR

จากการสร้างกราฟมาตรฐานของยีน *PCC-α*, *PCC-β* และ 16s-rRNA โดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 10^2 – 10^8 copy สามารถสร้างกราฟมาตรฐานของยีน *PCC-α*, *PCC-β* และ 16s-rRNA โดยมีค่า R^2 0.982, 0.996 และ 0.998 ตามลำดับแสดงในภาพที่ 4.36

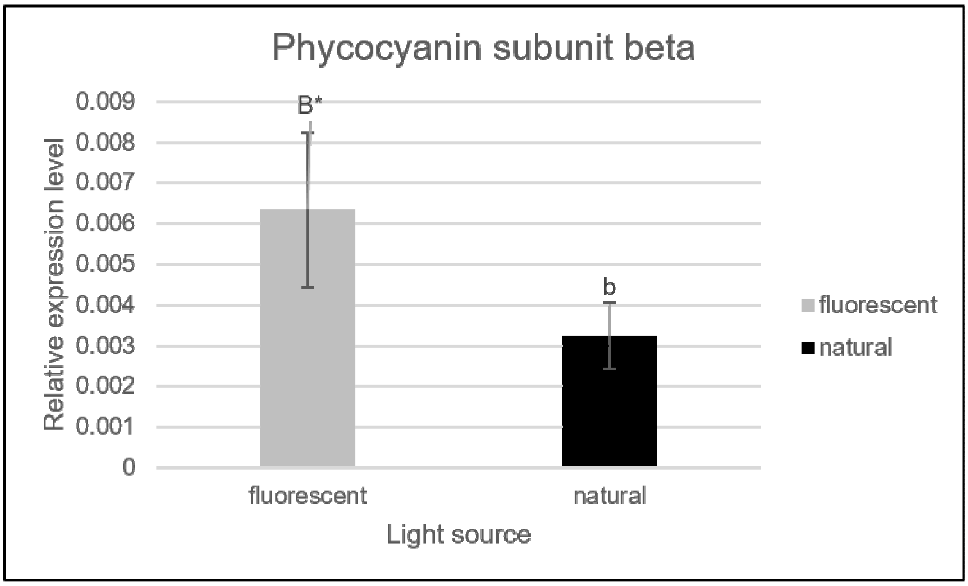


ภาพที่ 4.37 กราฟมาตรฐานยีน *PCC-α* (A) *PCC-β* (B) และ 16s rRNA (C)

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PCC-α* และ *PCC-β* ด้วยเทคนิค Real-time PCR และการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SPSS T-Test independent ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% (*$p<0.05$*) พบว่าสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะการให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ มีการแสดงออกของยีน *PCC-α* และ *PCC-β* สูงกว่าสาหร่ายที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*$p<0.05$*) ดังแสดงในภาพที่ 4.37 และ 4.38 และเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *PCC-α* และ *PCC-β* ในสาหร่าย *S. platensis* พบว่าการแสดงออกของ *PCC-α* สาหร่าย *S. platensis* สูงกว่าการแสดงออกของยีน *PCC-β* สาหร่าย *S. platensis* อย่างมีนัยสำคัยทางสถิติ (*$p<0.05$*) (ตารางที่ 4.29)



ภาพที่ 4.38 กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน *PCC-α* ในสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะการให้แสงจากธรรมชาติ และแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ด้วยเทคนิค Real-time PCR



ภาพที่ 4.39 กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน *PCC-β* ในสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะการให้แสงจากธรรมชาติ และแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ด้วยเทคนิค Real-time PCR

ตารางที่ 4.29 แสดงค่าระดับการแสดงออกของยีน *PCC-α* และ *PCC-β* ในสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะการให้แสงจากธรรมชาติ และแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์

แหล่งกำเนิดแสง	ระดับการแสดงออกของยีน	
	หลอดฟลูโอเรสเซนต์	แสงธรรมชาติ
PCC-α	14.34678±1.4997**	2.161476±0.6117
PCC-β	0.006349±0.0019*	0.003243±0.0008

*แสดงการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์กับแสงจากธรรมชาติ ที่ความเชื่อมั่น 95% (Independent T-test)

**แสดงการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *PCC-α* กับ *PCC-β* ที่ความเชื่อมั่น 95% (Independent T-test)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงภายใต้แหล่งแสงที่แตกต่างกัน

สาหร่าย *Spirulina* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีขนาดเล็ก (micro algae) มีโครงสร้างผนังเซลล์คล้ายแบคทีเรีย เยื้อหุ้มไซโตพลาสมิค (cytoplasmic membran) จัดให้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Sarada *et., al* 1999) ส่วนใหญ่เป็นพวกที่อาศัยอยู่ในน้ำจืดพบในน้ำจืดและน้ำกร่อยบ้างลักษณะเป็นเส้นสายขดตัวกันเป็นเกลียว มีความยาวประมาณ 300-500 ไมโครเมตร มีความกว้างประมาณ 8 ไมโครเมตร (ยุวดี พิพรพิศาล, 2546) โดย Pandey and Tiwari (2010) เลี้ยงสาหร่าย *Spirulina maxima* ที่ความเข้มแสง 1, 2, 3, 4 และ 5 กิโลลักซ์ พบว่า สาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงสูงมีการเจริญเติบโตสูงกว่าแต่ปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงต่ำ

รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ และคณะ (2558) พบว่า สาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ 4 กิโลลักซ์ มีการเจริญเติบโตที่สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสง 1 กิโลลักซ์ แต่สาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงสูงกว่าเซลล์มีลักษณะซีดกว่า เช่นเดียวกับผลจากงานวิจัยของ Pandey and Tiwari (2010) พบว่าสาหร่าย *Spirulina maxima* ที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงสูง (5 กิโลลักซ์) มีการเจริญเติบโตสูงกว่าที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงต่ำ แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงต่ำ แสดงให้เห็นว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงปกติ (Pandey and Tiwari, 2010) โดยความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้นหากอยู่ในช่วงที่เหมาะสม สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะปรับตัวโดยการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มความขุ่นของน้ำ แต่ในทางตรงกันข้ามหากความเข้มแสงที่สูงมากเกินไปอาจยับยั้งการแบ่งเซลล์ของสาหร่าย (Van-Liere and Mur, 1979) โดยรงควัตถุเหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับคุณภาพแสงที่มันได้รับ (Grossman et al., 2001) อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยดังกล่าวยังไม่มีการเปรียบเทียบกับการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะแสงจากธรรมชาติ

เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญเติบโตได้เหมือนสิ่งมีชีวิตทั่วไปจึงจำเป็นต้องมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม และต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโต เพื่อนำมาสร้างพลังงานและสารประกอบที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540; ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544) จากงานวิจัยนี้พบว่าสาหร่าย *S. platensis* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11 ในขณะที่สาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่คัดแยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้น เจริญได้ในอาหารเลี้ยง

เชื้อ F/2 แต่มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำเมื่อเทียบกับสาหร่าย *S. platensis* ที่ขยายพันธุ์ได้ในห้องปฏิบัติการมาแล้วหลายครั้ง

5.2 ปริมาณสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงภายใต้แหล่งแสงที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาการปรับตัวของ *Microcystis aeruginosa* ต่อความเข้มแสง พบว่าที่ความเข้มแสงสูงสาหร่ายผลิตไฟโคไซยานินและคลอโรฟิลล์ได้ต่ำกว่าที่ความเข้มแสงต่ำ และพบว่าความเข้มข้นของไฟโคบิลิโซม (PBS) ต่ำกว่า แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *M. aeruginosa* ปรับตัวต่อความเข้มแสงสูงโดยลดจำนวนไทลาคอยด์และ photosynthetic unit หรือไฟโคบิลิโซมต่อเซลล์ลง (Richmond, 2004) รงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงเหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับคุณภาพแสงที่สาหร่ายได้รับ (Grossman et al., 2001) โดยอาศัยกระบวนการ Complementary Chromatic Adaptation (CCA) ที่เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบโปรตีนในไฟโคบิลิโซมนั่นเอง (Bennett and Bogorad, 1973; Grossman and Kehoe, 1997) ที่ความเข้มแสงสูงสาหร่ายสามารถผลิตไฟโคไซยานิน และคลอโรฟิลล์ได้น้อยกว่าที่ความเข้มแสงต่ำ เนื่องจากความเข้มแสงสูงจะส่งผลอันตรายต่อพิกเมนต์ในเซลล์สาหร่ายและส่งผลให้ผลิตไฟโคไซยานินได้น้อยอีกด้วย (Chaiklahan et al., 2011)

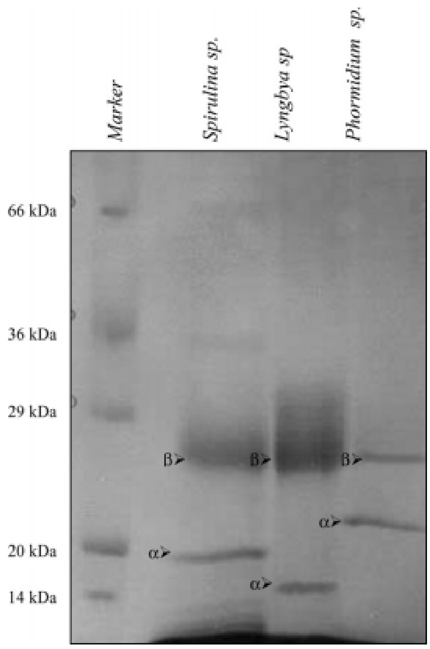
จากการเปรียบเทียบปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Spirulina* sp. (น้ำจืด), *Phormidium* sp. (น้ำเค็ม) และ *Lyngbya* sp. (น้ำเค็ม) พบว่าสาหร่าย *Spirulina* sp. (น้ำจืด) มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินมากที่สุด แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Spirulina* sp. มีศักยภาพในการผลิตไฟโคไซยานินในเชิงพานิชย์ได้ (Patel et al., 2005) นอกจากนี้ จากการเปรียบเทียบปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. พบว่าสาหร่าย *Arthrospira* sp. มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินมากกว่าสาหร่าย *Synechocystis* sp. นอกจากนี้ ซี-ไฟโคไซยานินมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งสองชนิดภายใต้สภาวะความเข้มแสงสูง (รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ และคณะ, 2558)

Chaiklahan et al. (2011) ศึกษาการตอบสนองของสาหร่าย *Spirulina* sp. ต่อความเข้มแสงและอุณหภูมิ พบว่าที่ความเข้มแสง 500 $\mu E/m^2/s$ สาหร่ายมีสารสกัดไฟโคไซยานิน และคลอโรฟิลล์น้อยกว่าที่ความเข้มแสง 100 $\mu E/m^2/s$ เนื่องจากความเข้มแสงสูงจะส่งผลอันตรายต่อพิกเมนต์ในเซลล์สาหร่ายและส่งผลให้ผลิตไฟโคไซยานินได้น้อยด้วย นอกจากนี้ Nomsawai (1998) ได้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Spirulina plantensis* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงสูง 500 $\mu E/m^2/s$ และที่ความเข้มแสงต่ำ 50 $\mu E/m^2/s$ พบว่าในช่วงแรกที่ให้ความเข้มแสงสูง สาหร่ายมีสีที่เปลี่ยนไปจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และเมื่อเปลี่ยนจากความเข้มแสงสูงมาต่ำ พบว่าสีของสาหร่ายกลับมาสี

เขียวเช่นเดิมสีที่เปลี่ยนไปภายใต้ความเข้มแสงสูงเกิดจากการลดลงของรงควัตถุ เช่นไฟบิลิโซม และคลอโรฟิลล์เอเปลี่ยนไปเป็น แคโรทีนอยด์ (Muller et al., 1999)

5.3 การศึกษาหน่วยย่อยของโปรตีนไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกันโดยการทำอิเลคโทรโฟริซิส แบบ SDS-PAGE

จากการศึกษารูปแบบของโปรตีนไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Spirulina* sp. ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Patel et al. (2004) ได้ศึกษาสารสกัดจากสาหร่าย 3 ชนิด ได้แก่ *Spirulina* sp. *Phormidium* sp. และ *Lyngbya* sp. โดยมีความสอดคล้องกับรูปแบบ α และ β (ภาพที่ 5.1) ซึ่ง รูปแบบ β มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 24.4 กิโลดาลตันของทั้ง 3 ชนิด และในขณะเดียวกันรูปแบบ α มีน้ำหนักโมเลกุล 17 19.1 และ 15.2 กิโลดาลตัน ตามลำดับ



ภาพที่ 5.1 ลักษณะของแถบโปรตีนในสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. *Phormidium* sp. และ *Lyngbya* sp. (Patel et al., 2004)

5.4 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลโดยใช้เทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR)

Venkatesan et al. (2012) ทำการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของสาหร่าย *Spirulina* sp. ด้วยเทคนิค FT-IR พบว่าประกอบด้วยโปรตีน ลิพิด ไกลโคเจน และกรดอะมิโน นอกจากนี้ ยังพบวิตามินเอในรูปแบบของเบต้าแคโรทีน และวิตามินบี 12 อีกด้วย Gang et al. (1998) ทำการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของซี-ไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Gel filtration และโครมาโตกราฟี โดยใช้เทคนิค FT-IR พบว่าความถี่ในช่วง 3,200 cm^{-1} 1,650 cm^{-1} 1,550 cm^{-1} 1,100 cm^{-1} 1,050 cm^{-1} และ 650 cm^{-1} จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของเทคนิค FT-IR ที่สามารถแสดงให้เห็นถึงคุณลักษณะของสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่สนใจเพิ่มเติมมากยิ่งขึ้น

ในงานวิจัยนี้ พบหมู่ฟังก์ชั่นที่สำคัญที่พบเฉพาะในสารสกัดไฟโคไซยานินที่ได้จากสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม เช่น โปรตีน ลิพิด เอสเทอร์ และกรดอะมิโน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดไฟโคไซยานินนี้เป็นสารอินทรีย์ ซึ่งสามารถใช้ความถี่ในช่วงเหล่านี้ในการยืนยันคุณลักษณะของสารได้ (Patel et al., 2005) นอกจากนี้ ยังพบเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระ โดยหมู่ฟังก์ชันของ C–O stretching, NH_2 rocking C-O และ CH_2 stretching เป็นบริเวณที่ไวต่อการเข้าจับกับโลหะ และจะแสดงช่วงความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเกิดการจับกับโลหะ (Venkatesan et al., 2012) ช่วงความถี่ดังกล่าวจึงสามารถแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของสารสกัดไฟโคไซยานินเมื่อเกิดการจับกับโลหะได้

5.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มยีนของยีนไฟโคไซยานินในส่วนของแอลฟา และเบต้า และระดับการแสดงออกของยีน

จากการตรวจสอบปริมาณการผลิตไฟโคไซยานินของสาหร่ายน้ำจืด *Spirulina platensis* ในสภาวะให้แสงธรรมชาติ (3.6905 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถสร้างสารไฟโคไซยานินสูงกว่าสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (1.0538 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่เมื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของ *PCC-*α และ *PCC-*β ในระดับ mRNA ให้ผลตรงข้ามกัน คือมีการแสดงออกของยีนในสภาวะการให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ สูงกว่าในสภาวะการให้แสงจากธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งจากรายการวิจัยของ Ajayan et al. (2012) เกี่ยวกับการให้แสงและไนโตรเจนต่อสาหร่าย *Spirulina patensis* เพื่อกระตุ้นการสร้างคลอโรฟิลล์ และ Phycobilliprotein พบว่า การให้แสงที่ 4.8-6.0 กิโลลักซ์ สาหร่าย *Spirulina patensis* สามารถสร้างยีน C-Phycocyanin ได้สูงกว่าสภาวะการให้แสงที่ 2-3 กิโลลักซ์ แต่ที่ความเข้มแสงที่ 4.8-6.0 กิโลลักซ์ สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าการให้แสง 2-3 กิโลลักซ์ ซึ่งการผลิตโปรตีนที่ลดลง เป็นผลมาจากภาวะความเครียดของสาหร่าย เช่นเดียวกันกับการทดลองนี้ ในสภาวะการให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ที่เป็นการให้แสงโดยตรงกับสาหร่าย

อาจเกิดภาวะอุณหภูมิที่สูงบริเวณผิวของสาหร่ายที่โดนแสงโดยตรงอาจทำให้เกิดสภาวะเครียด จึงมีการสร้าง C-phycocyanin ในระดับ mRNA ในระดับที่สูง ทำให้ค่าการแสดงออกของยีน *PCC-α* และ *PCC-β* ในสภาวะการให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ สูงกว่าการให้แสงจากธรรมชาติ และสาเหตุการแสดงออกในระดับ mRNA ของสาหร่ายที่ให้แสงจากธรรมชาติน้อยกว่าแสงที่จำกัดจากหลอดไฟฟลูโอเรสเซนต์ในห้องทดลอง อาจเนื่องมาจากเป็นสภาวะที่มีความเข้มแสงที่สูง

จากรายงานการวิจัยของ พิณทิพย์ น้อมไสว (2541) เกี่ยวกับโครงสร้างของไฟโคไซยานิน พบว่ายีนไฟโคไซยานิน *S. platensis* C1 ประกอบด้วย 3 ขนาด (1.4, 1.5 และ 3.5 kb) และภายใต้สภาวะความเข้มแสงสูง ไม่สามารถตรวจพบ mRNA ของยีนไฟโคไซยานินขนาด 3.5 kb ได้ ซึ่งความเข้มแสงนั้นมีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโต ปริมาณองค์ประกอบ และโครงสร้างต่างๆ ภายในเซลล์ โดยเฉพาะโครงสร้างรับแสงไฟโคบิลิโซม ภายใต้ความเข้มแสงสูงพบว่าไฟโคบิลิโซมจะมีขนาดเล็กลง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Myers and Kratz (1955) ซึ่งพบว่าไฟโคไซยานินจะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อมีแสงจำกัด นอกจากนี้ การผลิตไฟโคไซยานินตามธรรมชาติของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในแต่ละชนิด จะมีปริมาณไม่เท่ากันขึ้นกับความเข้มแสง คุณภาพแสง และเงื่อนไขการเจริญเติบโตซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ ให้ผลสอดคล้องกัน ดังนั้น ในการศึกษาไฟโคไซยานิน จึงต้องมีการศึกษาทั้งในระดับยีน และระดับโปรตีนร่วมด้วย และในการทดลองควรมีการควบคุมปัจจัยที่ทำให้เกิดสภาวะเครียดของสาหร่ายที่สนใจ

5.6 สรุปผลการวิจัย (Conclusions)

5.6.1 สาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติสามารถให้ผลผลิตของน้ำหนักเปียกและปริมาณไฟไซยานินได้มากที่สุด ในการเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่มีความเข้มแสงมากอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตและปริมาณในการผลิตสารไฟโคไซยานินได้ เมื่อเทียบกับสาหร่าย *Spirulina* sp.ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มแสงที่ต่ำกว่าแล้ว สาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะที่ความเข้มแสงต่ำสามารถให้ปริมาณสารไฟโคไซยานินได้มากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์

5.6.2 จากการศึกษาหน่วยย่อยของโปรตีนไฟโคไซยานินที่ได้จากสาหร่าย *S. platensis* สามารถให้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 39-15 กิโลดาลตันได้ และ *Spirulina sp.* สายพันธุ์น้ำเค็มสามารถให้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 19-15 กิโลดาลตัน

5.6.3 จากการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนไฟโคไซยานินด้วยเทคนิค FT-IR พบว่าสามารถให้ไฟโคไซยานินได้ โดยโครงสร้างของแถบโพลีเปปไทด์ ในสาหร่าย *S. platensis* ทั้งสองสภาวะ ประกอบไปด้วย O-H stretching vibration presence of carbohydrate amino acid, N-H stretching vibration presence of secondary amines (protein, lipid), C=O Stretching vibration (esters and amino acids), N-H bending vibration Carbonyl β-unsaturated Keton aminde, CH_2 bending

vibration CH_2-CO- presence of carbonyl compounds, Symmetric C-H Strerching vibration, presence of Antioxidant enzyme แต่พบ C-O stretching, O-H bending vibration presence of alcohol ในสภาวะแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เท่านั้น ส่วนในสาหร่าย *Spirulina sp.*สายพันธุ์น้ำเค็มทั้งสองสภาวะ ประกอบไปด้วย O-H stretching vibration presence of carbohydrate amino acid, N-H stretching vibration presence of secondary amines (protein, lipid), C=O Stretching vibration (esters and amino acids), N-H bending vibration Carbonyl β-unsaturated Keton aminde, CH_2 bending vibration CH_2-CO- presence of carbonyl compounds, C-O stretching, O-H bending vibration presence of alcohol, Symmetric C-H Strerching vibration, presence of Antioxidant enzyme แต่พบ Aliphatic C-H Stretching vibration และC-O asymmetric C-O-C Stretching presence of esters ในสภาวะแสงธรรมชาติเท่านั้น

5.6.4 PCC-α มีขนาดนิวคลีโอไทด์เต็มยีนในส่วน ORF เป็น 489 คู่เบส แปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 162 กรดอะมิโน พบ Domain ที่สำคัญคือ phycobilisomes ณ ตำแหน่งอะมิโนที่ 7-162 และพบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ PCC-β ซึ่งมีขนาดนิวคลีโอไทด์ 354 คู่เบสแปลงเป็นกรดอะมิโน 118 อะมิโน พบตำแหน่ง Phycobilisome domain ที่ อะมิโนลำดับที่ 7-118

5.6.5 จากการศึกษาผลกระทบของการให้แสงที่ต่างกัน คือจากหลอดฟลูโอเรสเซนต์และแสงจากธรรมชาติต่อการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินในระดับ mRNA ในสาหร่าย *S. platensis* พบว่าการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินจากการให้แสงจากหลอดฟลูโอเรสเซนต์ สูงกว่าการให้แสงจากธรรมชาติในทั้งหน่วยย่อยอัลฟา (PCC-α) และหน่วยย่อยเบต้า (PCC- β) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ ยังพบว่าในสภาวะการให้แสงที่เหมือนกันการแสดงออกของยีน PCC-α สูงกว่า PCC- β อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อีกด้วย

5.7 ข้อเสนอแนะ

5.7.1 การตรวจสอบความเข้มแสงและการตรวจสอบระบบให้อากาศ เป็นสิ่งที่ต้องปฏิบัติอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้รูปแบบการเลี้ยงสาหร่ายระหว่างการทดลองไม่มีความแปรปรวน

5.7.2 การเก็บเซลล์สาหร่ายเพื่อการสกัดสารพันธุกรรม ต้องล้างอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายออกให้หมดด้วยน้ำสะอาด เพื่อป้องการการยับยังกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

5.8 คุณค่าและประโยชน์ของผลผลิตการวิจัย

ในการศึกษานี้ มุ่งเน้นเกี่ยวกับการกระตุ้นการผลิตไฟโคไซยานินในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ต่างชนิดกันโดยเลี้ยงในสภาวะแสงที่แตกต่างกัน ตรวจสอบความสำเร็จโดยใช้ปริมาณไฟโคบิลิโปรตีน และระดับการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานิน โดยมุ่งหวังเพื่อให้สามารถผลิตไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้นเพียงพอกับความต้องการใช้ในเชิงอุตสาหกรรม ***ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 2 การสร้างศักยภาพและความสามารถเพื่อการพัฒนาทางเศรษฐกิจ***

5.9 แนวทางการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ และ/หรือพัฒนาต่อยอด

ผลจากการวิจัยในปีแรก จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำมาพัฒนาการผลิตสารไฟโคไซยานินโดยใช้ Bacteria expression system เพื่อให้สามารถผลิตไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้นเพียงพอกับความต้องการใช้ ทั้งทางการแพทย์และทางอุตสาหกรรมที่มีความต้องการมากขึ้นในอนาคตได้

5.10 ผลผลิต (Output) ที่เกิดขึ้นในช่วงที่ได้รับทุน

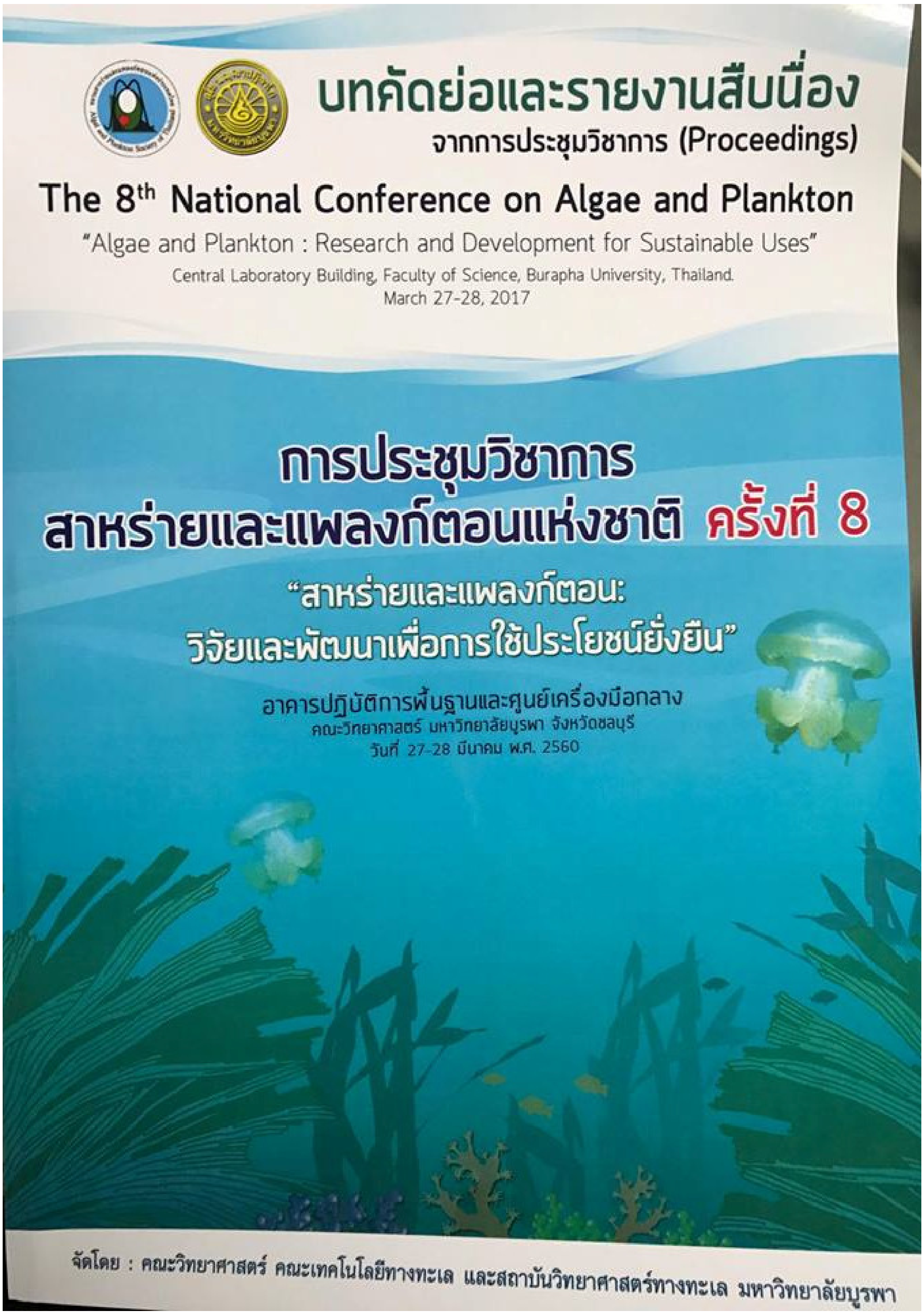
I. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี

1. กนกนันท์ เอกบรรพต. (2556). *รูปแบบการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินภายใต้สภาวะความเข้มแสงต่างกัน.* ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี, สาขาเทคโนโลยีทางทะเล. คณะเทคโนโลยีทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา

2. รวิวรรณ เริงจินดา. (2558). *ไฟโคไซยานินของสาหร่ายสไปรูไลน่าที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแหล่งแสงที่แตกต่างกัน*. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี, สาขาเทคโนโลยีทางทะเล. คณะเทคโนโลยีทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา

II. บทความวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในรายงานวิจัยสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการ

1. รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, รวิวรรณ เริงจินดา, มะลิวัลย์ คุตะโค, ชลี ไพบูลย์กิจกุล, และ ปริญญา ชินดุษฎีกุล. 2560. ไฟโคไซยานินของสาหร่ายสไปรูไลน่าที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแหล่งแสงที่แตกต่างกัน. การประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 8. วันที่ 27-28 มีนาคม พ.ศ. 2560, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี. หน้า 227 - 235. (งานวิจัยฉบับเต็มในรายงานวิจัยสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการ, full proceeding).


บทคัดย่อและรายงานสืบเนื่อง
จากการประชุมวิชาการ (Proceedings)
The 8th National Conference on Algae and Plankton
"Algae and Plankton : Research and Development for Sustainable Uses"
Central Laboratory Building, Faculty of Science, Burapha University, Thailand.
March 27-28, 2017
การประชุมวิชาการ
สาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 8
"สาหร่ายและแพลงก์ตอน:
วิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ยั่งยืน"
อาคารปฏิบัติการพื้นฐานและศูนย์เครื่องมือกลาง
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี
วันที่ 27-28 มีนาคม พ.ศ. 2560
จัดโดย : คณะวิทยาศาสตร์ คณะเทคโนโลยีทางทะเล และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

AqP-03

การเปรียบเทียบปริมาณไฟโคไซยานินของสาหร่ายสไปรูไลน่าน้ำจืดและน้ำเค็มที่เลี้ยงภายใต้แหล่งแสงที่แตกต่างกัน

Comparison of phycocyanin yields from *Spirulina platensis* and marine *Spirulina* sp. cultured under different light sources

รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ[1*] รวิวรรณ เริงจินดา[1] มะลิวัลย์ คุตะโค[1] ชลี ไพบูลย์กิจกุล[1] และ ปริญญา ชินดุษฎีกุล[2]

Rachanimuk Hiransuchalert[1*] Rawiwan Reungjinda[1] Maliwan Kutako[1] Chalee Paibulkichakul[1] and Parinya Chindudsadeegul[2]

[1]คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

[2]คณะอัญมณี มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

[1]Faculty of Marine Technology, Burapha University Chanthaburi Campus

[2]Faculty of Gems, Burapha University Chanthaburi Campus

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ในสภาวะแสงธรรมชาติ (1.36-1.68 กิโลลักซ์) และสภาวะแสงหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (2.55-3.49 กิโลลักซ์) ตลอดเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแสงธรรมชาติมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดและให้มวลชีวภาพสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (4.02±0.16 กรัมต่อลิตร, $p<0.05$) ในขณะที่สาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแสงฟลูออเรสเซนต์ให้มวลชีวภาพต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1.66±0.01 กรัมต่อลิตร, $p<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตไฟโคไซยานินในสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะที่ต่างกันพบว่า สาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแสงธรรมชาติให้ผลผลิตไฟโคไซยานินสูงที่สุด 3.70±1.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ($p<0.05$) และจากการศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดไฟโคไซยานินด้วยเทคนิค FT-IR พบหมู่ฟังก์ชันของโปรตีน-ลิพิด เอสเทอร์-กรดอะมิโน และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระ ในไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากธรรมชาติและแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ส่วนหมู่ฟังก์ชันของ Alphatic C-H stretching พบเฉพาะในไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากธรรมชาติเท่านั้น

คำสำคัญ : ไฟโคไซยานิน, แหล่งแสง, *Spirulina platensis*, *Spirulina* sp. น้ำเค็ม, FT-IR

ABSTRACT

In this study, *Spirulina platensis* and marine *Spirulina* sp. were cultured under two different light sources, i.e., natural light (1.36-1.68 klx) and fluorescent light (2.55-3.49 klx) (24 hrs.) sources. The results showed that *S. platensis* cultured under natural light source had the highest growth as well as the highest biomass with the statistical significance (4.02±0.16 grams per liter, $p<0.05$). In contrast, marine *Spirulina* sp. cultured under fluorescent light source provided the lowest biomass with the statistical significance (1.66±0.01 grams per liter, $p<0.05$). Moreover, in terms of the productivity of Phycocyanin, *S. platensis* cultured under natural light source provided the highest amount of Phycocyanin (3.70±1.10 milligrams per milliliter, $p<0.05$). The composition of extracted Phycocyanin was investigated by using FT-IR analysis. The results present the functional groups of protein-lipid, esters-amino acids and presence of antioxidant enzyme in Phycocyanin extraction of *S. platensis* and marine *Spirulina* sp. cultured under natural light source and fluorescent light source. While the functional groups of Alphatic

C-H stretching was found only in the Phycocyanin extraction of *S. platensis* and marine *Spirulina* sp. cultured under natural light source.

Key Words : Phycocyanin, light source, *Spirulina platensis*, marine *Spirulina* sp., FT-IR

*Corresponding author. e-mail: rachanimuk@buu.ac.th

บทนำ (Introduction)

สาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina* sp.) เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินขนาดเล็กพบในน้ำจืดและบางส่วนพบในน้ำทะเล ลักษณะคล้ายแบคทีเรีย คือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ มีคลอโรฟิลล์แต่ไม่มีคลอโรพลาสมีลักษณะเป็นเกลียวมีการเจริญเติบโตในทวีปเขตร้อน และเป็นสาหร่ายที่มีความต้องการสูงเนื่องจากเป็นที่นิยมในการที่จะนำมาเป็นอาหารของมนุษย์ ไฟโคบิลิน (Phycobilins) เป็นรงควัตถุหนึ่งที่พบได้ทั้งในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green algae/Cyanobacteria) สาหร่ายสีเหลืองทอง (Chrysophyta) และสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงแล้วส่งต่อให้คลอโรฟิลล์เอทำงานต่อไป (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540)

ไฟโคบิลินจะรวมอยู่กับสารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีนเป็นสารประกอบที่เรียกว่าไฟโคบิลิโปรตีน (Phycobiliprotein) สามารถละลายน้ำได้ดี สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่ม คือ ซี-ไฟโคไซยานิน (C-Phycocyanins) รงควัตถุที่มีสีน้ำเงิน ไฟโคอิริทริน (Phycoerythrins) รงควัตถุที่มีสีแดง และอัลโลไฟโคไซยานิน (Allophycocyanins) รงควัตถุที่มีสีน้ำเงินเช่นเดียวกับกลุ่มแรก เนื่องจากคุณสมบัติที่น่าสนใจของไฟโคบิลินโปรตีน ทำให้สารกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้เป็นสีผสมอาหารชนิดต่างๆ เช่น ลูกอม ขนม นมเปรี้ยว หรือใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง (Mary Leema et al., 2010) และด้วยคุณสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชั่น (antioxidation) ที่อยู่ในซี-ไฟโคไซยานิน ทำให้เครื่องสำอางมีมูลค่าสูง นอกจากนี้ยังสามารถนำซี-ไฟโคไซยานินมาใช้ประโยชน์อีกหลายด้าน เช่น ใช้เป็นสารต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ใช้เป็นเครื่องหมายติดฉลากฟลูออเรสเซนต์ เพื่อใช้ติดตามการมีชีวิตของเซลล์หรือติดฉลาก สารชีวโมเลกุลในงานวิจัยทางด้านชีวภาพ ดังนั้นโปรตีนในกลุ่มไฟโคบิลินจึงเป็นสารที่มีมูลค่าสูง (Patel et al., 2006)

สำหรับกระบวนการสกัดไฟโคไซยานินและการแปรรูป ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปผงตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น ผงไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูไลน่า Spirulina Extract (Xi'an Day Natural Tech Co., Ltd., 2009), Fluorescent Phycocyanin (Shaanxi Pioneer Biotrch Co., Ltd., 2012) และ Pure Phycocyanin Powder (Xi'an Aladdin Biotechnology Co., Ltd., 2010) เป็นต้น ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ทั้งเป็นสีผสมอาหาร เป็นส่วนผสมของยาแก้อักเสบ และอื่นๆ อีกมากมาย ในเชิงอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ นิยมใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) โดยไฟโคไซยานินของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในแต่ละชนิดมีปริมาณไม่เท่ากันขึ้นกับวิธีการสกัดและลักษณะสาหร่ายก่อนทำการสกัด (Rachen, 2009; Sarada et al., 1999; ทิพาพร เรืองยศ และคณะ, 2559) ความเข้มแสงและคุณภาพแสงที่ใช้เลี้ยง (รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ และคณะ, 2558; Pandey and Tiwari, 2010; Chaiklahan et al., 2011) และเงื่อนไขการเจริญเติบโต (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2549) อย่างไรก็ตาม ไฟโคไซยานินที่สาหร่ายผลิตได้ตามธรรมชาติมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณความต้องการในการใช้ประโยชน์ ในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นเกี่ยวกับการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Spirulina* sp. สายพันธุ์ที่มีปรับตัวให้สามารถเจริญได้ดีในระบบเลี้ยง และสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ ภายใต้สภาวะแหล่งแสงที่ต่างกัน เพื่อเปรียบเทียบปริมาณและรูปแบบไฟโคไซยานินที่สาหร่ายผลิตขึ้น รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดไฟโคไซยานินด้วยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR)

วิธีดำเนินการวิจัย (Methods)

สายพันธุ์สาหร่ายและการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อศึกษาการเจริญเติบโต

สาหร่าย *Spirulina platensis* ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ส่วนสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่ใช้ในการทดลองนี้ แยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในสินภิรมย์ฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี (พงศธร เจนจัดการ, 2558)

เลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 (Allen, 1968) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อหัวเชื้อสาหร่าย 5 มิลลิลิตร) และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) ที่ความเค็ม 20 ppt ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อหัวเชื้อสาหร่าย 5 มิลลิลิตร) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ในห้องปฏิบัติการ เพื่อติดตามการเติบโตของสาหร่ายเป็นเวลา 15 และ 30 วัน ตามลำดับ เขย่าขวดสาหร่ายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องเขย่าสารภายในห้องปฏิบัติการ และควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเติมอากาศตลอดเวลา

วัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. platensis* ด้วยวิธีการนับเส้นสาย (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540) โดยเก็บตัวอย่างสาหร่ายจากขวดรูปชมพู่โดยใช้ปิเปต จากนั้นใส่ตัวอย่างลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer) โดยนับจำนวนเส้นสายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม เนื่องจากสาหร่ายมีขนาดเล็ก จึงวัดการเจริญเติบโตโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักแห้ง อบกระดาษกรอง GF/C (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เก็บกระดาษกรองในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแห้งกระดาษกรอง จากนั้นกรองน้ำตัวอย่างด้วยกระดาษกรองที่เตรียมไว้ นำไปอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำกระดาษกรองมาใส่โถดูดความชื้นรอจนอุณหภูมิของกระดาษกรองเย็นและชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาผลต่างของน้ำหนัก เมื่อได้ทราบแนวโน้มการเจริญเติบของสาหร่ายจนถึงระยะเวลาที่สาหร่ายอยู่ในระยะทวีคูณ (log phase) นำสาหร่ายมาเลี้ยงในโหลแก้วขนาด 3 ลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ภายใต้สภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ และสภาวะให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ วัดค่าความเข้มแสงทุกวันระหว่างการทดลองในช่วงเวลา 11.00-12.00 น. และเก็บเซลล์สาหร่ายเพื่อหาปริมาณไฟโคไซยานินต่อไป

การหาปริมาณไฟโคไซยานิน

สกัดไฟโคไซยานินโดยดัดแปลงจากวิธีของ Patel et al. (2005) และ Soni et al. (2006) โดยนำสาหร่ายสด (200-300 มิลลิกรัม) ใส่ในหลอดขนาด 45 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง และสลับไปวางที่อุณหภูมิห้องอีก 6 ชั่วโมง (ทำทั้งหมด 3 รอบ) นำสารแขวนลอยที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ที่ 13,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แล้วนำไปแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง นำของเหลวสีฟ้าใสที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 และ 652 นาโนเมตร คำนวณปริมาณไฟโคบิลิโปรตีนตามสูตรของ Bennett and Bogorad (1973) จากสมการที่ 1 และ 2

ปริมาณซี-ไฟโคไซยานิน (มก./มล.) = $[A620_{nm} - 0.474(A652_{nm})]/ 5.34$ สมการที่ 1

ปริมาณอัลโลไฟโคไซยานิน (มก./มล.) = $[A652_{nm} - 0.208(A620_{nm})]/ 5.09$ สมการที่ 2

การใช้เทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR)

นำตัวอย่างสารไฟโคไซยานินที่ผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งมาทำการศึกษาหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของไฟโคไซยานินในสาหร่ายด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) (ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Nicolet iN10 Infrared Microscope) โดยผสมไฟโคไซยานินเข้ากับโพแทสเซียมโปรไมด์ (KBr) บดให้ละเอียดในโกร่งบดสาร ใส่ในแม่พิมพ์ตัวอย่างเพื่อทำการอัดเม็ด จากนั้นถอดออกตัวประกอบแม่พิมพ์ตัวอย่างจะติดอยู่กับแม่พิมพ์ (ลักษณะมีรูวงกลมตรงกลาง โดยตัวอย่างจะอยู่ในช่องตรงกลาง) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม OMNIC picta โดยเลือกความถี่ระหว่าง 4000-400 cm^{-1} และเลือกรูปแบบสเปกตรัมเป็น แบบ %Transmittance

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) เมื่อพบความแตกต่างจะทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล (Results and Discussion)

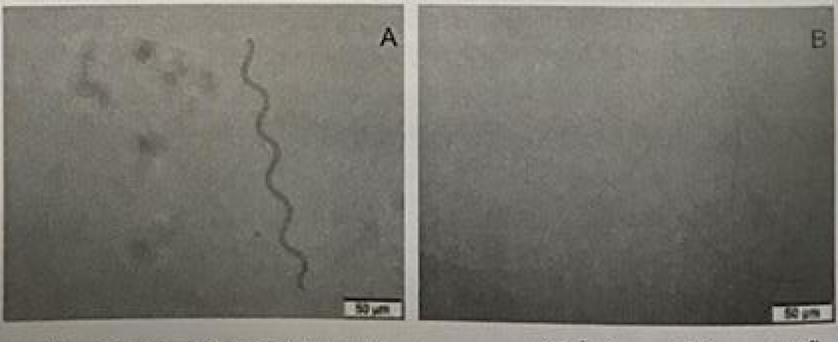
การเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงภายใต้แหล่งแสงที่แตกต่างกัน

ทำการเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม โดยให้ความเข้มแสงที่แตกต่างกันสามารถวัดค่าความเข้มแสงบริเวณสภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ ได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 1.58±0.19 กิโลลักซ์ต่อวัน และสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ชนิดแผง ได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 2.68±0.24 กิโลลักซ์ต่อวัน

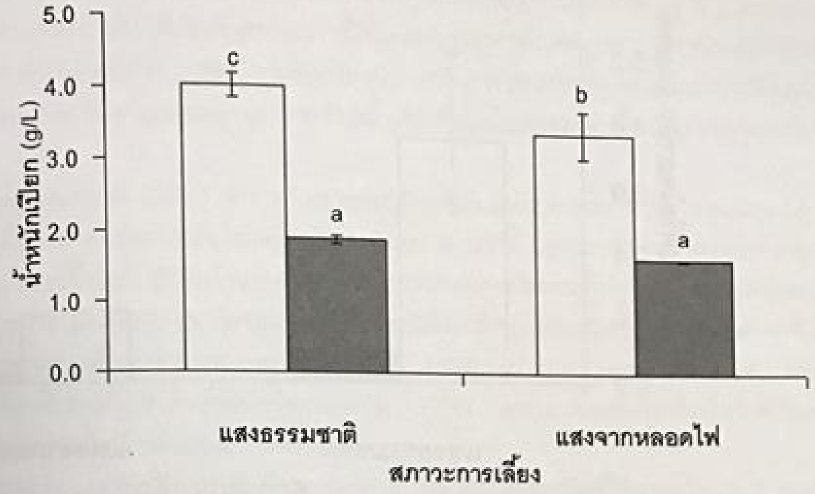
จากการทดลองโดยเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11 และสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มในอาหารเลี้ยงเชื้อ F/2 ความเค็ม 20 ppt ภายใต้แสงจากธรรมชาติและแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ พบว่าสาหร่าย *S. platensis* มีน้ำหนักเปียกเป็น 4.02±0.16 และ 3.44±0.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีการเจริญเติบโตดีกว่าสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ทั้งในสภาวะที่เลี้ยงภายใต้แสงจากธรรมชาติและแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (น้ำหนักเปียก 1.89±0.06 และ 1.66±0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ($p<0.05$) นอกจากนี้ สาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแสงธรรมชาติมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดและให้มวลชีวภาพสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่สาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแสงธรรมชาติและแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ให้มวลชีวภาพต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 2)

รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ และคณะ (2558) พบว่า สาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ 4 กิโลลักซ์ มีการเจริญเติบโตที่สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสง 1 กิโลลักซ์ แต่สาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงสูงกว่าเซลล์มีลักษณะซีดกว่า เช่นเดียวกับผลจากงานวิจัยของ Pandey and Tiwari (2010) พบว่าสาหร่าย *Spirulina maxima* ที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงสูง (5 กิโลลักซ์) มีการเจริญเติบโตสูงกว่าที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงต่ำ แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงต่ำแสดงให้เห็นว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงปกติ (Pandey and Tiwari, 2010) โดยความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้นหากอยู่ในช่วงที่เหมาะสม สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะปรับตัวโดยการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มความขุ่นของน้ำแต่ในทางตรงกันข้ามหากความเข้มแสงที่สูงมากเกินไปอาจยับยั้งการแบ่งเซลล์ของสาหร่าย (Van-Liere and Mur, 1979) อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยดังกล่าวยังไม่มีการเปรียบเทียบกับการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะแสงจากธรรมชาติ

เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญเติบโตได้เหมือนสิ่งมีชีวิตทั่วไปจึงจำเป็นต้องมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม และต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโต เพื่อนำมาสร้างพลังงานและสารประกอบที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540; ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544) จากงานวิจัยนี้พบว่าสาหร่าย *S. platensis* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11 ในขณะที่ สาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่คัดแยกได้จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้น เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ F/2 แต่มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำเมื่อเทียบกับสาหร่าย *S. platensis* ที่ขยายพันธุ์ได้ในห้องปฏิบัติการมาแล้วหลายครั้ง



ภาพที่ 1 สาหร่าย *Spirulina platensis* (A) และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (B) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 2 น้ำหนักเปียกของสาหร่าย *Spirulina platensis* (สีขาว) และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (สีเทา) ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากธรรมชาติและแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์

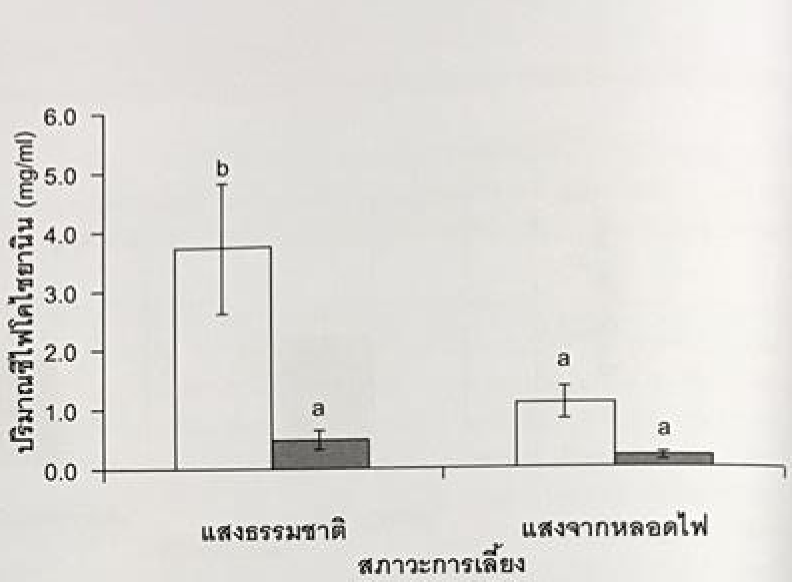
ปริมาณสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงภายใต้แหล่งแสงที่แตกต่างกัน

จากการหาปริมาณไฟโคไซยานินตามสูตรของ Bennett and Bogorad (1973) พบว่าปริมาณไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่เลี้ยงในสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (1.05±0.26 และ 0.18±0.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) มีปริมาณน้อยกว่าสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ (3.69±1.10 และ 0.47±0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) (ตารางที่ 1) โดยสาหร่าย *S. platensis* ที่สภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติมีปริมาณไฟไซยานินสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่เลี้ยงในสภาวะให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ และสาหร่าย *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็มที่สภาวะที่ได้รับแสงจากธรรมชาติมีปริมาณไฟไซยานินไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 ปริมาณของไฟโคบิลิโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสาหร่าย *Spirulina platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม

		ปริมาณของไฟโคบิลิโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
		S. platensis	*Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม
C-Phycocyanin	แสงธรรมชาติ	3.69±1.10	0.47±0.16
	แสงหลอดไฟ	1.05±0.26	0.18±0.07
Allophycocyanin	แสงธรรมชาติ	0.81±0.10	0.22±0.04
	แสงหลอดไฟ	0.33±0.06	0.05±0.04

หมายเหตุ: Phycoerythrin ไม่ได้ทำการศึกษา



ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบปริมาณของซีไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสาหร่าย *Spirulina platensis* (สีขาว) และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม (สีเทา) ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากธรรมชาติและแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์

จากการศึกษาการปรับตัวของ *Microcystis aeruginosa* ต่อความเข้มแสง พบว่าที่ความเข้มแสงสูงสาหร่ายผลิตไฟโคไซยานินและคลอโรฟิลล์ได้ต่ำกว่าที่ความเข้มแสงต่ำ และพบว่าความเข้มข้นของไฟโคบิลีโซม (PBS) ต่ำกว่า แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *M. aeruginosa* ปรับตัวต่อความเข้มแสงสูงโดยลดจำนวนไทลาคอยด์และ photosynthetic unit หรือไฟโคบิลิโซมต่อเซลล์ลง (Richmond, 2004) รงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงเหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับคุณภาพแสงที่สาหร่ายได้รับ (Grossman et al., 2001) โดยอาศัยกระบวนการ Complementary Chromatic Adaptation (CCA) ที่เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบโปรตีนในไฟโคบิลีโซมนั่นเอง (Bennett and Bogorad, 1973; Grossman and Kehoe, 1997) ที่ความเข้มแสงสูงสาหร่ายสามารถผลิตไฟโคไซยานิน และคลอโรฟิลล์ได้น้อยกว่าที่ความเข้มแสงต่ำ เนื่องจากความเข้มแสงสูงจะส่งผลอันตรายต่อพิกเมนต์ในเซลล์สาหร่ายและส่งผลให้ผลิตไฟโคไซยานินได้น้อยอีกด้วย (Chaiklahan et al., 2011)

จากการเปรียบเทียบปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Spirulina* sp. (น้ำจืด), *Phormidium* sp. (น้ำเค็ม) และ *Lyngbya* sp. (น้ำเค็ม) พบว่าสาหร่าย *Spirulina* sp. (น้ำจืด) มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินมากที่สุด แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Spirulina* sp. มีศักยภาพในการผลิตไฟโคไซยานินในเชิงพานิชย์ได้ (Patel et al., 2005) นอกจากนี้ จากการเปรียบเทียบปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. พบว่าสาหร่าย *Arthrospira* sp. มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินมากกว่าสาหร่าย *Synechocystis* sp. นอกจากนี้ ซี-ไฟโคไซยานินมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งสองชนิดภายใต้สภาวะความเข้มแสงสูง (รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ และคณะ, 2558)

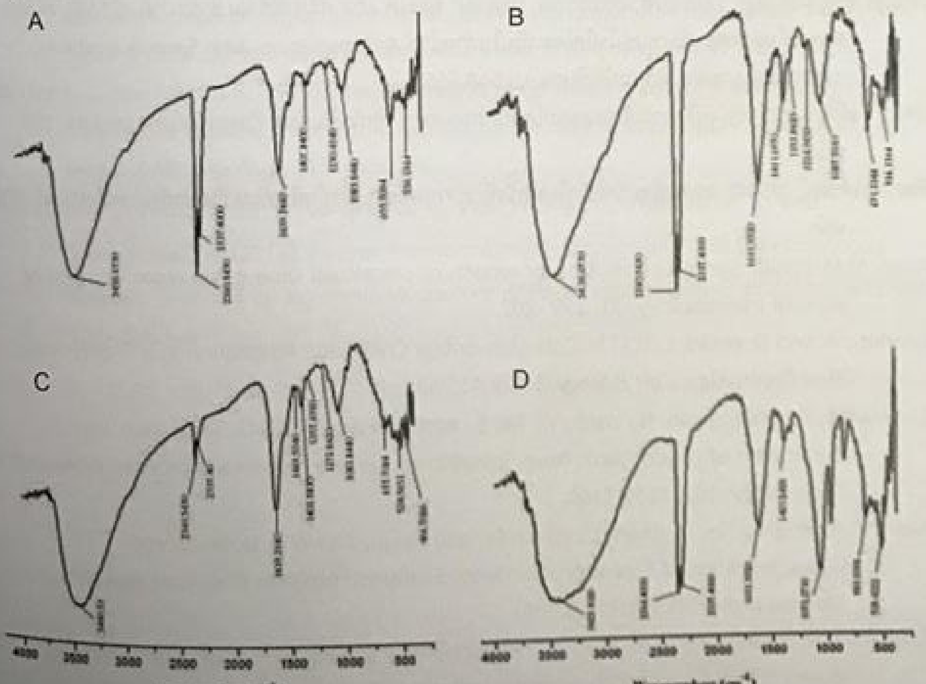
การศึกษาหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลโดยใช้เทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR)

จากการศึกษาหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง ด้วยเทคนิค FT-IR โดยใช้ช่วงความถี่ระหว่าง 4000-400 cm^{-1} พบความถี่ในช่วง 3425–3440 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน N-H stretching ของ 2° เอมีน (โปรตีนและลิพิด), ความถี่ในช่วง 2337-2360 cm^{-1} และ 1631-1639 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน C=O stretching (เอสเทอร์และกรดอะมิโน) และยังแสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน N-H bending ของ carbonyl β unsaturated ketone amide ความถี่ในช่วง 1403-

1411 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน CH_2 bending ความถี่ในช่วง 1072-1087 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน C-H stretching ที่สมมาตร หรือเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระ และความถี่ในช่วง 655-671 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน S-O stretching ของกรดซัลโฟนิก โดยพบในไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากธรรมชาติและแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ส่วนความถี่ในช่วง 2875-2925cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน Alphatic C-H stretching พบเฉพาะในไฟโคไซยานินของสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากธรรมชาติเท่านั้น (ภาพที่ 4)

Venkatesan et al. (2012) ทำการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของสาหร่าย *Spirulina* sp. ด้วยเทคนิค FT-IR พบว่าประกอบด้วยโปรตีน ลิพิด ไกลโคเจน และกรดอะมิโน นอกจากนี้ ยังพบวิตามินเอ ในรูปแบบของเบต้าแคโรทีน และวิตามินบี 12 อีกด้วย Gang et al. (1998) ทำการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของซี-ไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Gel filtration และโครมาโตกราฟี โดยใช้เทคนิค FT-IR พบว่าความถี่ในช่วง 3,200 cm^{-1} 1,650 cm^{-1} 1,550 cm^{-1} 1,100 cm^{-1} 1,050 cm^{-1} และ 650 cm^{-1} จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของเทคนิค FT-IR ที่สามารถแสดงให้เห็นถึงคุณลักษณะของสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่สนใจเพิ่มเติมมากยิ่งขึ้น

ในงานวิจัยนี้พบหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญที่พบเฉพาะในสารสกัดไฟโคไซยานินที่ได้จากสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม เช่น โปรตีน ลิพิด เอสเทอร์ และกรดอะมิโน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดไฟโคไซยานินนี้เป็นสารอินทรีย์ ซึ่งสามารถใช้ความถี่ในช่วงเหล่านี้ในการยืนยันคุณลักษณะของสารได้ (Patel et al., 2005) นอกจากนี้ ยังพบเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระ โดยหมู่ฟังก์ชันของ C–O stretching, NH_2 rocking C-O และ CH_2 stretching เป็นบริเวณที่ไวต่อการเข้าจับกับโลหะ และจะแสดงช่วงความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเกิดการจับกับโลหะ (Venkatesan et al., 2012) ช่วงความถี่ดังกล่าวจึงสามารถแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของสารสกัดไฟโคไซยานินเมื่อเกิดการจับกับโลหะได้



ภาพที่ 4 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของไฟโคไซยานิน ด้วยเทคนิค Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) ในสาหร่าย *Spirulina platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากธรรมชาติ (A และ B) และ ในสาหร่าย *S. platensis* และ *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะภายใต้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (C และ D)

สรุปผลการวิจัย (Conclusions)

สาหร่าย *S. platensis* ที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติให้ผลผลิตทั้งน้ำหนักเปียกและปริมาณไฟโซยานินได้มากที่สุด ส่วน *Spirulina* sp. สายพันธุ์น้ำเค็ม ที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติและภายใต้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ให้ผลผลิตทั้งน้ำหนักเปียกและปริมาณไฟโซยานินไม่แตกต่างกันและมีปริมาณน้อยที่สุด และหมู่ฟังก์ชันของโปรตีนไฟโคไซยานินด้วยเทคนิค FT-IR จากงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย N-H stretching ของ 2° เอมีน (โปรตีนและลิพิด), C=O stretching (เอสเทอร์และกรดอะมิโน), N-H bending ของ carbonyl β unsaturated ketone amide, CH_2 bending, C-H stretching ที่สมมาตร หรือเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระ และ S-O stretching ของกรดซัลโฟนิก

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2559

เอกสารอ้างอิง (References)

พงษธร เจนจัดการ. (2558). *การแยกสาหร่ายน้ำเค็มที่เติบโตได้ในห้องปฏิบัติการ จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จังหวัดจันทบุรี.* สาขา เทคโนโลยีทางทะเล. คณะเทคโนโลยีทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา

ทิพาพร เรืองยศ, สมเกียรติ จตุรงค์ล้ำเลิศ, ชนวัฒน์ นิทัศน์วิจิตร และจตุรภัทร วาฤทธิ์. (2559). ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่า โดยวิธีแช่แข็งสลับกับการละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง*. 10(2): 78-87.

ยุวดี พีรพรพิศาล. (2549). *สาหร่ายวิทยา*. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 545 หน้า.

รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, กนกนันท์ เอกบรรพต, มะลิวัลย์ คุตะโค และ ศรีภาพรรณ ธาระนาถ. (2558). ผลของความเข้มแสงต่อปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp.. *วารสารแก่นเกษตร*. 43 (ฉบับพิเศษ 1): 548-555.

ลัดดา วงศ์รัตน์. (2540). *คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 127 หน้า.

ลัดดา วงศ์รัตน์. (2544). *แพลงก์ตอนพืช*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 851 หน้า.

Allen, M.M. (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae. *Journal of general microbiology*. 51: 199 -202.

Bennett, A. and Bogorad, L. (1973). Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue Green Alga. *Cell Biology*. 58(2): 419-435.

Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tai, S., and Bunnag, B. (2011). Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresource Technology*. 102: 7159-7164.

Gang, Y., Zheng, L., Fei, L., Chen, L., Fu-xin D., and Nai-ju, Y. (1999). Isolation and Characterization of C-phycocyanin from *Spirulina Platensis*. *Chemical Research in Chinese Universities*. 15(1): 35-38.

Grossman, A. R., and Kehoe, D. M. (1997) Phosphorelay control of Phycobilisome biogenesis during complementary chromatic adaptation. *Photosynthesis Research*. 53(2): 95-108.

Guillard, R.R.L. (1973). *Methods for microflagellates and nannoplankton*. In, Stein J.R. (ed), *Handbook of Phycological Methods V. 1*, Cambridge: Cambridge University Press.

Mary Leema, J. T., Kirubagaran, R., Vinithkumar, N. V., Dheenan, P. S., and Karthikayulu, S. 2010. High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. *Bioresource Technology*. 101(23): 9221-9227.

Pandey, J.P. and Tiwari, A. (2010). Optimization of biomass production by *Spirulina platensis*. *J. Algal Biomass Utln*. 1(2): 20-32.

Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., and Ghosh, P.K. (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*. 40: 248-255.

Patel, A., Mishra, S., and Ghosh, P. K. 2006. Antioxidant potential of C-Phycocyanin isolated from cyanobacterial species *Lynbgya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 43:25-31.

Rachen, D. (2009). Extraction and stability of phycocyanin from *Spirulina* sp. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Food Technology. Suranaree University of Technology. Nakhon Ratchasima. 13 p.

Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Publishing Company, 566 pp.

Sarada, R., Pillai, M.G. and Ravishankar, G.A. (1999). Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*. (34): 795–801.

Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U., and Maddamwar, D. (2006). Extraction purification characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctula* isolated from the rocky shores of Bet Dwarka Gujarat India. *Process Biochemistry*. 41: 2017-2023.

Van-Liere, L. and Mur, L. R. (1979). Growth kinetics of *Oscillatoria agardhii* Gomont in continuous culture, limited in its growth by the light energy supply. *Journal of General Microbiology*. 115: I 53- 160.

Venkatesan, S., Pugazhendy, K., Sangeetha, D., Vasantharaja, C., Prabakaran, S., and Meenambal, M. (2012). Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) Spectoroscopic Analysis of *Spirulina*. International *Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*. 3(4): 969-972.

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (2559A10803005) สัญญาเลขที่ 41/2559

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษาปริมาณและการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และการผลิต heterologous protein ของสารไฟโคไซยานินโดยใช้ระบบแบคทีเรีย

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน / ผู้วิจัย ผศ.ดร.รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 31 มีนาคม 2560
ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 6 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 31 มีนาคม 2560

<u>รายจ่าย</u>

หมวด	**งบประมาณ รวมทั้งโครงการ**	**ค่าใช้จ่าย งวดปัจจุบัน**	**คงเหลือ (หรือเกิน)**
1. ค่าตอบแทน	-	-	-
2. ค่าจ้าง	180,000	180,000	-
3. ค่าวัสดุ	413,440	413,440	-
4. ค่าใช้สอย	56,000	56,000	-
5. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ			
ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน	72,160	72,160	-
รวม	721,600		

<u>จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ		721,600	
งวดที่ 1	360,800.00	บาท เมื่อ 19 พฤศจิกายน 2558	
งวดที่ 2	288,640.00	บาท เมื่อ 20 สิงหาคม 2559	
	รวม	649,440.00	บาท

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน
วันที่ 31 มีนาคม 2560

บรรณานุกรม

กนกนันท์ เอกบรรพต. (2556). *รูปแบบการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินภายใต้สภาวะความเข้มแสงต่างกัน.* สาขา เทคโนโลยีทางทะเล. คณะเทคโนโลยีทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา

กรรณการ์ ด้วงวิเศษ. (2556). *มวลชีวภาพและไฟโคไซยานินจากสาหร่าย Spirulina sp. ที่เลี้ยงในความเค็มที่ต่างกัน.* สาขา เทคโนโลยีทางทะเล. คณะเทคโนโลยีทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา

จิราพร ภู่ศรี. (2538). *การสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายเกลียวทองเพื่อใช้เป็นสีผสมอาหาร.* สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพฯ

พงศธร เจนจัดการ. (2558). *การแยกสาหร่ายน้ำเค็มที่เติบโตได้ในห้องปฏิบัติการ จากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จังหวัดจันทบุรี.* ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี, สาขาเทคโนโลยีทางทะเล. คณะเทคโนโลยีทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา

ทิพาพร เรืองยศ, สมเกียรติ จตุรงค์ล้ำเลิศ, ชนวัฒน์ นิทัศน์วิจิตร และจตุรภัทร วาฤทธิ์. (2559). ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่า โดยวิธีแช่แข็งสลับกับการละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง.* 10(2): 78-87.

ยุวดี พีรพรพิศาล. (2549). *สาหร่ายวิทยา*. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 545 หน้า.

รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, กนกนันท์ เอกบรรพต, มะลิวัลย์ คุตะโค และ ศรีภาพรรณ ธาระนาถ. (2558). ผลของความเข้มแสงต่อปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp.. *วารสารแก่นเกษตร.* 43 (ฉบับพิเศษ 1): 548-555.

ลัดดา วงศ์รัตน์. (2540). *คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 127 หน้า.

ลัดดา วงศ์รัตน์. (2544). *แพลงก์ตอนพืช*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 851หน้า.

เสาวรัตน์ จันทะโร. (2009). *กลไกตอบสนองของไซยาโนแบคทีเรียต้านภาวะเครียดจากแสงที่มีความเข้มสูง*. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 121-129

Allen, M.M. (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae. *Journal of general microbiology*. 51: 199 -202.

Bennett, A. and Bogorad, L. (1973). Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue Green Alga. *Cell Biology*. 58(2): 419-435.

Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tai, S., and Bunnag, B. (2011). Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresource Technology*. 102: 7159-7164.

Eriksen, N.(2008). *Production of phtcocyanin a pigment with application in biology, biotechnology, food and medicine*. Deparment of Biologythechnology. Chemistry and Environmental Engineering, Aalborg University, Sohngaardsholmsvej, 80: 1-14.

Gang, Y., Zheng, L., Fei, L., Chen, L., Fu-xin D., and Nai-ju, Y. (1999). Isolation and Characterization of C-phycocyanin from *Spirulina Platensis*. *Chemical Research in Chinese Universities*. 15(1): 35-38.

Grossman, A. R., and Kehoe, D. M. (1997) Phosphorelay control of Phycobilisome biogenesis during complementary chromatic adaptation. *Photosynthesis Research*. 53(2): 95-108.

Guillard, R.R.L. (1973). *Methods for microflagellates and nannoplankton*. In, Stein J.R. (ed), *Handbook of Phycological Methods V. 1*, Cambridge: Cambridge University Press.

MacColl, W. (1998). *Cyanobacterial Phycobillisome*. Stuctural biology. 124: 311-334.

Mary Leema, J. T., Kirubagaran, R., Vinithkumar, N. V., Dheenan, P. S., and Karthikayulu, S. 2010. High value pigment production from *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultured in seawater. *Bioresource Technology*. 101(23): 9221-9227.

Muller, H., Bub, A., Watzl, B. and Rechkemmer, G. (1999). Plasma concentrations of carotenoids inhealthy volunteers after intervention with carotenoid-rich food. *Eur. L. Nutr.* 38(1): 35-44.

Nomsawai, P. (1998). *A genetic study on the light regulation of Phycocyanin biosynthesis in Spirulina platensis Cl.* Doctoral Dissertation, School of Bioresources and Technology King Mongkut's University of technology Thonburi, Bangkok. 203 pp.

Pandey, J.P. and Tiwari, A. (2010). Optimization of biomass production by *Spirulina platensis*. *J. Algal Biomass Utln*. 1(2): 20-32.

Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., and Ghosh, P.K. (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*. 40: 248-255.

Patel, A., Mishra, S., and Ghosh, P. K. (2006). Antioxidant potential of C-Phycocyanin isolated from cyanobacterial species *Lynbgya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 43:25-31.

Rachen, D. (2009). Extraction and stability of phycocyanin from *Spirulina* sp. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of

Science in Food Technology. Suranaree University of Technology. Nakhon Ratchasima. 13 p.

Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Publishing Company, 566 pp.

Sarada, R., Pillai, M.G. and Ravishankar, G.A. (1999). Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*. (34): 795–801.

Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U., and Maddamwar, D. (2006). Extraction purification characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctula* isolated from the rocky shores of Bet Dwarka Gujarat India. *Process Biochemistry*. 41: 2017-2023.

Van-Liere, L. and Mur, L. R. (1979). Growth kinetics of *Oscillatoria agardhii* Gomont in continuous culture, limited in its growth by the light energy supply. *Journal of General Microbiology*. 115: l 53- 160.

Venkatesan, S., Pugazhendy, K., Sangeetha, D., Vasantharaja, C., Prabakaran, S., and Meenambal, M. (2012). Fourier transforms infrared spectra (FT-IR) Spectoroscopic Analysis of *Spirulina.* International *Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*. 3(4): 969-972.

Wansanit, P.(2006). *Controlling of Toxic Alga, Microcystis aeruginosa by Bioactive Compounds from Blue Green Algae. Environmental Science.* College of Environ. Kasetsart University. Bangkok.

ภาคผนวก

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	4.0233	3	.16563	.09563
	VAR00002	3.4467	3	.33292	.19221

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	3	-.382	.750

Paired Samples Test

		Paired Differences		
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.57667	.42477	.24524

Paired Samples Test

		Paired Differences	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-.47853	1.63186

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	2.351	2	.143

ผนวก ก การวิเคราะห์ผลทางสถิติ T-Test ด้วยโปรแกรม SPSS น้ำหนักเปียกต่อลิตรที่เปรียบเทียบระหว่างสภาวะแสงธรรมชาติกับสภาวะแสงจากหลอดไฟ

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	3.6905	3	1.10095	.63563
	VAR00004	1.0538	3	.25557	.14755

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00004	3	-.069	.956

Paired Samples Test

		Paired Differences		
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001 - VAR00004	2.63677	1.14719	.66233

Paired Samples Test

		Paired Differences	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00004	-.21302	5.48656

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	VAR00001 - VAR00004	3.981	2	.058

ผนวก ข การวิเคราะห์ผลทางสถิติ T-Test ด้วยโปรแกรม SPSS ผลของไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) ที่เปรียบเทียบระหว่างสภาวะแสงธรรมชาติกับสภาวะแสงจากหลอดไฟ

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	.8136	3	.10311	.05953
	VAR00002	.3254	3	.06352	.03667

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	3	-.234	.849

Paired Samples Test

		Paired Differences		
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.48817	.13318	.07689

Paired Samples Test

		Paired Differences	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.15734	.81900

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	6.349	2	.024

ผนวก ค การวิเคราะห์ผลทางสถิติ T-Test ด้วยโปรแกรม SPSS ผลของอัลโลไฟโคไซยานินที่เปรียบเทียบระหว่างสภาวะแสงธรรมชาติกับสภาวะแสงจากหลอดไฟ

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	.0778	3	.04146	.02394
	VAR00004	.0365	3	.05724	.03305

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00004	3	.031	.980

Paired Samples Test

		Paired Differences		
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001 - VAR00004	.04133	.06963	.04020

Paired Samples Test

		Paired Differences	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00004	-.13164	.21431

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	VAR00001 - VAR00004	1.028	2	.412

ผนวก ง การวิเคราะห์ผลทางสถิติ T-Test ด้วยโปรแกรม SPSS ผลของไฟโคอิริทรินที่เปรียบเทียบระหว่างสภาวะแสงธรรมชาติกับสภาวะแสงจากหลอดไฟ

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00003	.0030	3	.00015	.00009
	VAR00004	.0016	3	.00026	.00015

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00003 & VAR00004	3	.000	1.000

Paired Samples Test

		Paired Differences		
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00003 - VAR00004	.00137	.00031	.00018

Paired Samples Test

		Paired Differences	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
Pair 1	VAR00003 - VAR00004	.00061	.00213

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	VAR00003 - VAR00004	7.748	2	.016

ผนวก จ การวิเคราะห์ผลทางสถิติ T-Test ด้วยโปรแกรม SPSS การแช่แข็งสารสกัดไฟโคไซยานินเปรียบเทียบระหว่างสภาวะแสงธรรมชาติกับสภาวะแสงจากหลอดไฟ

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	1.8933	3	.06429	.03712
	VAR00002	1.6633	3	.00577	.00333

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	3	.629	.567

Paired Samples Test

		Paired Differences		
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.23000	.06083	.03512

Paired Samples Test

		Paired Differences	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.07890	.38110

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	6.549	2	.023

ผนวก ฉ การวิเคราะห์ผลทางสถิติ T-Test ด้วยโปรแกรม SPSS น้ำหนักเปียกต่อลิตรที่เปรียบเทียบระหว่างสภาวะแสงธรรมชาติกับสภาวะแสงจากหลอดไฟ

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	.4720	3	.15796	.09120
	VAR00002	.1745	3	.06629	.03827

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	3	.700	.506

Paired Samples Test

		Paired Differences		
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.29757	.12115	.06995

Paired Samples Test

		Paired Differences	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-.00339	.59852

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	4.254	2	.051

ผนวก ช การวิเคราะห์ผลทางสถิติ T-Test ด้วยโปรแกรม SPSS ผลของไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) ที่เปรียบเทียบระหว่างสภาวะแสงธรรมชาติกับสภาวะแสงจากหลอดไฟ

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	.2161	3	.03680	.02125
	VAR00002	.0506	3	.03583	.02069

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	3	.260	.833

Paired Samples Test

		Paired Differences		
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.16550	.04420	.02552

Paired Samples Test

		Paired Differences	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.05570	.27530

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	6.485	2	.023

ผนวก ซ การวิเคราะห์ผลทางสถิติ T-Test ด้วยโปรแกรม SPSS ผลของอัลโลไฟโคไซยานินที่เปรียบเทียบระหว่างสภาวะแสงธรรมชาติกับสภาวะแสงจากหลอดไฟ

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	.6319	3	.05627	.03249
	VAR00002	.4785	3	.03909	.02257

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	3	.438	.711

Paired Samples Test

		Paired Differences		
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.15337	.05259	.03036

Paired Samples Test

		Paired Differences	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.02274	.28400

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	5.052	2	.037

ผนวก ณ การวิเคราะห์ผลทางสถิติ T-Test ด้วยโปรแกรม SPSS ผลของไฟโคอิริทรินที่เปรียบเทียบระหว่างสภาวะแสงธรรมชาติกับสภาวะแสงจากหลอดไฟ

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	.0069	3	.00090	.00052
	VAR00002	.0058	3	.00067	.00038

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	3	-.901	.285

Paired Samples Test

		Paired Differences		
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.00113	.00153	.00088

Paired Samples Test

		Paired Differences	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-.00266	.00493

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	1.285	2	.327

ผนวก ญ การวิเคราะห์ผลทางสถิติ T-Test ด้วยโปรแกรม SPSS การแช่แข็งสารสกัดไฟโคไซยานินเปรียบเทียบระหว่างสภาวะแสงธรรมชาติกับสภาวะแสงจากหลอดไฟ

Descriptives

VAR00002

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
1.00		3	12.0709	.48923	.28246
2.00		3	5.6849	.19472	.11242
3.00		3	10.3313	1.00582	.58071
4.00		3	4.9771	.01634	.00943
Total		12	8.2661	3.18011	.91802
Model	Fixed Effects			.56772	.16389
	Random Effects				1.73738

Descriptives

VAR00002

		95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
		Lower Bound	Upper Bound			
1.00		10.8556	13.2862	11.56	12.54	
2.00		5.2012	6.1687	5.46	5.83	
3.00		7.8327	12.8299	9.23	11.19	
4.00		4.9365	5.0177	4.97	5.00	
Total		6.2455	10.2866	4.97	12.54	
Model	Fixed Effects	7.8882	8.6440			
	Random Effects	2.7370	13.7952			11.96653

Test of Homogeneity of Variances

VAR00002

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.414	3	8	.041

ANOVA

VAR00002

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	108.666	3	36.222	112.385	.000
Within Groups	2.578	8	.322		
Total	111.244	11			

Robust Tests of Equality of Means

VAR00002

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	179.599	3	3.352	.000
Brown-Forsythe	112.385	3	3.072	.001

a. Asymptotically F distributed.

Homogeneous Subsets

VAR00002

	VAR00001	N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
Duncan[a]	4.00	3	4.9771		
	2.00	3	5.6849		
	3.00	3		10.3313	
	1.00	3			12.0709
	Sig.		.165	1.000	1.000

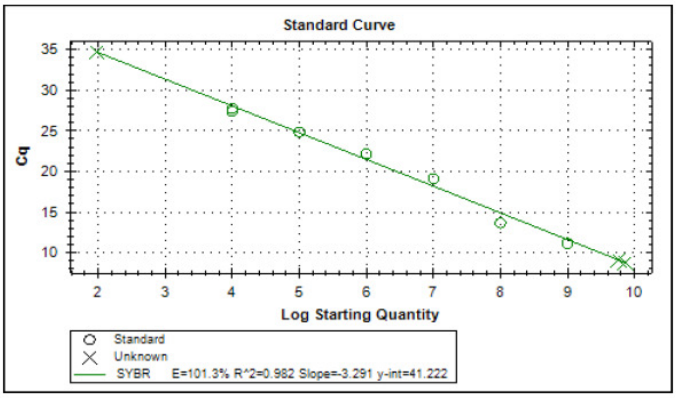
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ผนวก ฎ การวิเคราะห์ผลทางสถิติ ONE WAY anova ด้วยโปรแกรม SPSS การเปรียบเทียบน้ำหนักของสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ระหว่างสภาวะแสงธรรมชาติกับสภาวะแสงจากหลอดไฟ

Real time PCCA

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A01	SYBR	PCNA	Unkn	in1	15.76
A02	SYBR	PCNA	Unkn	in2	17.41
A03	SYBR	PCNA	Unkn	in3	16.68
A04	SYBR	PCNA	Unkn	out1	19.07
A05	SYBR	PCNA	Unkn	out2	18.74
A06	SYBR	PCNA	Unkn	out3	18.39
B01	SYBR	PCNA	Unkn	in1	16.50
B02	SYBR	PCNA	Unkn	in2	18.02
B03	SYBR	PCNA	Unkn	in3	17.55
B04	SYBR	PCNA	Unkn	out1	19.53
B05	SYBR	PCNA	Unkn	out2	19.88
B06	SYBR	PCNA	Unkn	out3	19.49



	sample	Cq	PCCA	16s rRNA	Target/ref	group
x=(y-c)/	in1	15.75718	54665689	461673.5	118.408	
	in2	17.41344	17157161	446754.7	38.404	1
	in3	16.67654	28731547	549618.6	52.2754	1
	in1	16.4986	32540779	550264.3	59.1366	1
	in2	18.02272	11202404	473552.5	23.6561	1
	in3	17.54531	15644952	351143.5	44.5543	1
	out1	19.0663	5397714	323512.9	16.6847	2
	out2	18.73784	6792281	406546.2	16.7073	2
	out3	18.38507	8693717	399483.3	21.7624	2
	out1	19.52847	3906387	127107.6	30.7329	2
	out2	19.87586	3063496	198480.2	15.4348	2
	out3	19.48853	4017093	274171.4	14.6518	2

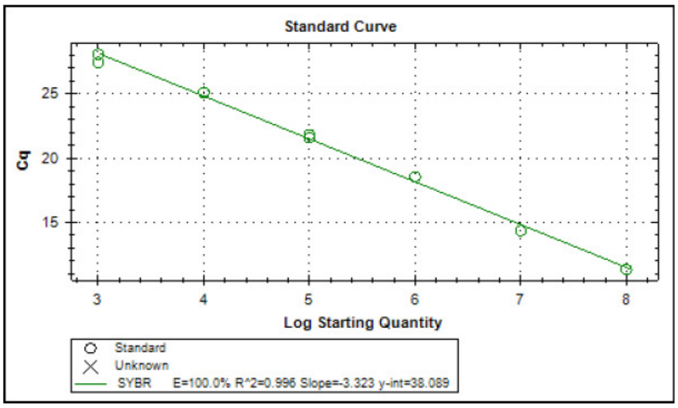
Group Statistics						
	GR	N	Mean	Std. Deviat	Std. Error Mean	
RATIO	1	5	43.60529	13.62276	6.09228	
	2	5	17.04818	2.775706	1.24133	

Independent Samples Test												
		Levene's Test for Equa		t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Diffe	Std. Error D	95% Confidence Interval of the Difference			
									Lower	Upper		
RATIO	Equal var	5.360393	0.049283	4.271374	8	0.00271911	26.55711	6.217463	12.2196	40.8946		
	Equal variances not assumed			4.271374	4.33156	0.01088535	26.55711	6.217463	9.80349	43.3107		

ผนวก ฎ ข้อมูลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน PCC-α ในสาหร่าย *S. platensis* ด้วยวิธี Quantitative real-time PCR และการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

PCCB

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
C01	SYBR	PCNB	Unkn	in1	23.58
C02	SYBR	PCNB	Unkn	in2	24.38
C03	SYBR	PCNB	Unkn	in3	24.06
C04	SYBR	PCNB	Unkn	out1	25.58
C05	SYBR	PCNB	Unkn	out2	26.47
C06	SYBR	PCNB	Unkn	out3	26.50
D01	SYBR	PCNB	Unkn	in1	24.02
D02	SYBR	PCNB	Unkn	in2	24.60
D03	SYBR	PCNB	Unkn	in3	25.59
D04	SYBR	PCNB	Unkn	out1	26.16
D05	SYBR	PCNB	Unkn	out2	25.76
D06	SYBR	PCNB	Unkn	out3	25.31



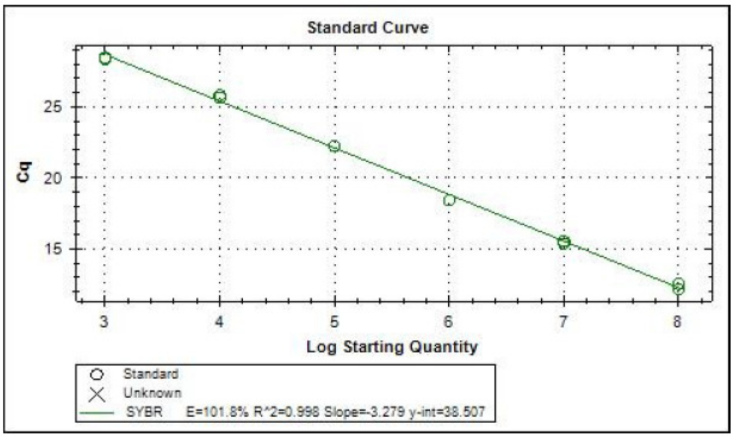
	sample		PCNB	16s rRNA	Target/re	group
x=(y-c)/m	in1	23.58111	23222.09	461673.5	0.0503	1
	in2	24.38057	13344.96	446754.7	0.02987	1
	in3	24.06478	16609.25	549618.6	0.03022	1
	in1	24.01763	17160.81	550264.3	0.03119	1
	in2	24.60426	11428.8	473552.5	0.02413	1
	in3	25.59003	5772.328	351143.5	0.01644	1
	out1	26.15604	3899.607	323512.9	0.01205	2
	out2	25.76126	5126.526	406546.2	0.01261	2
	out3	25.30772	7019.516	399483.3	0.01757	2
	out1	25.58103	5808.432	127107.6	0.0457	2
	out2	26.47433	3127.777	198480.2	0.01576	2
	out3	26.49965	3073.378	274171.4	0.01121	2

Group Statistics						
	GR	N	Mean	Std. Devia	Std. Error Mean	
RATIO	1	6	0.03035	0.011248	0.00459	
	2	6	0.019167	0.013224	0.0054	

Independent Samples Test												
		Levene's Test for Equa		t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tai	Mean Diffe	Std. Error	95% Confidence Interval of the Difference			
									Lower	Upper		
RATIO	Equal vai	0.146254	0.710143	1.577912	10	0.14567	0.011183	0.00709	-0.004608	0.02698		
	Equal variances not assumed			1.577912	9.74916	0.14645	0.011183	0.00709	-0.004664	0.02703		

ผนวก ฐ ข้อมูลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน PCC-β ในสาหร่าย *S. platensis* ด้วยวิธี Quantitative real-time PCR และการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
E01	SYBR	16s	ref	Sp.in1	19.93365
E02	SYBR	16s	ref	Sp.in1	19.98042
E03	SYBR	16s	ref	Sp.in1	19.68534
E04	SYBR	16s	ref	Sp.in2	19.68367
E05	SYBR	16s	ref	Sp.in2	19.89747
E06	SYBR	16s	ref	Sp.in2	20.32336
F01	SYBR	16s	ref	Sp.out1	20.44007
F02	SYBR	16s	ref	Sp.out1	20.11473
F03	SYBR	16s	ref	Sp.out1	20.13969
F04	SYBR	16s	ref	Sp.out3	21.77042
F05	SYBR	16s	ref	Sp.out3	21.13578
F06	SYBR	16s	ref	Sp.out3	20.67573



16s	sample	Cq	
x=(y-c)/m	in1	19.93365	461673.5
	in2	19.98042	446754.7
	in3	19.68534	549618.6
	in1	19.68367	550264.3
	in2	19.89747	473552.5
	in3	20.32336	351143.5
	out1	20.44007	323512.9
	out2	20.11473	406546.2
	out3	20.13969	399483.3
	out1	21.77042	127107.6
	out2	21.13578	198480.2
	out3	20.67573	274171.4

ผนวก ฑ ข้อมูลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน 16s rDNA ในสาหร่าย *S. platensis* ด้วยวิธี Quantitative real-time PCR

ประวัติผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ

หน่วยงาน คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.โขมง อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 22170
โทรศัพท์/โทรสาร 039-310000

2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลี ไพบูลย์กิจกุล

หน่วยงาน คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.โขมง อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 22170
โทรศัพท์/โทรสาร 039-310000

3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มะลิวัลย์ คุตะโค

หน่วยงาน คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.โขมง อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 22170
โทรศัพท์/โทรสาร 039-310000

4. นางสาวกาญจนา สิทธิขันแก้ว

หน่วยงาน ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำ
อาคาร สวทช กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 73/1
ถนนพระรามที่ 6 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์/โทรสาร 0-2644-8150-54

5. ดร. วิรักษ์ วิสุทธิผล (ที่ปรึกษา)

หน่วยงาน ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำ
อาคาร สวทช กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 73/1
ถนนพระรามที่ 6 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์/โทรสาร 0-2644-8150-54