



การผลิตและการศึกษาสมบัติทนอุณหภูมิของซี-ไฟโคไซยานิน
จากไซยาโนแบคทีเรียที่แยกจากบ่อน้ำพุร้อน

โดย

นางสาวคัทติยา สุวรรณมณี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การผลิตและการศึกษาสมบัติทนอุณหภูมิของซี-ไฟโคไซยานิน
จากไซยาโนแบคทีเรียที่แยกจากบ่อน้ำพุร้อน

โดย

นางสาวคัทติยา สุวรรณมณี



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์



PRODUCTION AND DETERMINATION OF THERMOTOLERANT
PROPERTIES OF C-PHYCOCYANIN ISOLATED
FROM HOT SPRING CYANOBACTERIUM

BY

MISS KATTIYA SUWANMANEE



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

THAMMASAT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2015

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวศัทธิตา สุวรรณมณี

เรื่อง

การผลิตและการศึกษาสมบัติทนอุณหภูมิของซี-ไฟโคโซยานิน
จากไซยาโนแบคทีเรียที่แยกจากบ่อน้ำพุร้อน

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

เมื่อ วันที่ 20 มิถุนายน พ.ศ. 2559

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

คณิตโชต ปิยพิทยานันต์

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

เนตรชนุตตา เวชชีวันต์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

สุเปญญา จิตตพันธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเปญญา จิตตพันธ์)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

จันทนา ไพโรจน์

(ดร. จันทนา ไพโรจน์)

คณบดี

ปกรณ์ เสริมสุข

(รองศาสตราจารย์ ปกรณ์ เสริมสุข)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและการศึกษาสมบัติทนอุณหภูมิของ ซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่แยกจาก บ่อน้ำพุร้อน
ชื่อผู้เขียน	นางสาวศัทธิตยา สุวรรณมณี
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุปัญญา จิตตพันธ์
ปีการศึกษา	2558

บทคัดย่อ

ซี-ไฟโคไซยานินเป็นสารสีธรรมชาติในกลุ่มโปรตีนที่มีการประยุกต์อย่างกว้างขวางในทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อย่างไรก็ตาม ซี-ไฟโคไซยานินมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในกระบวนการที่ใช้อุณหภูมิต่ำเท่านั้น เนื่องจากซี-ไฟโคไซยานินมีความเสถียรต่ำที่อุณหภูมิสูง ดังนั้น การค้นหาซี-ไฟโคไซยานินที่คงตัวที่อุณหภูมิสูงจึงจำเป็นต้องการเพิ่มโอกาสในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่หลากหลายขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง และใช้เป็นแหล่งของซี-ไฟโคไซยานินที่ทนอุณหภูมิสูงได้ โดยแผ่นไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาได้จากการสุมเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำพุร้อน 4 แห่งในจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้แสงต่อเนื่องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำตัวอย่างแผ่นสาหร่ายมาบดและเกลี่ยบนอาหารแข็งสูตร BG-11 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยให้แสงต่อเนื่อง จากการศึกษาพบไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกัน 5 สายพันธุ์ โดย *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 เป็นสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตได้ดี จึงนำไปศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตในอาหารสูตร BG-11 ที่เติม NaNO_3 ปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่า 100 รอบต่อนาที โดยให้แสงต่อเนื่อง เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เป็นเวลา 44 วัน แล้วนำไปวัดการเติบโตในรูปของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และพบความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 6.98 ในวันที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.155 ต่อวัน จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็น

เห็นว่า TUBT-T01 เป็นตัวเลือกที่สำคัญสำหรับการพัฒนากระบวนการผลิตไฟโคไซยานินทรร้อนต่อไป

เพื่อเปรียบเทียบซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำพุร้อน และไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีลักษณะพื้นฐานทางวิทยาใกล้เคียงกันได้แก่ *S. cedrorum* TISTR 8589 จึงทำการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง ในขวดปริมาตร 2 ลิตร เพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์สำหรับสกัดซี-ไฟโคไซยานินสำหรับใช้ทดสอบสมบัติทรร้อนของซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์พบว่า สายพันธุ์ TUBT-T01 มีปริมาณของเซลล์เปียกและเซลล์แห้งเท่ากับ 0.89 และ 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ TISTR 8589 ที่สามารถเก็บเกี่ยวของเซลล์เปียกและเซลล์แห้งเท่ากับ 6.67 และ 1.00 กรัมต่อลิตร

ส่วนของการเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบ เริ่มจากการทดสอบสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน ซึ่งได้แก่ น้ำกลั่น โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (แปรผันค่าพีเอชที่พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, และ 8.0) และโซเดียมคลอไรด์ (แปรผันความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, และ 250 มิลลิโมลาร์) พบว่าสารละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 คือการใช้น้ำกลั่นสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ให้สารสกัดหยาบที่มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินเท่ากับ 41.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และในส่วนของสายพันธุ์ TISTR 8589 พบว่าสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดคือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 mM ที่พีเอช 7.0 สกัดเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งให้สารสกัดหยาบของซี-ไฟโคไซยานินเท่ากับ 26.4 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง เมื่อทำการขยายขนาดการสกัดเพื่อเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ในอัตราส่วน 1: 50 ในการสกัดผลการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 มีความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินเท่ากับ 30.28 และ 15.88 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ตามลำดับ และมีค่าความบริสุทธิ์เท่ากับ 0.88 และ 0.47 ตามลำดับ

ส่วนของการเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ ขั้นตอนหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินของตัวแลกเปลี่ยนประจุ โดยใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ Streamline Direct HST1 ต่อสารสกัดหยาบซี-ไฟโคไซยานินในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ศึกษาที่พีเอช 4.0 ถึง 7.0 เมื่อทำการศึกษาซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 (TC-PC) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานิน คือ พีเอช 5.0 ดูดซับซี-ไฟโคไซยานินได้ถึง 90.58 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการขยายขนาดการดูดซับจาก 5 มิลลิลิตร เป็น 250 มิลลิลิตร พบว่า มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกดูดซับร้อยละ 83.19 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถเพิ่มความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินได้ถึง 3.71 เท่า มีผลได้จากการชะเท่ากับ 74.1 เปอร์เซ็นต์ และมีความบริสุทธิ์สูงสุดเท่ากับ 1.96 และเมื่อทำการศึกษาซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TISTR 8589 (SC-PC) พบว่า สภาวะที่เหมาะสม

สำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินคือ ที่พีเอช 4.5 สามารถดูดซับซี-ไฟโคไซยานินได้ 49.48 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการขยายขนาดการดูดซับจาก 5 มิลลิลิตร เป็น 250 มิลลิลิตร พบว่า มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกดูดซับ ร้อยละ 74.87 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกดูดซับ 4.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวดูดซับ เพิ่มความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินได้ 2.50 เท่า และให้ค่าผลได้เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ และมีบริสุทธิ์สูงสุดเท่ากับ 2.15

และส่วนสุดท้ายการศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน พบว่า อุณหภูมิและพีเอชมีบทบาทสำคัญต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน โดยส่งผลให้ซี-ไฟโคไซยานินมีค่าคงที่อัตราการสลายตัวเพิ่มขึ้นและค่าครึ่งชีวิตลดลง พีเอชทำให้ซี-ไฟโคไซยานินมีความเสถียรสูงสุด คือ พีเอช 5.0 ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินคงเหลือสูงถึง 97.45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งมีเสถียรภาพมากกว่า SC-PC ที่มีความเสถียรสูงสุดที่พีเอช 7.0 และมีความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินคงเหลือ 74.54 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: การคัดแยก, ไชยานโนแบคทีเรีย, ซี-ไฟโคไซยานิน, สมบัติทนอุณหภูมิ, บ่อน้ำพุร้อน, จังหวัดสุราษฎร์ธานี

Thesis Title	Production and Determination of Thermotolerant Properties of C-phycoerythrin Isolated from Hot Spring Cyanobacterium
Author	Miss Kattiya Suwanmanee
Degree	Master of Science
Department/Faculty/University	Department of Biotechnology Faculty of Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Assistant Professor Theppanya Charoenrat, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Assistant Professor Supenya Chittapun, Ph.D.
Academic Years	2015

ABSTRACT

Phycocyanin, a natural colorant protein, has been widely applied in biotechnological aspects, e.g. foods and cosmetics industries. However, phycocyanin is limited to apply only in the process at low temperature because it has poor stability under high temperature. Thus, discovery of thermotolerant phycocyanin is needed to increase its application in various industries. Therefore, this work was aimed to isolate and cultivate and use the isolated thermophilic cyanobacteria as a new source of thermotolerant phycocyanin. Cyanobacteria mats were randomly collected from 4 hot springs in Surat Thani Province and cultured in BG-11 medium at 45°C under continuous light for a week. Then, the mats were ground and then spreaded on BG-11 agar and incubated at 50°C under continuous lighting condition. From the morphological isolation, five cyanobacteria were obtained. The dominant strain that exhibit fast growing, which was named as *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 from morphological classification, was selected to be cultured in BG-11 liquid medium supplemented with 3 g L⁻¹ NaNO₃ for 44 days at 50°C with shaking for 100 rpm under continuous lighting condition for growth profile investigation. For the measurement, the samples were taken every 2 day. It was measured the growth by

using spectrophotometer at 730 nm. The maximum cell density from OD_{730} measurement was found to be 6.98 at 36 days of cultivation. In addition, the specific growth rate of the cyanobacteria was calculated to be 0.155 d^{-1} . From the results, it was indicated that *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 is a promising candidate for further process of thermotolerant phycocyanin production.

In order to compare the properties of C-phycocyanin extracted from TUBT-T01 (TC-PC) that was isolated from the hot spring with C-phycocyanin extracted from *Synechococcus cedrorum* TISTR 8589 (SC-PC) that have the morphology similar to TUBT-T01, both cyanobacterial strains were cultured in 2 L photo-bioreactor to increase C-PC product of both strains for the study of their thermotolerant properties. From the cultivations, TUBT-T01 was found to have wet cell weight and dry cell weight as 0.89 and 0.25 g/L, respectively. For TISTR 8589, it was found to have wet cell weight and dry cell weight as 6.67 and 1.00 g L^{-1} , respectively.

In the preparation of crude C-PCs, the extraction solutions were varied to optimize the solution for C-PC extraction. Both cyanobacterial strains were extracted by using distilled water, 50 mM potassium phosphate buffer (varied the pH as 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, and 8.0) and sodium chloride (varied the concentration as 50, 100, 150, 200, and 250 mM) were used to extract C-PCs. For extraction of C-PC from TUBT-T01, the results shown that the suitable extraction condition was extraction in distilled water for 48 h at 4°C . This extraction provided extraction yield as $41.0 \text{ mg g}_{\text{DCW}}^{-1}$. Meanwhile, the suitable condition for extraction of C-PC from TISTR 8589 was extraction in 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 for 8 h at 4°C . It resulted in $26.4 \text{ mg g}_{\text{DCW}}^{-1}$ of extraction yield. When increase the extraction capacity, 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 was used with the ratio of 1:50 for extraction C-PCs from TUBT-T01 and TISTR 8589. The extraction yields were found to be 30.28 and $15.88 \text{ mg g}_{\text{DCW}}^{-1}$, respectively. For the purity, it was determined as 0.88 and 0.47, respectively.

For primary purification of C-PCs, The adsorption buffers were varied the pH from 4.0 to 7.0 in order to optimize the adsorption on anion-exchange absorbent (Streamline Direct HST1). For the adsorption, the ratio between absorbent and C-PC solution was 1: 10. It was found that the suitable pH for TC-PC adsorption was 5.0.

This condition could be used to absorb TC-PC up to 90.58%. When increase the absorption volume from 5 mL into 250 mL, the absorption was found to be 83.19%. This absorption could increase TC-PC concentration up to 3.71 times. In addition, the elution yield and the purity were determined to be 74.1% and 1.96, respectively. For SC-PC absorption, the suitable pH for the adsorption was 4.5 which could be used to absorb SC-PC up to 49.48 %. When increase the absorption volume from 5 mL into 250 mL, the absorption was found to be 74.87%. This absorption could increase SC-PC concentration up to 2.50 times. In addition, the elution yield and the purity were determined to be 50.00% and 2.15, respectively.

In the last experiment, the stability of C-PCs on pH and temperature were examined. The results revealed that pH and temperature influenced on C-PC stability by increasing degradation rate of C-PCs and decreasing half-life of C-PCs. The most stable pH of TC-PC was 5.0 which the remaining of TC-PC was found to be 97.45% when was incubated at 50°C for 4 h. The stability of TC-PC was higher than SC-PC that the most stable pH was found to be 7.0 and the remaining of SC-PC was 97.45%.

Keywords: isolation, cyanobacteria, C-phycoyanin, thermotolerant properties, hot spring, Surat Thani Province

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุปัญญา จิตตพันธ์ กรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษา กรุณาให้ความรู้ ประสบการณ์ คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ ความเอื้อเฟื้อและการดูแลเอาใจใส่ ตลอดมาจนจบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ ดร. ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อเสนอแนะต่างๆ ทั้งการเล่าเรียน และการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ดร. อาภารัตน์ มหาพันธ์ คณะกรรมการสอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะต่างๆ ตลอดจนการให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *S. cedrorum* TISTR 8589 จากฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (ฟวช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. จันทนา ไพโรบูรณ์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะต่างๆ

ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และความช่วยเหลือต่างๆ

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ รวมทั้งทุกๆ ท่านที่คอยให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจ ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยสนับสนุนเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา ให้ความใส่ใจดูแล และข้อคิดต่างๆ

และสุดท้ายขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัย กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ประเภทนักศึกษา) ฉบับที่ ทน 25/2558

นางสาวคัทติยา สุวรรณมณี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญตาราง	(13)
สารบัญภาพ	(15)
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	(18)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ไชยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)	3
2.1.1 ลักษณะทั่วไปของไชยาโนแบคทีเรีย	4
2.1.1.1 องค์ประกอบของเซลล์	4
2.1.1.2 ลักษณะรูปร่างและการแตกแขนง	5
2.1.1.3 การเคลื่อนที่	6
2.1.1.4 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ	6
2.1.1.5 ลักษณะพิเศษ	7
2.1.1.6 การจัดจำแนกไชยาโนแบคทีเรีย	8

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.1.1.7 การใช้ประโยชน์จากไซยาโนแบคทีเรีย	9
2.1.1.8 ไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (Thermophilic cyanobacteria)	10
2.2 ซี-ไฟโคไซยานิน (C-Phycocyanin)	11
2.2.1 ซี-ไฟโคไซยานิน (C-Phycocyanin)	12
2.2.2 การสกัดซี-ไฟโคไซยานิน	13
2.2.3 การเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานิน	14
2.2.4 การใช้ประโยชน์จากซี-ไฟโคไซยานิน	14
2.2.5 ข้อจำกัดของซี-ไฟโคไซยานิน	15
2.2.6 การศึกษาซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิสูง	16
2.3 กระบวนการดูดซับแบบแบทช์	17
2.4 น้ำพุร้อน	17
2.4.1 แบ่งตามลักษณะกายภาพ	17
2.4.1.1 น้ำพุร้อนไกเซอร์ (Geyser)	17
2.4.1.2 น้ำพุร้อน (Hot Spring)	18
2.4.1.3 บ่อไอเดือดหรือพุก๊าซ (Fumarole)	18
2.4.1.4 บ่อโคลนเดือดหรือพุโคลน (Mud Pot)	18
2.4.2 แบ่งตามปริมาณแร่ธาตุที่ละลายในน้ำ	19
2.4.2.1 น้ำพุร้อนทั่วไป (Simple Springs)	19
2.4.2.2 น้ำพุร้อนคาร์บอเนต (Carbonate Springs)	19
2.4.2.3 น้ำพุร้อนเกลือหรือน้ำพุร้อนน้ำเค็ม (Salt Springs)	19
2.4.2.4 น้ำพุร้อนแอลคาไล (Alkaline Springs)	19
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	20
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ	20
3.2 การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากบ่อน้ำพุร้อน	20

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.2.1 การเก็บตัวอย่าง	20
3.2.1.1 พื้นที่เก็บตัวอย่าง	20
3.2.1.2 การเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน	23
3.2.2 การแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย	24
3.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย	24
3.3.1 การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณไซยาโนแบคทีเรียที่ คัดแยกได้จากน้ำพุร้อนเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ	24
3.3.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่ คัดแยกได้จากน้ำพุร้อน	24
3.4 การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเชื้อของไซยาโนแบคทีเรีย	25
3.4.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์	25
3.4.2 การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย	25
3.5 การเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบ	25
3.5.1 ศึกษาสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน	25
3.5.2 การเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบ	26
3.6 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ	26
3.6.1 การหาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานิน ของตัวแลกเปลี่ยนประจุ	26
3.6.1.1 การเตรียมตัวกลางดูดซับ	26
3.6.1.2 การเตรียมสารละลายซี-ไฟโคไซยานิน	27
3.6.1.3 การหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับ	27
3.6.2 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ	27
3.7 การศึกษาสมบัติทนร้อนของซี-ไฟโคไซยานิน	27
 บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	 30
4.1 การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากบ่อน้ำพุร้อน	30

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย	33
4.3 การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเชื้อของไซยาโนแบคทีเรีย	34
4.4 การเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบ	35
4.4.1 ศึกษาสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน	35
4.4.1.1 ศึกษาสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก <i>Thermosynechococcus</i> sp. TUBT-T01	36
4.4.1.2 ศึกษาสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก <i>Synechococcus cedrorum</i> TISTR 8589	38
4.4.2 การเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบ	41
4.5 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ	42
4.5.1 การหาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานิน ของตัวแลกเปลี่ยนประจุ	42
4.5.1.1 การหาพีเอชที่เหมาะสมของตัวแลกเปลี่ยนประจุสำหรับการดูดซับ ซี-ไฟโคไซยานินจาก <i>Thermosynechococcus</i> sp. TUBT-T01	42
4.5.1.2 การหาพีเอชที่เหมาะสมของตัวแลกเปลี่ยนประจุสำหรับการดูดซับ ซี-ไฟโคไซยานินจาก <i>Synechococcus cedrorum</i> TISTR 8589	44
4.5.2 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ	45
4.5.2.1 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินจาก <i>Thermosynechococcus</i> sp. TUBT-T01 เข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ	45
4.5.2.2 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินจาก <i>Synechococcus cedrorum</i> TISTR 8589 เข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ	48
4.6 การศึกษาสมบัติความร้อนของซี-ไฟโคไซยานิน	52
4.6.1 ศึกษาผลของพีเอชและความร้อนที่มีต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน ที่ได้จาก <i>Thermosynechococcus</i> sp. TUBT-T01	52
4.6.2 ศึกษาผลของพีเอชและความร้อนที่มีต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน ที่ได้จาก <i>S. cedrorum</i> TISTR 8589	56

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	61
5.1 การคัดแยกและเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน จังหวัดสุราษฎร์ธานี	61
5.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของ <i>Thermosynechococcus</i> sp. TUBT-T01	61
5.3 การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเชื้อของไซยาโนแบคทีเรีย	61
5.4 การเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบ	62
5.5 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ	62
5.6 การศึกษาสมบัติทนร้อนของซี-ไฟโคไซยานิน	63
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	63
รายการอ้างอิง	64
ภาคผนวก	69
ภาคผนวก ก	70
ภาคผนวก ข	73
ประวัติผู้เขียน	92

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3-1 แหล่งน้ำพุร้อน 8 แหล่ง ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี	21
4-1 แหล่งน้ำพุร้อน 4 แหล่ง ที่เลือกใช้เป็นแหล่งในการเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี	30
4-2 ผลน้ำหนักเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ TUBT-T01 และ TISTR 8589 จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ปริมาตร 2 ลิตร	35
4-3 การสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ในอัตราส่วน 1: 5	42
4-4 ผลการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ที่พีเอช 5.0	46
4-5 ผลการชะซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ออกจากตัวดูดซับ	47
4-6 สรุปผลการเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01	47
4-7 ผลการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ที่พีเอช 4.5	49
4-8 ผลการชะซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ออกจากตัวดูดซับ	50
4-9 สรุปผลการเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589	51
4-10 เปรียบเทียบความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ศึกษาที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง	54
4-11 ศึกษาค่าคงที่อัตราการสลายตัว ค่าระดับความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าครึ่งชีวิตของ ซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง	55
4-12 ศึกษาค่าคงพารามิเตอร์ต่างๆ จากสมการอาเรเนียส ของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง	56
4-13 เปรียบเทียบความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง	57
4-14 ศึกษาค่าคงที่อัตราการสลายตัว ค่าระดับความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าครึ่งชีวิตของ ซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ที่เวลา 4 ชั่วโมง	58

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4-15 ศึกษาค่าคงพารามิเตอร์ต่างๆ จากสมการอาเรเนียส ของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง	58
4-16 เปรียบเทียบค่าคงที่อัตราการสลายตัว ค่าระดับความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าครึ่งชีวิต ของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียสที่พีเอช 5 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง	59
4-17 เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากสมการอาเรเนียส ของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 5 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง	60

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 องค์ประกอบของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย	5
2-2 ไฟโคบิลิโชมและตำแหน่งยึดจับภายในเซลล์	12
2.3 โครงสร้างของซี-ไฟโคไซยานิน 1 โมโนเมอร์	13
3-1 แผนที่แสดงตำแหน่งบ่อน้ำพุร้อนในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี	22
3-2 ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยในแต่ละเดือนของจังหวัดสุราษฎร์ธานีปี พ.ศ. 2551-2554	23
3-3 ลิแกนด์ของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก Streamline Direct HST1	26
4-1 สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ภาพ ก. และ ภาพ ข. คัดแยกจากเขานางฮี ภาพ ค. คัดแยกจากเขาน้อย ภาพ ง. คัดแยกจากเขาตอก และภาพ จ. คัดแยกจากบ่อกรัง	31
4-2 TUBT-T01 คัดแยกได้จากบ่อกรัง	32
4-3 <i>Thermosynechococcus</i> sp. CL-1 (ก.) TUBT-T01 (ข.)	32
4-4 การเจริญเติบโตของ <i>Thermosynechococcus</i> sp. TUBT-T01	34
4-5 ระบบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง TUBT-T01 เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สำหรับใช้ การสกัดซี-ไฟโคไซยานิน	35
4-6 การศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน TUBT-T01 (น้ำกลั่น และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, และ 8.0) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (0, 8, 16, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง)	37
4-7 การศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน จาก TUBT-T01 (น้ำกลั่น และ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, และ 250 มิลลิโมลาร์) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (0, 8, 16, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง)	37
4-8 การศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน จาก TISTR 8589 (น้ำกลั่น และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, และ 8.0) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (0, 8, 16, 24, และ 48 ชั่วโมง)	39
4-9 การศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 (น้ำกลั่น และ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, และ 250 มิลลิโมลาร์) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (0, 8, 16, 24, และ 48 ชั่วโมง)	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-10 ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 ที่สกัดโดยใช้ น้ำกลั่น โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, และ 250 มิลลิโมลาร์ และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, และ 8.0 (คิดจากค่าเฉลี่ยของเวลาที่ใช้เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 8, 16, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง)	41
4-11 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 ศึกษาที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง	43
4-12 การติดตามการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ Streamline Direct HST1 ด้วย SDS-PAGE เมื่อแถวที่ 1 และ 10 คือ โปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 2, 4, 6, 8, 11, 13 และ 15 คือ สารละลาย เริ่มต้นก่อนการดูดซับที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ตามลำดับ แถวที่ 3, 5, 7, 9, 12, 14, และ 16 คือ สารละลายส่วนใสหลังการดูดซับที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ตามลำดับ	43
4-13 การติดตามการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ Streamline Direct HST1 ด้วย SDS-PAGE เมื่อแถวที่ 1 และ 10 คือโปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 2, 4, 6, 8, 11, 13 และ 15 คือสารละลายเริ่มต้น ก่อนการดูดซับที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ตามลำดับ แถวที่ 3, 5, 7, 9, 12, 14, และ 16 คือสารละลายส่วนใสหลังการดูดซับที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ตามลำดับ	44
4-14 ผลการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ที่พีเอช 5.0 แสดงปริมาณ ซี-ไฟโคไซยานินที่เหลือในสารละลายหลังผ่านการดูดซับที่เวลา 20 นาที	46
4-15 ผลการชะซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ออกจากตัวดูดซับ แสดงปริมาณ ซี-ไฟโคไซยานินในสารละลายที่ชะได้ 5 ครั้ง	47
4-16 ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ที่ชะออกจากตัวดูดซับ โดยที่ 0 คือสารละลายเริ่มต้น และ 1-5 คือ ลำดับครั้งของการชะตามลำดับ	48
4-17 ผลการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ที่พีเอช 5.0 แสดงปริมาณ ซี-ไฟโคไซยานินที่เหลือในสารละลายหลังผ่านการดูดซับที่เวลา 20 นาที	49

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-18 ผลการชะซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ออกจากตัวดูดซับ แสดงปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสารละลายที่ชะได้ 5 ครั้ง	50
4-19 ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ที่ชะออกจากตัวดูดซับ โดยที่ 0 คือ สารละลายเริ่มต้น และ 1-5 คือ ลำดับครั้งของการชะตามลำดับ	51
4-20 ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ที่เวลา 0 ถึง 240 นาที	53
4-21 ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ศึกษาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ที่เวลา 0 ถึง 240 นาที	53
4-22 ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ศึกษาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ที่เวลา 0 ถึง 240 นาที	54
4-23 ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 เก็บตัวอย่างเมื่อเวลาผ่านไป 0 ถึง 240 นาที	57

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์/คำย่อ	คำเต็ม/คำจำกัดความ
μ	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
TC-PC	ซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก <i>Thermosynechococcus</i> sp. TUBT-T01
SC-PC	ซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก <i>Synechococcus cedrorum</i> TISTR 8589
C-PC	ซี-ไฟโคไซยานิน
k_d	ค่าคงที่อัตราการสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานิน
$t_{1/2}$	ค่าครึ่งชีวิต เวลาที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของซี-ไฟโคไซยานินลดลงครึ่งหนึ่ง
C_R	ร้อยละความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่เหลือ

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliprotein) เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ทำหน้าที่รวบรวมพลังงานแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ และส่งไปยังระบบแสงหลักเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ไฟโคบิลิโปรตีนที่รู้จักทั่วไปมี 3 ชนิด คือ แอลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) และไฟโคอีรีทริน (phycoerythrin) โครงสร้างโมโนเมอร์หลักของไฟโคบิลิโปรตีนเหล่านี้ประกอบด้วยโมเลกุลโปรตีน 2 หน่วยย่อย (subunit) คือ หน่วยย่อยแอลฟา (α subunit) และหน่วยย่อยเบต้า (β subunit) และมีกลุ่มบิลินโครโมฟอร์ (bilin chromophore) ที่มีลักษณะการจัดเรียงตัวของพันธะคู่ที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด โมโนเมอร์ของไฟโคไซยานิน ประกอบด้วยโปรตีนแอลฟาซับยูนิตขนาด 17 กิโลดาลตัน และเบต้าซับยูนิต 19.5 กิโลดาลตัน โดยมีบิลินโครโมฟอร์จับกับโปรตีนหน่วยย่อยแอลฟา 1 โมเลกุลที่ตำแหน่ง α 84 และจับกับโปรตีนหน่วยย่อยเบต้า 2 โมเลกุลที่ตำแหน่ง β 84 และ β 154 ตามลำดับ ส่วนใหญ่ไฟโคไซยานินมักอยู่เป็นไตรเมอร์ (trimer) และเฮกซะเมอร์ (hexamer) ไฟโคไซยานินเป็นโปรตีนละลายน้ำ ให้สีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดประมาณ 615 นาโนเมตร ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป โดยไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียเรียก ซี-ไฟโคไซยานิน (Romay และคณะ, 2003)

ปัจจุบันนิยมนำซี-ไฟโคไซยานินมาใช้ในงานเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่าง ๆ เช่น เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ มีการนำซี-ไฟโคไซยานินมาใช้เป็นเครื่องหมายติดฉลากฟลูออเรสเซนต์ ใช้เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ และใช้เป็นสารต้านการอักเสบ (Romay และคณะ, 2003) เป็นต้น ในทางเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรม มีการนำซี-ไฟโคไซยานินมาใช้เป็นสีผสมอาหาร หรือใช้เป็นสีในการผลิตเครื่องสำอาง เป็นต้น (Batita และคณะ, 2006; Arad และ Yaron, 1992) ทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเป็นที่ต้องการของตลาดและมีราคาสูง อย่างไรก็ตาม ซี-ไฟโคไซยานินยังมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุณหภูมิสูงในกระบวนการผลิต เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงซี-ไฟโคไซยานินจะเสื่อมสภาพและสีของซี-ไฟโคไซยานินจะจางลง (Antelo และคณะ, 2008) จึงจัดเป็นข้อจำกัดที่สำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ ฉะนั้นหากสามารถสกัด ซี-ไฟโคไซยานินที่มีสมบัติเสถียรที่อุณหภูมิสูงจะสามารถลดข้อจำกัดดังกล่าว และสามารถนำซี-ไฟโคไซยานินไปใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่าง ๆ ได้มากขึ้น

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และพบแพร่กระจายได้ทุกระบบนิเวศทั้งบนบกและในน้ำ รวมทั้งในระบบนิเวศที่มีสภาพอากาศรุนแรง เช่น บริเวณขั้วโลกที่หนาวเย็นมาก ๆ หรือบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงมาก เช่น น้ำพุร้อน ซึ่งเป็นระบบนิเวศธรรมชาติที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส (ยวดี, 2549) ไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อนส่วนใหญ่เป็นกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic cyanobacteria) ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า ซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงนี้ น่าจะมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่าซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิต่ำ รวมทั้งจากการสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไซยาโนแบคทีเรียในบริเวณน้ำพุร้อนในประเทศไทยนั้น ส่วนใหญ่มุ่งเน้นในการจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ส่วนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกและเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงนั้นยังมีอยู่น้อย และส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในเขตภาคเหนือของประเทศ อีกทั้งยังไม่มีรายงานการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงในประเทศไทย งานวิจัยชิ้นนี้จึงมุ่งเน้นที่จะคัดแยก เพาะเลี้ยง และสกัดซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงจากน้ำพุร้อนในจังหวัดสุราษฎร์ธานี พร้อมทั้งเปรียบเทียบคุณสมบัติของซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงและที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อคัดแยกและเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง จากน้ำพุร้อน ในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี
- 1.2.2 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตซี-ไฟโคไซยานินของไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำพุร้อน ในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี
- 1.2.3 เพื่อเปรียบเทียบสมบัติของซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง และที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงกันที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไชยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไชยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจัดอยู่ในกลุ่ม Division Cyanophyta หรืออาจมีชื่อเรียกเป็นดิวิชันอื่น เช่น Myxophyta, Cyanophyta, Cyanochloronta และ Cyanophycophyta

ไชยาโนแบคทีเรียจัดเป็นพืชชั้นต่ำที่เรียกว่า โปรคาริโอต (prokaryote) ซึ่งจัดรวมอยู่ในพวกเดียวกับแบคทีเรีย โดยถูกจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ แต่มีคุณสมบัติแตกต่างจากแบคทีเรียไปคือ มีคลอโรฟิลล์เอ จึงสามารถสังเคราะห์แสงได้ และปล่อยออกซิเจนจากการสังเคราะห์แสงสู่บรรยากาศ ซึ่งคุณสมบัตินี้จะไม่พบในพวกแบคทีเรีย สาหร่ายกลุ่มนี้ไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เปลี่ยนสีของเซลล์ได้ สามารถขึ้นอยู่ได้ทั่วทุกแห่งในโลกทั้งน้ำจืด ทะเลน้ำพุร้อน (ลัดดา, 2544)

ไชยาโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสง และผลิตออกซิเจนที่เก่าแก่ที่สุดของโลก โดยมีผลกระทบต่อชั้นบรรยากาศ (atmosphere) และระบบนิเวศโดยรวมของโลกในปัจจุบัน ไชยาโนแบคทีเรียมีประวัติศาสตร์การวิวัฒนาการเป็นเวลานาน โดยมีการพัฒนากลยุทธ์ในการอยู่รอด และยังคงเป็นผู้ผลิตหลักที่สำคัญสำหรับการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศและธรณีเคมีจำนวนมาก ที่เกิดขึ้นบนโลกในช่วง 3.5 พันล้านปีที่ผ่านมา (Gupta และคณะ, 2013)

ไชยาโนแบคทีเรียมีความหลากหลายมากมายอาทิ เช่น มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวไปถึงหลายเซลล์รวมกัน ลักษณะเซลล์กลมไปถึงลักษณะเป็นเส้นใย ลักษณะความเข้มข้นของเม็ดสีน้อยไปถึงความเข้มข้นของเม็ดสีมาก สามารถรับพลังงาน และธาตุคาร์บอนจากสารอินทรีย์ (heterotrophic) ไปถึงใช้ออกซิเจนอิสระเผาผลาญสารอนินทรีย์เพื่อให้ได้พลังงานและใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (autotrophic) เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic) ไปถึงเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic) อาศัยอยู่ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง (acidophilic) ไปถึงสภาวะที่มีความเป็นด่างสูง (alkaliphilic) ล่องลอยอยู่ในกระแสน้ำ (planktonic) ไปถึงยึดติดบริเวณพื้นผิวต่าง ๆ (barophilic) พบบริเวณแหล่งน้ำจืดไปถึงบริเวณทะเลที่มีเกลือในปริมาณสูง (salt pans) โดยพบทั้งที่อาศัยอยู่เป็นอิสระและอาศัยอยู่ร่วมกัน จากความหลากหลายทางชีวภาพของไชยาโนแบคทีเรียในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ นำไปสู่การพัฒนา และประยุกต์ใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์มากมาย (Thajuddin และ Subramanian, 2005)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของไซยาโนแบคทีเรีย

2.1.1.1 องค์ประกอบของเซลล์

รงควัตถุ

รงควัตถุที่พบคือ คลอโรฟิลล์เอ แครโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิโพรตีน ซึ่งในไซยาโนแบคทีเรียไม่มีคลอโรพลาสต์ชัดเจน เพียงแต่มีไทลาคอยด์ซึ่งจะอยู่เดี่ยว ๆ ไม่มีเยื่อบาง ๆ หุ้ม และไม่มีการจัดเรียงกันเป็นชั้น ๆ จะพบเป็นอิสระทั่วไปในเซลล์ หรือบริเวณรอบ ๆ นอกของตัวเซลล์ จึงเรียกบริเวณที่มีรงควัตถุเหล่านี้ว่า โครโมพลาซึม (chromoplasm) บริเวณไทลาคอยด์นี้เป็นที่อยู่ของคลอโรฟิลล์เอ ส่วนรงควัตถุ อื่น ๆ จะเกาะอยู่บนพื้นผิวของไทลาคอยด์ในลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ เรียกว่า ไฟโคบิลิโซม

รงควัตถุที่กล่าวมานั้นจะไม่รวมกันเป็นพลาสติด (plastid) เหมือนพืชชั้นสูงเมื่อศึกษาดูใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ อยู่แบบร่างแหกระจายอยู่ทั่วไป การที่ไซยาโนแบคทีเรียมีทั้งคลอโรฟิลล์ และซี-ไฟโคไซยานินทำให้มองเห็นเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน ถ้ามีซี-ไฟโคอิทรินมากอาจจะมองเห็นเป็นสีแดงปนอยู่ด้วย สัดส่วนของรงควัตถุดังกล่าวมีต่าง ๆ กัน ซึ่งทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีสีที่แตกต่างกันไป เช่น มีตั้งแต่สีเขียว ไปจนถึงดำหรือแดง และสีที่เป็นกึ่งกลางของสีเหล่านี้

ผนังเซลล์

ประกอบด้วยผนังเซลล์ 2 ชั้น ผนังชั้นในบาง ประกอบด้วยเซลลูโลส ผนังชั้นนอกหนาประกอบด้วยเจลาติน ซึ่งเป็นชั้นที่เรียกว่าปลอกหุ้มหรือซีท ผนังชั้นนี้สามารถเก็บความชื้นไว้ได้มาก ซึ่งเป็นประโยชน์เมื่อไซยาโนแบคทีเรียอยู่ในสภาพแห้งแล้งก็สามารถมีชีวิตอยู่ได้

ไซโตพลาซึม

อยู่ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปด้านใน แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ บริเวณส่วนใน (centroplasm) เป็นส่วนที่ไม่มีรงควัตถุ และส่วนบริเวณรอบนอก (chromoplasm) เป็นส่วนที่มีรงควัตถุสะสมอยู่

แควิวโอล

จะไม่พบว่าไซยาโนแบคทีเรียมีแควิวโอลขนาดใหญ่เหมือนสาหร่ายชนิดอื่นแต่บางชนิดจะพบก๊าซแควิวโอลโดยก๊าซที่อยู่ภายในส่วนใหญ่เป็นก๊าซไนโตรเจนและจะมีก๊าซออกซิเจนเป็นส่วนน้อยซึ่งก๊าซแควิวโอลนี้จะช่วยในการลอยตัวของสาหร่าย

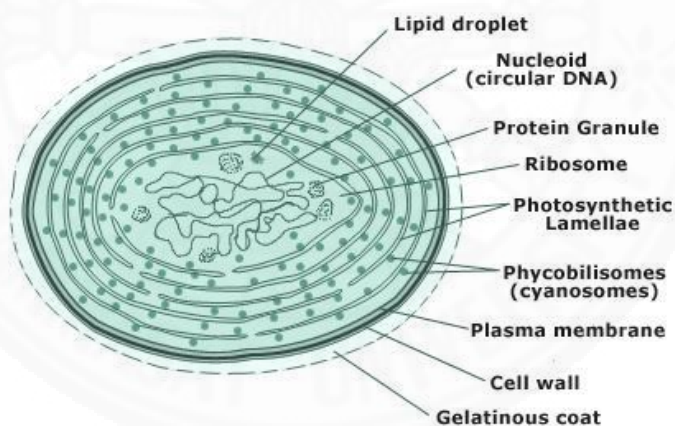
อาหารที่เก็บสะสม

ในไซยาโนแบคทีเรียมีการเก็บสะสมอาหารเป็นพวกรับโไฮเดรต ได้แก่ แป้งไซยาโนไฟซิน (cyanophycin starch) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตในรูปไซยาโนไฟซินแกรนูล กระจายอยู่ในชั้น

ภาพที่ 2-1

องค์ประกอบของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

ที่มา <http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iii/kingdoms-living-world/cyanobacteria.php> สืบค้นเมื่อวันที่ 22 ตุลาคม 2556



2.1.1.2 ลักษณะรูปร่างและการแตกแขนง

มี 2 แบบ คือรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีไม่เป็นเส้นสาย (single cell or non filamentous form) และรูปร่างเป็นเส้นสาย (filamentous form) โดยรูปแบบเส้นสายนั้นหากมีการแตกแขนง สามารถแตกแขนงได้ 2 แบบ คือการแตกแขนงที่แท้จริง แบ่งออกเป็น 3 แบบย่อยคือการแตกแขนงด้านข้าง การแตกแขนง 2 กิ่ง การแตกแขนงรูปตัววี และการแตกแขนงไม่แท้จริง เกิดจากเซลล์ในเส้นสายแบ่งตัวตามปกติให้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์หลุดออกจากกัน

2.1.1.3 การเคลื่อนที่

ไซยาโนแบคทีเรียมีการเคลื่อนที่โดยไม่อาศัยแฟลเจลลัม เช่น การผลิต สารเมือก การยึดและหดตัวของเซลล์ในเส้นสายที่ไม่เท่ากัน และการแลกเปลี่ยนน้ำกับสารละลายภายในเซลล์ ด้วยกระบวนการออสโมซิส

2.1.1.4 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

การแบ่งเซลล์

พบในพวกที่เป็นเซลล์เดี่ยวแต่มีซีพทุ่มอยู่ เมื่อแบ่งหลาย ๆ เซลล์ และรวมกันอยู่ในซีพเดียวกัน จะมองดูเหมือนพวกที่เป็นโคโลนี แต่เมื่อซีพแตกออกก็จะกระจัดกระจายเป็นแต่ละเซลล์ หรืออาจจะเกิดกับพวกที่เป็นโคโลนี ซึ่งเมื่อแบ่งเซลล์มาก ๆ จะกลายเป็นโคโลนีใหญ่ ต่อมาก็จะหลุดออกเป็นแต่ละโคโลนี ในพวกเส้นสายมีการแบ่งเซลล์เช่นเดียวกัน โดยอาจจะเกิดที่เซลล์บริเวณปลาย ตรีโคม หรือเซลล์ภายในตรีโคมก็ได้

การขาดออกเป็นท่อน (fragmentation)

พบในพวกที่เป็นเส้นสาย หรือพบในพวกที่เป็นโคโลนีบ้าง โดยการขาดเป็นท่อนนั้น จะเกิดบริเวณเซลล์ตาย (dead cell) แต่ละท่อนที่หลุดออกมานั้นเรียกว่า ฮอร์โมโกเนียม (homogonium) ซึ่งเกิดจากเซลล์ใดเซลล์หนึ่งหรือหลาย ๆ เซลล์ในตรีโคมเกิดตายลง เซลล์ข้างเคียงทั้ง 2 ด้านจึงเกิดการโป่งออกมาทำให้ลักษณะของเซลล์ที่ตายไปเหมือนเลนส์เว้า บริเวณนี้จึงเป็นจุดอ่อนที่สามารถจะเกิดการขาด หรือหลุดออกมาได้

การสร้างฮอร์โมโกเนียมเทียม (pseudohomogonium)

มักมีการสร้างเมื่อสภาวะไม่เหมาะสม ฮอร์โมโกเนียมเทียมที่มีลักษณะแตกต่างไปจากฮอร์โมโกเนียมปกติคือ มีผนังที่หนากว่า มีขนาดใหญ่ และมีเมือกหุ้มที่หนา

สร้างสปอร์

การสร้างสปอร์มีทั้งเอนโดสปอร์ (endospore) และเอกโซสปอร์ (exospore) พบส่วนมากใน ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เดี่ยว เกิดจากการแบ่งเซลล์หลาย ๆ ครั้ง โดยเซลล์ทั้งเซลล์ จะทำหน้าที่เป็นสปอร์แรงเจียม (sporangium) และมักจะสร้างขึ้นจำนวนมากต่อครั้ง เมื่อสปอร์หลุดออกมาจะเกิดเป็นเซลล์ใหม่ได้ สำหรับเอกโซสปอร์นั้นจะลักษณะคล้ายโคนิเดีย (conidia) ของเชื้อรา

โดยเกิดจากการแบ่งโปรโตพลาสต์ตามขวาง เมื่อสปอร์เหล่านี้หลุดออกมาก็จะสามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ใหม่ได้ต่อไป

2.1.1.5 ลักษณะพิเศษ

การเปลี่ยนสี

ไซยาโนแบคทีเรียมีความพิเศษที่แตกต่างจากสาหร่ายอื่นอีกประการหนึ่ง คือสามารถเปลี่ยนสีได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นแสงและความเข้มของแสง โดยมีการทดลองที่ให้ความเข้มของแสงที่ต่างกัน พบว่าถ้าให้ความเข้มของแสงสูงจะมีสีน้ำเงิน ถ้าความเข้มของแสงต่ำจะเป็นสีแดง ซึ่งตรงกับความจริงตามธรรมชาติที่ไซยาโนแบคทีเรียที่ขึ้นในระดับน้ำลึก ๆ จะมีสีแดงหรือม่วง ส่วนที่ขึ้นอยู่ที่ผิวน้ำ จะมีสีน้ำเงินเข้ม

การตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation)

เกิดในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ผลที่ได้จากการตรึงไนโตรเจนคือ แอมโมเนีย (กาญจนภาชน์, 2527) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน การตรึงไนโตรเจนจะเกิดได้ทั้งในสภาวะที่อยู่เป็นอิสระหรืออยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น *Anabaena azollae* ที่ขึ้นในแหนแดง ไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้นี้มีการแพร่กระจายกว้างขวางทั้งในดิน ในน้ำจืด และในทะเล โดยเฉพาะในเขตร้อนพบได้ทั่วไป และเกือบตลอดปี การตรึงไนโตรเจนโดยทั่วไปหมายถึง การเปลี่ยนรูปไนโตรเจนในรูปของอินทรีย์สารได้แก่ ไนเตรต แอมโมเนีย และก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศ หรืออากาศในดิน หรือในน้ำให้อยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน (สมศักดิ์, 2525) โดยมีเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้ในการตรึงไนโตรเจนคือ เอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่มีโมลิบดีนัม และเหล็ก (Mo-Fe protein) และโปรตีนที่มีเหล็ก (Fe protein) รวมกันเป็นโครงสร้างที่สลับซับซ้อน (Mortenson และคณะ, 1967)

เฮเทอโรซิสต์

เป็นเซลล์พิเศษที่มีผนังหนา บริเวณด้านข้างของเฮเทอโรซิสต์ที่ติดกับเซลล์อื่น ๆ จะมีการสะสมสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์มาพอกอยู่มองเห็นเป็นตุ่ม ๆ เล็กทั้ง 2 ด้านซึ่งเรียกว่า โพลาร์โนดูล (polar nodule) พบในไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย ทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจน เซลล์มีการเปลี่ยนรูปจากเซลล์ธรรมดาให้มีผนังเซลล์หนาขึ้น ภายในเซลล์มีลักษณะใส เพราะขาดรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง เหลือเฉพาะแคโรทีนเท่านั้น ในขณะเดียวกัน

ตำแหน่งรอยต่อของเฮเทอโรซิสต์กับเซลล์ข้างเคียงอาจเกิดแตกหักออกจากกันได้ ฉะนั้นเฮเทอโรซิสต์ จึงทำหน้าที่อีกอย่างหนึ่งคือการขยายพันธุ์ (สุวรรณ, 2542)

การสร้างเฮเทอโรซิสต์จากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabaena* จะใช้เวลา ประมาณ 24 ชั่วโมงหลังจากเซลล์อยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน โปรตีนมากกว่า 500 โปรตีน จะ แสดงออกแตกต่างกันในระหว่างการเปลี่ยนแปลงเซลล์ปกติเป็น heterocysts แสดงให้เห็นว่า กระบวนการที่ซับซ้อนนี้อยู่ภายใต้การควบคุมของยีนหลายยีน โดยหลักเป็น HetR, serine-type protease และ NtcA (Pastor และ Hess, 2012)

2.1.1.6 การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรีย

โดยมีการจัดเป็นหมวดหมู่ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้

Order 1 Chroococcales

ไซยาโนแบคทีเรียในออร์เดอร์นี้เป็นพวกเซลล์เดี่ยว โดยเซลล์อาจจะอยู่เดี่ยว ๆ หรือ เป็นโคโลนีสืบพันธุ์โดยวิธีแบ่งเซลล์ มี 11 แฟมิลี (ยูวดี, 2549)

Order 2 Oscillatoriales

ไซยาโนแบคทีเรียในออร์เดอร์นี้มีลักษณะเป็นเส้นสาย อาจจะเป็นเส้นสายที่ไม่แตก แขนงหรือแตกแขนงแบบไม่แท้จริง บางชนิดมีเมือกหุ้ม เซลล์มีรูปร่างแบบทรงกระบอก ไม่มีการสร้าง เฮเทอโรซิสต์หรืออะคินีท สืบพันธุ์โดยการใช้อิทธิพลเป็นท่อน ๆ อาจสร้างไฮโมโกเนียมประกอบไปด้วย 6 แฟมิลี (ยูวดี, 2549)

Order 3 Nostocales

ไซยาโนแบคทีเรียในออร์เดอร์นี้มีลักษณะเป็นเส้นสาย ไม่แตกแขนง มีชีทหุ้มหนา หรือบางแล้วแต่ชนิด เซลล์มีรูปร่างกลม หรือเหลี่ยมเล็กน้อยแล้วป่องตรงกลาง บางชนิดเป็นแบบ ทรงกระบอก มีเฮเทอโรซิสต์ มีการสร้างอะคินีทด้วย เฮเทอโรซิสต์สามารถงอกเป็นเส้นสายใหม่ได้ ประกอบไปด้วย 4 แฟมิลี (ยูวดี, 2549)

Order 4 Stigonematales

ไซยาโนแบคทีเรียในออร์เดอร์นี้เป็นเส้นสายที่แตกแขนงได้หลายแบบ มีทั้งแตกแขนง แท้จริงและแตกแขนงไม่แท้จริง และแต่ละแบบจะมีการแตกแขนงหลายทิศทาง เซลล์ที่ประกอบด้วย

เส้นสายนั้นอาจประกอบด้วยเซลล์แถวเดียว 2 แถว หรือมากกว่า แต่แขนงที่แตกออกไปมักเป็นเซลล์แถวเดียว แต่อาจมีมากกว่า 1 แถวก็ได้ ซีพที่หุ้มมักมีสีเหลือง หรือน้ำตาล มีการสร้างเฮเทอโรซิสต์ซึ่งอาจมีโพลาริโนตุลถึง 3 อัน สืบพันธุ์โดยการสร้างไฮโมโกเนียม แล้วขาดออกเป็นท่อน ๆ ไม่พบว่ามี การสร้างอะคินิท ประกอบไปด้วย 8 แฟมิลี (ยวดี, 2549)

2.1.1.7 การใช้ประโยชน์จากไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาจเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ในรูปแบบต่าง ๆ ไซยาโนแบคทีเรียเป็นทรัพยากรที่มีศักยภาพมากมายในการใช้งานที่แตกต่างกัน เช่น อาหารคน, อาหารสัตว์, เชื้อเพลิง, ปุ๋ย, ยา, อุตสาหกรรม และในการแก้ไขมลพิษ (Priyadarshani and Rath, 2012)

อาหารคนและอาหารสัตว์

โปรตีนจากไซยาโนแบคทีเรียเป็นอาหารเสริมที่เป็นแหล่งทางเลือกที่ได้รับความสนใจทั่วโลก บางสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่ม *Anabaena* และ *Nostoc* มีการบริโภคเป็นอาหารของมนุษย์ในประเทศชิลี, เม็กซิโก, เปรูและฟิลิปปินส์ โดยพบว่า *N.commune* มีปริมาณของเส้นใยสูงและโปรตีนในระดับปานกลาง มีศักยภาพเป็นแหล่งใยอาหารใหม่และมีบทบาททางโภชนาการที่สำคัญในอาหารของมนุษย์ (Jeraci และ Vansoest, 1986)

ไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากทะเลและสามารถตรึงไนโตรเจนหลายสายพันธุ์มีการทดสอบคุณค่าทางโภชนาการในการเลี้ยงลูกปลานิลพบว่าอัตราการเติบโตสูงมากไม่ว่าจะเป็นการเพาะเลี้ยงแบบปิดหรือแบบเปิด (Thajuddin และ Subramanian, 2005)

ปุ๋ยชีวภาพ

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นมีบทบาทสำคัญในการสร้างความอุดมสมบูรณ์ของดิน จากความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ซึ่งเป็นผลดีต่อพืชและดินทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายปุ๋ยเคมี และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Sahu และคณะ, 2012) จากการศึกษาของ Maqubela และคณะในปี 2009 ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า *Nostoc* สามารถปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์และความมั่นคงของโครงสร้างของดินที่เสื่อมโทรม เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าอนุภาคของดินและชิ้นส่วนเล็ก ๆ ของดินที่มีการเติมเชื้อ *Nostoc* มีการเคลือบสารโพลีเมอร์ที่มีการหลั่งออกสู่ภายนอก (EPS) กับอนุภาคอื่น ๆ

ไซยาโนแบคทีเรียยังเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น สารต่อต้านมะเร็ง สารต้านไวรัส สารต้านแบคทีเรีย สารต้านเชื้อรา สารต้านการอักเสบ และกระตุ้นความ

เป็นพืชต่อเซลล์ (Thajuddin และ Subramanian, 2005) ทั้งยังใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงาน ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และตัวดูดซับทางชีวภาพ (Priyadarshani and Rath, 2012)

2.1.1.8 ไชยาโนแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (Thermophilic cyanobacteria)

ไชยาโนแบคทีเรียเป็นโพรคาริโอต ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์แสง สามารถกระจายตัวอยู่ได้ทั้งบนบกและในน้ำ แม้กระทั่งในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงเช่นน้ำพุร้อน จากที่กล่าวข้างต้นว่า ไชยาโนแบคทีเรียมีชีทที่หนา และโมเลกุลโปรตีนภายในโพรโตพลาสซึมจับตัวกันแน่น ช่วยให้สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงเรียกว่า เทอร์โมฟิลิกส์ไชยาโนแบคทีเรีย โดยสามารถแบ่งเทอร์โมฟิลิกไชยาโนแบคทีเรียออกเป็น 3 กลุ่มย่อย โดยหากเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียสจะเรียกว่าไฮเปอร์เทอร์โมไฟล์ (Hyperthermophiles) เจริญเติบโตได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 45-65 องศาเซลเซียสเรียกว่าเทอร์โมไฟล์ (Thermophiles) และหากเจริญเติบโตได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 55 องศาเซลเซียสจะเรียกว่าเมโซไฟล์ (mesophile) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเมโซไฟล์คือ 37 องศาเซลเซียส (Prabha และคณะ, 2013)

สำหรับในประเทศไทยนั้นได้มีการศึกษาไชยาโนแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิสูง ในบริเวณที่มีความร้อนสูงเช่น บริเวณน้ำพุร้อนนั้นพบไชยาโนแบคทีเรียหลายชนิด สระบุรี (2523) ซึ่งทำการสำรวจจุลินทรีย์ในน้ำพุร้อนโป่งฮ่อม อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่พบ *Anacystis* ที่อุณหภูมิ 71-91 องศาเซลเซียส พบ *Chroococcus turgidus*, *Anabaena* และ *Oscillatoria* ที่อุณหภูมิ 36-40 องศาเซลเซียส และยังมีรายงานว่าพบ *Synechococcus*, *Mastigocladus* และ *Phormidium* และยังพบ *Phormidium* ที่อุณหภูมิ 65-68 องศาเซลเซียส อีกด้วย โดยอุดมลักษณ์และคณะ (2544) ได้ศึกษาความหลากหลายของไชยาโนแบคทีเรีย ในน้ำพุร้อน 9 แหล่ง ในทางภาคเหนือตอนบน พบไชยาโนแบคทีเรียในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียสทั้งหมด 36 ชนิด โดยช่วงอุณหภูมิที่พบมากที่สุดคือช่วง 40-50 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส ไชยาโนแบคทีเรียที่เป็นชนิดเด่นคือ *Synechococcus* ช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ชนิดเด่นคือ *Phormidium* และ *Synechococcus* และช่วงอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ชนิดเด่นคือ *Phormidium*, *Calothrix*, *Pseudanabaena* และ *Chroococcus*

การศึกษาไชยาโนแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิสูงในประเทศไทยนั้นเป็นการศึกษาความหลากหลายและรูปแบบการกระจายตัวโดยใช้ 16S rDNA ในการจำแนกไชยาโนแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ ในปี 2008 Sompong และคณะ ได้ศึกษาลักษณะความหลากหลายทางสายวิวัฒนาการ และ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของไซยาโนแบคทีเรียในภาคเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย จากน้ำพุร้อน 6 แหล่ง มีอุณหภูมิ ตั้งแต่ 40-75 องศาเซลเซียส โดยทำการเพาะเลี้ยงพบ 14 สายพันธุ์ ไซยาโนแบคทีเรียที่ได้รับการตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ สายพันธุ์เด่นคือ *Synechococcus* spp., *Phormidium* cf. *boryanum* และ *Leptolyngbya* spp. พบ 20 ไอโซเลทที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร และอีก 79 ตัวอย่าง มีการตรวจสอบโดยใช้ denaturing gradient gel electrophoresis โดยใช้ 16S rDNA

2.2 ซี-ไฟโคไซยานิน (C-Phycocyanin)

ซี-ไฟโคไซยานินเป็นไฟโคบิลินโปรตีนชนิดหนึ่ง สามารถละลายน้ำได้ โดยเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เรียกว่า ไฟโคบิลิโซม (phycobilisomes) สารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้ก่อตัวขึ้นจากโมโนเมอร์ (monomer) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยแอลฟา (α - subunit) หน่วยย่อยเบต้า (β -subunit) และหน่วยย่อยแกมมา (γ -subunit) โดยไฟโคบิลิโปรตีนจะเกาะอยู่บนผิวด้านนอกของไทลาคอยด์ ซึ่งภายในไทลาคอยด์มีคลอโรฟิลล์เอบรรจุอยู่ โดยไฟโคบิลิโปรตีนทำหน้าที่รับพลังงานจากแสงแล้วส่งต่อไปให้กับคลอโรฟิลล์เอ (Romay และคณะ, 2003)

ไฟโคบิลิโปรตีนสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดตามสมบัติของการดูดกลืนแสง (Glazer, 1999) คือ

- ไฟโคอีริทริน (Phycoerythrin) λ_{\max} 540-570 nm เป็นสารประกอบที่มีสีแดง มีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยแอลฟา 17.6 kDa หน่วยย่อยเบต้า 19.2 kDa และหน่วยย่อยแกมมา 31.0 kDa

- ซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycocyanin) λ_{\max} 610-620 nm เป็นสารประกอบที่มีสีน้ำเงิน มีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยแอลฟา 19.5 kDa และหน่วยย่อยเบต้า 17.0 kDa

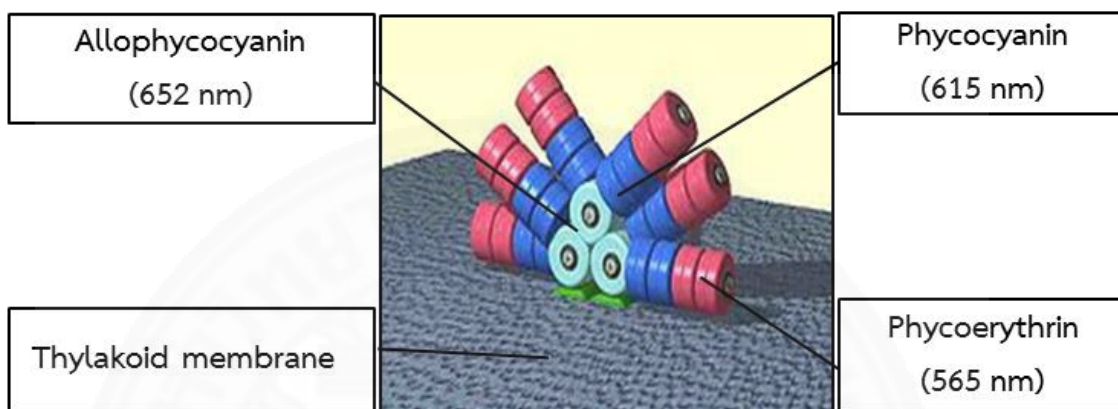
- อัลโลซี-ไฟโคไซยานิน (Allophycocyanin) λ_{\max} 650-655 nm เป็นสารประกอบที่ไม่มีสี มีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยแอลฟา 19.6 kDa และหน่วยย่อยเบต้า 17.7 kDa

ภาพที่ 2-2

ไฟโคบิลิโซมและตำแหน่งยึดจับภายในเซลล์

ที่มาดัดแปลงจาก http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phycobilisome_structure.jpg

สืบค้นเมื่อวันที่ 22 ตุลาคม 2556



2.2.1 ซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycocyanin)

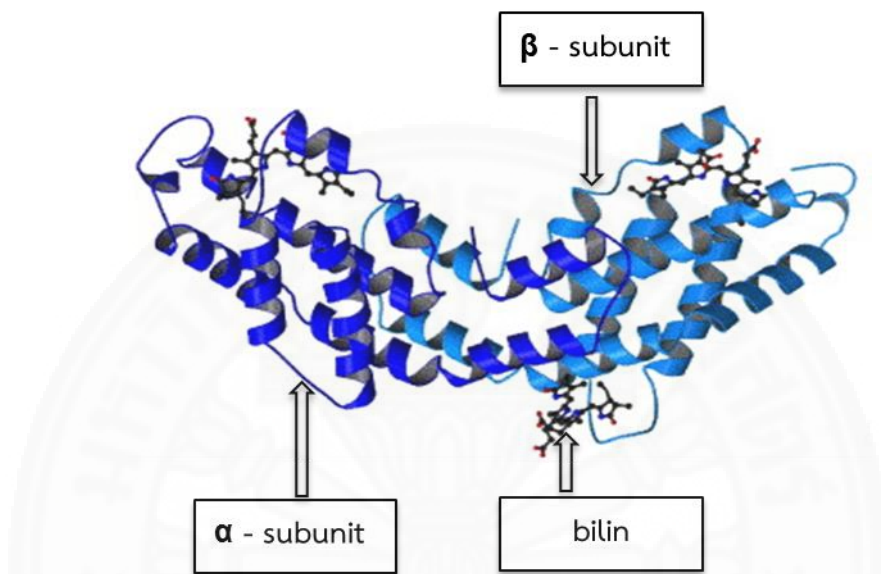
ซี-ไฟโคไซยานินเป็นสารในกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีน เป็นสารประกอบที่มีสีน้ำเงิน เรืองแสงได้ และละลายน้ำได้ สามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 610-620 นาโนเมตร โดยทั่วไป โมเลกุลของซี-ไฟโคไซยานินจะรวมตัวอยู่ในรูปไตรเมอร์ ($\alpha_3 \beta_3$) และเฮกซะเมอร์ ($\alpha_6 \beta_6$) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ซี-ไฟโคไซยานินมีความเสถียร หรืออาจจะอยู่ในรูปโอลิโกเมอร์ (oligomers) และรูปแบบอื่น ๆ การเรียกชื่อสารในกลุ่มนี้หากเป็นซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียจะมีคำนำหน้าว่า ซี-ไฟโคไซยานิน แต่หากเป็นสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายสีแดงจะมีคำนำหน้าว่า อาร์-ไฟโคไซยานิน (Romay และคณะ, 2003)

ภาพที่ 2-3

โครงสร้างของซี-ไฟโคไซยานิน 1 โมโนเมอร์

ที่มาดัดแปลงจาก http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phycobilisome_structure.jpg

สืบค้นเมื่อวันที่ 22 ตุลาคม 2556



2.2.2. การสกัดซี-ไฟโคไซยานิน

จากลักษณะโครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรียไฟโคบิลิโซมจะยึดเกาะอยู่บริเวณพื้นผิวของไทลาคอยด์ซึ่งกระจายอยู่ในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย ดังนั้นการสกัดซี-ไฟโคไซยานินทำได้โดยการทำลายผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียด้วยวิธีการย่อยทางเคมี เอนไซม์ และใช้วิธีทางกล ได้แก่ การใช้คลื่นอัลตราโซนิค การใช้เฟรนช์เพรส (French press) การแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย (freeze-thaw) การบดด้วยโกร่ง (mortar/pestle grinding) และ liquid nitrogen freeze-grind

การแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย

การแช่เยือกแข็งสลับกับการละลายเป็นการทำลายผนังเซลล์โดยอาศัยการขยายขนาดของผลึกน้ำแข็งซึ่งเกิดขึ้นในในการแช่แข็ง ทำให้น้ำแข็งเกิดรูรั่วในระหว่างการละลายน้ำแข็ง

การใช้คลื่นอัลตราโซนิก

การใช้คลื่นอัลตราโซนิกเป็นการทำลายผนังเซลล์โดยอาศัยแรงเฉือนที่เกิดจากคลื่นเสียงที่มีความถี่ ทำให้แก๊สอากาศขนาดเล็กในสารแขวนลอยและภายในเซลล์สาหร่าย ฟองอากาศจะขยายขนาดกระทั่งแตกออกทำให้เกิดคลื่นสะท้อนอย่างรุนแรง เกิดความแตกต่างของแรงเฉือนที่รุนแรง ทำให้ผนังเซลล์ฉีกขาด

การใช้เครื่องโฮโมจิไนซ์

เครื่องโฮโมจิไนซ์ทำงานโดยใช้ปั๊มความดันสูง บังคับให้ของเหลวผ่านช่องแคบ ที่เรียกว่า วาล์วโฮโมจิไนซ์ (homogenization valve) ด้วยความเร็วสูงมาก พลังงานจากแรงดัน ทำให้เกิดแรงเฉือน (shear) แรงกระแทกและการแตกตัวของฟองอากาศ ขนาดเล็ก (cavitation) อย่างรุนแรง มีผลให้ผนังเซลล์ฉีกขาด

2.2.3 การเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานิน

หลักและวิธีการแยกสารออกจากกันมีหลายวิธี ได้แก่ การแยกโดยใช้ตัวกลาง การแยกเชิงกล และการแยกโดยใช้ตัวกลาง สำหรับการแยกโดยใช้ตัวกลางนั้นมีหลายวิธีเช่น กระบวนการไมโครฟิลเตรชัน (Microfiltration) กระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) กระบวนการนาโนฟิลเตรชัน (Nanofiltration) กระบวนการออสโมซิสผันกลับ (Reverse osmosis) กระบวนการเพอร์แวกซ์ เพอร์เวชัน (Pervaporation) กระบวนการเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange membrane) และการดูดซับแบบแบทช์

2.2.4 การใช้ประโยชน์จากซี-ไฟโคไซยานิน

- ใช้เป็นสีผสมอาหาร โดยใช้เป็นสีผสมในลูกกวาด ไอศกรีม และเครื่องดื่มประเภท softdrinks ใช้เป็นสีผสมในเครื่องสำอาง เช่น เป็นสีผสมใน eye liner, eye shadow และ lipstick (Batita และคณะ, 2006; Arad และ Yaron, 1992)

- ใช้ในอุตสาหกรรมยา

- ใช้เป็นเครื่องหมายติดตามผลของเซลล์เนื่องจากมีความไวต่อการดูดกลืนแสง เพื่อศึกษาการติดตามเซลล์

- ใช้เป็นตัวชี้วัด (Marker) ในการตรวจสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology Diagnostic Applications)

- ใช้เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ พบว่าซี-ไฟโคไซยานิน มีประสิทธิภาพในการกำจัดออกซิเจน ที่เป็นอนุมูลอิสระ และยังทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระอื่น ๆ ที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพ ได้แก่ กรดไฮโปคลอรัสและเพอรอกซีไนไตรท์ รวมทั้งยังมีผลต่อปฏิกิริยาการออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งจากการศึกษาไมโครโซมในเซลล์ตับของหนูที่ได้รับกรดเอสคอปิกที่มีไอออนของเหล็กพบว่า ซี-ไฟโคไซยานินสามารถยับยั้งการเพิ่มปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้อย่างมีนัยสำคัญ (Romay และคณะ, 1998)

- มีคุณสมบัติเป็นสารต้านการอักเสบ โดยการให้ซี-ไฟโคไซยานิน 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถช่วยยับยั้งการเกิดโรคทำบวมน้ำของหนู โดยการกำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Romay และคณะ, 1998) ซี-ไฟโคไซยานินยังมีผลต่อการตายของเซลล์ประสาท โดยจากการศึกษาพบว่า ซี-ไฟโคไซยานินปริมาณ 1-3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วยป้องกันการตายของเซลล์สมองหนูที่เกิดจากการขาดโพแทสเซียมและเซรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Rambau และคณะ, 2001)

2.2.5 ข้อจำกัดของซี-ไฟโคไซยานิน

จากงานวิจัยต่าง ๆ ที่ได้ศึกษาเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินพบว่าอุณหภูมินั้นส่งผลต่อการสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานิน ได้แก่ การศึกษาไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis* ซึ่งเป็นแหล่งของเม็ดสี เช่น ซี-ไฟโคไซยานิน ซึ่งใช้ในอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และยา จากสมบัตินี้ดังกล่าวจึงมีการศึกษาจลนพลศาสตร์การสลายตัวของสารสกัดซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 5 6 และ 7 ที่ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 50 ถึง 65 องศาเซลเซียส ซึ่งแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ที่ได้เป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง พบว่าในช่วงอุณหภูมิ 50 ถึง 55 องศาเซลเซียส สารสกัดซี-ไฟโคไซยานินมีเสถียรภาพสูงสุดที่พีเอช 6 และในช่วงอุณหภูมิ 57 ถึง 65 องศาเซลเซียส สารสกัดซี-ไฟโคไซยานินมีเสถียรภาพสูงสุดที่พีเอช 5 และมีเสถียรภาพต่ำสุดที่พีเอช 7 ทั้งนี้พบว่าการเติมซอร์บิทอลที่ความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 10 ถึงร้อยละ 50 โดยน้ำหนักของสารสกัดซี-ไฟโคไซยานิน ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที ทำให้ค่าครึ่งชีวิตของสารสกัดซี-ไฟโคไซยานินสูงขึ้น ซึ่งเป็นการพิสูจน์ว่าสีที่จางลงของซี-ไฟโคไซยานินเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของโปรตีน (Antelo และคณะ, 2008)

อุณหภูมิและพีเอชมีบทบาทสำคัญต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน ซึ่งตามธรรมชาติจะให้สีน้ำเงิน จากการศึกษารูปแบบพบที่ ซี-ไฟโคไซยานินมีความเสถียรสูงสุดที่พีเอช 5.5 ถึง 6.0 โดยการบ่มซี-ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิในช่วง 47 ถึง 64 องศาเซลเซียส มีผลให้ความเข้มข้นและค่าครึ่งชีวิตของซี-ไฟโคไซยานินในสารละลายมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินจะเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 50 หลังจากบ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส และหลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่พีเอช 7.0 ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินจะคงเหลือประมาณร้อยละ 62 ถึง 70 เมื่อเติมกลูโคสหรือซูโครสร้อยละ 20 ถึง 40 และส่งผลให้ค่าครึ่งชีวิตเพิ่มขึ้นจาก 19 นาที เป็น 30 ถึง 44 นาที พบว่าไซเดียม

คลอไรด์ร้อยละ 2.5 สามารถรักษาเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 7.0 ได้เป็นอย่างดี โดยสามารถรักษาความเข้มข้นได้ร้อยละ 76 และเพิ่มค่าครึ่งชีวิตเป็น 67 นาที (Rattana และคณะ, 2012) และในปี 2013 Martelli และคณะ ได้ศึกษาปฏิกิริยาการสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานินจาก *Spirulina platensis* ที่ช่วงอุณหภูมิ 25-80 องศาเซลเซียส ก่อนและหลังการเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ พบว่าน้ำตาลฟรุคโตสสามารถป้องกันการสูญเสียตามธรรมชาติได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่นที่ใช้ทดสอบ หลังจากทำการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไรด์เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าน้ำเชื่อมดังกล่าวมีการจางของสีฟ้าน้อย

2.2.6 การศึกษาซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิสูง

ในต่างประเทศนั้นได้มีการศึกษาโครงสร้างสามมิติของซี-ไฟโคไซยานินจาก Thermophilic cyanobacteria สายพันธุ์ *Synechococcus elongatus* ที่ 1.45Å (Niell และคณะ, 2003) โดยทำการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน ทำให้บริสุทธิ์ ดูความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยใช้วิธี SDS-PAGE และทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเป็นผลึก (crystalization) โดยใช้เทคนิค hanging drop และนำมาศึกษาโครงสร้างสามมิติโดยใช้โปรแกรม MOSFLM และ CCP4

ในปี 2001 Adir และคณะ ได้ศึกษาโครงสร้าง 3 มิติ ของซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่ทนความร้อน *Synechococcus vulcanus* ที่ความละเอียด 2.5 Å พบว่า โครงสร้างของซี-ไฟโคไซยานินนั้นเหมือนกับซี-ไฟโคไซยานินอื่น ๆ คือประกอบด้วยไตรเมอร์ ($\alpha \beta$)₃ ที่รวมเป็นเฮกซะเมอร์ ($\alpha \beta$)₆ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแต่ละระดับของการรวมกันของโอลิโกเมอร์ซี-ไฟโคไซยานิน (oligomeric phycocyanin) ซึ่งทำให้เกิดรูปแบบของโครงสร้างไฟโคบิลิโซมั้นต่างกัน โดยในไซยาโนแบคทีเรียที่ทนต่ออุณหภูมิสูงมีกรดอะมิโนแทนที่แต่ละการแทนที่นั้นต่างกัน โดยในไซยาโนแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงกรดอะมิโนแทนที่ ที่ตำแหน่งวิกฤตบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนตำแหน่งของวงแหวน D จะอยู่ในรูปของไอออนโดยมีแรงระหว่างขั้วที่สำคัญบริเวณรอยต่อทั้งโมโนเมอร์ ($\alpha \beta$) และเฮกซะเมอร์ ($\alpha \beta$)₆

ในปี 2013 Yih Leu และคณะ ได้ศึกษาลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ใหม่จากน้ำพุร้อนไต้หวันในไต้หวันสำหรับลดผลกระทบของคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูง และการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน ไซยาโนแบคทีเรียพวกชอบอุณหภูมิสูงที่สามารถสังเคราะห์แสงได้มีประโยชน์ในการจับกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกปล่อยออกมาจากภาคพลังงานเนื่องจากการปรับตัวที่มีอุณหภูมิสูง การเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นของ CO₂ ที่สูง และสารสำคัญทางเศรษฐกิจ ลักษณะดังกล่าวของจุลินทรีย์ คือไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนไต้หวัน มีลักษณะเป็นรูปแท่ง มีขนาด 1.2 - 2.5 μm x 6.0 - 9.0 μm เปรียบเทียบลำดับของ 16S RNA และ cpcBA-IGS เผยให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 จึงตั้งชื่อเป็น

Thermosynechococcus elongates TA-1 ไชยาโนแบคทีเรียชนิดนี้เจริญเติบโตได้ดีที่ 10 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 50 องศาเซลเซียส มีการให้แสงความเข้มแสง 6000 ลักซ์ ที่พีเอชเริ่มต้น 7-9 ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์ ซี-ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์จาก TA-1 สามารถเก็บไว้และใช้งานที่อุณหภูมิ 4 ถึง 60 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชตั้งแต่ 4 ถึง 9 โดยมีกิจกรรมร้อยละ 65.65 แม้ที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงสมบัติการทนความร้อนและกรดเบสที่ดี

2.3 กระบวนการดูดซับแบบแบบทซ์

การแยกสารโดยวิธีดูดซับแบบแบบทซ์แลกเปลี่ยนไอออนเกิดขึ้นโดยกระบวนการดูดซับบนพื้นผิวแบบย้อนกลับ (reversible ion exchanges) เกิดขึ้นสองขั้นตอน คือ ขั้นแรก เป็นกระบวนการดูดซับสารตัวอย่างบนพื้นผิวของตัวแลกเปลี่ยนประจุส่วนสารที่ไม่ถูกดูดซับถูกชะออกไปด้วยบัฟเฟอร์ ขั้นที่สอง โมเลกุลของสารที่ยึดเกาะกับตัวแลกเปลี่ยนประจุถูกชะออกจากคอลัมน์ โดยมีอัตราเร็วในการหลุดชะออกที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความแรงของการยึดเหนี่ยวกับประจุของสารแต่ละชนิดกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ หรือความจำเพาะทางไฟฟ้าเนื่องจากการมีประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนที่แตกต่างกัน ความจำเพาะดังกล่าวนี้สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงได้โดยการเปลี่ยนค่าพีเอช และค่า ionic strength ของสารละลายในระบบเป็นผลทำให้เทคนิคดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการเก็บเกี่ยวโปรตีนชนิดที่ต้องการออกจากสารละลายโปรตีน

2.4 น้ำพุร้อน

บ่อน้ำร้อน หรือ พุน้ำร้อน (hot spring) เป็นสถานที่ที่มีน้ำร้อนจากใต้ดินเป็นน้ำที่พุ่งขึ้นมาผ่านตามช่องเปิดใต้พื้นดินที่มีโครงสร้างหลายลักษณะต่างกัน น้ำพุร้อนนั้นจะมีอุณหภูมิสูงกว่าน้ำที่ไม่มีการพุ่งขึ้นมา แต่ไหลมาซึ่งอยู่ในแอ่งพื้นโลกเรียกว่า บ่อน้ำร้อน แหล่งน้ำพุร้อนสามารถแบ่งได้หลายประเภทตามเกณฑ์ต่าง ๆ เช่น ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณแร่ธาตุที่ละลายในน้ำ ดังนี้ (สำนักงานพัฒนาการท่องเที่ยว, 2549)

2.4.1 แบ่งตามลักษณะกายภาพ

2.4.1.1 น้ำพุร้อนไกเซอร์ (Geyser)

เป็นน้ำพุร้อนที่มีขนาดใหญ่ มีกำลังแรงมาก มีน้ำและไอน้ำที่ร้อนจัดพุ่งขึ้นมาได้สูง และมีแรงพุ่งออกมาเป็นระยะ ๆ ค่อนข้างสม่ำเสมอ บางแห่งน้ำอาจพุ่งสูงได้ถึง 60 เมตร ระยะเวลาการพุ่งน้ำออกมาจะเท่า ๆ กัน เช่น 5 นาที 7 นาที ปรากฏการณ์นี้เกิดจากการที่ใต้ผิวโลก มีโพรงกักเก็บน้ำติดต่อกัน เมื่อน้ำได้รับความร้อนในระดับลึก ๆ ถูกสกัดกั้นไม่ให้ถ่ายเทได้โดยง่ายเพราะรูที่ทำให้

น้ำไหลออกมามีขนาดเล็ก และมีน้ำซึ่งเย็นกว่าซึ่งอยู่ในแอ่งที่อยู่ด้านบน น้ำที่อยู่ในระดับลึกมีอุณหภูมิสูงขึ้น และเมื่อสูงกว่า 100 องศาเซลเซียสก็จะเปลี่ยนสภาพเป็นไอน้ำดันน้ำที่ซึ่งอยู่ในรูไหลพุ่งขึ้นมา เมื่อไอน้ำได้ถ่ายเทพลังงานความร้อนจนหมดแรงดัน น้ำก็จะหยุดพุ่งจนสะสมความร้อนได้อีกก็จะพุ่งขึ้นมาอีกครั้งหนึ่ง น้ำพุร้อนไกอเซอร์ที่มีชื่อเสียง เช่น น้ำพุร้อนโอล์ด์เฟรฟูล (Old Faithful) ที่อุทยานแห่งชาติเยลโลว์สโตน (Yellow Stone National Park) ประเทศสหรัฐอเมริกา น้ำพุร้อนกีเยเซอร์ (Geysir) ประเทศไอซ์แลนด์ ซึ่งเป็นที่มาของคำว่า ไกอเซอร์ (Geysir) และน้ำพุร้อนอีกหลายแห่งในประเทศนิวซีแลนด์

2.4.1.2 น้ำพุร้อน (Hot Spring)

น้ำพุร้อนหรือบ่อน้ำร้อน (Hot Pool) คือ แหล่งน้ำที่มีอุณหภูมิสูงกว่าร่างกายมนุษย์ ไหลขึ้นมาจากใต้ดิน น้ำที่ขึ้นมาติดตั้งแต่อย่างใด จนถึงเดือดพล่าน เนื่องจากทางเดินน้ำใต้ดินใหญ่ทำให้ น้ำสามารถไหลเวียนอย่างรวดเร็วได้ น้ำร้อนที่ไหลขึ้นมาจะไหลออกไปจากแหล่งหรือกลายเป็นไอ เพื่อปล่อยพลังงานความร้อน เมื่อน้ำร้อนนั้นเย็นลงจะไหลกลับสู่ระบบน้ำใต้ดิน น้ำร้อนแต่ละแห่งจะมีแร่ธาตุรวมทั้งก๊าซละลายอยู่ในปริมาณที่ไม่เท่ากัน ทำให้มีสีและกลิ่นแตกต่างกัน และมีปริมาณน้ำที่ไหลออกมาจากแต่ละบ่อแตกต่างกัน เช่น บ่อน้ำพุร้อนที่ทะเลสาบโบโกเรีย น้ำพุร้อนนับร็อยแห่งที่ประเทศ ไอซ์แลนด์ ประเทศนิวซีแลนด์ และน้ำพุร้อนในประเทศไทย เป็นต้น ถ้ามีเพียงน้ำร้อนไหลซึมขึ้นมาบนผิวดินจะเรียกว่าน้ำซึม

2.4.1.3 บ่อไอเดือดหรือพุก๊าซ (Fumarole)

ลักษณะเป็นหลุมหรือปล่องที่มีไอน้ำพุ่งขึ้นมา จะไม่มีน้ำเหมือน น้ำพุร้อน สาเหตุอาจเกิดจากบริเวณนั้นมีน้ำเพียงเล็กน้อย เมื่อได้รับความร้อนจึงกลายเป็นไอน้ำออกมา หรืออาจเกิดจากการที่ชั้นใต้ดินมีความร้อนสูงมากจนน้ำกลายเป็นไอน้ำจนหมด บ่อไอเดือดพบมากในประเทศที่มีภูเขาไฟ แต่ก็สามารถพบได้ในพื้นที่ที่ไม่มีภูเขาไฟได้เช่นกัน

2.4.1.4 บ่อโคลนเดือดหรือพุโคลน (Mud Pot)

ลักษณะเป็นโคลน (แอ่งตะกอนที่อึดตัวไปด้วยน้ำ) ซึ่งมีไอน้ำร้อนจัดอยู่เบื้องล่าง เมื่อไอน้ำนั้นเคลื่อนที่ที่จะทำให้โคลนที่อยู่ด้านบนพุ่งกระจายขึ้นมาคล้ายการระเบิดย่อย ๆ ในบริเวณภูเขาไฟ ปกติบ่อโคลนเดือดมักมีกัมมะถันอยู่มากและมีหลาย

2.4.2 แบ่งตามปริมาณแร่ธาตุที่ละลายในน้ำ

ในต่างประเทศสามารถแบ่งน้ำพุร้อนตามปริมาณแร่ธาตุที่ละลายในน้ำได้หลายสิบประเภท แต่ในประเทศไทย พบน้ำพุร้อนที่แบ่งตามส่วนประกอบเคมี เพียง 4 ประเภท ดังนี้

2.4.2.1 น้ำพุร้อนทั่วไป (Simple Springs)

เป็นน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน เกลือ และแร่ธาตุอื่นๆ น้อยกว่า 1 กรัมต่อลิตร เป็นน้ำพุร้อนส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทย

2.4.2.2 น้ำพุร้อนคาร์บอเนต (Carbonate Springs)

เป็นน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิต่ำหรือเป็น น้ำพุเย็น ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน และแร่ธาตุอื่นๆ น้อยกว่า 1 กรัมต่อลิตร ลักษณะคล้ายน้ำพุร้อนทั่วไป แต่มีปริมาณคาร์บอเนตสูงกว่า

2.4.2.3 น้ำพุร้อนเกลือหรือน้ำพุร้อนน้ำเค็ม (Salt Springs)

เป็นน้ำพุร้อนที่ประกอบด้วยสารเคมีมากกว่าน้ำพุร้อนทั่วไป มีแร่ธาตุต่าง ๆ มากกว่า 1 กรัมต่อลิตร กรณีที่น้ำประกอบด้วยเกลือระหว่าง 1 ถึง 5 กรัมต่อลิตร เรียกว่าน้ำพุเกลืออ่อน (Weak Saline) ประกอบด้วยเกลือระหว่าง 5 ถึง 10 กรัมต่อลิตร เรียกว่าน้ำพุเกลือ และประกอบด้วยเกลือมากกว่า 10 กรัมต่อลิตร เรียกว่าน้ำพุเกลือเข้มข้น (Strong Saline) มีคุณสมบัติในการเก็บรักษาความร้อนได้ดี

2.4.2.4 น้ำพุร้อนแอลคาไล (Alkaline Springs)

เป็นการแบ่งประเภทน้ำพุร้อน โดยใช้ ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ของน้ำพุร้อน เป็นหลัก น้ำพุร้อนที่มีพีเอช 7.5 ถึง 8.5 เรียกว่า Weak Alkaline Springs และน้ำพุร้อนที่มีพีเอช สูงกว่า 8.5 เรียกว่า Alkaline Springs

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer, Biochrom Libra S22 UV-visible, England)
2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, PSI 50 bench top pH meter, Beckman; Germany)
3. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert; Germany)
4. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow, Microflow, Bioquell UK Ltd; United Kingdom)
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Memmert; Germany)
6. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator, Memmert; Germany)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (microfuge 16, Beckman Coulter; Germany)
8. อ่างเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking Water Baths; JULABO SW 22)
9. ตู้ดูดความชื้น (Dessicator, Weifo Dry-60; Taiwan)
10. อ่างคลื่นความถี่สูง (Benchtop ultrasonics cleaner, 575HT, CREST ULTRASONICS; USA)
11. เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานด้านจุลชีววิทยา
12. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์
13. ตัวกลางดูดซับ Streamline Direct HST1 (Adsorbent, GE Healthcare; Sweden)

3.2 การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากบ่อน้ำพุร้อน

3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

3.2.1.1 พื้นที่เก็บตัวอย่าง

สืบค้นแหล่งน้ำพุร้อนในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี ผ่านฐานข้อมูลจังหวัดสุราษฎร์ธานี พบว่ามีแหล่งน้ำพุร้อนทั้งสิ้น 8 แหล่ง ดังตารางที่ 3-1 จากนั้นออกสำรวจลักษณะทางกายภาพของพื้นที่ เก็บตัวอย่าง ระบุตำแหน่งและวัดอุณหภูมิในพื้นที่จริง บันทึกข้อมูลอุณหภูมิ และสำรวจพื้นที่โดยรอบ (ตารางที่ 3-1 และภาพที่ 3-1) จากข้อมูลอุณหภูมิและลักษณะของพื้นที่ สามารถคัดเลือก

พื้นที่เก็บตัวอย่างได้ 4 แหล่งด้วยกัน คือ บ่อกรัง เขาน้อย เขานางฮี และเขาตอก เนื่องจากลักษณะของพื้นที่ยังคงได้รับการรักษาความเป็นธรรมชาติดั้งเดิมของพื้นที่ และมีการดูแลรักษาเพื่อให้คงอยู่ โดยองค์กรท้องถิ่น

ตารางที่ 3-1

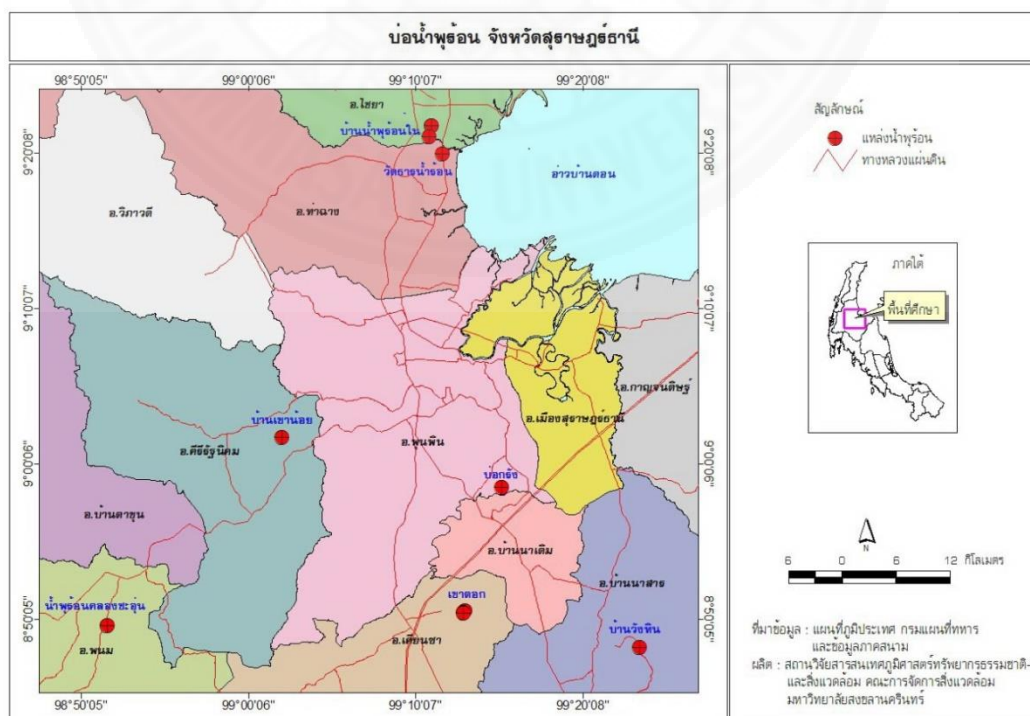
แหล่งน้ำพุร้อน 8 แหล่ง ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

	ชื่อน้ำพุร้อน	แหล่ง	ตำแหน่ง	อุณหภูมิ
1	บ้านน้ำพุร้อน	หมู่ที่ 2 บ้านน้ำพุร้อน ต.เลม็ด อ.ไชยา	ตำแหน่งที่ 1. บริเวณน้ำผุด N 9° 21.891' E 99° 11.350'	54 °C
			ตำแหน่งที่ 2. N 9° 21.883' E 99° 11.351'	42 °C
2	เขานางฮี (บ้านน้ำพุร้อนใน)	บ้านเขาน้ำร้อนใน ต.เลม็ด อ. ไชยา	ตำแหน่งที่ 1 บริเวณขอบบ่อ. ของน้ำผุด N 9° 21.342' E 99° 11.040'	42 °C
3	วัดธารน้ำร้อน	วัดธารน้ำร้อน หมู่ 1 ต.เขาถ่าน อ.ท่าฉาง	ตำแหน่งที่ 1. บริเวณขอบบ่อ N 9° 20.045' E 99° 12.073'	37 °C
4	น้ำพุร้อนคลองชะอุ่น	ต. คลองชะอุ่น อ. พนม	ตำแหน่งที่ 1. บริเวณขอบบ่อ N 8° 49.719' E 98° 50.457'	54 °C
			ตำแหน่งที่ 2. N 8° 49.728' E 98° 50.448'	48 °C
5	บ้านเขาน้อย	บ้านเขาน้อย หมู่ 5 ต. บ้านสิงขร อ. ศิริรัฐนิคม	ตำแหน่งที่ 1. จุดปล่อยจากบ่อ N 9° 1.828' E 99° 1.733'	50 °C
6	บ่อกรัง (รัตนโกสัย)	หมู่ 6 ต. ท่าสะท้อน อ. พุนพิน	N 8° 58.622' E 99° 15.881'	56 °C

	ชื่อน้ำพุร้อน	แหล่ง	ตำแหน่ง	อุณหภูมิ
7	บ้านวังหิน	หมู่ 5 ต. เพิ่มพูนทรัพย์ อ. บ้านนาสาร	N 8° 48.282' E 99° 24.799'	42 °c
8	เขาดอก	เขตหนองทุ่งทอง หมู่ 2 ต. เขาดอก อ. เคียนซา	บ่อที่ 1. บริเวณน้ำผุด N 8° 55.635' E 99° 16.513'	61.5 °c
			บ่อที่ 2. N 8° 50.534' E 99° 13.450'	51 °c
			บ่อที่ 3. ตำแหน่งที่ 1 N 8° 50.533' E 99° 13.458'	62 °c
			ตำแหน่งที่ 2	53 °c

ภาพที่ 3-1

แผนที่แสดงตำแหน่งบ่อน้ำพุร้อนในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี



3.2.1.2 การเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน

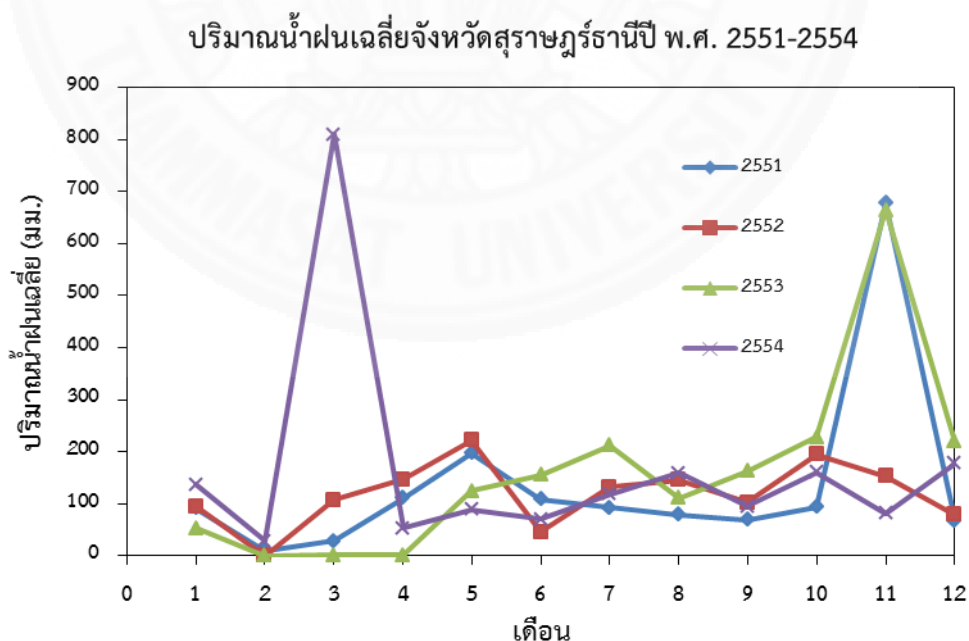
กำหนดช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างโดยสำรวจข้อมูลปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยย้อนหลัง 4 ปีของจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ภาพที่ 3-2) พบว่าลักษณะภูมิอากาศของจังหวัดสุราษฎร์ธานีแบ่งออกเป็น 2 ช่วง ได้แก่ช่วงปริมาณฝนน้อยคือเดือนพฤษภาคม และช่วงปริมาณฝนมากคือเดือนพฤศจิกายน จึงเลือกทำการเก็บตัวอย่างในช่วงฝนน้อย เพื่อลดการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียจากภายนอกน้ำพุร้อนซึ่งอาจไหลมาพร้อมกับน้ำฝน

ออกเก็บไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน 4 แหล่งได้แก่ บ่อกรัง เขาน้อย เขานางฮี และเขาดอก เมื่อวันที่ 18 พฤษภาคม พ.ศ. 2555 เก็บตัวอย่างแบบสุ่มโดยใช้ซอนสแตนเลสตัดแผ่นไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ขอบบ่อใส่ถุงพลาสติก จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปในถุง 100 มิลลิลิตร พร้อมจดบันทึกข้อมูลอุณหภูมิ ระบุตำแหน่งพิกัดของแต่ละแหล่ง แล้วนำตัวอย่างกลับไปยังห้องปฏิบัติการ

นำตัวอย่างที่เก็บได้ใส่ในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 10 วัน จากนั้นจึงนำไปคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียต่อไป

ภาพที่ 3-2

ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยในแต่ละเดือนของจังหวัดสุราษฎร์ธานีปี พ.ศ. 2551-2554



3.2.2 การแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย

คัดแยกไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงด้วยเทคนิคสเปรดเพลท (Spread-plate technique) โดยสู่มตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากพลาสติกมาใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 1 นาที จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียนี้ไปเจือจาง 100 เท่า แล้วดูดตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร spread บนอาหารแข็งสูตร BG-11 พันขอบจานเพาะเลี้ยงด้วยแผ่นพาราฟิล์ม แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง เมื่อพบโคโลนีของไซยาโนแบคทีเรีย เชื้อโคโลนีที่เจริญไปเลี้ยงในพลาสติกซึ่งมีอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง และเขย่าวันละครั้ง เมื่อไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโต ดูดตัวอย่างที่คัดแยกได้มา spread ข้ำ และแยกโคโลนีเดี่ยวอีกครั้งเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้จะเก็บรักษาในหลอดฝาเกลียว ซึ่งมีอาหารสูตร BG-11 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรและบ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง

3.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

3.3.1 การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำพุร้อนเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

คัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการเจริญเติบโตได้ดีจำนวน 1 สายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้คือ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 เพื่อนำไปศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่ผลิตได้ต่อไป การเพิ่มปริมาณเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ ทำโดยดูดตัวอย่างกล้าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส ให้แสง 24 ชั่วโมง และเขย่าทุกวัน

3.3.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำพุร้อน

นำกล้าเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (OD_{730}) เท่ากับ 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 180 มิลลิลิตร บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 3600 ลักซ์ตลอดเวลา มีการเขย่า 100 รอบต่อนาที และให้แสงตลอดเวลาสู่มเก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุก 2 วัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร นำข้อมูลไปเขียนกราฟหาอัตราการเจริญเติบโต จำเพาะโดยใช้โปรแกรม Microsoft office excel 2010 โดยดำเนินการ 3 ข้ำ

3.4 การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเชื้อของไซยาโนแบคทีเรีย

3.4.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ ไซยาโนแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ที่คัดแยกได้จากน้ำพุร้อนบ่อกรัง หมู่ที่ 6 ตำบลท่าสะท้อน อำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี และ *Synechococcus cedrorum* TISTR 8589 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปกติที่ใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.4.2 การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

ในการศึกษาครั้งนี้ไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิสูง คือ TUBT-T01 และไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงที่เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิปกติ คือ TISTR 8589 เพาะเลี้ยง TUBT-T01 และ TISTR 8589 ในอาหารเหลวสูตร BG-11 ในขวดขนาด 2 ลิตร ให้อากาศ 6.5 ลิตร ต่อนาที และให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง โดย TUBT-T01 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 ± 1 องศาเซลเซียส ส่วน TISTR 8589 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เก็บเกี่ยวที่ระยะเวลา 15 ถึง 20 วัน ทำการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ซ้ำ 3 รอบ (ใช้ไซยาโนแบคทีเรียเริ่มต้น 0.2 ลิตร เติมน้ำ BG-11 1.8 ลิตร) เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 3000xg เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ออบเซลล์แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บดให้ละเอียดโดยใช้โกร่ง และร่อนผ่านตะแกรงขนาดรูพรุน 180 ไมครอน เก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.5 การเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบ

3.5.1 ศึกษาสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน

ทดสอบสารละลายที่ใช้ในการสกัด ซี-ไฟโคไซยานิน โดยสารละลายที่ใช้ได้แก่ น้ำกลั่น โปแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ศึกษาที่พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, และ 8.0 และโซเดียมคลอไรด์ศึกษาที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, และ 250 มิลลิโมลาร์ เก็บตัวอย่างเมื่อเวลาผ่านไป 0, 8, 16, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง โดยในการสกัดซี-ไฟโคไซยานินใช้สัดส่วนระหว่างเซลล์แห้งต่อสารละลายที่ใช้สกัดในอัตราส่วน 1 กรัม ต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายสีฟ้าที่สกัดได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินจากสมการดังต่อไปนี้

ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน (มก/มล.) = $[A620 - 0.7 A650]/7.38$ (Leu และคณะ, 2013)

ความบริสุทธิ์ = $A620/A280$ (Romay และคณะ, 2003)

3.5.2 การเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบ

การสกัดเพื่อเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบสำหรับใช้ในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นขึ้นด้วยเทคนิคดูดซับ โดยใช้เซลล์แห้ง 50 กรัม สกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 1 ลิตร มีการกวนตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000xg เก็บส่วนของสารละลายไว้ที่ -20 สำหรับใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.6 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ

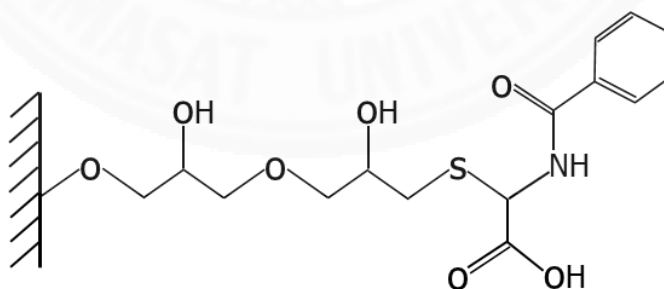
3.6.1 การหาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินของตัวแลกเปลี่ยนประจุ

3.6.1.1 การเตรียมตัวกลางดูดซับ

ตัวกลางดูดซับที่ใช้ในการทดลอง คือ Streamline Direct HST1 ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวกที่มีหลายหมู่ฟังก์ชันประกอบกันเป็นลิแกนด์ ดังภาพที่ 3-3

ภาพที่ 3-3

ลิแกนด์ของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก Streamline Direct HST1



ดัดแปลงจาก กรวิชัย และคณะ, 2553

ทำการเตรียมตัวกลางดูดซับ โดยเติมตัวกลางดูดซับ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดพลาสติกฝาเกลียว 18 หลอด ล้างตัวกลางดูดซับด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง ทำให้ตัวกลางดูดซับอิ่มตัวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ จำนวน 5 ครั้ง และทำให้

ตัวกลางดูดซับอิมมัตว์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จำนวน 10 ครั้ง โดยทำการศึกษาที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0

3.6.1.2 การเตรียมสารละลายซี-ไฟโคไซยานิน

ทำโดยปรับพีเอชของสารละลายซี-ไฟโคไซยานินให้เท่ากับ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 และปรับความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่ทุกพีเอชให้เท่ากัน

3.6.1.3 การหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับ

ทำโดยเติมสารละลายซี-ไฟโคไซยานินที่แต่ละพีเอชปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีตัวกลางดูดซับที่ผ่านการทำให้อิมมัตว์ด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชเดียวกัน นำไปเขย่าแบบกลับหลอดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง วิเคราะห์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินในส่วนใส ที่แต่ละพีเอชทำการทดลอง 3 ซ้ำ ติดตามผลการทดลองด้วย SDS-PAGE

3.6.2 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ

เตรียมตัวกลางดูดซับและสารละลายซี-ไฟโคไซยานินเช่นเดียวกับการหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับ โดยเลือกใช้พีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับ และขยายขนาดการเก็บเกี่ยวโดยเพิ่มปริมาตรของตัวกลางดูดซับเป็น 10 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรของสารละลายซี-ไฟโคไซยานิน 50 มิลลิลิตร ทำการดูดซับเป็นเวลา 20 นาที จำนวน 5 ครั้ง ล้างสารปนเปื้อนที่ไม่ถูกดูดซับด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เซซี-ไฟโคไซยานินออกจากตัวกลางดูดซับด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีพีเอชสูงกว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับ 1 หน่วยพีเอช ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินที่เก็บเกี่ยวได้

3.7 การศึกษาสมบัติทนร้อนของซี-ไฟโคไซยานิน

การศึกษาสมบัติทนร้อนของซี-ไฟโคไซยานินทำโดยศึกษาผลของพีเอชและความร้อนที่มีต่อความคงตัวของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 และ TISTR 8589

เตรียมตัวอย่างซี-ไฟโคไซยานินเพื่อศึกษาจลนศาสตร์การสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานิน โดยใช้สารละลายซี-ไฟโคไซยานินที่เก็บเกี่ยวได้ ศึกษาที่อุณหภูมิ 4, 25, 50, 60, 70, และ 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 เก็บตัวอย่างเมื่อเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180,

และ 240 นาที เพื่อหาความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน และคำนวณค่าคงที่ในการสลายตัว (k_d) ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของซี-ไฟโคไซยานิน คำนวณร้อยละความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่เหลือ และหาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากสมการอาร์เรเนียส โดยสามารถหาพารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาได้ดังต่อไปนี้

ร้อยละความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่เหลือ (C_R)

$$C_R (\%) = [C/C_0] \times 100$$

โดย C_R คือ ร้อยละความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่เหลือ
 C คือ ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินในช่วงเวลาที่ศึกษา
 C_0 คือ ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินในช่วงเวลาเริ่มต้น

ค่าคงที่ในการสลายตัว (k_d)

$$\ln[C/C_0] = -k_d t$$

โดย C คือ ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินในช่วงเวลาที่ศึกษา
 C_0 คือ ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินในช่วงเวลาเริ่มต้น
 k_d คือ ค่าคงที่อัตราการสลายตัวมีหน่วยเป็นต่ออนาที

ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$)

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_d$$

โดย $t_{1/2}$ คือ เวลาที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของซี-ไฟโคไซยานินลดลงครึ่งหนึ่ง
 k_d คือ ค่าคงที่อัตราการสลายตัวมีหน่วยเป็นต่ออนาที

สมการอาร์เรเนียส

$$k_d = Ae^{-E_d/RT}$$

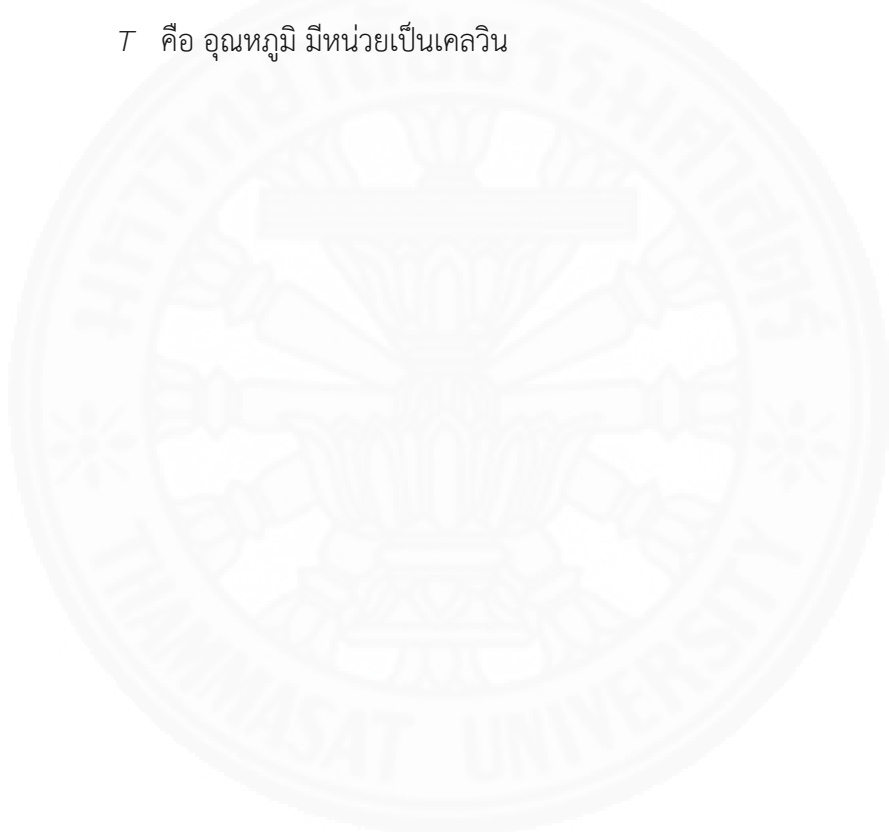
โดย k_d คือ ค่าคงที่อัตราการสลายตัวมีหน่วยเป็นต่อนาที

A คือ อาร์เรเนียสแฟกเตอร์ หรือแฟกเตอร์แห่งความถี่มีหน่วยเป็นต่อนาที

E_d คือ พลังงานก่อกัมมันต์ มีหน่วยเป็นแคลอรีต่อกรัมโมล

R คือ ค่าคงที่ของแก๊ส มีหน่วยเป็นแคลอรีต่อกรัมโมลเคลวิน

T คือ อุณหภูมิ มีหน่วยเป็นเคลวิน



บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกไฮยาโนแบคทีเรียจากบ่อน้ำพุร้อน

การเก็บตัวอย่างไฮยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนได้เลือกเก็บใน 4 แหล่ง คือ บ่อกรัง เขาน้อย เขานางฮี และเขาดอก (ตารางที่ 4-1) เนื่องจากแหล่งดังกล่าวอยู่ในพื้นที่ที่ได้รับการรักษาความเป็นธรรมชาติดั้งเดิม และมีการดูแลรักษาโดยองค์กรท้องถิ่น

ตารางที่ 4-1

แหล่งน้ำพุร้อน 4 แหล่ง ที่เลือกใช้เป็นแหล่งในการเก็บตัวอย่างไฮยาโนแบคทีเรีย
ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

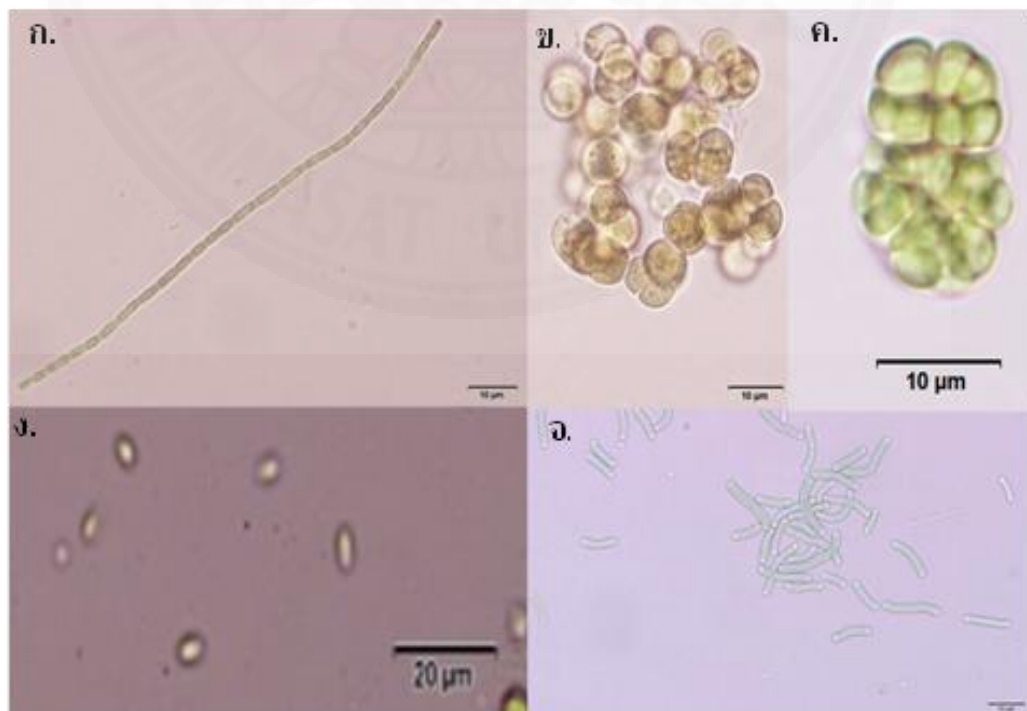
	ชื่อน้ำพุร้อน	แหล่ง	ตำแหน่ง	อุณหภูมิ
1	เขาดอก	เขตหนองทุ่งทอง หมู่ 2 ต. เขาดอก อ. เคียนซา	บ่อที่ 1 บริเวณน้ำผุด N 8° 55.635' E 99° 16.513'	61.5 °C
			บ่อที่ 2 N 8° 50.534' E 99° 13.450'	51 °C
			บ่อที่ 3 ตำแหน่งที่ 1 N 8° 50.533' E 99° 13.458'	62 °C
			บ่อที่ 3 ตำแหน่งที่ 2	53 °C
2	เขานางฮี (บ้านน้ำพุร้อนใน)	บ้านเขาน้ำร้อนใน ต. เลม็ด อ.ไชยา	ตำแหน่งที่ 1 บริเวณขอบบ่อของ น้ำผุด N 9° 21.342' E 99° 11.040'	42 °C
3	บ้านเขาน้อย	บ้านเขาน้อย หมู่ 5 ต. บ้านสิงขร อ. คีรีรัฐนิคม	ตำแหน่งที่ 1 จุดปล่อยจากบ่อ N 9° 1.828' E 99° 1.733'	50 °C

	ชื่อน้ำพุร้อน	แหล่ง	ตำแหน่ง	อุณหภูมิ
4	บ่อกรัง (รัตนโกสัย)	หมู่ 6 ต. ท่าสะท้อน อ. พุนพิน	N 8° 58.622' E 99° 15.881'	56 °C

เลือกทำการเก็บตัวอย่างในช่วงฝนน้อย (เก็บตัวอย่างช่วงเดือนพฤษภาคม) เพื่อลดการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียจากภายนอกบ่อน้ำพุร้อนซึ่งอาจไหลมาพร้อมกับน้ำฝน จากการสุ่มเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนจำนวน 4 แหล่งในจังหวัดสุราษฎร์ธานี มาคัดแยกด้วยเทคนิคสเปคโตรฟลูออโรเมตริกโดยสเปคโตรบนาอาหารแข็งสูตร BG-11 ที่เติมโซเดียมไนเตรท ปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอดเวลา พบไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์ (ภาพที่ 4-1) ซึ่งเป็นการคัดแยกโดยใช้อาหาร BG-11 เพียงอย่างเดียวเท่านั้น โดยพบว่า *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 (ภาพที่ 4-2) เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพจึงนำไปศึกษาการเจริญเติบโตต่อไป ในขณะที่สายพันธุ์อื่นจะมีการเจริญแบบรวมตัวกันเป็นก้อนและ/หรือ ยึดติดกับผนังภาชนะ

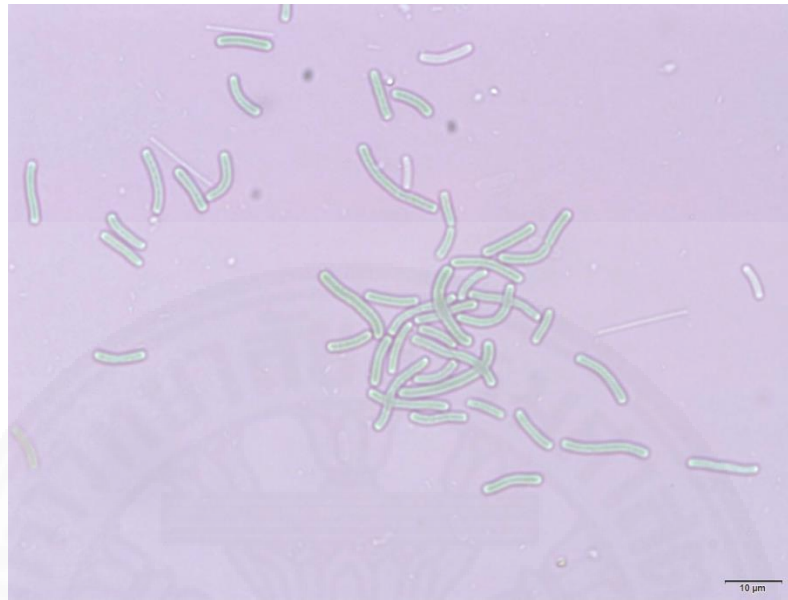
ภาพที่ 4-1

สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ภาพ ก. และ ภาพ ข. คัดแยกจากเขานางสี
ภาพ ค. คัดแยกจากเขาน้อย ภาพ ง. คัดแยกจากเขาดอก และภาพ จ. คัดแยกจากบ่อกรัง

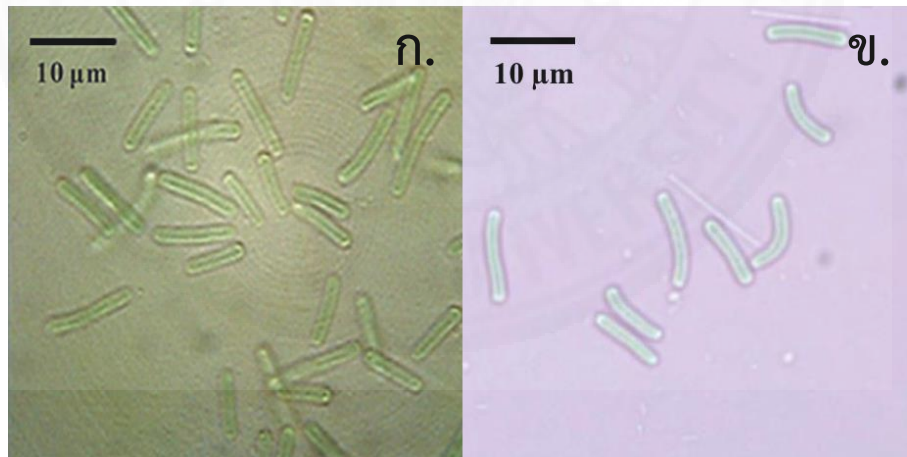


ภาพที่ 4-2

TUBT-T01 คัดแยกได้จากบ่อกรัง



ภาพที่ 4-3

Thermosynechococcus sp. CL-1 (ก.) TUBT-T01 (ข.)

โดยเมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ TUBT-T01 พบว่ามีลักษณะใกล้เคียง *Thermosynechococcus* sp. CL-1 (Hsueh และคณะ, 2007) แสดงดังภาพที่ 4-3 (ก) คัดแยกจากน้ำพุร้อนแอลคาไลในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของไต้หวัน ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกับ *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 และ *Synechococcus elongatus* ตามการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA โดย *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำพุร้อนในเมืองทางภาคใต้ของประเทศญี่ปุ่น มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว

สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 45-65 องศา มีการศึกษาจีโนมทั้งหมด ซึ่งมีลักษณะโครโมโซมเป็นรูปวงแหวนขนาดประมาณ 2.6 ล้านคู่เบส (Nakamura และคณะ, 2002) ซึ่งทำให้มีฐานข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ในการศึกษา

ทั้งนี้ ยังมีการศึกษาทางฟิสิกศาสตร์ของซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูง ได้แก่ *S. elongatus* และ *S. vulcanus* พบว่าภายในโครงสร้างซี-ไฟโคไซยานินมีกรดอะมิโนอนุรักษ์ซึ่งเป็นตำแหน่งจับกับโครโมฟอร์ ได้แก่ กรดอะมิโนซิสเทอีนตำแหน่งที่ 84 ของหน่วยย่อยแอลฟา และ ตำแหน่งที่ 82 และ 153 ของหน่วยย่อยเบต้า (Adir และคณะ, 2002 และ Adir และ Lerner, 2003) และยังพบว่ามีกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในอะโปโปรตีนของซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย *S. elongatus* และ *S. vulcanus* แต่ไม่มีการอนุรักษ์ไว้ในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. PCC7002 ซึ่งเจริญเติบโตที่อุณหภูมิปานกลาง ซึ่งได้แก่ กรดอะมิโนแอสพาเทตในตำแหน่งที่ 28 ของหน่วยย่อยแอลฟาที่สามารถจับกับแอสพาราจिनในตำแหน่งที่ 35 ของหน่วยย่อยเบต้าและโครโมฟอร์ และกรดอะมิโนเซอร์รินในตำแหน่งที่ 72 ของหน่วยย่อยแอลฟา ที่สามารถจับกับกรดอะมิโนอาร์จินีนในตำแหน่งที่ 57 ของหน่วยย่อยเบต้า ในอีกโมโนเมอร์หนึ่งได้ และกรดอะมิโนกลูตามีนในตำแหน่งที่ 68 ของหน่วยย่อยเบต้าสามารถจับกับกรดอะมิโนอาร์จินีนในตำแหน่งที่ 86 ของหน่วยย่อยแอลฟาในอีกโมโนเมอร์หนึ่งได้ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ถูกอนุรักษ์ของซี-ไฟโคไซยานินที่ตำแหน่งดังกล่าว ช่วยสร้างความเสถียรของโครงสร้างซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูง (Adir และคณะ, 2001)

นอกจากนี้ ยังมีการรายงานที่พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในอุณหภูมิสูงซึ่งได้แก่ *Thermosynechococcus elongatus* TA-1 มีซี-ไฟโคไซยานินที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงด้วยโดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ยังคงมีกิจกรรมของซี-ไฟโคไซยานินถึง 65.65 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคิดจากการปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Leu และคณะ, 2013)

จากเหตุผลสนับสนุนข้างต้นทำให้ TUBT-T01 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสม ในการศึกษาการผลิตและการศึกษาสมบัติทนอุณหภูมิของซี-ไฟโคไซยานิน

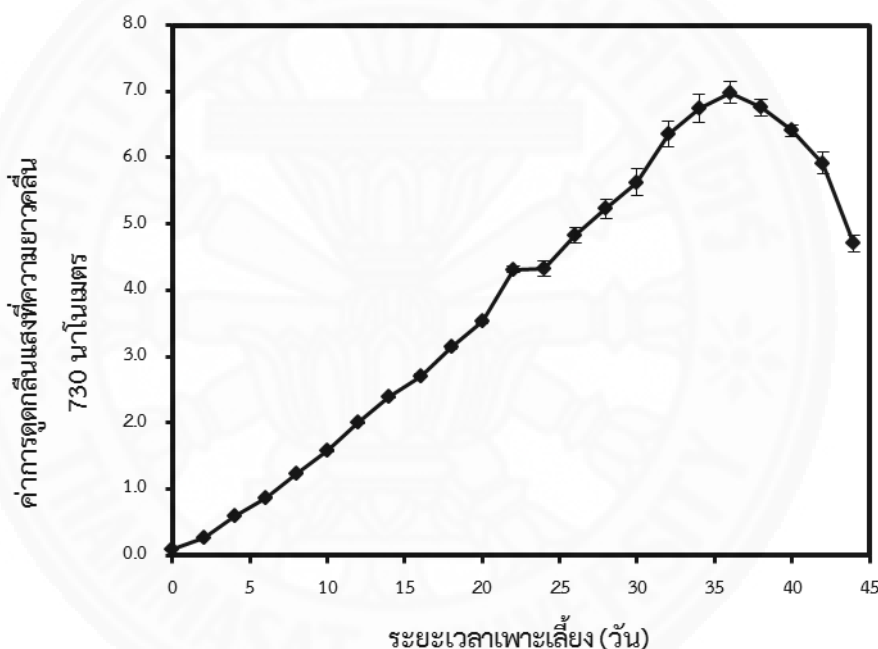
4.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย ในอาหารสูตร BG-11 ที่เติม NaNO_3 ปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่า 100 รอบต่อนาที และให้แสงตลอดเวลา เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน เป็นระยะเวลา 44 วัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร พบว่าวันที่ 36 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 6.98 (ภาพที่ 4-4) และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.155 ต่อวัน ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ

Oscillatoria sp. BG 00205 ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.157 ต่อวัน แต่น้อยกว่า *Oscillatoria* sp. BG 00105 และ *Oscillatoria* sp. BG 00305 ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.170 ต่อวัน และ 0.258 ต่อวัน ตามลำดับ (กัญญาลักษณ์และคณะ, 2554) และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตกับสายพันธุ์ *Nostoc* sp. TUBT01 และ *Nostoc* sp. TUBT02 ที่เลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีการเติมไนโตรเจน พบว่า TUBT-T01 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำกว่า โดยทั้ง 2 สายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.162 ต่อวัน และ 2.688 ต่อวัน ตามลำดับ (กันต์กนิษฐ และคณะ, 2555)

ภาพที่ 4-4

การเจริญเติบโตของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01



4.3 การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเชื้อของไซยาโนแบคทีเรีย

สำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย สายพันธุ์ TUBT-T01 และ TISTR 8589 ในขวดปริมาตร 2 ลิตร ผลแสดงดังตารางที่ 4-2 พบว่าหลังจากเก็บเกี่ยวเซลล์ สายพันธุ์ TUBT-T01 มีปริมาณของเซลล์เปียกและเซลล์แห้งเท่ากับ 0.89 และ 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ TISTR 8589 ที่สามารถเก็บเกี่ยวของเซลล์เปียกและเซลล์แห้งเท่ากับ 6.67 และ 1 กรัมต่อลิตร พบว่า TUBT-T01 เก็บเกี่ยวเซลล์จากการเพาะเลี้ยงได้น้อยกว่า TISTR 8589 โดยสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์แห้งได้มากกว่าถึง 4 เท่า ทั้งนี้ เนื่องมาจากข้อจำกัดของระบบการเพาะเลี้ยง TUBT-T01 ที่มีการเพาะเลี้ยงโดยใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำ

ควบคุมอุณหภูมิ ทำให้ยากต่อการออกแบบระบบการเพาะเลี้ยงให้แสงมีการส่องลงไปถึงก้นภาชนะเพาะเลี้ยงได้อย่างทั่วถึง ซึ่งเมื่อทำการออกแบบระบบการเพาะเลี้ยงดังภาพที่ 4-5 พบว่าแสงที่ให้แก่ระบบไม่สามารถส่องลงไปใต้ผิวน้ำได้เพียงพอ

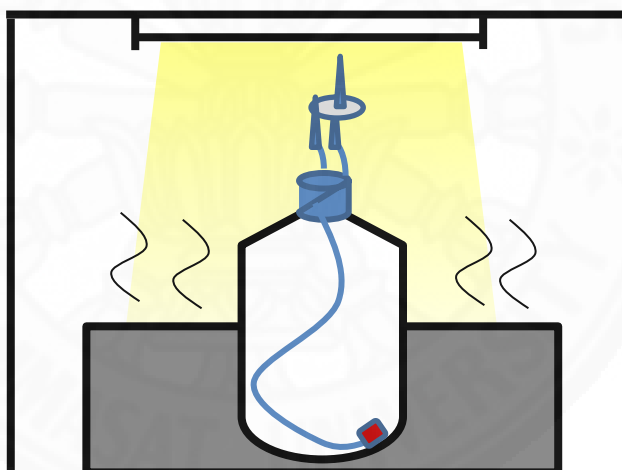
ตารางที่ 4-2

ผลน้ำหนักเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ TUBT-T01 และ TISTR 8589 จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ปริมาตร 2 ลิตร

ไซยาโนแบคทีเรีย	เซลล์เปียก (g/L)	เซลล์แห้ง (g/L)
TUBT-T01	0.89 ± 0.09	0.25 ± 0.03
TISTR 8589	6.67 ± 0.82	1.00 ± 0.01

ภาพที่ 4-5

ระบบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง TUBT-T01 เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สำหรับการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน



4.4 การเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบ

4.4.1 คีงษาสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน

ในการศึกษาสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน ทำการศึกษาโดยใช้ไซยาโนแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ TUBT-T01 และ TISTR 8589 โดยสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน ได้แก่ น้ำกลั่น โฟแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (แปรผันค่าพีเอชที่พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, และ 8.0) และโซเดียมคลอไรด์ (แปรผันความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, และ 250 มิลลิโมลาร์) ทำการสกัดซี-ไฟโคไซยานินโดยใช้เซลล์แห้ง

ของไซยาโนแบคทีเรีย (ทั้ง 2 สายพันธุ์) ต่อสารละลายที่ใช้ในการสกัดในอัตราส่วน 1 ต่อ 100 และบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผลที่ระยะเวลา 0, 8, 16, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง

4.4.1.1 ศึกษาสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก

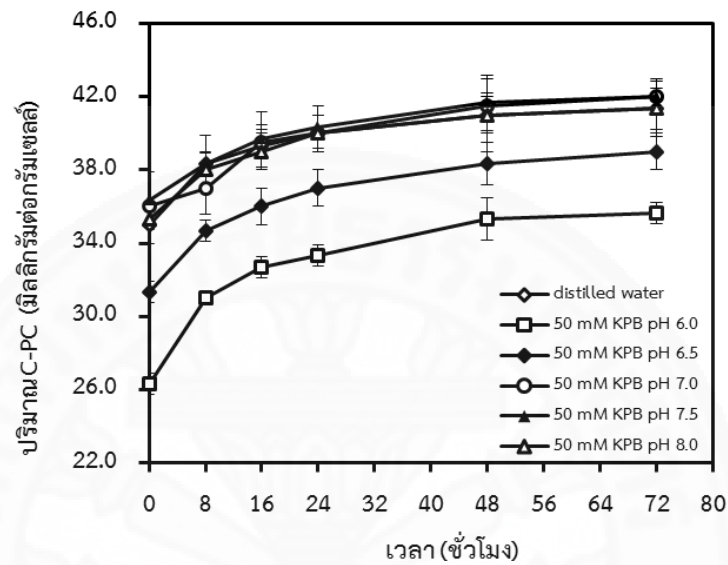
Thermosynechococcus sp. TUBT-T01

ผลการศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจากสายพันธุ์ TUBT-T01 แสดงดังภาพที่ 4-6 และภาพที่ 4-7 พบว่าการใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 และ 7.5 เป็นสารละลายในการสกัดที่เวลา 72 ชั่วโมง ให้สารสกัดหยาบที่มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินสูงสุดเท่ากับ 42.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ในขณะที่ใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 เป็นสารละลายในการสกัดที่เวลา 0 ชั่วโมง มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินต่ำสุดเท่ากับ 26.3 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Tukey test ($P \leq 0.05$) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยที่จำแนกตามเวลา และสารละลายที่ใช้ในการสกัดพบว่าปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และการใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7.0, 7.5, 8.0 และน้ำกลั่นเป็นสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน พบว่ามีปริมาณของซี-ไฟโคไซยานินไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากผลการทดลองทางสถิติข้างต้นสารละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 คือ การใช้น้ำกลั่นสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

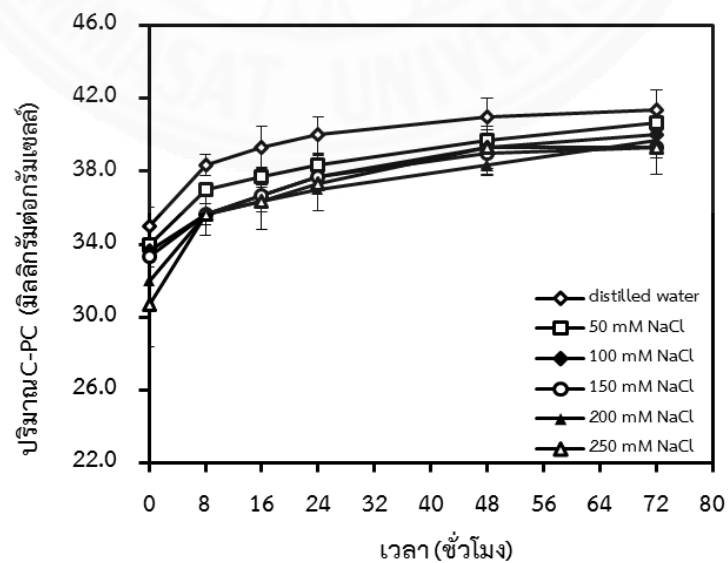
ภาพที่ 4-6

การศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน TUBT-T01 (น้ำกลั่น และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, และ 8.0) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (0, 8, 16, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง)



ภาพที่ 4-7

การศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน จาก TUBT-T01 (น้ำกลั่น และ โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, และ 250 มิลลิโมลาร์) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (0, 8, 16, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง)



4.4.1.2 ศึกษาสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก

Synechococcus cedrorum TISTR 8589

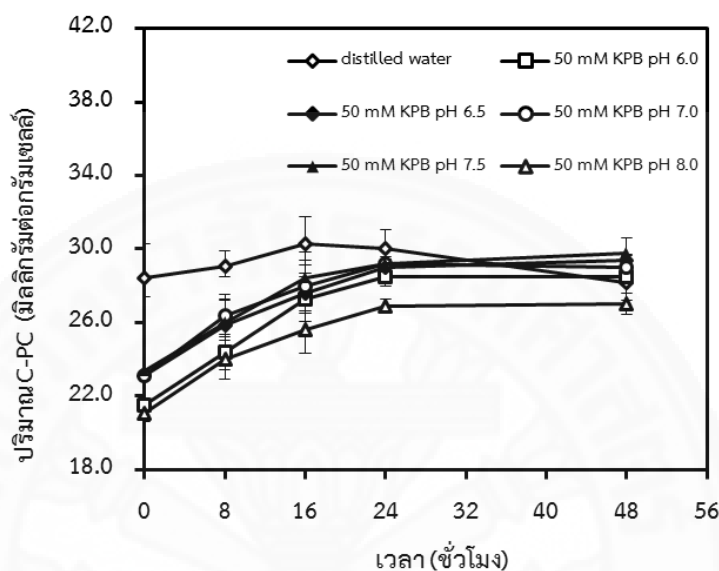
ผลการศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจากสายพันธุ์ TISTR 8589 แสดงดังภาพที่ 4-8 และภาพที่ 4-9 พบว่าการใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายในการสกัดที่เวลา 16 ชั่วโมง ให้สารสกัดหยาบที่มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินสูงสุดเท่ากับ 30.3 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งในขณะที่การใช้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ เป็นสารละลายในการสกัดที่เวลา 48 ชั่วโมง ให้ปริมาณซี-ไฟโคไซยานินต่ำสุดเท่ากับ 19.4 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

อย่างไรก็ตาม การสกัดโดยใช้น้ำกลั่นนั้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเป็น 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินลดลง ซึ่งแตกต่างจากการใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6.5, 7.0, และ 7.5 ที่สกัดได้ช้ากว่า แต่ปริมาณความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินไม่ลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลา แสดงให้เห็นว่าซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จาก TISTR 8589 อาจมีการเสียดสภาพได้เมื่อเก็บในน้ำกลั่น 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลามากกว่า 16 ชั่วโมง ดังนั้น หากต้องการสกัดซี-ไฟโคไซยานินเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป ควรเลือกใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6.5, 7.0, และ 7.5

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Tukey test ($P \leq 0.05$) พบว่าปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้ที่เวลา 8 16 และ 24 ชั่วโมงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และการใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7.0 และ 7.5 และน้ำกลั่นเป็นสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน พบว่ามีปริมาณของซี-ไฟโคไซยานินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากผลการทดลองทางสถิติข้างต้นพบว่าวิธีการที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 คือ การใช้น้ำกลั่นหรือ ฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7.0 และ 7.5 สกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายที่ใช้ในการสกัดให้ปริมาณซี-ไฟโคไซยานินสูงสุด แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเป็น 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินลดลง ซึ่งแตกต่างจากการใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7.0 และ 7.5 ที่สกัดได้ช้ากว่า แต่ปริมาณความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินเมื่อเพิ่มระยะเวลา แสดงให้เห็นว่าซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จาก TISTR 8589 อาจมีการเสียดสภาพได้เมื่อเก็บในน้ำกลั่น 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นหากต้องการสกัดซี-ไฟโคไซยานินเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป ควรเลือกใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7.0 หรือ 7.5

ภาพที่ 4-8

การศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน จาก TISTR 8589 (น้ำกลั่น และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, และ 8.0) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (0, 8, 16, 24, และ 48 ชั่วโมง)

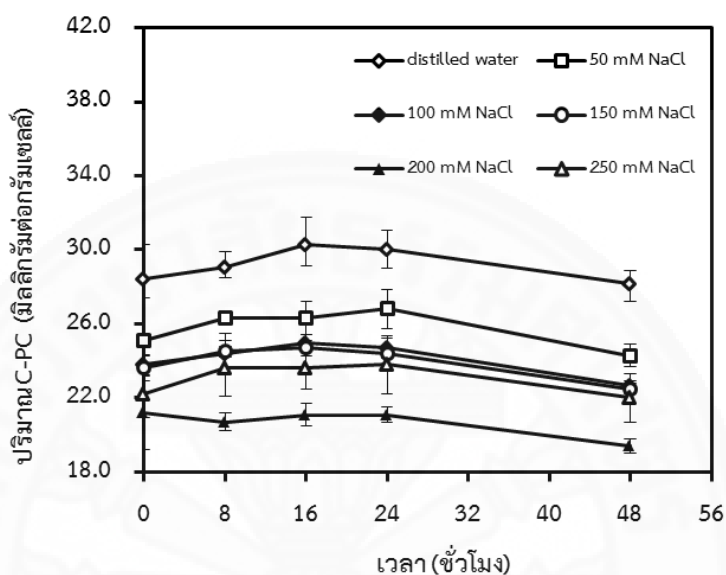


เมื่อเปรียบเทียบการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 ในครั้งนี้พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จาก TUBT-T01 มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินสูงกว่า สารสกัดหยาบที่ได้จาก TISTR 8589 โดยมากกว่าประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

เมื่อเปรียบเทียบกับซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ พบว่าซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินน้อยกว่า *Oscillatoria okeni* TISTR 8549 ที่สกัดด้วยวิธีการแช่แข็ง-ละลายซึ่งมีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินสูงสุดเท่ากับ 91.01 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ (กัญญาลักษณ์ และคณะ, 2554) แต่มีปริมาณ ซี-ไฟโคไซยานินสูงกว่า *Synechococcus* sp. IO9201 ที่สกัดด้วยวิธีการแช่แข็ง-ละลาย โดยใช้ Alkaline phase เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ซึ่งมีความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินเท่ากับ 27.11 ไมโครกรัมต่อลิตร (Abalde และคณะ, 1998)

ภาพที่ 4-9

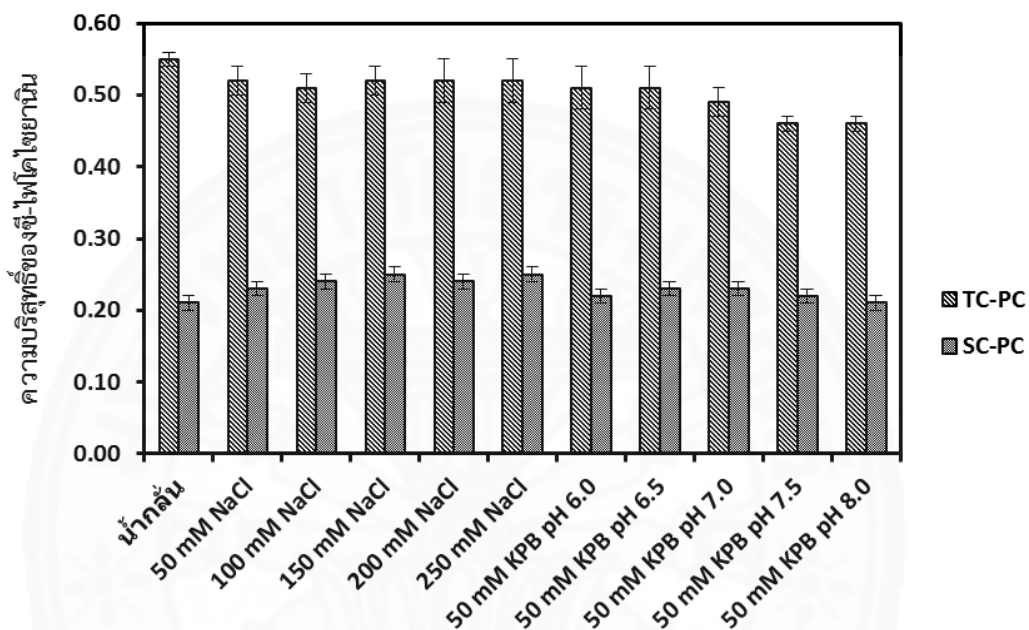
การศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 (น้ำกลั่น และ โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, และ 250 มิลลิโมลาร์) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ (0, 8, 16, 24, และ 48 ชั่วโมง)



แต่เมื่อพิจารณาที่ค่าความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้ พบว่าซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จาก TUBT-T01 มีความบริสุทธิ์สูงกว่าซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จาก TISTR 8589 โดยมีความบริสุทธิ์สูงกว่าประมาณสองเท่า จากภาพที่ 4-10 จะเห็นว่าค่าความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดด้วยสารละลายชนิดต่าง ๆ มีค่าอยู่ที่ 0.46 – 0.55 โดยสารละลายที่ใช้สกัดแล้วให้ซี-ไฟโคไซยานินมีความบริสุทธิ์สูงสุด คือ น้ำกลั่น ให้ค่าความบริสุทธิ์ที่ 0.55 ในส่วนของซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จาก TISTR 8589 มีค่าความบริสุทธิ์อยู่ที่ 0.21 - 0.25 โดยสารละลายที่ใช้สกัดแล้วให้ค่าความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินสูงสุด คือ โซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ และ 250 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าความบริสุทธิ์ที่ 0.25

ภาพที่ 4-10

ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 ที่สกัดโดยใช้น้ำกลั่น โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, และ 250 มิลลิโมลาร์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, และ 8.0 (คิดจากค่าเฉลี่ยของเวลาที่ใช้เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 8, 16, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง)



4.4.2 การเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบ

ในส่วนของการเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป เลือกใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ในอัตราส่วน 1: 50 ในการสกัด เนื่องจากซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบที่ได้ต้องการนำไปใช้ในกระบวนการต่อไป คือ การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ จึงเลือกใช้สารละลายที่ทำให้ซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากทั้งสองสายพันธุ์มีความเสถียรเมื่อเก็บไว้ในระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งสังเกตจากผลการสกัดที่ระยะเวลาต่าง ๆ ทั้งนี้ เลือกใช้ที่พีเอช 7 เนื่องจากเป็นค่าที่อยู่ในช่วงพีเอชที่ศึกษาในขั้นตอนต่อไป ผลการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 แสดงดังตารางที่ 4-3 มีความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินเท่ากับ 30.28 และ 15.88 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ตามลำดับ และมีค่าความบริสุทธิ์เท่ากับ 0.88 และ 0.47 ตามลำดับ

ตารางที่ 4-3

การสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ในอัตราส่วน 1: 50

สายพันธุ์	CPC (mg/ml)	ความบริสุทธิ์ของ CPC (A620/A280)	C-PC (mg/g _{cell})
TUBT-T01	0.61	0.88	30.28
TISTR 8589	0.32	0.47	15.88

4.5 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ

สำหรับการเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินด้วยวิธีการดูดซับแบบแบทช์ ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินของตัวแลกเปลี่ยนประจุ โดยศึกษาจากซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์คือ TUBT-T01 และ TISTR 8589 เมื่อได้พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับ ขยายขนาดการดูดซับเพื่อเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินสำหรับใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.5.1 การหาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินของตัวแลกเปลี่ยนประจุ

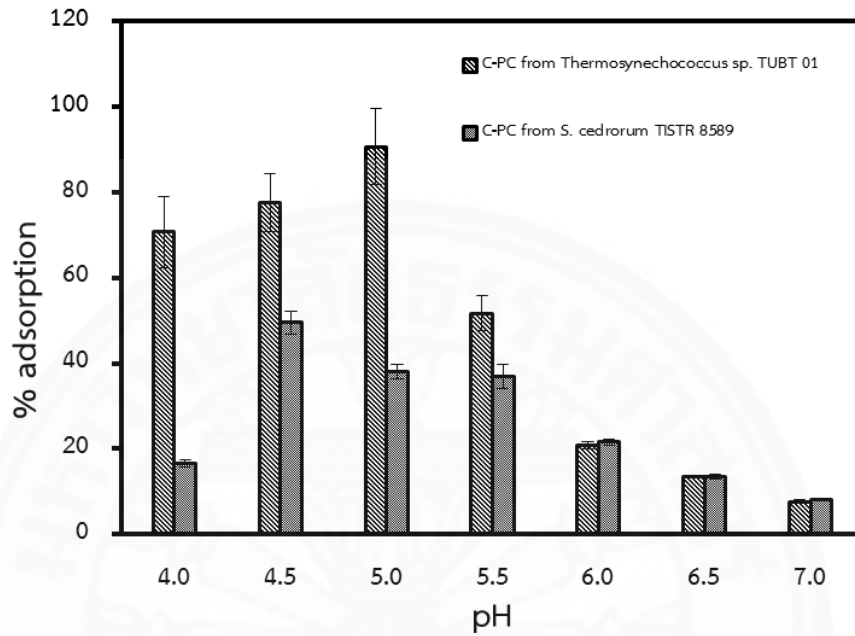
4.5.1.1 การหาพีเอชที่เหมาะสมของตัวแลกเปลี่ยนประจุสำหรับการดูดซับ

ซี-ไฟโคไซยานินจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01

หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินของตัวแลกเปลี่ยนประจุ โดยศึกษาที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 เมื่อทำการศึกษาซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานิน คือ พีเอช 5.0 สามารถดูดซับซี-ไฟโคไซยานินได้ 90.58 เปอร์เซ็นต์ โดยความเข้มข้นซี-ไฟโคไซยานินเริ่มต้นเท่ากับ 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นซี-ไฟโคไซยานินในสารละลายหลังจากผ่านการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเท่ากับ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถดูดซับซี-ไฟโคไซยานินได้ถึง 0.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ พีเอช 4.5 และ 4.0 ซึ่งสามารถดูดซับซี-ไฟโคไซยานินได้ 77.53 และ 70.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4-11 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการติดตามการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ Streamline Direct HST1 ด้วย SDS-PAGE ดังภาพที่ 4-12 และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Tukey test ($P \leq 0.05$) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยที่จำแนกตามพีเอชต่าง ๆ พบว่าปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่เหลืออยู่ในสารละลาย หลังจากผ่านการดูดซับเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ที่พีเอช 5.0, 4.5 และ 4.0 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

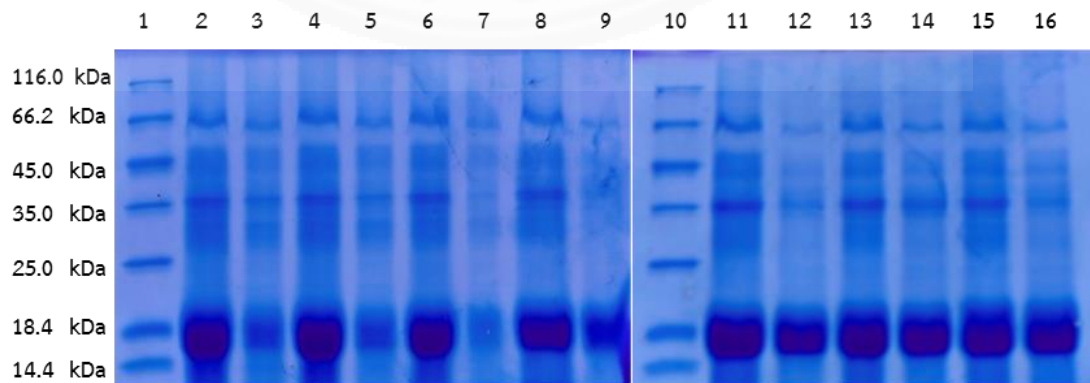
ภาพที่ 4-11

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 ศึกษาที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-12

การติดตามการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ของตัวกลาง แลกเปลี่ยนประจุ Streamline Direct HST1 ด้วย SDS-PAGE เมื่อแถวที่ 1 และ 10 คือ โปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 2, 4, 6, 8, 11, 13 และ 15 คือ สารละลายเริ่มต้นก่อนการดูดซับที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ตามลำดับ แถวที่ 3, 5, 7, 9, 12, 14, และ 16 คือ สารละลายส่วนใส หลังการดูดซับที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ตามลำดับ

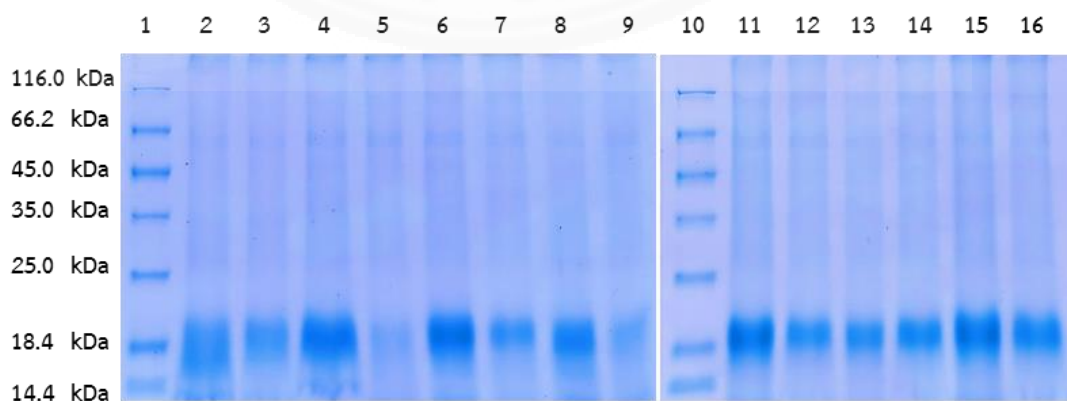


4.5.1.2 การหาพีเอชที่เหมาะสมของตัวแลกเปลี่ยนประจุสำหรับการดูดซับ ซี-ไฟโคไซยานินจาก *Synechococcus cedrorum* TISTR 8589

เมื่อทำการศึกษาซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TISTR 8589 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานิน คือ พีเอช 4.5 สามารถดูดซับซี-ไฟโคไซยานินได้ 49.48 เปอร์เซ็นต์ โดยความเข้มข้นซี-ไฟโคไซยานินเริ่มต้นเท่ากับ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นซี-ไฟโคไซยานินในสารละลายหลังจากผ่านการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เท่ากับ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถดูดซับซี-ไฟโคไซยานินได้ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือพีเอช 5.0 และ 5.5 ซึ่งสามารถดูดซับซี-ไฟโคไซยานินได้ 38.11 และ 36.89 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4-11 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการติดตามการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ Streamline Direct HST1 ด้วย SDS-PAGE ดังภาพที่ 4-13 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Tukey test ($P \leq 0.05$) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยที่จำแนกตามพีเอชต่างๆ พบว่าปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่เหลืออยู่ในสารละลาย หลังจากผ่านการดูดซับเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ที่พีเอช 4.5, 5.0 และ 5.5 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ภาพที่ 4-13

การติดตามการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ Streamline Direct HST1 ด้วย SDS-PAGE เมื่อแถวที่ 1 และ 10 คือโปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 2, 4, 6, 8, 11, 13 และ 15 คือสารละลายเริ่มต้นก่อนการดูดซับที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ตามลำดับ แถวที่ 3, 5, 7, 9, 12, 14, และ 16 คือสารละลายส่วนใสหลังการดูดซับที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ตามลำดับ



จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับพบว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์นั้นมีความแตกต่างกันโดยจากการศึกษาของเทพปัญญาและคณะ ในปี พ.ศ. 2553 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก *A. siamensis* TISTR 8012 ด้วยตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ Streamline Direct HST1 คือพีเอช 5.0

4.5.2 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับในหัวข้อก่อนหน้า ในการทดลองในส่วนนี้ได้นำค่าพีเอชที่เหมาะสมที่ได้มาขยายขนาดกระบวนการดูดซับ ดังรายละเอียดวิธีดำเนินการที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อ 3.6.2 เรื่องการเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ ซึ่งได้เพิ่มปริมาตรของตัวกลางดูดซับเป็น 10 มิลลิลิตร และใช้สารละลายซี-ไฟโคไซยานินทั้งหมด 250 มิลลิลิตร โดยแบ่งเป็นการดูดซับครั้งละ 50 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นจึงล้างสารปนเปื้อนที่ไม่ถูกดูดซับด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม และทำการชะซี-ไฟโคไซยานินออกจากตัวกลางดูดซับด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร โดยแยกการชะออกเป็น 5 ครั้ง ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ซึ่งการศึกษาในส่วนนี้แยกเป็น 2 ส่วนย่อยตามสารละลายซี-ไฟโคไซยานินที่ได้มาจากเชื้อ 2 ชนิด

4.5.2.1 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินจาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 เข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ

สำหรับการเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ในขั้นตอนการดูดซับเลือกใช้พีเอช 5.0 เนื่องจากเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับที่สุด ซึ่งผลในขั้นตอนการดูดซับแสดงดังตารางที่ 4-4 และภาพที่ 4-14 ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกดูดซับจะมีค่าลดลงเมื่อจำนวนครั้งในการเติมสารละลายใหม่เพิ่มขึ้น โดยหลังจาก 5 ครั้งของการดูดซับ โดยมีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกดูดซับ 59.16 มิลลิกรัม และคิดเป็นร้อยละซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกดูดซับ 83.19 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกดูดซับ 5.92 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวดูดซับ

ในขั้นตอนการชะ พบว่าสามารถชะซี-ไฟโคไซยานินออกมาได้สูงถึง 52.70 มิลลิกรัม หรือคิดเป็นปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกชะออกมาเท่ากับ 89.1 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4-5) และพบว่าปริมาณของซี-ไฟโคไซยานินลดลงในแต่ละครั้งของการชะออกจากตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ภาพที่ 4-15) ซึ่งสามารถสรุปผลการเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ได้ดังตารางที่ 4-6 ซึ่งสามารถเพิ่มความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินได้ 3.71 เท่า และให้ค่าผลได้เท่ากับ 74.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เพิ่ม

ความเข้มข้น ซี-ไฟโคไซยานินที่ได้ยังมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 4-16 โดยความบริสุทธิ์เริ่มต้นของสารสกัดหยาบ คือ 0.87 สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์สูงสุดเท่ากับ 1.96 สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินได้ 2.25 เท่า

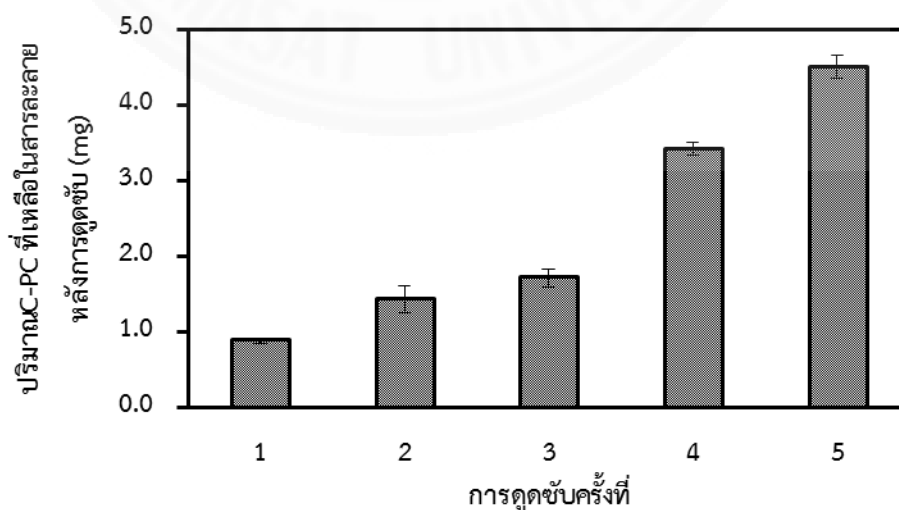
ตารางที่ 4-4

ผลการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ที่พีเอช 5.0

การดูดซับครั้งที่	ปริมาตร C-PC ที่เติม (มล.)	[C-PC] ที่เหลือในสารละลายหลังการดูดซับ (มก./มล.)	ปริมาณ C-PC ที่เหลือในสารละลายหลังการดูดซับ (มก.)
1	50	0.018	0.89
2	50	0.029	1.43
3	50	0.034	1.71
4	50	0.068	3.42
5	50	0.090	4.51
รวม	250	0.048	11.96
C-PC เริ่มต้น	250	0.284	71.12

ภาพที่ 4-14

ผลการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ที่พีเอช 5.0 แสดงปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่เหลือในสารละลายหลังผ่านการดูดซับที่เวลา 20 นาที



ตารางที่ 4-5

ผลการชะซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ออกจากตัวดูดซับ

การชะครั้งที่	ปริมาณบัพเฟอร์ที่ชะ (มล.)	[C-PC] ในสารละลายที่ชะได้ (มก./มล.)	ปริมาณ C-PC ที่ชะได้ (มก.)
1	10	3.331	33.31
2	10	1.197	11.97
3	10	0.442	4.42
4	10	0.191	1.91
5	10	0.108	1.08
รวม	50	1.054	52.70

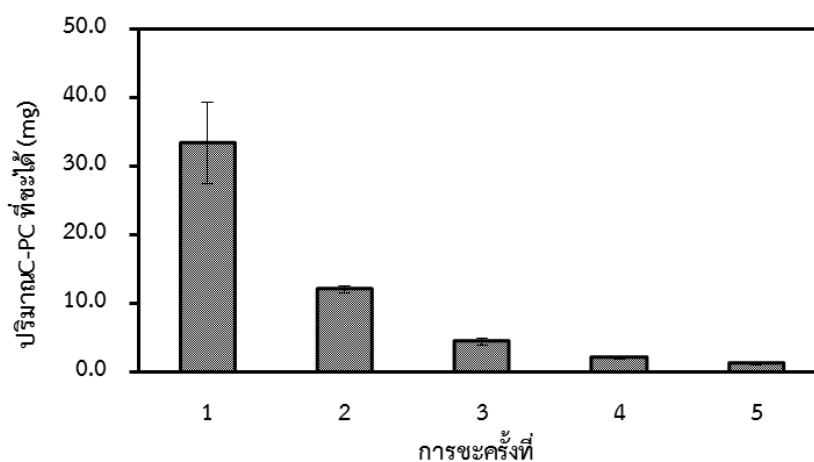
ตารางที่ 4-6

สรุปผลการเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01

ขั้นตอน	ปริมาตร (มล.)	C-PC (มก.)	[C-PC] (มก./มล.)	ผลได้ (%)	ค่าความเข้มข้น (เท่า)
สารเริ่มต้น	250	71.12	0.284	100	1
ผลิตภัณฑ์	50	52.70	1.054	74.1	3.71

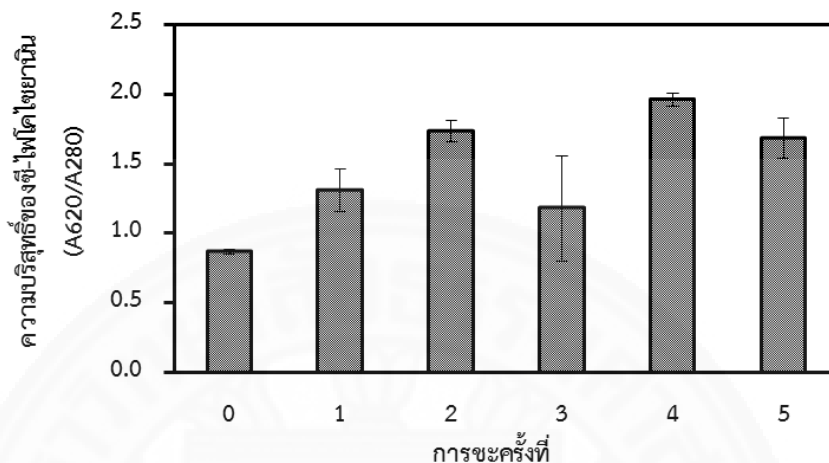
ภาพที่ 4-15

ผลการชะซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ออกจากตัวดูดซับ แสดงปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสารละลายที่ชะได้ 5 ครั้ง



ภาพที่ 4-16

ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ที่ชะออกจากตัวดูดซับ โดยที่ 0 คือสารละลายเริ่มต้น และ 1-5 คือ ลำดับครั้งของการชะตามลำดับ



4.5.2.2 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินจาก *Synechococcus cedrorum* TISTR 8589 เข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ

จากการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 พบว่าพีเอช 4.5 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับ จึงเลือกพีเอชดังกล่าวมาใช้ในการเก็บเกี่ยว ซึ่งผลที่ได้จากการดูดซับแสดงดังตารางที่ 4.7 ทั้งนี้ พบว่าแนวโน้มของผลการทดลองเป็นไปในแนวทางเดียวกับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 (ภาพที่ 4-17 และภาพที่ 4-18) ซึ่งมีซี-ไฟโคไซยานินถูกดูดซับไปทั้งหมด 40.73 มิลลิกรัม หรือคิดเป็นความเข้มข้นที่ถูกดูดซับบนตัวกลางดูดซับ 4.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวดูดซับ และเมื่อพิจารณาถึงร้อยละของการดูดซับ พบว่าซี-ไฟโคไซยานินในสารละลายถูกดูดซับไป 74.87 เปอร์เซ็นต์

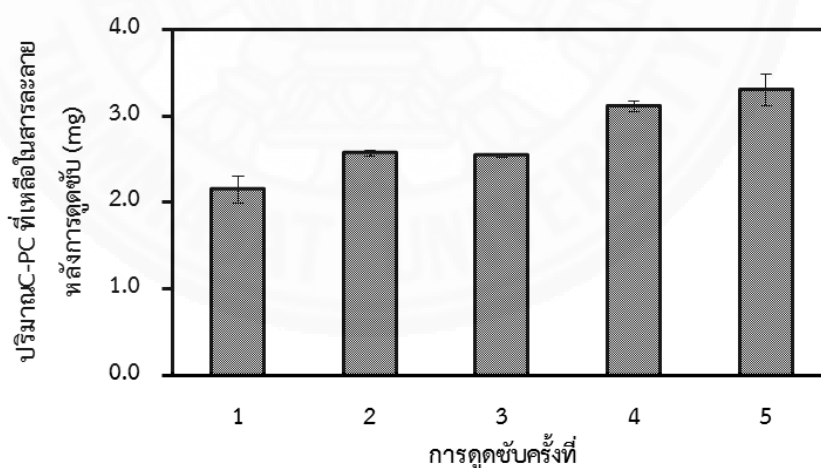
ตารางที่ 4-7

ผลการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ที่พีเอช 4.5

การดูดซับ ครั้งที่	ปริมาตร C-PC ที่ เติม (มล.)	[C-PC] ที่เหลือในสารละลาย หลังการดูดซับ (มก./มล.)	ปริมาณC-PC ที่เหลือใน สารละลายหลังการดูดซับ (มก.)
1	50	0.043	2.14
2	50	0.051	2.57
3	50	0.051	2.54
4	50	0.062	3.10
5	50	0.066	3.30
รวม	250	0.055	13.75
C-PC เริ่มต้น	250	0.218	54.40

ภาพที่ 4-17

ผลการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ที่พีเอช 5.0 แสดงปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่เหลือใน
สารละลายหลังผ่านการดูดซับที่เวลา 20 นาที



จากตารางที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่าสามารถเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินได้ 27.58 มก. โดยเมื่อพิจารณาร้อยละของการเก็บเกี่ยวเปรียบเทียบกับปริมาณซี-ไฟโคไซยานินเริ่มต้นจะได้ค่า 50.70 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาร้อยละของการชะจะได้อัตราเท่ากับ 67.70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถสรุปผลการเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ได้ดังตาราง 4.9 โดยพบว่าซี-ไฟโคไซยานินส่วนหนึ่งมีการสูญเสียไปในขั้นตอนการดูดซับ ขั้นตอนการล้าง และขั้นตอนชะ ทำให้ผลได้ของ

กระบวนการดูดซับมีค่าเพียงร้อยละ 50 เท่านั้น อย่างไรก็ตาม กระบวนการนี้ทำให้ซี-ไฟโคไซยานินมีความเข้มข้นสูงขึ้นประมาณ 2.5 เท่าของสารละลายเริ่มต้น และสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินได้จาก 0.40 เป็น 2.15 โดยสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ได้ถึง 5.38 เท่า (ภาพที่ 4-19)

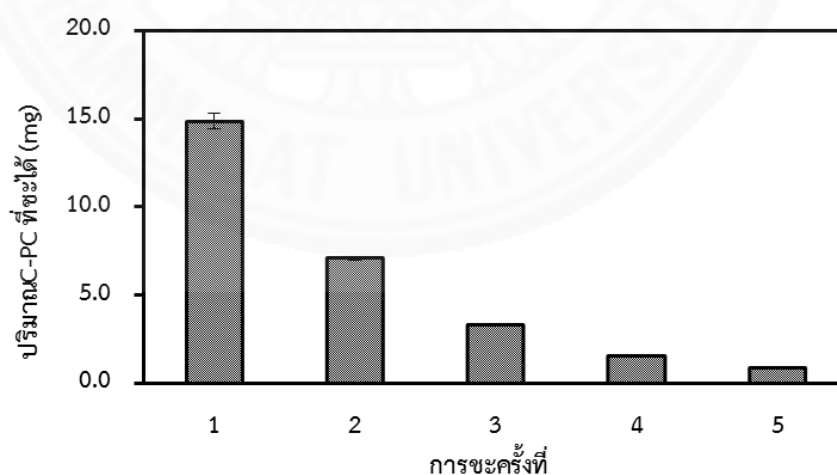
ตารางที่ 4-8

ผลการชะซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ออกจากตัวดูดซับ

การชะครั้งที่	ปริมาณบัฟเฟอร์ที่ชะ (มล.)	[C-PC] ในสารละลายที่ ชะได้ (มก./มล.)	ปริมาณ C-PC ที่ชะได้ (มก.)
1	10	1.485	14.85
2	10	0.708	7.08
3	10	0.327	3.27
4	10	0.152	1.52
5	10	0.085	0.85
รวม	50	0.551	27.58

ภาพที่ 4-18

ผลการชะซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ออกจากตัวดูดซับ แสดงปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสารละลายที่ชะได้ 5 ครั้ง



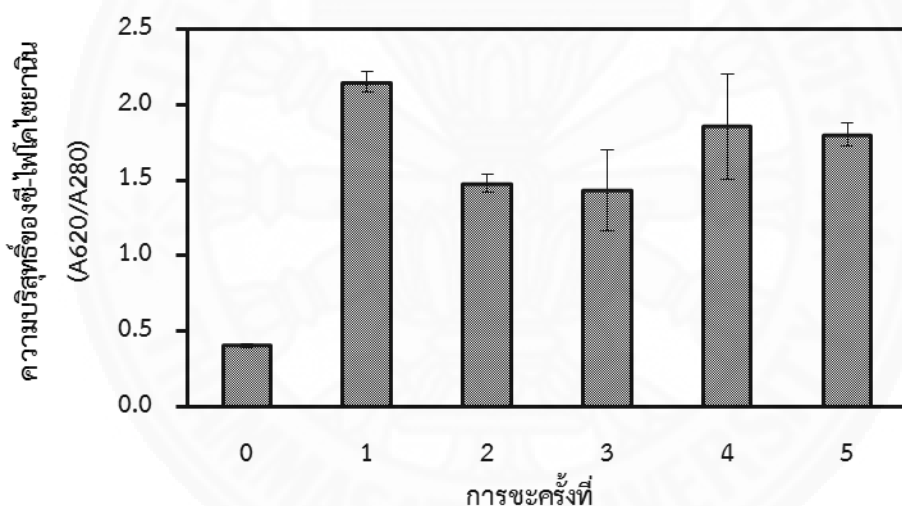
ตารางที่ 4-9

สรุปผลการเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589

ขั้นตอน	ปริมาณ (มล.)	C-PC (มก.)	[C-PC] (มก./มล.)	ผลได้ (%)	ค่าความ เข้มข้น (เท่า)
สารเริ่มต้น	250	54.40	0.218	100	1
ผลิตภัณฑ์	50	27.58	0.551	50.70	2.53

ภาพที่ 4-19

ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ที่ชะออกจากตัวดูดซับ โดยที่ 0 คือ สารละลายเริ่มต้น และ 1-5 คือ ลำดับครั้งที่ของการชะตามลำดับ



ในกระบวนการเพิ่มความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินด้วยเทคนิคดูดซับนั้นทำให้ได้ซี-ไฟโคไซยานินมีความเข้มข้นเพียงพอสำหรับการศึกษาสมบัติทนร้อนของซี-ไฟโคไซยานิน เนื่องจากหากผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคที่มีความยุ่งยากเช่น เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดฐานคงที่นั้นจะทำให้ได้ผลได้ของซี-ไฟโคไซยานินที่บริสุทธิ์แล้วประมาณ 32 เปอร์เซ็นต์ (Ramos และคณะ, 2011) ซึ่งในกระบวนการครั้งนี้สามารถเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ได้ 74.1 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ได้ 50.70 เปอร์เซ็นต์

4.6 การศึกษาสมบัติความร้อนของซี-ไฟโคไซยานิน

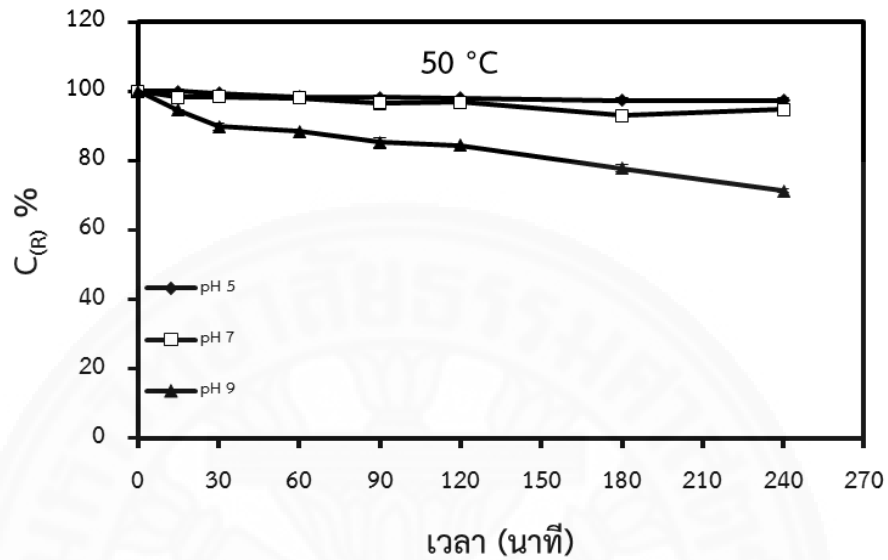
ศึกษาผลของพีเอชและความร้อนที่มีต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 4, 25, 50, 60, 70, และ 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 เก็บตัวอย่างเมื่อเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, และ 240 นาที เพื่อหาความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน และคำนวณค่าคงที่ในการสลายตัว (k) และค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของซี-ไฟโคไซยานิน

4.6.1 ศึกษาผลของพีเอชและความร้อนที่มีต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01

ซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ในครั้งนี้ได้มาจากการผ่านการเก็บเกี่ยวด้วยวิธีการดูดซับแบบแบทช์ที่พีเอช 5 หลังจากนำซี-ไฟโคไซยานินที่ได้มาศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิพบว่า ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส พีเอช 5, 7 และ 9 เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง ซี-ไฟโคไซยานินยังคงมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับซี-ไฟโคไซยานินเริ่มต้น และเมื่อมีการให้ความร้อนเพิ่มขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียส พบว่าที่พีเอช 5 มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินสูงสุด เท่ากับ 97.45 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่พีเอช 7 และ 9 มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน เท่ากับ 94.88 และ 71.41 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-20 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าที่พีเอช 5 มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินสูงสุด เท่ากับ 90.04 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่พีเอช 7 และ 9 มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน เท่ากับ 86.41 และ 21.71 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-21 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่าที่พีเอช 5 มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินสูงสุด เท่ากับ 41.70 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่พีเอช 7 และ 9 มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน เท่ากับ 31.84 และ 17.03 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-22 และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 องศาเซลเซียสพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของไฟโคไซยานินเหลือเพียง 25.43, 22.22, และ 13.93 ที่พีเอช 5, 7 และ 9 ตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.10 พบว่าเมื่อมีการให้ความร้อนสูงขึ้น เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินจะลดลง แสดงให้เห็นว่าความร้อนสูงชันมีผลทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเกิดการสลายตัว และเมื่อพิจารณาที่พีเอชพบว่าที่พีเอช 5 มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการคงอยู่ของซี-ไฟโคไซยานินที่ทุกช่วงอุณหภูมิ เมื่อเปรียบเทียบกับที่พีเอช 7 และ 9 ตามลำดับ

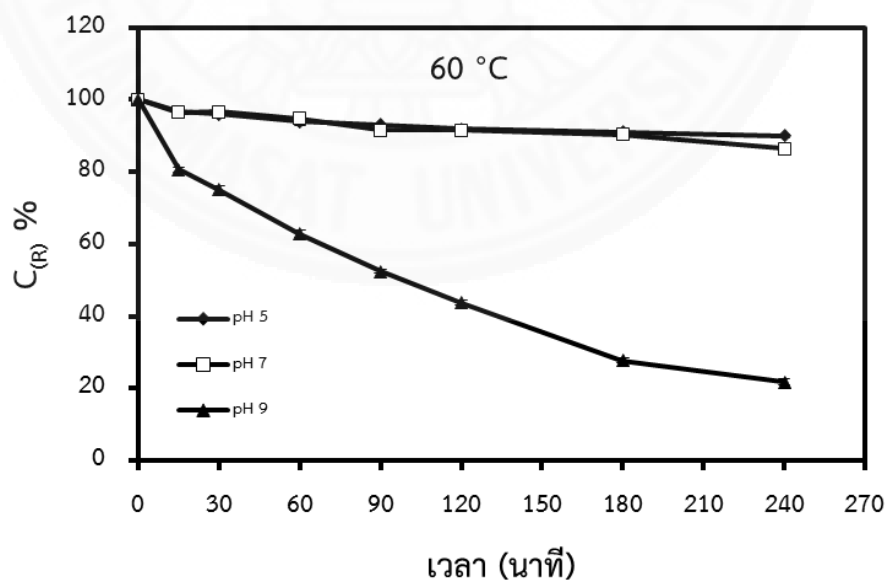
ภาพที่ 4-20

ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ที่เวลา 0 ถึง 240 นาที



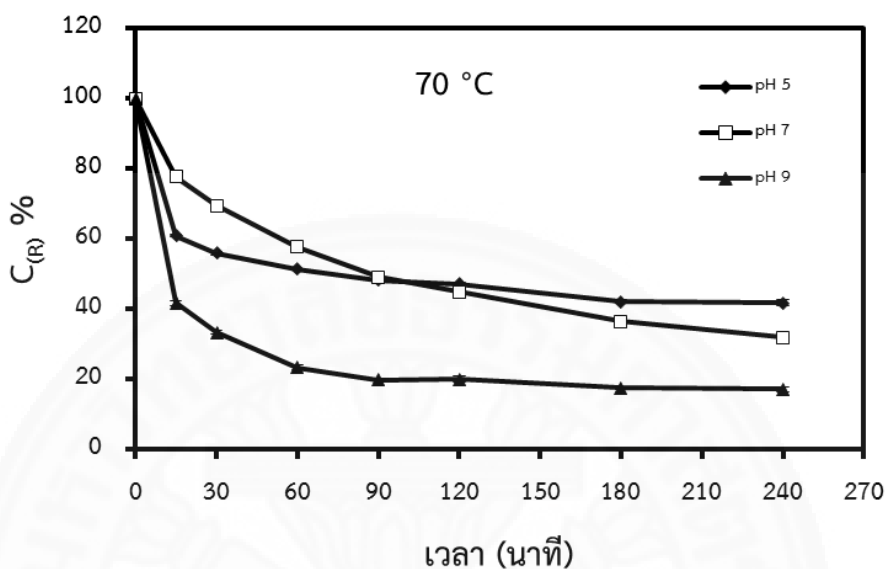
ภาพที่ 4-21

ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ศึกษาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ที่เวลา 0 ถึง 240 นาที



ภาพที่ 4-22

ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ศึกษาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ที่เวลา 0 ถึง 240 นาที



ตารางที่ 4-10

เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ศึกษาที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

พีเอช	เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน (C_R %)					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
5	100.00	100.00	97.45	90.04	41.70	25.43
7	100.00	100.00	94.88	86.41	31.84	22.22
9	100.00	100.00	71.41	21.71	17.03	13.93

เมื่อศึกษาค่าคงที่อัตราการสลายตัว และค่าครึ่งชีวิตของซี-ไฟโคไซยานิน พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นค่าคงที่อัตราการสลายตัวเพิ่มขึ้น และค่าครึ่งชีวิตลดลง ที่ทุก ๆ พีเอช โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 5 มีศักยภาพสูงสุดในการรักษาเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน โดยมีค่าคงที่การสลายตัวเท่ากับ 0.0001 ต่ออนาที และค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 115.52 ชั่วโมง รองลงมาคือพีเอช 7 และ 9 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 7 มีศักยภาพสูงสุดในการรักษาเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน โดยมีค่าคงที่การสลายตัวเท่ากับ 0.0006 ต่ออนาที และค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 19.25 ชั่วโมง รองลงมาคือพีเอช 5 และ 9 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 7

มีศักยภาพสูงสุดในการรักษาเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน โดยมีค่าคงที่การสลายตัวเท่ากับ 0.0070 ต่อนาที และค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 1.67 ชั่วโมง รองลงมาคือพีเอช 5 และ 9 ตามลำดับ ซึ่งแสดงไว้ดังตารางที่ 4-11

ตารางที่ 4-11

ศึกษาค่าคงที่อัตราการสลายตัว ค่าระดับความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าครึ่งชีวิตของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (°C)	พีเอช 5			พีเอช 7			พีเอช 9		
	k_d (min ⁻¹)	r^2	$t_{(1/2)}$ (h)	k_d (min ⁻¹)	r^2	$t_{(1/2)}$ (h)	k_d (min ⁻¹)	r^2	$t_{(1/2)}$ (h)
50	0.0001	0.96	115.52	0.0003	0.99	57.76	0.0013	0.97	8.89
60	0.0013	0.93	11.03	0.0006	0.98	19.25	0.0063	0.99	1.84
70	0.0194	0.86	0.59	0.0070	0.94	1.67	0.0361	0.87	0.32
80	0.0388	0.83	0.30	0.0381	0.82	0.31	0.0518	0.86	0.22

เมื่อศึกษาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากสมการอาร์เรเนียส (Arrhenius Equation) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยากับอุณหภูมิ โดยค่าคงที่อัตราการสลายตัว (k_d) ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ สามารถหาพลังงานก่อกัมมันต์ (E_a) มีหน่วยเป็นแคลอรีต่อกรัมโมล โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะสูงขึ้น และเมื่อลดอุณหภูมิอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะลดลง ตามทฤษฎีจลน์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิโมเลกุลของสารจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วเพิ่มขึ้น การชนกันต่อหนึ่งหน่วยเวลามีโอกาสมากขึ้นเป็นผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น โดยที่ A คือ แฟกเตอร์ความถี่ (frequency factor) เกี่ยวข้องกับความถี่การชนกันของโมเลกุลทั้งหมดของสารตั้งต้น

จากการศึกษาซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าที่พีเอช 5 มีแฟกเตอร์ความถี่สูงที่สุดเท่ากับ 1.35×10^{28} และมีพลังงานก่อกัมมันต์เท่ากับ 4.69×10^4 แคลอรีต่อกรัมโมล ในขณะที่พีเอช 7 มีแฟกเตอร์ความถี่เท่ากับ 5.91×10^{23} และมีพลังงานก่อกัมมันต์เท่ากับ 3.95×10^4 แคลอรีต่อกรัมโมล และที่พีเอช 9 มีแฟกเตอร์ความถี่เท่ากับ 8.42×10^{16} และมีพลังงานก่อกัมมันต์เท่ากับ 2.91×10^4 แคลอรีต่อกรัมโมลตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4-12

ตารางที่ 4-12

ศึกษาค่าคงพารามิเตอร์ต่างๆ จากสมการอาเรเนียส ของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

พีเอช	A	E_d (ca/gmol)	r^2
5	1.35×10^{28}	4.69×10^4	0.96
7	5.91×10^{23}	3.95×10^4	0.96
9	8.42×10^{16}	2.91×10^4	0.95

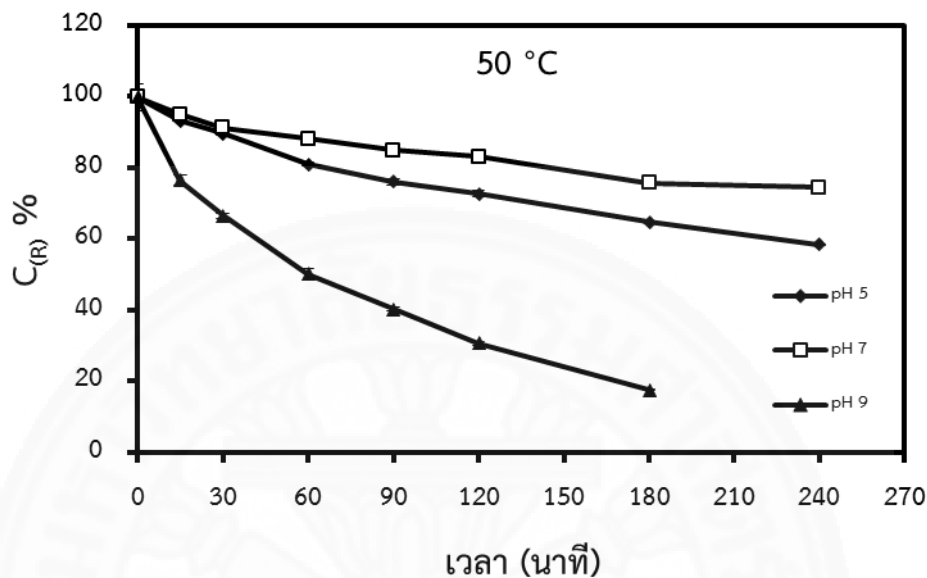
4.6.2 ศึกษาผลของพีเอชและความร้อนที่มีต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก

S. cedrorum TISTR 8589

ซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TISTR 8589 ในครั้งนี้ได้มาจากการผ่านการเก็บเกี่ยวด้วยวิธีการดูดซับแบบแบทช์ที่พีเอช 4.5 หลังจากนำซี-ไฟโคไซยานินที่ได้มาศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิพบว่า ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส พีเอช 5, 7, และ 9 เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง ซี-ไฟโคไซยานินยังคงมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับซี-ไฟโคไซยานินเริ่มต้น และเมื่อมีการให้ความร้อนเพิ่มขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียส พบว่าที่พีเอช 7 มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินสูงสุด เท่ากับ 74.54 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังภาพที่ 4-23 รองลงมาคือ ที่พีเอช 5 มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน เท่ากับ 58.49 เปอร์เซ็นต์ โดยที่พีเอช 9 ไม่สามารถหาความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินได้เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง โดยที่เวลา 3 ชั่วโมง เหลือเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินเพียง 17.50 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 องศาเซลเซียสพบว่าที่พีเอช 5 มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินสูงสุด เท่ากับ 32.32 เปอร์เซ็นต์ โดยที่พีเอช 7 และ 9 ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินเมื่อครบระยะเวลา 4 ชั่วโมง เนื่องจากซี-ไฟโคไซยานินเสถียรภาพ และไม่สามารถหาค่าได้ แสดงดังตารางที่ 4-13

ภาพที่ 4-23

ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 เก็บตัวอย่างเมื่อเวลาผ่านไป 0 ถึง 240 นาที



ตารางที่ 4-13

เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

พีเอช	เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน (C _R %)					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
5	100.00	100.00	58.49	32.32	15.94	13.10
7	100.00	100.00	74.54	nd	nd	nd
9	100.00	100.00	nd	nd	nd	nd

*หมายเหตุ nd (non-detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

เมื่อศึกษาค่าคงที่อัตราการสลายตัว และค่าครึ่งชีวิตของซี-ไฟโคไซยานิน พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นค่าคงที่อัตราการสลายตัวเพิ่มขึ้น และค่าครึ่งชีวิตลดลง ที่ทุก ๆ พีเอช โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7 มีศักยภาพสูงสุดในการรักษาเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน โดยมีค่าคงที่การสลายตัวเท่ากับ 0.0016 ต่อนาที และค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 5.25 ชั่วโมง รองลงมาคือพีเอช 5 และ 9 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 7 มีศักยภาพสูงสุดในการรักษาเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน โดยมีค่าคงที่การสลายตัวเท่ากับ 0.0135 ต่อนาที และค่าครึ่งชีวิต

เท่ากับ 0.86 ชั่วโมง รองลงมาคือพีเอช 5 และ 9 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 5 มีศักยภาพสูงสุดในการรักษาเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน โดยมีค่าคงที่การสลายตัวเท่ากับ 0.0496 ต่อนาที และค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 0.23 ชั่วโมง โดยที่พีเอช 7 และ 9 ไม่สามารถหาค่าอัตราการสลายตัว และค่าครึ่งชีวิตได้ ซึ่งแสดงไว้ดังตารางที่ 4-14

ตารางที่ 4-14

ศึกษาค่าคงที่อัตราการสลายตัว ค่าระดับความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าครึ่งชีวิตของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ที่เวลา 4 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (°C)	พีเอช 5			พีเอช 7			พีเอช 9		
	k_d (min ⁻¹)	r^2	$t_{(1/2)}$ (h)	k_d (min ⁻¹)	r^2	$t_{(1/2)}$ (h)	k_d (min ⁻¹)	r^2	$t_{(1/2)}$ (h)
50	0.0022	0.98	5.25	0.0016	0.96	6.82	0.0093	0.99	1.25
60	0.0258	0.87	0.45	0.0135	0.97	0.86	0.0782	0.80	0.15
70	0.0496	0.89	0.23	nd	nd	nd	nd	nd	nd
80	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

*หมายเหตุ nd (non-detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางที่ 4-15

ศึกษาค่าคงพารามิเตอร์ต่างๆ จากสมการอาร์เรเนียส ของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

พีเอช	A	E_d (ca/gmol)	r^2
5	6.8×10^{20}	3.44×10^4	0.91
7	nd	nd	nd
9	nd	nd	nd

*หมายเหตุ nd (non-detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

เมื่อศึกษาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากสมการอาร์เรเนียส จากการศึกษาศี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5, 7, และ 9 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าที่พีเอช 5 มีแพกเตอร์ความถี่สูงที่สุดเท่ากับ 6.8×10^{20} และมีพลังงาน

ก่อกัมมันต์เท่ากับ 3.44×10^4 แคลลอรี่ต่อกรัมโมล ในขณะที่พีเอช 7 และ 9 ไม่สามารถหาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้ แสดงดังตารางที่ 4-15

เมื่อนำค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่ได้จากการศึกษาการสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานินระหว่าง TUBT-01 และ TISTR 8589 ซึ่งได้แก่ค่าคงที่อัตราการสลายตัว ค่าระดับความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าครึ่งชีวิตของซี-ไฟโคไซยานินมาเปรียบเทียบพบว่าซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-01 มีประสิทธิภาพในการคงตัวสูงกว่าซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TISTR 8589 ซึ่งพิจารณาได้จากพารามิเตอร์ต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบที่ระดับของอุณหภูมิ และพีเอชเดียวกัน เมื่อพิจารณาจากตารางที่ 4-16 ซึ่งเปรียบเทียบค่าคงที่อัตราการสลายตัว ค่าระดับความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าครึ่งชีวิตของซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 ที่ค่าพีเอช 5 แสดงให้เห็นว่าที่ทุก ๆ อุณหภูมิ ซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 มีค่าครึ่งชีวิตที่สูงกว่า ซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 ซึ่งสอดคล้องกับพารามิเตอร์ที่ได้จากสมการอาเรเนียสพบว่า ซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 มีค่าพลังงานก่อกัมมันต์ที่สูงกว่า ซี-ไฟโคไซยานินจาก TISTR 8589 (ตารางที่ 4-17) แสดงให้เห็นว่าต้องใช้พลังงานที่สูงกว่าในการสลายตัวเมื่อเทียบที่เวลาเดียวกัน

ตารางที่ 4-16

เปรียบเทียบค่าคงที่อัตราการสลายตัว ค่าระดับความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าครึ่งชีวิตของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียสที่พีเอช 5 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (°C)	TC-PC			SC-PC		
	k_d (min ⁻¹)	r^2	$t_{(1/2)}$ (h)	k_d (min ⁻¹)	r^2	$t_{(1/2)}$ (h)
50	0.0001	0.96	115.52	0.0022	0.98	5.25
60	0.0013	0.93	11.03	0.0258	0.87	0.45
70	0.0194	0.86	0.59	0.0496	0.89	0.23
80	0.0388	0.83	0.30	nd	nd	nd

*หมายเหตุ nd (non-detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางที่ 4-17

เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากสมการอาเรเนียส ของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 ศึกษาที่อุณหภูมิ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 5 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

พารามิเตอร์	TC-PC	SC-PC
A	1.35×10^{28}	6.8×10^{20}
E_d (cal/gmol)	4.69×10^4	3.45×10^4
r^2	0.96	0.91

โดยผลการทดลองข้างต้นนั้นบ่งชี้ได้ว่าอุณหภูมิและพีเอชมีผลต่อการสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานินซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ รัตนาและคณะ ในปี ค.ศ. 2012 และ Martelli และคณะ ในปี ค.ศ. 2013 ในหัวข้อ 2.2.3 โดยซี-ไฟโคไซยานินจะเสถียรภาพที่อุณหภูมิที่สูงขึ้นตามลำดับ โดยพีเอชที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของซี-ไฟโคไซยานิน โดยพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการรักษาเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์นั้นมีความแตกต่างกัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 การคัดแยกและเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน จังหวัดสุราษฎร์ธานี

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำพุร้อน 4 แห่งในจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้แสงต่อเนื่องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำตัวอย่างแผ่นสาหร่ายมาบดและเกลี่ยบนอาหารแข็งสูตร BG-11 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยให้แสงต่อเนื่อง จากการศึกษาพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะแตกต่างกัน 5 สายพันธุ์ โดย *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 เป็นสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตได้ดี ในระหว่างการเพาะเลี้ยง ไม่จับกันเป็นก้อน หรือยึดติดกับผนังภาชนะเพาะเลี้ยง จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาการผลิตและการศึกษาสมบัติทนอุณหภูมิของซี-ไฟโคไซยานิน

5.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01

TUBT-T01 เป็นสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตได้ดี จึงนำไปศึกษารูปแบบการเจริญเติบโต ในอาหารสูตร BG-11 ที่เติม NaNO_3 ปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่า 100 รอบต่อนาที โดยให้แสงต่อเนื่อง เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เป็นเวลา 44 วัน แล้วนำไปวัดการเติบโต ในรูปของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และพบความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด เท่ากับ 6.98 ในวันที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.155 ต่อวัน

5.3 การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเชื้อของไซยาโนแบคทีเรีย

เพื่อเปรียบเทียบซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำพุร้อน และไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีลักษณะลักษณะทางวิทยาใกล้เคียงกันซึ่งเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิปกติ ได้แก่ *S. cedrorum* TISTR 8589 เพาะเลี้ยงในขวดปริมาตร 2 ลิตร เพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์สำหรับสกัดซี-ไฟโคไซยานินสำหรับใช้ทดสอบสมบัติทนร้อนของซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ TUBT-T01 มีปริมาณของเซลล์เปียกและเซลล์แห้งเท่ากับ 0.89 และ 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ TISTR 8589 ที่สามารถเก็บเกี่ยวของเซลล์เปียกและเซลล์แห้งเท่ากับ 6.67 และ 1 กรัมต่อลิตร โดยเมื่อพิจารณาจากผลปริมาณเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ พบว่า TISTR 8589 สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่า TUBT-T01

5.4 การเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบ

สำหรับการเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบ เริ่มจากการทดสอบสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายที่ใช้ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน พบว่าสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 คือ การใช้น้ำกลั่นสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ให้สารสกัดหยาบที่มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินเท่ากับ 41.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และในส่วนของสายพันธุ์ TISTR 8589 พบว่าสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัด คือ ฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7.0 สกัดเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งให้สารสกัดหยาบของซี-ไฟโคไซยานินเท่ากับ 26.4 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง เมื่อทำการขยายขนาดการสกัดเพื่อเตรียมซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 ในการสกัดผลการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก TUBT-T01 และ TISTR 8589 มีความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินเท่ากับ 30.28 และ 15.88 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ตามลำดับ และมีค่าความบริสุทธิ์เท่ากับ 0.88 และ 0.47 ตามลำดับ

5.5 การเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ

สำหรับการเก็บเกี่ยวและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินเข้มข้นด้วยเทคนิคดูดซับ ขั้นตอนหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานินของตัวแลกเปลี่ยนประจุ โดยใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ Streamline Direct HST1 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานิน คือ พีเอช 5.0 ดูดซับซี-ไฟโคไซยานินได้ถึง 0.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (90.58 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อขยายขนาดการดูดซับ โดยใช้พีเอช 5.0 มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกดูดซับ 59.16 มิลลิกรัม (ร้อยละซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกดูดซับ 83.19 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกดูดซับ 5.92 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวดูดซับ เพิ่มความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินได้ 3.71 เท่า และให้ค่าผลได้เท่ากับ 74.1 เปอร์เซ็นต์ มีความบริสุทธิ์สูงสุดเท่ากับ 1.96 และเมื่อทำการศึกษาซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TISTR 8589 (SC-PC) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับซี-ไฟโคไซยานิน คือ ที่พีเอช 4.5 สามารถดูดซับซี-ไฟโคไซยานินได้ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (49.48 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อขยายขนาดการดูดซับ โดยใช้พีเอช 4.5 มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกดูดซับ 40.73 มิลลิกรัม (ร้อยละซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกดูดซับ 74.87 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่ถูกดูดซับ 4.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวดูดซับ เพิ่มความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินได้ 2.50 เท่า และให้ค่าผลได้เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ และมีบริสุทธิ์สูงสุดเท่ากับ 2.15

5.6 การศึกษาสมบัติความร้อนของซี-ไฟโคไซยานิน

สำหรับการศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน พบว่า อุณหภูมิและพีเอชมีบทบาทสำคัญต่อเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานิน โดยความร้อนทำให้มีค่าคงที่อัตราการสลายตัวเพิ่มขึ้นและค่าครึ่งชีวิตลดลง ในส่วนของ TC-PC มีความเสถียรสูงสุดที่พีเอช 5 โดยความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินยังคงเหลืออยู่ที่ร้อยละ 97.45 เมื่อต้มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งมีเสถียรภาพมากกว่า SC-PC ที่มีความเสถียรสูงสุดที่พีเอช 7 โดยความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินยังคงเหลืออยู่ที่ร้อยละ 74.54 โดย TC-PC มีความเสถียรมากกว่า SC-PC ที่ทุกอุณหภูมิและพีเอชที่ศึกษา

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้สามารถคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน 4 แหล่ง ในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร BG-11 ได้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ โดยพบว่า TUBT-T01 นั้นมีความเหมาะสมในการศึกษาต่อทั้งสามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่าสายพันธุ์อื่น และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมาะสมสำหรับศึกษาการเจริญเติบโต โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.155 ต่อวัน และเมื่อทำการศึกษาซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก TUBT-T01 และไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิปกติ ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน คือ TISTR 8589 พบว่านอกจากเรื่องการใช้ อุณหภูมิที่สูงในการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งเป็นปัญหาสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื่องจากการให้แสงที่ไม่ทั่วถึง ทำให้เจริญเติบโตช้าและเก็บเซลล์ได้น้อยกว่าแล้ว TC-PC นั้นมีประสิทธิภาพมากกว่า SC-PC ในทุกการศึกษา ในส่วนของการสกัดปริมาณสูงสุดต่อกรัมเซลล์ที่สกัดได้ของ TUBT-T01 เท่ากับ 42 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ในขณะที่ TISTR 8589 สามารถสกัดได้ 30 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ให้ค่าผลได้ของซี-ไฟโคไซยานินที่สูงเมื่อเก็บเกี่ยวด้วยวิธีการดูดซับแบบแบทช์ และเมื่อเปรียบเทียบเสถียรภาพของซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จากทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าที่ทุกระดับของพีเอช และทุกระดับของอุณหภูมิ TC-PC มีเสถียรภาพสูงกว่า SC-PC ทั้งนี้ ควรมีการพัฒนาในเรื่องการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้ปริมาณสูง และเลี้ยงได้ง่าย ซึ่งสามารถพัฒนาต่อโดยการใช้พันธุวิศวกรรมเข้ามาเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน

รายการอ้างอิง

1. กรวิขญ์ จิวส์วัตต์. 2551. การเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Anabaena siamensis* TISTR 8012. โครงการปัญหาพิเศษ วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, 100 หน้า
2. กัญญาลักษณ์ สังข์ประไพ แพรพรรณ เกตุเรืองรอง สุเปญญา จิตตพันธ์ วัชรีย์ กัลยาลัง และ เทพปัญญา เจริญรัตน์ (2554) การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria* ssp. สำหรับนำมาใช้ในการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน. วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 19(3): 1-12.
3. กนต์กนิษฐ เสือเปลี่ยว ญาวดี แก้วสุกใส กัญญาลักษณ์ สังข์ประไพ นริศรา คล้ายหิรัญ เทพปัญญา เจริญรัตน์ และสุเปญญา จิตตพันธ์ (2555) ผลของไนโตรเจนต่อการเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน ซึ่งคัดแยกจากพื้นที่เกษตรอินทรีย์. วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 20(3)
4. กาญจนภาชน ลิว์มนอมต์. 2527. สาหร่าย. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
5. เทพปัญญา เจริญรัตน์ กรวิขญ์ จิวส์วัตต์ นิติ พานิชเกษม และพรรณทิพย์ วรเดชวิทยา (2553) เทคนิคอย่างรวดเร็วและประหยัดในการหาสถานะดูดซับโปรตีนของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ. วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 18(3): 1-11.
6. ยูวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา Phycology. เชียงใหม่โรงพิมพ์โชติพัฒนาพรินท์
7. ลัดดา วงศ์รัตน์. 2544. แพลงก์ตอนพืช. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร
8. สมศักดิ์ วงใน. 2525. การตรึงไนโตรเจนไรโซเปียม-พืชตระกูลถั่ว. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
9. สระบุรี ไชยมงคล. 2523. จุลินทรีย์ในน้ำพุร้อนโป่งฮ่อม ตำบลออนหลวย อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่. การวิจัยวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
10. สุวรรณฯ สาสน์รักกิจ. 2542. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียของไทยที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศเพื่อนำมาใช้ทำปุ๋ยชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
11. อุดมลักษณ์ มณีโชติ. 2552. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน. รายงานการประชุมเรื่องการทบทวนและทะเบียนรายการสาหร่ายและแพลงก์ตอนพืชในประเทศไทย, น. 43-51.

12. Abalde, J., Betancourt, L., Tores, E., Cid, A. and Barwell, C. (1998) Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO 9201. *Plant Sci.* 136 (1): 109-120.
13. Adir, N., Vainer, R. and Lerner, N. (2002) Refined structure of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* at 1.6 Å: insights into the role of solvent molecules in thermal stability and co-factor structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1556: 168-174.
14. Adir, N., Dobrovetsky, Y. and Lerner, N. (2001) Structure of c-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 angstrom: Structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly. *J. Mol. Biol.* 313: 71-81.
15. Adir, N. and Lerner, N. (2003) The crystal structure of a novel unmethylated form of C-phycocyanin, a possible connector between cores and rods in phycobilisomes. *J. Biol. Chem.* 278: 25926-32.
16. Adir, N., Vainer, R. and Lerner, N. (2002) Refined structure of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 1.6 Å: insights into the role of solvent molecules in thermal stability and co-factor structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 2: 2-3.
17. Anagnostidis and Komarek. 1988. PLANKTOTHRIX. *Algolog. Stud.* 414: 50-53.
18. Antelo, F., Costa, J. and Kalil, S. (2008). Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem. Eng. J.* 41: 43-47.
19. Arad, S.M. and Yaron, A. (1992). Natural pigment from red microalgae for use in food and Cosmetics. *Trends Food Sci. Tech.* 3: 92-97.
20. Batita, A.P., Raymundo, A., Souasa, I. and Empis, J. (2006) Rheological characterization of coloured oil-in-water food emulsions with leutein and phycocyanin add to the oil and aqueous phases. *Food Hydrocolloid.* 20: 44-52.
21. Chaiklahan, R., Chirasuwan, N. and Bunnag, B. (2012) Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochem.* 47: 659-664.

22. Glazer, A.N. (1999) Phycobilinproteins, In: Cohen Z (ed) Chemicals from Microalgae. Francis Ltd. p 262-280. UK.
23. Hsueh, H.T., Li, W.J., Chen, H.H. and Chu, H. (2009) Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata*. J. Photochem. Photobiol. B. 9 (1): 33-39.
24. Jeraci, J. and Vansoest, P. (1986) In Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition (ed. Spiller, G.). CRC Press. Boca. Raton. pp. 299–303.
25. Leu, J.Y., Lin, T.H., Selvamani, M.J.P., Chen, H.C., Liang, J.Z. and Pan, K.M. (2013) Characterization of a novel thermophilic cyanobacterial strain from Taian hot springs in Taiwan for high CO₂ mitigation and C-phycoerythrin extraction. Process. Biochem. 48: 41-48.
26. Maqubela, M.P., Mnkeni, P.N.S., Malam, O.I., Pardo, M.T. and Acqui, L.P.D. (2009) *Nostoc* cyanobacterial inoculation in South African agricultural soils enhances soil structure, fertility, and maize growth. Plant and Soil. 315: 79-92.
27. Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. and Tabata, S. (2002) Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium. DNA Res. 9(4): 123-130.
28. Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M. and Ferrari, D. (2013) Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. Process Biochem. 49: 154-159.
29. Mitsui, A., Enternmann, B. and Gill, K. (1983) Indoor and outdoor cultivation of Tilapia in seawater with algae as a sole food source. In Proceedings of the 2nd North Pacific Aquaculture System. Tokyo University, Japan. pp. 323–340.
30. Mortenson, L.E., Morris J.A. and Jeng D.Y. (1967). Recent Advance in Biological Nitrogen Fixation. Biochem. J. 105(30).
31. Pastor, M.A.M. and Hess, W.R. (2012). Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches, Trends Microbiol. 20: 548-557.
32. Priyadarshani, I. and Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae. J. Algal Biomass Utiln. 3 (4): 89-100.

33. Nield, J., Rizkallah, P., Barber, J. and Chayen, N. (2003) The 1.45 Å three-dimensional structure of C-phycoerythrin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *J. Structure Biology*. 414: 149-155.
34. Prabha, R., Singhl, D., Gupta, S., Farias, S. and Rai, A. (2013) Comparative analysis to identify determinants of changing life style in *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 a thermophilic cyanobacterium. *Bioinformation*. 9: 299-308.
35. Ramos, A., Acien, F. G., Fernandez-Sevilla, J. M., Gonzalez, C.V. and Bermejo, R. (2011) Development of a process for large-scale purification of C-phycoerythrin from *Synechocystis aquatilis* using expanded bed adsorption chromatography. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (7-8): 511-519.
36. Rimbau, V., Camins, A., Pubill, D., Sureda, F.X., Romay, Ch., Gonzalez, R., Jimenez, A., Escubedo, E., Camarasa J. and Pallas, M. (2001) Naunyn-Schmiedeberg's *Arch. Pharmacol.* 364: 96-104.
37. Romay, C., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez D. and Rimbau, V. (2003) C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4: 207-216.
38. Sahu, D., Priyadarshani, I. and Rath, B. (2012) Cyanobacteria as potential biofertilizer, *CIBTech. J. Microbiol.* 1: 20-26.
39. Sarada, R., Pillai, M. 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 Biochem.* 3: 795-801.
40. Silveira, S.T., Burkert, J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V. and Kalil, S.J. (2007) Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technol.* 98: 1629-1634.
41. Sompong, U., Anuntalabhochai, S., Cutler, R.W., Castenholz, R.W. and Peerapornpisal Y. (2008) Morphological and phylogenetic diversity of cyanobacterial populations in six hot springs of Thailand. *Science Asia.* 34: 153-162.

42. Thajuddin, N. and Subramanian G. (2005) Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Curr. Sci.* 89: 47-57.
43. “น้ำพุร้อน” [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก <http://61.19.236.142/hotspring/knowning2.html>
(วันที่เข้าถึงข้อมูล 14 มิ.ย. 2556)



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และวิธีการเตรียม

1. การเตรียมอาหาร BG-11

ตารางภาคผนวก ก-1

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร BG-11 ที่มีการเติมโซเดียมไนเตรท 3 กรัมต่อลิตร

องค์ประกอบ	ปริมาณที่ใช้ในอาหาร (กรัมต่อลิตร)
NaNO ₃	3.0
K ₂ HPO ₄	0.04
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036
Citric acid	0.006
Ferric ammonium citrate	0.006
EDTA (disodium salt)	0.001
Na ₂ CO ₃	0.02
Trace metal mixed A5*	1.0 (มิลลิลิตรต่อลิตร)
Agar (สำหรับอาหารแข็ง)	10.0

ตารางภาคผนวก ก-2

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Trace metal mixed A5

องค์ประกอบ	ปริมาณที่ใช้ในอาหาร (กรัมต่อลิตร)
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.39
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.0494

2. การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าพีเอชเท่ากับ 6 6.5 7.0 และ 7.5

สารละลาย A : 0.5 M K_2HPO_4 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (ซึ่ง K_2HPO_4 87.09 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.5 M KH_2PO_4 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (ซึ่ง KH_2PO_4 68.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

ตารางภาคผนวก ก-3

การเตรียมโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ pH ต่าง ๆ

pH	Solution A (ml)	Solution B (ml)
6.0	87.7	12.3
6.5	68.5	31.5
7.0	39.0	61.0
7.5	16.0	84.0
8.0	5.3	94.7

จากนั้นนำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โพแทสเซียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ค่าพีเอชเท่ากับ 4 4.5 5.0 และ 5.5

สารละลาย A : 0.5 M glacial acetic acid ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (ดวง glacial acetic acid ปริมาตร 28.88 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.5 M $KC_2H_3O_2$ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (ซึ่ง $KC_2H_3O_2$ 49.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

ตารางภาคผนวก ก-4

การเตรียมโพแทสเซียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ pH ต่าง ๆ

Desired pH	Solution A (ml)	Solution B (ml)
4.0	82.0	18.0
4.5	56.0	44.0
5.0	29.6	70.4
5.5	13.6	86.4

จากนั้นนำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข
ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางภาคผนวก ข-1

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 nm ของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ที่ทุกๆ 2 วัน

ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 nm
0	0.09± 0.00
2	0.26± 0.01
4	0.59± 0.01
6	0.87± 0.00
8	1.24± 0.01
10	1.58± 0.01
12	2.00± 0.01
14	2.38± 0.01
16	2.71± 0.02
18	3.14± 0.03
20	3.53± 0.03
22	4.31± 0.05
24	4.32± 0.11
26	4.83± 0.11
28	5.23± 0.14
30	5.63± 0.20
32	6.36± 0.19
34	6.74± 0.21
36	6.98± 0.16
38	6.76± 0.12
40	6.41± 0.09
42	5.92± 0.16
44	4.71± 0.13

ตารางภาคผนวก ข-2

การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเพื่อเก็บเซลล์ของ TUBT-T01 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 15-20 วัน และ
TISTR 8589 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 10-15 วัน โดยเลี้ยงในขวด 2 ลิตร

สายพันธุ์	น้ำหนักเปียก (g)	น้ำหนักแห้ง (g)	น้ำหนักเปียก: น้ำหนักแห้ง	เซลล์เปียก (g/L)	เซลล์แห้ง (g/L)
T	12.46±1.10	3.52±0.35	3.55±0.34	0.89±0.09	0.25±0.03
S	60.90±6.90	9.17±0.88	0.28±0.03	6.67±0.82	1.00±0.10

ตารางภาคผนวก ข-3

ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน จากการศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัด TC-PC โดยใช้น้ำกลั่น
และโซเดียมคลอไรด์เป็นสารละลายที่ใช้สกัด

เวลา (ชั่วโมง) สารละลาย ที่ใช้สกัด	ความเข้มข้น C-PC (mg/ml)					
	น้ำกลั่น	50mM NaCl	100mM NaCl	150mM NaCl	200mM NaCl	250mM NaCl
0	0.35 ± 0.01	0.34± 0.01	0.34± 0.01	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.02
8	0.38± 0.01	0.37± 0.00	0.36± 0.01	0.36 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.36 ± 0.01
16	0.39± 0.01	0.38± 0.01	0.37± 0.01	0.37 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.36 ± 0.02
24	0.40± 0.01	0.38± 0.01	0.38± 0.01	0.38 ± 0.01	0.37 ± 0.00	0.37 ± 0.02
48	0.41± 0.01	0.40± 0.01	0.39± 0.01	0.39 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.39 ± 0.02
72	0.41± 0.01	0.41± 0.01	0.40± 0.01	0.39 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.39 ± 0.02

ตารางภาคผนวก ข-4

ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานิน จากการศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัด TC-PC โดยใช้ น้ำกลั่น และโซเดียมคลอไรด์เป็นสารละลายที่ใช้สกัด

เวลา (ชั่วโมง) สารละลาย ที่ใช้สกัด	ความบริสุทธิ์ของ C-PC					
	น้ำกลั่น	50mM NaCl	100mM NaCl	150mM NaCl	200mM NaCl	250mM NaCl
0	0.54± 0.01	0.49± 0.01	0.48± 0.01	0.48± 0.01	0.48± 0.03	0.43± 0.03
8	0.55± 0.00	0.52± 0.00	0.51± 0.00	0.51± 0.00	0.51± 0.00	0.52± 0.00
16	0.54± 0.00	0.52± 0.00	0.51± 0.00	0.51± 0.00	0.51± 0.01	0.53± 0.01
24	0.57± 0.01	0.52± 0.01	0.52± 0.00	0.52± 0.00	0.52± 0.01	0.53± 0.01
48	0.56± 0.00	0.53± 0.01	0.53± 0.00	0.54± 0.01	0.53± 0.01	0.56± 0.02
72	0.55± 0.00	0.53± 0.00	0.52± 0.00	0.53± 0.01	0.54± 0.01	0.56± 0.00

ตารางภาคผนวก ข-5

ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน จากการศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัด TC-PC โดยใช้ฟอสเฟส บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์เป็นสารละลายที่ใช้สกัด

เวลา(ชั่วโมง) สารละลายที่ใช้สกัด	ความเข้มข้น C-PC (mg/ml)				
	PB pH 6.0	PB pH 6.5	PB pH 7.0	PB pH 7.5	PB pH 8.0
0	0.26± 0.01	0.31± 0.01	0.36± 0.00	0.36± 0.02	0.35± 0.01
8	0.31± 0.00	0.35± 0.01	0.37± 0.01	0.38± 0.02	0.38± 0.01
16	0.33± 0.01	0.36± 0.01	0.40± 0.01	0.40± 0.02	0.39± 0.01
24	0.33± 0.01	0.37± 0.01	0.40± 0.00	0.40± 0.01	0.40± 0.01
48	0.35± 0.01	0.38± 0.01	0.42± 0.01	0.42± 0.02	0.41± 0.02
72	0.36± 0.01	0.39± 0.01	0.42± 0.00	0.42± 0.01	0.41± 0.02

*หมายเหตุ PB คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

ตารางภาคผนวก ข-6

ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานิน จากการศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัด TC-PC โดยใช้ฟอสเฟส
บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์เป็นสารละลายที่ใช้สกัด

เวลา(ชั่วโมง) สารละลายที่ใช้สกัด	ความบริสุทธิ์ของ C-PC				
	PB pH 6.0	PB pH 6.5	PB pH 7.0	PB pH 7.5	PB pH 8.0
0	0.45± 0.02	0.46± 0.02	0.46± 0.01	0.44± 0.00	0.46± 0.00
8	0.51± 0.01	0.52± 0.01	0.50± 0.01	0.47± 0.00	0.46± 0.02
16	0.51± 0.00	0.51± 0.00	0.49± 0.01	0.46± 0.00	0.47± 0.00
24	0.52± 0.01	0.52± 0.00	0.50± 0.00	0.47± 0.00	0.47± 0.01
48	0.52± 0.01	0.53± 0.00	0.50± 0.01	0.47± 0.00	0.47± 0.00
72	0.53± 0.00	0.53± 0.00	0.51± 0.01	0.47± 0.01	0.46± 0.01

*หมายเหตุ PB คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

ตารางภาคผนวก ข-7

ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน จากการศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัด SC-PC โดยใช้น้ำกลั่น
และโซเดียมคลอไรด์เป็นสารละลายที่ใช้สกัด

เวลา (ชั่วโมง) สารละลาย ที่ใช้สกัด	ความเข้มข้น C-PC (mg/ml)					
	น้ำกลั่น	50 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl	200 mM NaCl	250 mM NaCl
0	0.28± 0.02	0.25± 0.00	0.24± 0.01	0.24± 0.01	0.21± 0.02	0.22± 0.01
8	0.29± 0.01	0.26± 0.00	0.24± 0.01	0.25± 0.00	0.21± 0.00	0.24± 0.02
16	0.30± 0.01	0.26± 0.01	0.25± 0.00	0.25± 0.00	0.21± 0.01	0.24± 0.01
24	0.30± 0.01	0.27± 0.01	0.25± 0.01	0.24± 0.00	0.21± 0.00	0.24± 0.02
48	0.28± 0.01	0.24± 0.01	0.23± 0.00	0.23± 0.00	0.19± 0.00	0.22± 0.01

ตารางภาคผนวก ข-8

ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน จากการศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัด SC-PC โดยใช้ฟอสเฟส
บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นสารละลายที่ใช้สกัด

เวลา (ชั่วโมง) สารละลาย ที่ใช้สกัด	ความเข้มข้น C-PC (mg/ml)				
	PB pH 6.0	PB pH 6.5	PB pH 7.0	PB pH 7.5	PB pH 8.0
0	0.22± 0.00	0.23± 0.00	0.23± 0.00	0.23± 0.00	0.21± 0.00
8	0.24± 0.01	0.26± 0.01	0.26± 0.01	0.26± 0.01	0.24± 0.01
16	0.27± 0.01	0.28± 0.01	0.28± 0.01	0.28± 0.01	0.26± 0.01
24	0.29± 0.01	0.29± 0.00	0.29± 0.00	0.29± 0.01	0.27± 0.00
48	0.29± 0.00	0.29± 0.00	0.29± 0.01	0.30± 0.01	0.27± 0.01

*หมายเหตุ PB คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

ตารางภาคผนวก ข-9

ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานิน จากการศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัด SC-PC โดยใช้ น้ำกลั่น
และโซเดียมคลอไรด์เป็นสารละลายที่ใช้สกัด

เวลา (ชั่วโมง) สารละลาย ที่ใช้สกัด	ความบริสุทธิ์ของ C-PC					
	น้ำกลั่น	50 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl	200 mM NaCl	250 mM NaCl
0	0.22± 0.00	0.24± 0.01	0.25± 0.00	0.26± 0.01	0.25± 0.01	0.26± 0.01
8	0.21± 0.00	0.23± 0.00	0.24± 0.00	0.25± 0.00	0.23± 0.00	0.24± 0.01
16	0.21± 0.00	0.24± 0.01	0.25± 0.00	0.25± 0.01	0.25± 0.00	0.26± 0.01
24	0.21± 0.00	0.23± 0.01	0.24± 0.00	0.25± 0.01	0.24± 0.00	0.26± 0.01
48	0.21± 0.01	0.23± 0.00	0.23± 0.00	0.24± 0.00	0.24± 0.01	0.26± 0.01

ตารางภาคผนวก ข-10

ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานิน จากการศึกษาสารละลายที่ใช้ในการสกัด SC-PC โดยใช้ฟอสเฟส
บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์เป็นสารละลายที่ใช้สกัด

เวลา(ชั่วโมง) สารละลายที่ใช้สกัด	ความบริสุทธิ์ของ C-PC				
	PB pH 6.0	PB pH 6.5	PB pH 7.0	PB pH 7.5	PB pH 8.0
0	0.22± 0.00	0.23± 0.01	0.23± 0.01	0.23± 0.00	0.22± 0.00
8	0.21± 0.00	0.22± 0.00	0.22± 0.00	0.21± 0.00	0.20± 0.00
16	0.23± 0.00	0.23± 0.01	0.23± 0.01	0.23± 0.00	0.22± 0.00
24	0.23± 0.00	0.23± 0.00	0.23± 0.01	0.23± 0.00	0.22± 0.00
48	0.29± 0.00	0.29± 0.00	0.29± 0.01	0.30± 0.01	0.27± 0.01

*หมายเหตุ PB คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

ตารางภาคผนวก ข-11

ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินในสารละลายผ่านการดูดซับเป็นระยะเวลา 1
ชั่วโมง ที่ พีเอชต่าง ๆ (TC-PC)

พีเอช	ความเข้มข้น C-PC (mg/ml)	ความบริสุทธิ์ของ C-PC
4.0 (control)	0.51± 0.05	0.47± 0.03
4.0	0.15± 0.00	0.27± 0.00
4.5 (control)	0.56± 0.01	0.54± 0.00
4.5	0.13± 0.01	0.26± 0.02
5.0 (control)	0.60± 0.02	0.60± 0.02
5.0	0.06± 0.00	0.17± 0.00
5.5 (control)	0.68± 0.05	0.88± 0.05
5.5	0.33± 0.00	0.67± 0.01
6.0 (control)	0.69± 0.01	1.09± 0.02
6.0	0.55± 0.02	1.01± 0.05
6.5 (control)	0.69± 0.01	1.16± 0.03
6.5	0.59± 0.01	1.21± 0.03
7.0 (control)	0.68± 0.02	1.09± 0.01
7.0	0.62± 0.02	1.03± 0.09

ตารางภาคผนวก ข-12

ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินในสารละลายผ่านการดูดซับเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ที่ พีเอชต่าง ๆ (SC-PC)

พีเอช	ความเข้มข้น C-PC (mg/ml)	ความบริสุทธิ์ของ C-PC
4.0 (control)	0.14± 0.00	0.27± 0.00
4.0	0.12± 0.00	0.26± 0.00
4.5 (control)	0.12± 0.00	0.22± 0.01
4.5	0.06± 0.00	0.16± 0.00
5.0 (control)	0.14± 0.00	0.24± 0.00
5.0	0.08± 0.00	0.19± 0.00
5.5 (control)	0.12± 0.00	0.21± 0.00
5.5	0.07± 0.00	0.18± 0.01
6.0 (control)	0.22± 0.00	0.38± 0.00
6.0	0.18± 0.00	0.33± 0.00
6.5 (control)	0.24± 0.01	0.40± 0.01
6.5	0.21± 0.00	0.39± 0.01
7.0 (control)	0.25± 0.00	0.38± 0.01
7.0	0.23± 0.01	0.37± 0.01

ตารางภาคผนวก ข-13

เปอร์เซ็นต์การดูดซับซี-ไฟโคไซยานิน ระยะเวลา 1 ชั่วโมง ที่พีเอชต่าง ๆ (TC-PC)

พีเอช	ปริมาณ C-PC ที่ถูกดูดซับ (mg/ml)	เปอร์เซ็นต์การดูดซับ(%)
4.0	0.024 ± 0.01	16.61 ± 0.78
4.5	0.058 ± 0.00	49.48 ± 2.76
5.0	0.052 ± 0.00	38.11 ± 1.72
5.5	0.043 ± 0.01	36.89 ± 2.85
6.0	0.048 ± 0.00	21.61 ± 0.70
6.5	0.032 ± 0.01	13.51 ± 0.66
7.0	0.020 ± 0.01	8.06 ± 0.33

ตารางภาคผนวก ข-14

เปอร์เซ็นต์การดูดซับซี-ไฟโคไซยานิน ระยะเวลา 1 ชั่วโมง ที่พีเอชต่าง ๆ (SC-PC)

พีเอช	ปริมาณ C-PC ที่ถูกดูดซับ (mg/ml)	เปอร์เซ็นต์การดูดซับ(%)
4.0	0.357 ± 0.05	70.66 ± 8.31
4.5	0.436 ± 0.01	77.53 ± 6.80
5.0	0.548 ± 0.02	90.58 ± 8.84
5.5	0.350 ± 0.05	51.71 ± 4.20
6.0	0.144 ± 0.01	20.83 ± 0.85
6.5	0.093 ± 0.01	13.58 ± 0.31
7.0	0.051 ± 0.01	7.61 ± 0.42

ตารางภาคผนวก ข-15

ปริมาณความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 5 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (TC-PC)

เวลา (นาที)	ปริมาณ C-PC (mg/ml)					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.252± 0.003	0.252± 0.003	0.252± 0.003	0.252± 0.003	0.252± 0.003	0.252± 0.003
15	0.255± 0.002	0.243± 0.001	0.254± 0.002	0.242± 0.003	0.153± 0.001	0.090± 0.006
30	0.254± 0.004	0.248± 0.003	0.251± 0.002	0.240± 0.004	0.141± 0.001	0.079± 0.005
60	0.260± 0.017	0.248± 0.006	0.248± 0.002	0.236± 0.003	0.129± 0.001	0.066± 0.003
90	0.252± 0.004	0.250± 0.005	0.250± 0.003	0.240± 0.010	0.123± 0.003	0.071± 0.005
120	0.254± 0.001	0.247± 0.006	0.248± 0.002	0.233± 0.003	0.119± 0.000	0.066± 0.010
180	0.253± 0.003	0.246± 0.004	0.246± 0.002	0.231± 0.002	0.108± 0.003	0.065± 0.006
240	0.252± 0.001	0.252± 0.004	0.246± 0.002	0.225± 0.002	0.106± 0.003	0.063± 0.002

ตารางภาคผนวก ข-16

ปริมาณความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (TC-PC)

เวลา (นาที)	ปริมาณ C-PC (mg/ml)					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.246± 0.003	0.250± 0.000	0.244± 0.000	0.244± 0.000	0.250± 0.000	0.250± 0.000
15	0.250± 0.004	0.245± 0.003	0.239± 0.002	0.234± 0.002	0.192± 0.005	0.089± 0.002
30	0.251± 0.004	0.246± 0.005	0.241± 0.001	0.236± 0.001	0.172± 0.002	0.080± 0.001
60	0.248± 0.006	0.242± 0.005	0.241± 0.004	0.229± 0.003	0.145± 0.002	0.065± 0.001
90	0.249± 0.001	0.246± 0.001	0.234± 0.006	0.225± 0.003	0.123± 0.001	0.060± 0.002
120	0.251± 0.001	0.244± 0.004	0.237± 0.002	0.224± 0.001	0.114± 0.003	0.060± 0.002
180	0.249± 0.001	0.243± 0.005	0.227± 0.001	0.219± 0.002	0.092± 0.002	0.052± 0.014
240	0.251± 0.003	0.248± 0.004	0.234± 0.004	0.210± 0.001	0.081± 0.003	0.056± 0.000

ตารางภาคผนวก ข-17

ปริมาณความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 9 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (TC-PC)

เวลา (นาที)	ปริมาณ C-PC (mg/ml)					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.222± 0.002	0.217± 0.001	0.222± 0.002	0.222± 0.002	0.217± 0.001	0.217± 0.001
15	0.222± 0.005	0.220± 0.003	0.198± 0.004	0.177± 0.004	0.088± 0.004	0.058± 0.002
30	0.220± 0.005	0.217± 0.001	0.208± 0.003	0.162± 0.008	0.073± 0.002	0.046± 0.001
60	0.220± 0.000	0.225± 0.006	0.197± 0.001	0.136± 0.006	0.051± 0.001	0.039± 0.001
90	0.221± 0.003	0.219± 0.004	0.192± 0.005	0.116± 0.001	0.043± 0.000	0.037± 0.001
120	0.222± 0.000	0.220± 0.004	0.188± 0.000	0.097± 0.002	0.043± 0.002	0.036± 0.001
180	0.219± 0.002	0.217± 0.005	0.175± 0.004	0.063± 0.003	0.038± 0.001	0.034± 0.000
240	0.222± 0.003	0.219± 0.006	0.222± 0.002	0.048± 0.002	0.037± 0.001	0.032± 0.002

ตารางภาคผนวก ข-18

ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 5 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (TC-PC)

เวลา (นาที)	ความบริสุทธิ์ของ C-PC					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	2.76± 0.13	2.67± 0.12	2.76± 0.13	2.76± 0.13	2.67± 0.12	2.67± 0.12
15	2.73±0.03	2.70±0.01	1.83±0.03	1.05±0.01	0.44±0.01	0.32±0.00
30	2.53±0.05	2.54±0.06	1.75±0.01	0.99±0.02	0.42±0.01	0.32±0.01
60	2.72±0.01	2.45±0.03	1.76±0.02	0.99±0.02	0.40±0.00	0.32±0.00
90	2.76±0.09	2.67±0.03	1.64±0.04	0.97±0.04	0.41±0.00	0.33±0.00
120	2.51±0.02	2.39±0.08	1.64±0.02	0.95±0.02	0.39±0.00	0.31±0.02
180	2.76±0.02	2.35±0.06	1.64±0.02	0.96±0.01	0.39±0.00	0.34±0.02
240	2.71±0.04	2.43±0.01	1.59±0.01	0.95±0.01	0.39±0.00	0.33±0.01

ตารางภาคผนวก ข-19

ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (TC-PC)

เวลา (นาที)	ความบริสุทธิ์ของ C-PC					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	2.58±0.11	2.80±0.06	2.58±0.11	2.58±0.11	2.80±0.06	2.80±0.06
15	2.65±0.05	2.79±0.09	2.50±0.05	1.85±0.02	0.70±0.02	0.31±0.00
30	2.52±0.10	2.74±0.02	2.52±0.03	1.70±0.04	0.61±0.01	0.30±0.00
60	2.51±0.13	2.59±0.14	2.65±0.13	1.67±0.00	0.55±0.00	0.28±0.00
90	2.79±0.08	2.68±0.12	2.27±0.26	1.51±0.06	0.50±0.01	0.27±0.01
120	2.60±0.09	2.30±0.04	2.45±0.05	1.50±0.01	0.46±0.01	0.27±0.01
180	2.84±0.05	2.52±0.04	2.45±0.06	1.49±0.01	0.43±0.01	0.27±0.01
240	2.50±0.14	2.53±0.03	2.38±0.01	1.45±0.02	0.41±0.01	0.28±0.01

ตารางภาคผนวก ข-20

ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 9 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (TC-PC)

เวลา (นาที)	ความบริสุทธิ์ของ C-PC					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	2.44±0.09	2.48±0.05	2.48±0.04	2.44±0.09	2.48±0.05	2.48±0.05
15	2.40±0.17	2.53±0.02	2.15±0.08	1.42±0.16	0.38±0.01	0.28±0.01
30	2.30±0.06	2.29±0.08	1.89±0.01	1.28±0.05	0.34±0.01	0.25±0.00
60	2.40±0.06	2.27±0.02	2.04±0.04	1.08±0.04	0.30±0.01	0.23±0.00
90	2.18±0.04	2.38±0.01	1.88±0.15	0.90±0.01	0.28±0.00	0.22±0.00
120	2.35±0.03	2.11±0.01	1.82±0.04	0.77±0.01	0.27±0.01	0.22±0.00
180	2.47±0.09	2.18±0.07	1.89±0.01	0.58±0.04	0.26±0.00	0.17±0.04
240	2.05±0.08	2.26±0.04	1.70±0.05	0.47±0.02	0.25±0.00	0.17±0.01

ตารางภาคผนวก ข-21

ร้อยละความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 5 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (TC-PC)

เวลา (นาที)	% ความเข้มข้น (C/C0)100					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
15	100.00	100.00	100.00	96.14	60.89	35.53
30	100.00	100.00	100.00	95.36	55.85	31.28
60	100.00	100.00	100.00	95.36	51.32	26.31
90	100.00	100.00	99.14	95.44	48.75	28.11
120	100.00	100.00	98.55	92.65	47.18	26.35
180	100.00	100.00	97.60	91.64	42.82	25.74
240	100.00	100.00	97.51	89.31	42.19	24.90

ตารางภาคผนวก ข-22

ร้อยละความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (TC-PC)

เวลา (นาที)	% ความเข้มข้น (C/C0)100					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
15	100.00	100.00	100.00	97.69	79.25	36.71
30	100.00	100.00	99.55	97.69	71.11	32.92
60	100.00	100.00	99.67	94.74	59.95	26.88
90	100.00	100.00	96.53	93.08	50.88	24.90
120	100.00	100.00	98.12	92.46	47.05	24.82
180	100.00	100.00	93.60	90.67	38.06	21.50
240	100.00	100.00	96.49	86.98	33.63	22.96

ตารางภาคผนวก ข-23

ปริมาณความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 5 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (SC-PC)

เวลา (นาที)	ปริมาณ C-PC (mg/ml)					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.292± 0.006	0.303± 0.003	0.292± 0.006	0.292± 0.006	0.303± 0.003	0.303± 0.003
15	0.293± 0.003	0.297± 0.003	0.268± 0.007	0.156± 0.002	0.092± 0.003	0.051± 0.007
30	0.298± 0.004	0.298± 0.007	0.262± 0.002	0.137± 0.002	0.068± 0.002	0.041± 0.006
60	0.293± 0.007	0.282± 0.073	0.238± 0.003	0.125± 0.001	0.063± 0.011	0.038± 0.003
90	0.291± 0.001	0.299± 0.001	0.212± 0.017	0.116± 0.003	0.050± 0.002	0.037± 0.010
120	0.298± 0.004	0.303± 0.005	0.207± 0.010	0.114± 0.006	0.042± 0.010	0.034± 0.005
180	0.298± 0.005	0.305± 0.008	0.189± 0.001	0.103± 0.002	0.043± 0.007	0.027± 0.002
240	0.300± 0.001	0.300± 0.002	0.171± 0.001	0.097± 0.004	0.047± 0.003	0.040± 0.000

ตารางภาคผนวก ข-24

ปริมาณความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา
0 ถึง 240 นาที (SC-PC)

เวลา (นาที)	ปริมาณ C-PC (mg/ml)					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.282± 0.003	0.278± 0.008	0.282± 0.003	0.282± 0.003	0.278± 0.008	0.278± 0.008
15	0.281± 0.002	0.280± 0.009	0.264± 0.007	0.168± 0.006	0.033± 0.000	0.036± 0.002
30	0.286± 0.002	0.293± 0.020	0.257± 0.002	0.138± 0.005	nd	nd
60	0.284± 0.005	0.283± 0.006	0.249± 0.001	0.092± 0.003	nd	nd
90	0.280± 0.002	0.277± 0.004	0.237± 0.004	0.071± 0.002	nd	nd
120	0.278± 0.008	0.286± 0.004	0.237± 0.005	0.053± 0.002	nd	nd
180	0.281± 0.003	0.274± 0.003	0.217± 0.007	0.042± 0.023	nd	nd
240	0.279± 0.006	0.281± 0.006	0.210± 0.002	nd	nd	nd

*หมายเหตุ nd (non-detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางภาคผนวก ข-25

ปริมาณความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 9 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา
0 ถึง 240 นาที (SC-PC)

เวลา (นาที)	ปริมาณ C-PC (mg/ml)					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	0.228± 0.008	0.233± 0.004	0.228± 0.008	0.228± 0.008	0.233± 0.004	0.233± 0.004
15	0.237± 0.007	0.240± 0.001	0.174± 0.003	0.026± 0.000	0.025± 0.001	0.027± 0.001
30	0.234± 0.003	0.235± 0.004	0.152± 0.002	0.022± 0.003	nd	nd
60	0.235± 0.009	0.233± 0.008	0.114± 0.004	nd	nd	nd
90	0.237± 0.003	0.233± 0.003	0.092± 0.001	nd	nd	nd
120	0.236± 0.006	0.234± 0.002	0.070± 0.001	nd	nd	nd
180	0.234± 0.002	0.223± 0.003	0.040± 0.000	nd	nd	nd
240	0.233± 0.001	0.232± 0.002	nd	nd	nd	nd

*หมายเหตุ nd (non-detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางภาคผนวก ข-26

ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 5 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (SC-PC)

เวลา (นาที)	ความบริสุทธิ์ของ C-PC					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	3.04±0.06	3.47±0.06	3.04±0.06	3.04±0.06	3.47±0.06	3.47±0.06
15	3.22±0.03	3.30±0.03	1.82±0.05	0.52±0.01	0.37±0.00	0.29±0.01
30	2.81±0.00	2.91±0.04	1.58±0.02	0.52±0.01	0.35±0.00	0.28±0.00
60	3.02±0.07	2.97±0.12	1.34±0.03	0.52±0.01	0.34±0.01	0.28±0.00
90	2.94±0.05	2.86±0.04	1.17±0.04	0.50±0.01	0.33±0.00	0.29±0.01
120	3.09±0.06	2.77±0.13	1.09±0.01	0.50±0.01	0.32±0.00	0.27±0.01
180	3.29±0.05	2.91±0.00	1.00±0.01	0.49±0.01	0.31±0.01	0.26±0.00
240	3.14±0.09	2.98±0.03	0.92±0.01	0.47±0.00	0.31±0.01	0.29±0.00

ตารางภาคผนวก ข-27

ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (SC-PC)

เวลา (นาที)	ความบริสุทธิ์ของ C-PC					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	3.04±0.09	3.21±0.05	3.10±0.15	3.04±0.09	3.21±0.05	3.21±0.05
15	3.17±0.21	3.29±0.05	2.85±0.08	1.71±0.06	0.43±0.01	0.47±0.00
30	2.71±0.09	2.79±0.07	2.77±0.07	1.19±0.02	nd	nd
60	2.96±0.27	2.83±0.01	2.77±0.04	0.85±0.01	nd	nd
90	2.95±0.03	3.13±0.05	2.22±0.29	0.62±0.01	nd	nd
120	3.01±0.09	2.65±0.03	2.43±0.00	0.51±0.01	nd	nd
180	3.08±0.31	2.82±0.03	2.42±0.02	0.42±0.15	nd	nd
240	3.12±0.05	2.81±0.03	2.12±0.04	nd	nd	nd

*หมายเหตุ nd (non-detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางภาคผนวก ข-28

ความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 9 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (SC-PC)

เวลา (นาที)	ความบริสุทธิ์ของ C-PC					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	2.51±0.03	2.66±0.07	2.51±0.03	2.51±0.03	2.66±0.07	2.66±0.07
15	2.31±0.13	2.65±0.03	1.95±0.04	0.40±0.01	0.39±0.00	0.40±0.00
30	2.24±0.01	2.33±0.01	1.61±0.03	0.35±0.02	nd	nd
60	2.57±0.18	2.68±0.01	1.27±0.08	nd	nd	nd
90	2.43±0.08	2.62±0.02	0.97±0.02	nd	nd	nd
120	2.52±0.05	2.19±0.02	0.75±0.01	nd	nd	nd
180	2.62±0.02	2.31±0.02	0.48±0.01	nd	nd	nd
240	2.51±0.05	2.31±0.03	nd	nd	nd	nd

*หมายเหตุ nd (non-detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางภาคผนวก ข-29

ร้อยละความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 5 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (SC-PC)

เวลา (นาที)	% ความเข้มข้น (C/C0)100					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
15	100.00	100.00	91.99	53.52	30.34	16.79
30	100.00	100.00	89.80	47.15	22.58	13.39
60	100.00	100.00	81.65	42.81	20.73	12.48
90	100.00	100.00	72.82	39.79	16.61	12.25
120	100.00	100.00	70.87	39.26	13.91	11.30
180	100.00	100.00	64.83	35.30	14.10	8.97
240	100.00	100.00	58.58	33.11	15.42	13.12

ตารางภาคผนวก ข-30

ร้อยละความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา
0 ถึง 240 นาที (SC-PC)

เวลา (นาที)	% ความเข้มข้น (C/C0)100					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
15	100.00	100.00	93.75	59.63	11.89	12.77
30	100.00	100.00	91.22	49.04	nd	nd
60	100.00	100.00	88.20	32.66	nd	nd
90	100.00	100.00	83.96	25.08	nd	nd
120	100.00	100.00	84.10	18.96	nd	nd
180	100.00	100.00	77.04	14.74	nd	nd
240	100.00	100.00	74.54	nd	nd	nd

*หมายเหตุ nd (non-detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางภาคผนวก ข-31

ร้อยละความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่พีเอช 9 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา
0 ถึง 240 นาที (SC-PC)

เวลา (นาที)	% ความเข้มข้น (C/C0)100					
	4 °C	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
15	100.00	100.00	76.41	11.61	10.66	11.53
30	100.00	100.00	66.58	9.81	nd	nd
60	100.00	100.00	50.12	nd	nd	nd
90	100.00	100.00	40.23	nd	nd	nd
120	100.00	100.00	30.59	nd	nd	nd
180	100.00	100.00	17.49	nd	nd	nd
240	100.00	100.00	nd	nd	nd	nd

*หมายเหตุ nd (non-detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางภาคผนวก ข-32

ค่าคงที่อัตราการสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานิน ค่าครึ่งชีวิต ที่พีเอช 5 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (TC-PC)

อุณหภูมิ (°C)	k_d (min ⁻¹)	r^2	t1/2 (min)
4	0	0	
25	0	0	
50	0.0001±0.0000	0.96±0.03	6931.47±0.00
60	0.0013±0.0005	0.93±0.05	661.64±44.56
70	0.0194±0.0006	0.86±0.01	35.69±1.01
80	0.0388±0.0024	0.83±0.04	17.91±1.11

ตารางภาคผนวก ข-33

ค่าคงที่อัตราการสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานิน ค่าครึ่งชีวิต ที่พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (TC-PC)

อุณหภูมิ (°C)	k_d (min ⁻¹)	r^2	t1/2 (min)
4	0.0000	0.00	0
25	0.0000	0.00	0
50	0.0003±0.0001	0.99±0.00	3465.74±0.00
60	0.0006±0.0000	0.98±0.02	1155.25±0.00
70	0.0070±0.0008	0.94±0.01	100.32±11.53
80	0.0381±0.0004	0.82±0.01	18.18±0.17

ตารางภาคผนวก ข-34

ค่าคงที่อัตราการสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานิน ค่าครึ่งชีวิต ที่พีเอช 9 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (TC-PC)

อุณหภูมิ (°C)	k_d (min ⁻¹)	r^2	t1/2 (min)
4	0	0	0
25	0	0	0
50	0.0013±±0.000	0.97±0.00	533.19±0.00
60	0.0063±0.0001	0.99±0.01	110.61±1.02
70	0.0361±0.0009	0.87±0.04	19.21±0.49
80	0.0518±0.0008	0.86±0.02	13.38±0.20

ตารางภาคผนวก ข-35

ค่าคงที่อัตราการสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานิน ค่าครึ่งชีวิต ที่พีเอช 5 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (SC-PC)

อุณหภูมิ (°C)	k_d (min^{-1})	r^2	t1/2 (min)
4	0	0	0
25	0	0	0
50	0.0022±0.0000	0.98±0.01	315.07±0.00
60	0.0258±0.0005	0.87±0.01	26.91±0.47
70	0.0496±0.0015	0.89±0.02	13.98±0.41
80	nd	nd	nd

*หมายเหตุ nd (non-detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางภาคผนวก ข-36

ค่าคงที่อัตราการสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานิน ค่าครึ่งชีวิต ที่พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (SC-PC)

อุณหภูมิ (°C)	k_d (min^{-1})	r^2	t1/2 (min)
4	0	0	0
25	0	0	0
50	0.0016±0.0003	0.96±0.03	409.15±17.02
60	0.0135±0.0003	0.97±0.03	51.49±0.81
70	nd	nd	nd
80	nd	nd	nd

*หมายเหตุ nd (non-detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางภาคผนวก ข-37

ค่าคงที่อัตราการสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานิน ค่าครึ่งชีวิต ที่พีเอช 9 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (SC-PC)

อุณหภูมิ (°C)	k_d (min^{-1})	r^2	t1/2 (min)
4	0	0	0
25	0	0	0
50	0.0093±0.0002	0.99±0.00	74.81±0.56
60	0.0782±0.0041	0.80±0.04	8.88±0.15
70	nd	nd	nd
80	nd	nd	nd

*หมายเหตุ nd (non-detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางภาคผนวก ข-38

ค่าคงที่อัตราการสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานิน ค่าครึ่งชีวิต ที่พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (TC-PC)

pH	A (min^{-1})	Ed (ca/gmol)	r^2
5	1.35×10^{28}	46866.93	0.96
7	5.91×10^{23}	39503.93	0.96
9	8.42×10^{16}	29140.91	0.95

ตารางภาคผนวก ข-39

ค่าคงที่อัตราการสลายตัวของซี-ไฟโคไซยานิน ค่าครึ่งชีวิต ที่พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ถึง 240 นาที (SC-PC)

pH	A (min^{-1})	Ed (ca/gmol)	r^2
5	6.80×10^{20}	34458.45	0.91
7	0	0	0
9	0	0	0

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวศัทธิตยา สุวรรณมณี
วันเดือนปีเกิด	15 พฤศจิกายน พ.ศ. 2532
ตำแหน่ง	-
ทุนการศึกษา (ถ้ามี)	ทุนสนับสนุนการวิจัย กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ประเภทนักศึกษา) ฉบับที่ ทน 25/2558
ผลงานทางวิชาการ	การคัดแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงจากบ่อน้ำพุร้อนในเขต จังหวัดสุราษฎร์ธานี
ประสบการณ์ทำงาน	-