# บทที่ 1

# บทนำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Chlorella

ในปี ค.ศ. 1890 นักจุลชีววิทยาชาวดัทช์ชื่อ Beijerinck เป็นผู้ที่แยกสาหร่าย Chlorella vulgaris ได้บนจานวุ้นเป็นคนแรก Chlorella เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่มีขนาด 3-15 ไมครอน เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรี มีผนังเซลล์หุ้มอยู่ภายนอก· นิวเคลียสมีขนาด 0.3-0.5 ไมครอน มีคลอโรพลาสเป็นรูปถ้วย มี pyrenoid 1 อันขนาดใหญ่กว่านิวเคลียส ส่วนใหญ่จะพบที่ผิวน้ำของแหล่งน้ำจืด เช่น ทะเลสาบ, บ่อ, คลอง, แม่น้ำ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 4.5-5.6 (Nakamura, 1981a)

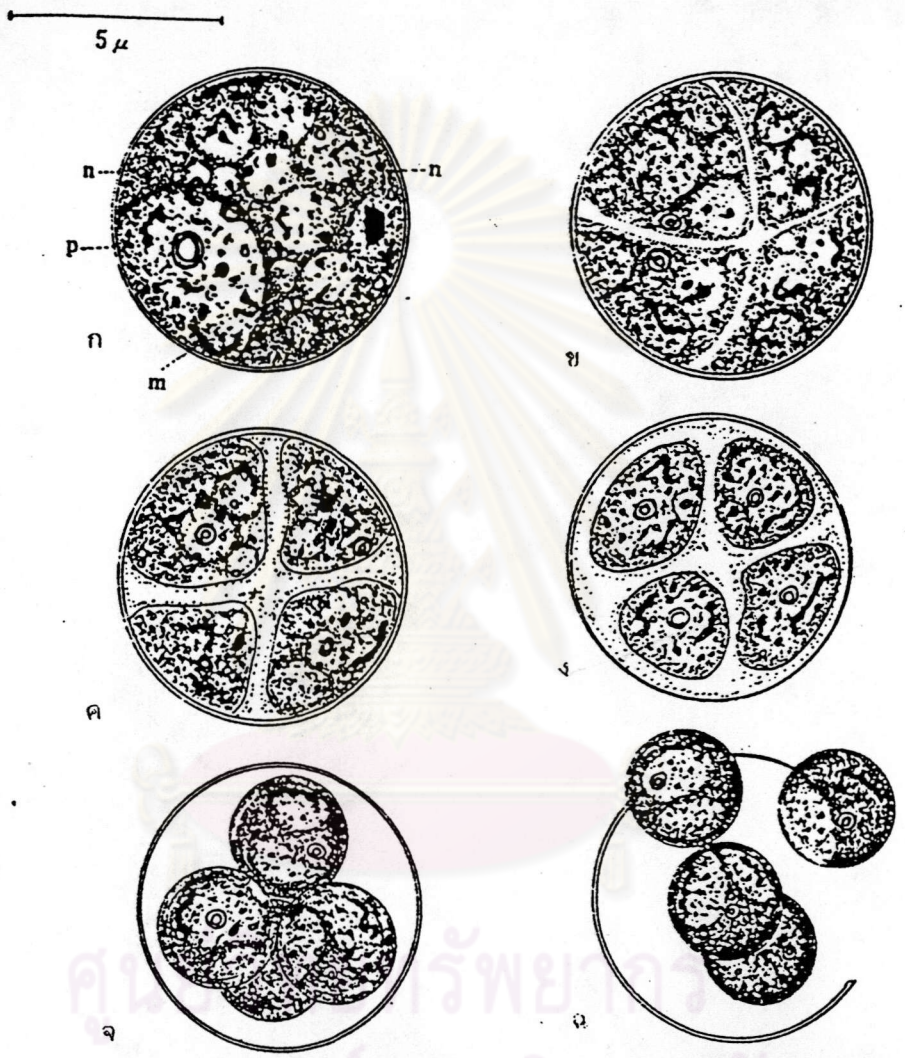
Chlorella เท่าที่พบมี 11 ชนิดได้แก่ Chlorella vulgaris , Chlorella pyrenoidosa , Chlorella conglomerala , Chlorella simplex , Chlorella miniala , Chlorella ellipsoidea , Chlorella protothecoides , Chlorella saccharophila , Chlorella acuminata , Chlorella faginea และ Chlorella variegata (ภาคผนวก ง) โดยมีลักษณะที่ใช้ในการจำแนกคือ รูปร่างของเซล ความหนาของผนังเซลล์ ขนาดของเซลล์ ลักษณะของไพรีนอย ลักษณะของคลอโรพลาส

ลักษณะของ Chlorella ที่ต่างจากสาหร่ายอื่นคือ ไม่มีแฟลกเจลลา ไม่มี spine ไม่สร้าง zoospore

Chlorella สามารถเจริญได้ในอาหารหลายชนิดเช่น Beijerinck, Bold basal , Bozniak Community, Rodhe VIII, Volvox, Waris, Woods Hole MBL, Proteose and Trebouxia agar (Nichols, 1973)

Chlorella มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างออโตสปอร์ 4 ถึง 8 เซลล์ ภายในผนังเซลล์ โดยมีขั้นตอนการแบ่งคือ เริ่มต้นจากแบ่งนิวเคลียส, ไมโตคอนเดรีย และพลาสติด (plastid) จากนั้นก็จะแบ่งมวลของพลาสมิค ซึ่งไม่มีผนังเซลล์. และเกิด

โปร-ออโตสปอร์ ที่เคลื่อนที่ได้ภายในผนังเซลล์เดิม แล้วสร้างผนังเซลล์ใหม่ก็จะได้ ออโตสปอร์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ ซึ่งออโตสปอร์นี้จะถูกปล่อยจากเซลล์แม่ โดยผนังเซลล์ของเซลล์แม่จะแตก หรือละลายออกได้เป็น เซลล์ลูก (รูปที่ 1)




รูปที่ 1. แสดงการแบ่งตัวของ Chlorella เพื่อสร้างออโตสปอร์ (Nakamura, 1981a)

ก) เซลล์แม่ในระยะพักตัว ;n: นิวเคลียส ,m: ไมโตครอนเดรีย ,p: ไพรีนอยด์

ข) เซลล์แม่เริ่มแสดงการแบ่งตัวให้เห็นเล็กน้อย ค) เซลล์แม่แสดงการแบ่งตัวให้เห็นชัดขึ้น

ง) เซลล์แม่แบ่งตัวเป็น 4 โปร-ออโตสปอร์ จ) เซลล์แม่สร้าง ออโตสปอร์ 4 สปอร์

ฉ) ออโตสปอร์ 4 สปอร์ที่สมบูรณ์แล้วถูกปล่อยออกมาจากผนังเซลล์ของเซลล์แม่ที่แตกออก

ในปี ค.ศ. 1940 นักวิทยาศาสตร์ได้หันมาสนใจการเพาะเลี้ยง Chlorella ในปริมาณมาก ทั้งนี้เพราะ Chlorella มีคุณสมบัติดังนี้

1. มีคุณค่าทางอาหารสูงมีโปรตีนอยู่มาก ประมาณ 55.6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (Kawaguchi, 1981) จึงเหมาะที่จะใช้เป็นอาหารเสริม

2. สามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมหลายแบบ ดังนั้นสามารถเลี้ยงในบ่อเปิดซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมเช่น อุณหภูมิ, แสง อยู่ตลอดเวลาได้ ทำให้ต้นทุนต่ำกว่าในระบบปิด

3. สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว ดังนั้นในการเลี้ยงระดับอุตสาหกรรม ซึ่งมักจะเพาะเลี้ยงแบบ Batch culture การใช้สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็ว จะทำให้สามารถเลี้ยงได้หลายครั้งในระยะเวลาเท่ากันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีการเจริญเติบโตช้ากว่า

4. ประกอบไปด้วยวิตามินที่สำคัญต่อมนุษย์หลายชนิด เช่น มี เบตา-แคโรตีน ซึ่ง 1 มิลลิกรัม จะให้วิตามิน เอ 1500 ไอ.ยู. ดังนั้นสามารถใช้เป็นวิตามินทดแทนได้

5. อาจใช้เป็นวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น ไขมันของสาหร่ายมีลักษณะใกล้เคียงกับ ไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ที่ใช้ในการทำสีและแลกเกอร์, ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารหลายชนิด เช่น ขนมปัง, คุ๊กกี้, ไอศครีม, หมากฝรั่ง และนอกจากนี้ยังมี เบตา แคโรทีน ซึ่งสามารถนำไปใช้ทำสีผสมอาหารได้

6. ใช้ในโครงการอวกาศ เพื่อใช้สร้างออกซิเจน และกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์

7. ใช้ในทางการแพทย์ ทั้งนี้เพราะมีสารประกอบหลายชนิดที่ช่วยในการเจริญของสัตว์และช่วย ต่อต้านแผลมีหนองได้ (opposing ulcers)

8. ใช้กำจัดน้ำเสียและ คลอเรลลาที่ได้จากการนี้สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้

9. ใช้พื้นที่ในการเลี้ยงน้อย ทั้งนี้เพราะเมื่อต้องการโปรตีนในปริมาณเท่ากันจะต้องใช้พื้นที่ในการเลี้ยงพืชหรือสัตว์มากกว่าในการเลี้ยง Chlorella

ดังนั้นจึงอาจนำ Chlorella มาเป็นอาหารแหล่งใหม่ของมนุษย์ได้ เนื่องจาก Chlorella มีโปรตีนและวิตามินมาก นอกจากนี้ Chlorella ยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายในปริมาณมากดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่พบในโปรตีนของ Chlorella (Nakamura, 1981c)

| ชนิดของกรดอะมิโน | ปริมาณในโปรตีนของ Chlorella 100 กรัม |
|---|---|
| ไอโซลิวซีน* | 5.5 |
| ลิวซีน* | 7.7 |
| ไลซีน* | 5.7 |
| ฟีนิลอะลานีน* | 4.1 |
| ไทโรซีน | 2.7 |
| เมทไธโอนีน* | 1.5 |
| ซีสทีน | 0.9 |
| ทรีโอนีน* | 4.3 |
| ทริพโทเฟน* | 1.1 |
| แวลีน* | 4.9 |
| อาร์จีนีน | 7.8 |
| ฮีสทิดีน | 1.2 |

*กรดอะมิโนที่จำเป็น

Nakamura (1981a) รายงานว่าในปี ค.ศ.1947 มีผู้เริ่มเลี้ยง Chlorella ครั้งแรกในสหรัฐอเมริกา จากนั้นหลาย ๆประเทศก็ได้เริ่มหันมาสนใจมากขึ้น เช่น รัสเซีย, เยอรมัน และญี่ปุ่น เป็นต้น ในปี ค.ศ.1951 สถาบันวิจัยสาหร่ายขนาดเล็กแห่งประเทศญี่ปุ่นได้เริ่มเลี้ยง Chlorella ในระดับอุตสาหกรรม

ในปี ค.ศ.1954 เริ่มมีการศึกษา การเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในประเทศไต้หวัน หลังจากนั้นอีก 10 ปี มีการจัดตั้งบริษัทผลิต Chlorella บริษัทแรกในประเทศไต้หวัน (Soong, 1980)

ในปี ค.ศ.1957 Tamiya ได้ทำการเลี้ยง Chlorella ในบ่อเปิดโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งของคาร์บอน (อ้างโดย Kawaguchi, 1980)

ในปี ค.ศ.1960 ในประเทศสหรัฐอเมริกามีการศึกษา Chlorella เพื่อใช้ผลิตแก๊สออกซิเจนสำหรับโครงการปฏิบัติการในอวกาศ (Soeder, 1980)

ในปี ค.ศ. 1963 Nakamura ได้พัฒนาการเลี้ยงขึ้นโดยใช้วิธี Autotrophic ที่เลี้ยงในบ่อแบบเหลี่ยม (rectangular ponds) ที่มีใบพัดหมุน ( churning wheels ) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ให้ดีขึ้นกว่าวิธีของ Tamiya ( อ้างถึงใน Kawaguchi, 1980 )

ในปี ค.ศ. 1971 Takechi ปรับปรุงวิธีการเลี้ยง Chlorella โดยใช้วิธี Mixotrophic ในบ่อเปิดโดยมีกรดแอซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน (อ้างโดย Kawaguchi, 1980)

ในปี ค.ศ. 1977 ในประเทศไต้หวันมีโรงงานที่ผลิต Chlorella ทั้งหมด 30 โรงงานสามารถผลิต Chlorellaได้ 200 ตันต่อเดือนหรือมากกว่า 1000 ตันต่อปี Chlorella ส่วนใหญ่ที่ผลิตได้นำไปใช้เป็นอาหารเสริม (Soong, 1980)

ในเอเชียมีโรงงานที่ผลิตสาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) 46 โรงงาน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนโรงงานที่ผลิตสาหร่ายขนาดเล็กในเอเชีย (สิงหาคม,2520) (Kawaguchi,1980)

| ประเทศ | Autotrophic (ก) | Mixotrophic (ข) | Heterotrophic (ค) | Heterotrophic - Mixotrophic (ง) | Heterotrophic with light (จ) |
|---|---|---|---|---|---|
| ญี่ปุ่น | 3 | 4 | 2 | - | 1 |
| ไต้หวัน | 1 | 29 | 2 | 1 | 1 |
| เกาหลี | 1 | - | - | - | - |
| มาเลเซีย | - | 1 | - | - | - |
| รวม | 5 | 34 | 4 | 1 | 2 |

ก) ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนโดยให้ตลอดเวลาในถังปิดที่ต่อกับบ่อเลี้ยงสาหร่ายโดยเติมกรดแอซีติกเล็กน้อย เพื่อใช้ควบคุมความเป็นกรดด่าง

ข) ใช้กรดแอซีติกเป็นแหล่งคาร์บอนในบ่อกลมซึ่งมีการกวนตลอดเวลา

ค) เลี้ยงสาหร่ายในถังเหล็กปลอดสนิม ในที่มืดโดยใช้กลูโคสหรือกรดแอซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน

ง) เลี้ยงสาหร่ายในสภาวะ Heterotrophic ให้มีปริมาณเพียงพอแล้วย้ายลงบ่อกลมเปิด เพื่อเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ต่ออีก 2-3 วัน

จ) เลี้ยงสาหร่ายในที่มีแสงเพื่อเพิ่มปริมาณคลอโรฟิล

สาหร่ายขนาดเล็กมีหลายชนิดที่นำมาใช้ในทางการค้า เช่น Chlorella,Spirulina และ Dunaliella ซึ่งใช้ผลิตผลิตภัณฑ์หลายอย่างเช่น เบตา-แคโรทีน, ไฟโคไซยานิน รวมทั้งใช้เลี้ยงสัตว์ และเป็นอาหารของมนุษย์ (Borowitzka, 1992)

ขั้นตอนในการเลือกสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อใช้ในการค้านั้นจุดสำคัญคือ ต้องมีการสำรวจตลาด โดยพิจารณาจากหลายๆปัจจัย อาทิเช่น ราคาของสินค้าที่จะผลิต, ขนาดของตลาดที่จะรองรับสินค้าว่าผู้บริโภคมีความต้องการในปริมาณเท่าใด รวมทั้งแนวโน้มของการเจริญของตลาดและข้อจำกัดการเจริญของตลาด

ผลิตภัณฑ์ของสาหร่ายขนาดเล็กจะแสดงในตารางที่ 3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงการประมาณค่าสาหร่าย ตามค่าของผลิตภัณฑ์ และ ปริมาณของผลิตภัณฑ์ในเซลล์ (Borowitzka, 1992)

| สาหร่าย | ผลิตภัณฑ์ในเซลล์ | ส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ในเซลล์ (% น.น แห้ง) | ราคาผลิตภัณฑ์ (A$ต่อ กก.) | ราคาสาหร่าย (A$ กก.) |
|---|---|---|---|---|
| Chlorella | อาหาร | 100 | 25 | 25.00 |
| Dunaliella salina | กลีเซอรอล | 40 | 2 | 0.80 |
| | เบตา-แคโรทีน | 5 | 600 | 30.00 |
| | | 10 | 600 | 60.00 |
| Haematococcus pluvialis | แอสตาแซนติน | 1 | 3000 | 30.00 |
| Spirulina platensis | ไฟโคไซยานิน | 2 | 500 | 10.00 |
| Porphyridium cruentum | พอลิแซ็กคาไรด์ | 50 | 5-10 | 2.50-5.00 |

ในปัจจุบันได้มีการเลี้ยง Chlorella ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมเพิ่มขึ้นในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น, ไต้หวัน, ออสเตรเลีย และ สหรัฐอเมริกา ชนิดของ Chlorella ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมได้แก่ Chlorella pyrenoidosa และ Chlorella vulgaris (Nakamura, 1981b) โดยคุณสมบัติของสายพันธุ์ Chlorella ที่ต้องการคือ มีอัตราการเจริญสูง, มีภูมิต้านทานต่อจุลินทรีย์อื่น, มีคุณค่าทางอาหารสูง และสามารถย่อยได้ง่าย

ปัญหาสำคัญในการเลี้ยง Chlorella ในภาคอุตสาหกรรมคือต้นทุนในการผลิตสูงดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง ทั้งนี้มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต เช่น องค์ประกอบของอาหาร และสภาวะในการเลี้ยง

1. องค์ประกอบของอาหาร

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่สำคัญ ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ธาตุอาหารที่ต้องการปริมาณมากอื่น ๆ ได้แก่ ฟอสฟอรัส, โปแตสเซียม, แมกนีเซียม, ซัลเฟอร์ และคลอไรด์ ในขณะที่ธาตุอาหารที่ต้องการปริมาณน้อย ได้แก่ แมงกานีส, เหล็ก, สังกะสี,ทองแดง และโมลิบดีนัม (Oh-Hama, and Miyachi, 1988)

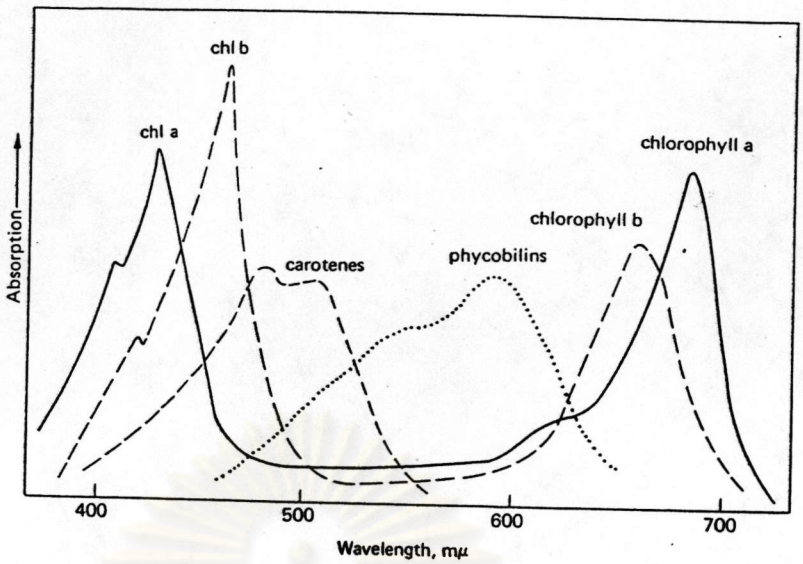
2. สภาวะการเพาะเลี้ยง

ในระดับอุตสาหกรรม ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงสาหร่าย นอกจากองค์ประกอบของอาหารดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นอีกหลายประการ เช่น แสง อุณหภูมิ การให้อากาศ

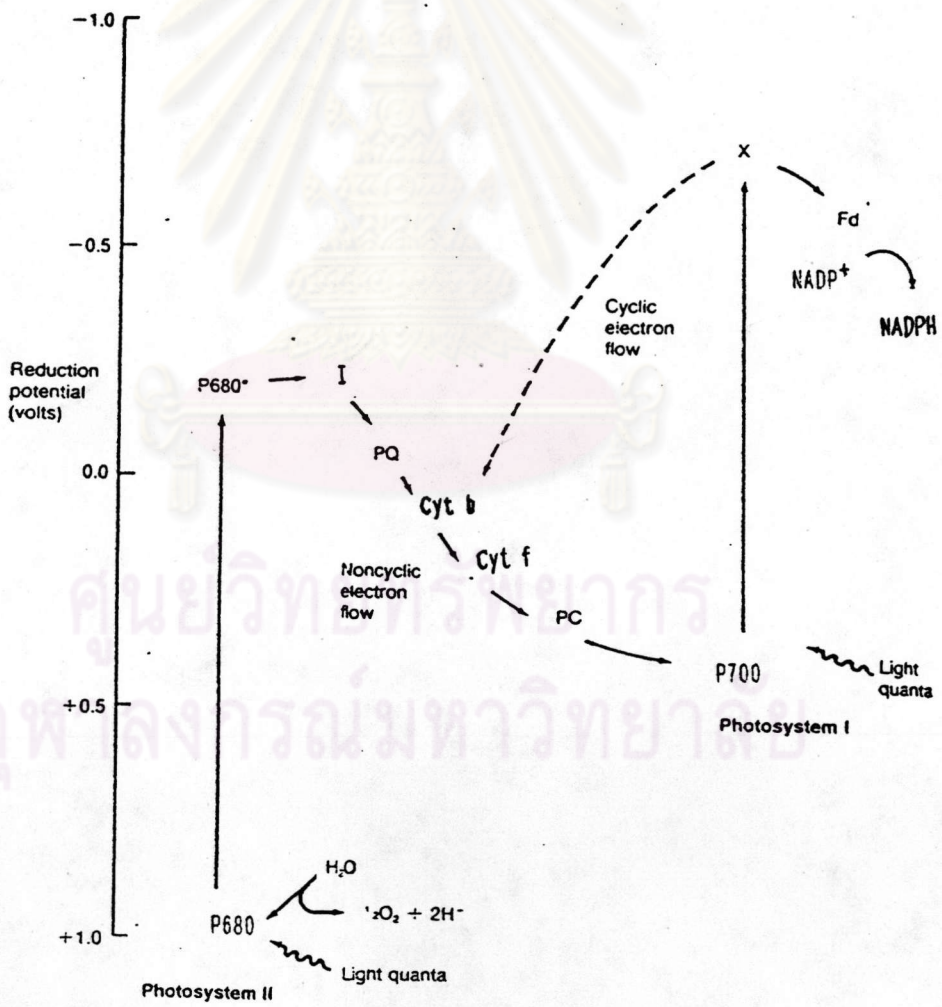
2.1 แสง แสงนับเป็นปัจจัยสำคัญมากตัวหนึ่งในการสังเคราะห์แสง การสังเคราะห์แสงเป็นการสร้างอินทรีย์สาร โดยสาหร่ายจะเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานเคมีโดยใช้ คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยพลังงานแสงจะใช้ในการรีดักชันคาร์บอนไดออกไซด์ ให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ แสงจะถ่ายทอดพลังงานให้รงควัตถุที่มีอยู่ในสาหร่ายหรือพืช เช่น คลอโรฟิล, แคโรทินอยด์ รงควัตถุเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นตัวรับพลังงานของโฟตอนและส่งไปยังศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยา บริเวณศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยานี้ พลังงานจะเปลี่ยนรูปไปเป็นแบบที่สารสามารถใช้ประโยชน์ เพื่อเปลี่ยนไปเป็นสารชนิดใหม่ได้ สมการรวมของการสังเคราะห์แสงคือ

$$6CO_2 + 12H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + 6O_2$$

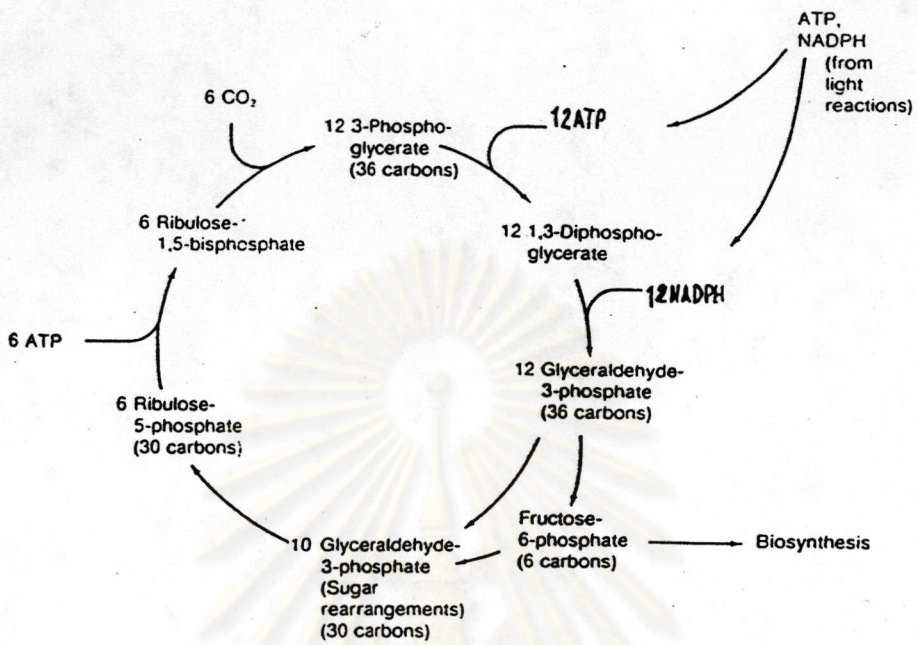
พลังงานซึ่งช่วยในการสังเคราะห์แสง เป็นพลังงานซึ่งได้จากแสงในช่วงที่เราสามารถมองเห็น มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 400-700 นาโนเมตร รงควัตถุแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ แตกต่างกัน ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของแต่ละรงควัตถุ ดังแสดงในรูปที่ 2 Chlorella sp. ประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิดที่พบมากคือ คลอโรฟิล เอ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 และ 430 นาโนเมตร คลอโรฟิล บี ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 และ 470 นาโนเมตร และแคโรทีนดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 480 นาโนเมตร (Bidwell, 1974) พลังงานแสงที่ได้รับจากรงควัตถุต่างๆ จะถูกถ่ายทอดไปยังโมเลกุลของคลอโรฟิล เอ ที่เป็นศูนย์กลางการเกิดปฏิกริยา พลังงานแสงนี้จะกระตุ้นอิเล็คตรอนของคลอโรฟิลที่โฟโตซิสเต็ม I และ II แล้วเกิดการถ่ายทอดอิเล็คตรอนเป็นลูกโซ่ซึ่งจะได้ ATP และ NADPH ดังรูปที่ 3 ซึ่ง ATP และ NADPH ที่ได้จะนำไปใช้ใน วัฏจักรแคลวิน (รูปที่ 4) ซึ่งจะทำการนำคาร์บอนไดออกไซด์มาสร้างเป็นน้ำตาล




รูปที่ 2 แสดงการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิล เอ (a) คลอโรฟิล บี (b) และแคโรทีน (Bidwell, 1974)




รูปที่ 3. แสดงการถ่ายทอดอิเล็คตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง (Brock, 1988)




รูปที่ 4.แสดงวัฏจักรแคลวิน (Brock, 1988)

Endo, Sansawa และ Nakajima (1977) พบว่าอัตราการเจริญของ Chlorella เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มของแสงเพิ่มขึ้น และจะเริ่มคงที่เมื่อแสงมีความเข้มถึงจุดอิ่มตัวซึ่งจุดอิ่มตัวของแสงนี้อยู่ในช่วง 4,000-30,000 ลักซ์ แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่าย ( Oh-Hama และ Miyachi, 1988)

การได้รับแสงในปริมาณมากเกินไป จะทำให้รงควัตถุถูกทำลาย สาหร่ายจะมีสีซีดจาง และตายในที่สุด หลังจากกระบวนการ โฟโตออกซิเดชัน (หรือ โฟโตลิซิส) โฟโตออกซิเดชัน จะเกิดขึ้นหลังจากมีระยะ แล็ก เฟส และมีการลดลงของกระบวนการสังเคราะห์แสงซึ่งเรียกช่วงนี้ว่า โฟโตอินฮิบิชัน (Nakamura, 1981c)

de Ortega และ Roux (1986) ทดลองผลของความเข้มแสงที่ 1 และ 50 วัตต์ต่อตารางเมตร และผลของการให้แสงแบบต่อเนื่อง กับการให้แสงแบบสว่างสลับมืด (12 ช.ม สลับ 12 ช.ม) ต่อ Chlorella พบว่า ที่ความเข้มแสง 1 วัตต์ต่อตารางเมตร จะมีอัตราการเจริญและความหนาแน่นของเซลล์ต่ำกว่าที่ความเข้มแสง 50 วัตต์ต่อตารางเมตร และที่ความเข้มแสง

50 วัตต์ต่อตารางเมตร พบว่าการให้แสงแบบต่อเนื่องจะมีอัตราการเจริญดีกว่าการให้แสงแบบสว่างสลับมืด

Endo และคณะ 1977 พบว่า อัตราการเจริญจำเพาะของ Chlorella regularis S-50 ในช่วง เอกซ์โพเนนเชียล เฟส ภายใต้ภาวะ Photo-autotrophic จะแปรตามความเข้มแสงในช่วง 0-10 กิโลลักซ์ และเริ่มเข้าสู่ระดับคงที่ที่ความเข้มแสง 30 กิโลลักซ์ ภายใต้สภาวะ Mixotrophic อัตราการเจริญจำเพาะจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มแสงเช่นกัน แต่ถ้าความเข้มแสงเกิน 15 กิโลลักซ์ จะทำให้อัตราการเจริญจำเพาะลดลง ในขณะที่ภายใต้สภาวะ Autotrophic จะไม่เกิดเหตุการณ์นี้

2.2 อุณหภูมิ Chlorella สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่จำกัดตั้งแต่ 15-40 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่าย ในการเลี้ยงสาหร่ายในบ่อเปิดจำเป็นต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสม ในแต่ละฤดูของการเลี้ยง สำหรับประเทศในเขตอบอุ่น (Nakamura, 1981b)

ปี ค.ศ. 1957 สถาบันวิจัยสาหร่ายขนาดเล็กแห่งประเทศญี่ปุ่น ได้แบ่งประเภทของ Chlorella ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเพิ่มจำนวนดังนี้

2.2.1 Psychrophilic strain อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนคือ 15 องศาเซลเซียส

2.2.2 Mesophilic strain อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนคือ 25 องศาเซลเซียส

2.2.3 Thermophilic strain อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนคือ 35-40 องศาเซลเซียส

Morimuru (1959, อ้างถึงใน Oh-Hama and Miyachi, 1988) พบว่าการพัฒนาและการแบ่งตัวของเซลล์จะช้าลงที่อุณหภูมิต่ำ แต่อัตราการสังเคราะห์แสงจะได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิน้อยกว่า

Patterson (1970, อ้างถึงใน Oh-Hama and Miyachi,1988) พบว่ากรดไขมันใน Chlorella สายพันธุ์ทนร้อน ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ จะต่างกัน โดยที่ 38 องศาเซลเซียส C.sorokiniana จะมีกรดไขมันส่วนใหญ่เป็นแบบอิ่มตัว (46 เปอร์เซ็นต์ ของทั้งหมด) ในขณะที่ถ้าเลี้ยงที่ 22 และ 14 องศาเซลเซียส จะมีกรดไขมันเป็นแบบ ไม่อิ่มตัว 3 ตำแหน่ง (40

เปอร์เซ็นต์ของทั้งหมด)และกรดไขมันเป็นแบบไม่อิ่มตัว 2 ตำแหน่ง (47 เปอร์เซ็นต์ของทั้งหมด)

Tischer และคณะ (1978) รายงานว่าที่ 4 องศาเซลเซียส Chlorella pyrenoidosa ซึ่งเลี้ยงไว้ให้อยู่ในระยะเดียวกัน (Synchronous culture) ในช่วงต้นของการเจริญเติบโตรงควัตถุจะซีดลง ปริมาณไขมันลดลง และทำให้การเรียงตัว และรูปร่างของไทลาคอยเสียไป รวมทั้งทำให้ กอลจิ แอพพาราตัส, เอ็นโดพลาสมิก เรคติคูลัม และไมโตรคอนเดรียถูกทำลายไปบางส่วน และที่ 45 องศาเซลเซียส จะให้ผลต่างจากที่ 4 องศาเซลเซียส คือ ที่ 45 องศาเซลเซียส การเรียงตัวของโครงสร้างไทลาคอยจะถูกทำลาย

de Ortega และ Roux (1986) ทดลองเลี้ยง Chlorella pyrenoidosa ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีการให้อากาศที่ผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 96:4 โดยปริมาตร และใช้แสงไฟ 40 วัตต์ต่อตารางเมตร โดยการทดลองนี้มีการกวนโดยใช้แท่งแม่เหล็ก และใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้น $10^6$ เซลล์ต่อมล. พบว่า Chlorella pyrenoidosa สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 15-35 องศาเซลเซียสได้ โดยที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส สาหร่ายจะยังอยู่ในช่วง ลอคเฟส และจะเพิ่มขนาดของเซลล์โดยไม่เพิ่มจำนวนเซลล์

2.3 การให้อากาศ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อ Chlorella มีการเพิ่มจำนวนจะมีการตกตะกอนทำให้สาหร่ายได้รับแสงไม่ทั่วถึง ดังนั้นจึงต้องมีการให้อากาศเพื่อช่วยให้ได้รับแสงอย่างทั่วถึงและยังเป็นการกระจายแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำด้วย รวมทั้งเป็นการทำให้แก๊สออกซิเจนกลับสู่บรรยากาศได้เร็วขึ้น ( Nakamura, 1981b )

2.4 ความเป็นกรด-ด่าง ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอาหารมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของสาหร่าย ผลการศึกษาแหล่งน้ำในธรรมชาติซึ่งมีสิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น ในบ่อที่มีการเจริญของสาหร่ายจำนวนมากหรือ ในบ่อเลี้ยงปลาจะมีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 6.5 ในช่วงก่อนดวงอาทิตย์ขึ้น เนื่องจากการสะสมของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และจะเปลี่ยนเป็น 11 ในช่วงเวลาเย็น เนื่องจากเมื่อคาร์บอนไดออกไซด์ และไบคาร์บอเนตอิออนถูกใช้ไปในการสังเคราะห์แสง การเปลี่ยนแปลงของความเป็น กรด-ด่าง ในน้ำจะมีความสัมพันธ์กับชนิดของคาร์บอน เช่น คาร์บอนไดออกไซด์, ไบคาร์บอเนตอิออน และคาร์บอเนตอิออน ดังจะกล่าวในหัวข้อแหล่งคาร์บอน

นอกจากนี้ความเป็น กรด-ด่าง ยังมีบทบาทต่อการละลายของเกลือ และสารประกอบ

เชิงซ้อนชนิดต่าง ๆ ในน้ำซึ่งอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษ หรือยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิต ขณะเดียวกันค่าความเป็นกรด-ด่างยังส่งผลต่อการละลายของสารประกอบโลหะ โดยการเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นสาเหตุให้สารประกอบโลหะที่เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นบางชนิดตกตะกอน ดังนั้นสาหร่ายจึงอาจขาดธาตุโลหะที่จำเป็นบางตัวได้ (Richmond,1986 : อ้างถึงในพรทิภา,2533)

นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ก็มีผลต่อการละลายธาตุอาหารจำพวกฟอสฟอรัส คือที่ความเป็นกรด-ด่าง สูงกว่า 7 ฟอสเฟตจะเปลี่ยนเป็น ฟอสเฟตอิออน ซึ่ง Chlorella นำไปใช้ไม่ได้ ที่ความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง 5.6–6.5 ฟอสเฟตจะอยู่ในรูป ไดไฮโดรเจนฟอสเฟตอิออน และไฮโดรเจนฟอสเฟต อิออน ซึ่ง Chlorella สามารถใช้ได้ แต่ถ้าเป็นกรดมาก ฟอสเฟตจะรวมตัวกับเหล็กหรืออลูมิเนียมตกตะกอน

ดังนั้นจึงต้องควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารให้อยู่ในช่วง 5.6-6.5 และนอกจากนี้ในสภาวะที่เป็นด่าง คาร์บอนไดออกไซด์จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป ไบคาร์บอเนตอิออน และคาร์บอเนตอิออน ซึ่ง Chlorella บางชนิดไม่สามารถใช้ได้ และแร่ธาตุอื่น เช่น แมงกานีส, โบรอน,โมลิบดินัม จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่สาหร่ายไม่สามารถนำไปใช้ได้ (Nakamura, 1981c)

2.5 น้ำ ถ้าใช้น้ำประปาจะต้องคำนึงถึงปริมาณคลอรีนที่อาจมีมากเกินไป ซึ่งอาจแก้ปัญหาได้โดยเก็บน้ำไว้มากกว่า 1 วันก่อนนำไปใช้ ถ้าใช้น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ อาจมีแร่ธาตุต่าง ๆ ปนอยู่ ดังนั้นจึงควรที่จะมีการตรวจสอบปริมาณแร่ธาตุในแหล่งน้ำที่เลือกใช้ก่อนนำมาใช้

de Ortega และ Roux (1986) ทดลองเลี้ยง Chlorella pyrenoidosa ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีการให้อากาศที่ผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 96:4 โดยปริมาตร และใช้แสงไฟ 40 วัตต์ต่อตารางเมตร เพื่อสังเกตุผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการเจริญของสาหร่ายเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด จากการทดลองพบว่า น้ำกลั่นสามารถใช้เลี้ยง Chlorella pyrenoidosa ได้ดีกว่าน้ำประปาและน้ำจากโรงงานอุตสาหกรรม

การจำแนกสาหร่ายตามแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน

สาหร่ายสามารถจัดจำแนกตามความสามารถในการใช้แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดังนี้ (Neilson et al, 1973)

1. Photo-autotrophy

เจริญในที่มีแสงสว่างเท่านั้น โดยได้พลังงานจากการสังเคราะห์แสง และใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน

2. Heterotrophy

เจริญได้ทั้งในที่มีแสง และในที่มืด โดยใช้สารอินทรีย์หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน ทั้งนี้อาจใช้หรือไม่ใช้คาร์บอนไดออกไซด์ก็ได้ การเจริญของสาหร่ายในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืดจะแตกต่างจากพืชคือ สาหร่ายที่เจริญในที่มืดจะยังคงมีรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

3. Mixotrophy

เจริญในที่มีแสงสว่าง และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยต้องการสารอินทรีย์อย่างน้อยหนึ่งชนิด โดยใช้แสงและสารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน และใช้คาร์บอนไดออกไซด์และสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน

สาหร่าย Chlorella ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม Photoautotrophic แต่มีบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในสภาวะ Heterotrophic โดยบางสายพันธุ์สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้โดยใช้กลูโคส หรือกรดแอซีติกเป็นแหล่งของคาร์บอน (Oh-Hama, and Miyachi, 1988)

แหล่งคาร์บอน

สาหร่ายทุกชนิดมีความต้องการใช้คาร์บอนในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ มีการทดลองพบว่าครึ่งหนึ่งของน้ำหนักแห้งของ Chlorella เป็นคาร์บอน (Oh-Hama, and Miyachi, 1988 ) Chlorella สามารถใช้คาร์บอนได้จากหลายแหล่ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ Chlorella ด้วย ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่สาหร่ายสามารถใช้ได้ ได้แก่

1. คาร์บอนไดออกไซด์

สาหร่ายขนาดเล็กสามารถสังเคราะห์แสงได้โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์โดยวัฏจักรแคลวิน ( Shelp and Canvin, 1980) ดังรูปที่ 4

เมื่ออยู่ในน้ำสารประกอบคาร์บอนต่างอยู่ในรูปต่างกันได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ กรดคาร์บอนิก ไบคาร์บอเนตอิออน คาร์บอเนตอิออน ซึ่งขึ้นอยู่กับความเป็น กรด-ด่าง ของน้ำ ในแหล่งน้ำจืดทั่วไปมักจะมีระบบบัฟเฟอร์อยู่ในรูประบบ คาร์บอนไดออกไซด์-กรดคาร์บอนิก-

ไบคาร์บอเนตอิออน-คาร์บอเนตอิออน ($CO_2$-$H_2CO_3$-$HCO_3^-$-$CO_3^{2-}$ System) ความเป็นบัฟเฟอร์นี้มีความสำคัญต่อการเลี้ยงสาหร่าย เพื่อที่จะรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่างของน้ำให้ค่อนข้างคงที่(Richmond, 1986 อ้างถึงใน พรทิภา 2533)

Fox (1983) ได้อธิบายถึงการนำคาร์บอนไปใช้ของสาหร่ายที่เลี้ยงในบ่อ โดยใช้สมการของ Kurt Schneider ซึ่งเขียนอธิบายถึงการเปลี่ยนแปลง และทำปฏิกิริยาของคาร์บอนในน้ำดังนี้

$$CO_2+H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^-+H^+ \rightleftharpoons 2H^++CO_3^{2-}$$

$$HCO_3^-+H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3+OH^-$$

Fox อธิบายว่า คาร์บอนไดออกไซด์ ในสภาวะแก๊สในบรรยากาศสามารถละลายในน้ำได้ ความสามารถในการละลายของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์นี้ขึ้นกับอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง ในขณะนั้น (Oh-Hama, and Miyachi1988) เมื่ออุณหภูมิต่ำลงคาร์บอนไดออกไซด์จะละลายน้ำได้มากขึ้น สารละลายคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำนี้บางส่วนจะถูกสาหร่ายนำไปใช้ในทันที บางส่วนจะทำปฏิกิริยากับน้ำได้กรดคาร์บอนิค เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของแหล่งน้ำเหมาะสม กรดคาร์บอนิคจะเปลี่ยนเป็นไบคาร์บอเนตอิออน และไฮโดรเจนอิออน สำหรับไบคาร์บอเนตอิออน ก็สามารถเปลี่ยนไปเป็นสารละลายคาร์บอนไดออกไซด์และคาร์บอเนตอิออนได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกิดขึ้นนี้เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ทั้งหมด การนำสารละลายคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ทำให้มีการเพิ่มปริมาณของ ไฮดรอกไซด์อิออน ที่เป็นตัวทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น

Zahradnik(1968) ทำการทดลองเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในบ่อเปิด พบว่าประสิทธิภาพของการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในน้ำ ในการสังเคราะห์แสงจะดีที่สุดที่ความเป็นกรด-ด่าง 6.6 เมื่อให้อากาศที่ผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในรูปฟองอากาศ สาหร่ายสามารถนำคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในน้ำ ไปใช้ในการสังเคราะห์แสงได้ 65 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเป็นกรด-ด่าง 6.6 นี้เช่นกัน

019240

Silva and Pirt (1984) พบว่าการเกิดการยับยั้งการสังเคราะห์แสงโดยคาร์บอนไดออกไซด์นี้ เกิดเนื่องจากความดันย่อยของคาร์บอนไดออกไซด์เอง โดยคาร์บอน-ไดออกไซด์จะทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์แสงได้ที่ความดันย่อยของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 0.6 บรรยากาศ และจะเกิดการยับยั้งการสังเคราะห์แสงอย่างสมบูรณ์ที่ความดันย่อยของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1 บรรยากาศ แต่ปฏิกริยาการยับยั้งนี้สามารถย้อนกลับได้

2. ไบคาร์บอเนตอิออน

สาหร่ายจะนำไปใช้ได้ประมาณ 72 เปอร์เซ็นต์ แต่มีข้อจำกัดในการใช้คือจะใช้ได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่จำกัด ทั้งนี้เพราะการเติมไบคาร์บอเนต จะทำให้อาหารมีความเป็นด่างสูงขึ้น ทำให้เกิดการตกตะกอนของส่วนประกอบอื่นของอาหาร อันจะมีผลไปถึงการทำให้ผลผลิตลดลงด้วย ( Goldman et al., 1981)

Chlorella จะใช้ไบคาร์บอเนตอิออนได้เฉพาะสายพันธุ์ที่มีเอ็นไซม์ คาร์บอนิก แอนไฮเดรส โดยเอ็นไซม์ คาร์บอนิก แอนไฮเดรส จะเปลี่ยน ไบคาร์บอเนตอิออนให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ก่อนนำไปใช้ เอ็นไซม์ คาร์บอนิก แอนไฮเดรส จะส่งเสริมการสังเคราะห์แสง เมื่อความเข้มข้นของ คาร์บอนไดออกไซด์ถูกจำกัด ถ้าเซลล์เลี้ยงในอาหารที่มีคาร์บอนไดออกไซด์มาก เซลล์จะขาดเอ็นไซม์ คาร์บอนิก แอนไฮเดรส และคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกส่งให้แก่เอ็นไซม์ RuBP carboxylase โดยการแพร่ ซึ่งเป็นการให้คาร์บอนไดออกไซด์โดยตรง แต่ถ้าเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ คาร์บอนไดออกไซด์เมื่อผ่านเยื่อหุ้มคลอโรพลาส จะถูกเปลี่ยนเป็นไบคาร์บอเนตอิออนโดยเอ็นไซม์ คาร์บอนิก แอนไฮเดรส ในสโตรมา ที่ความเป็นกรด-ด่างประมาณ 8 ซึ่งเป็นวิธีการส่งคาร์บอนไดออกไซด์จากนอกเซลล์เข้าสู่คลอโรพลาสสโตรมา (Miyachi et al., 1983) เมื่อ 1 โมเลกุลของ คาร์บอนไดออกไซด์ถูกตรึงโดยเอ็นไซม์ RuBP carboxylase ไบคาร์บอเนตอิออน ที่อยู่ใกล้ ๆ จะถูกเอ็นไซม์ คาร์บอนิก แอนไฮเดรส นี้เปลี่ยนให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับเอ็นไซม์ RuBP carboxylase ซึ่งเป็นวิธีการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ทางอ้อม ดังนั้นภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ต่ำ สาหร่ายจะสังเคราะห์แสงโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ จากวิธีนี้

Goldman และคณะ (1981) ทำการทดลองเปรียบเทียบการเลี้ยง Chlorella vulgaris โดยใช้ไบคาร์บอเนตอิออน 135 มก. คาร์บอนต่อลิตร และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไบคาร์บอเนตอิออนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดี แต่จะมีข้อเสียคือจะทำให้อาหารตกตะกอน เนื่องจากมีความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้นทำให้ผลผลิตลดลง สำหรับการให้คาร์บอนในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ จะให้ผลผลิตมากกว่าไบคาร์บอเนตอิออนประมาณ 10 เท่า

3. กลูโคส

สาหร่ายบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยจะเป็นสาหร่ายในกลุ่ม Heterotroph และ Mixotroph นอกจากนี้การเลี้ยงสาหร่ายด้วยกลูโคสจะมีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ง่ายกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น (Oh-Hama, and Miyachi, 1988)

การเลี้ยงสาหร่ายด้วยกลูโคสจะใช้ Inducible hexose transport system (Hass และ Tanner, 1974) และถ้าเป็น Chlorella ชนิดที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูงจะพบว่าการเจริญจะใช้แบบ Constitutive hexose transport (Heath, 1979)

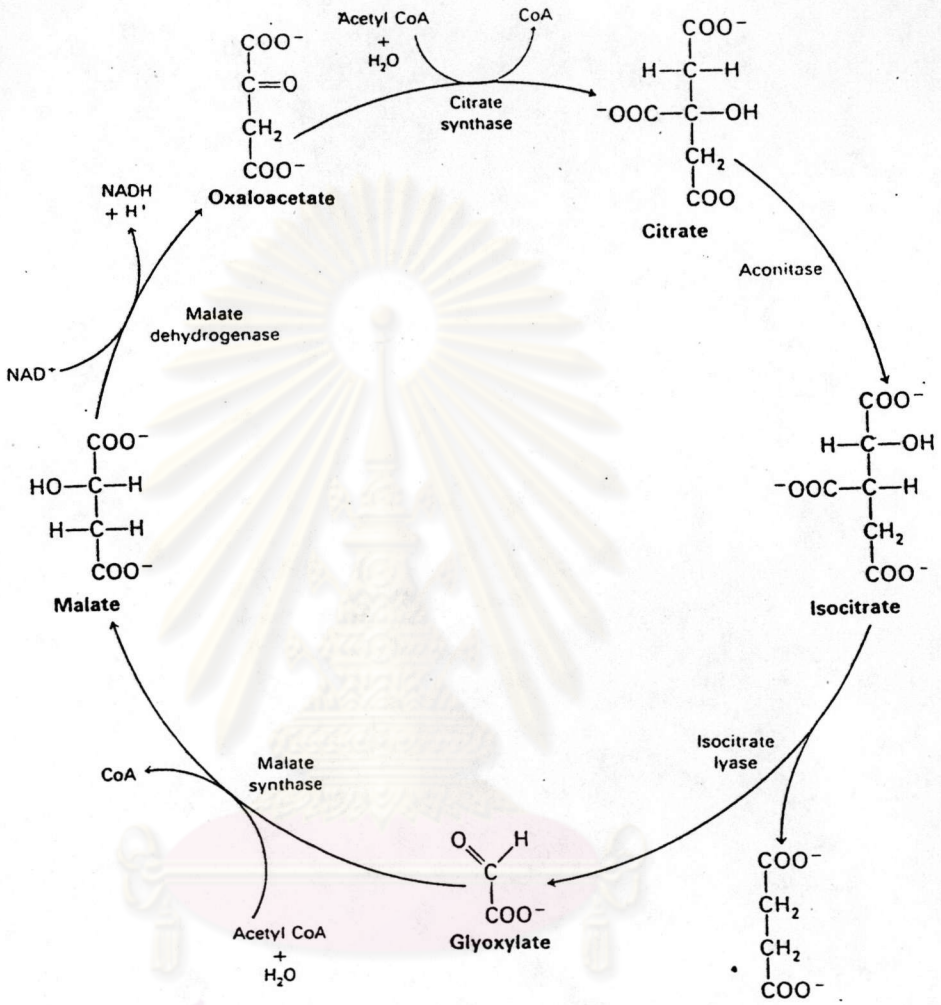
4. แอซีเตต

สาหร่ายบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในกรดแอซีติก โดยจะเป็นสาหร่ายในกลุ่ม Heterotroph และ Mixotroph ซึ่งจะเปลี่ยนกรดแอซีติกเป็น acetyl CoA โดยใช้ เอนไซม์ acetyl CoA synthetase (Stryer,1988) ดังสมการ

Acetate + CoA + ATP ---------> acetyl CoA + AMP + PPi

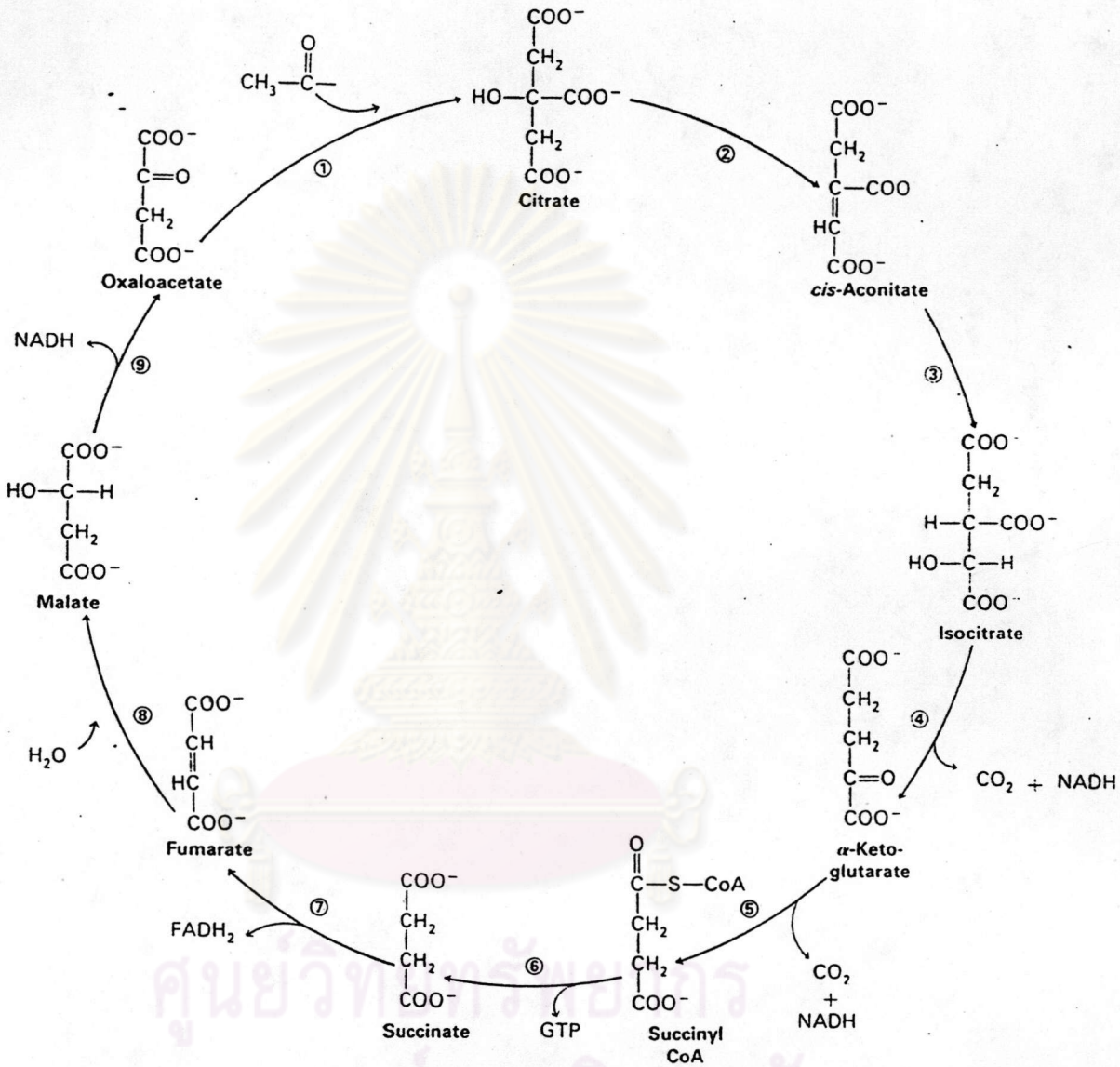
แล้วเข้าสู่วัฏจักรไกลออกซีเลต (รูปที่ 5) เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรทต่อไป (Oh-Hama, and Miyachi, 1988) การเติมแอซีเตตจะเหนี่ยวนำเอ็นไซม์ isocitrate lyase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์สำคัญของวัฏจักรไกลออกซีเลต (McCullough and John, 1972)

จากวัฏจักรไกลออกซีเลต จะได้ซัคซิเนต จากนั้น ซัคซิเนต จะเข้าสู่ วัฏจักรกรดซิตริก (รูปที่ 6) จากวัฏจักรกรดซิตริกจะสามารถนำออกซาโลแอซีเตตไปสร้างกลูโคส ได้จากขบวนการ gluconeogenesis หรืออีกทางหนึ่งสารตัวกลางในวัฏจักรกรดซิตริกเช่น แอลฟา-คีโตกลูตาเรต ,ออกซาโลแอซีเตต ก็สามารถนำไปสร้าง กรดอะมิโน ได้เช่นกัน ดังรูปที่ 7

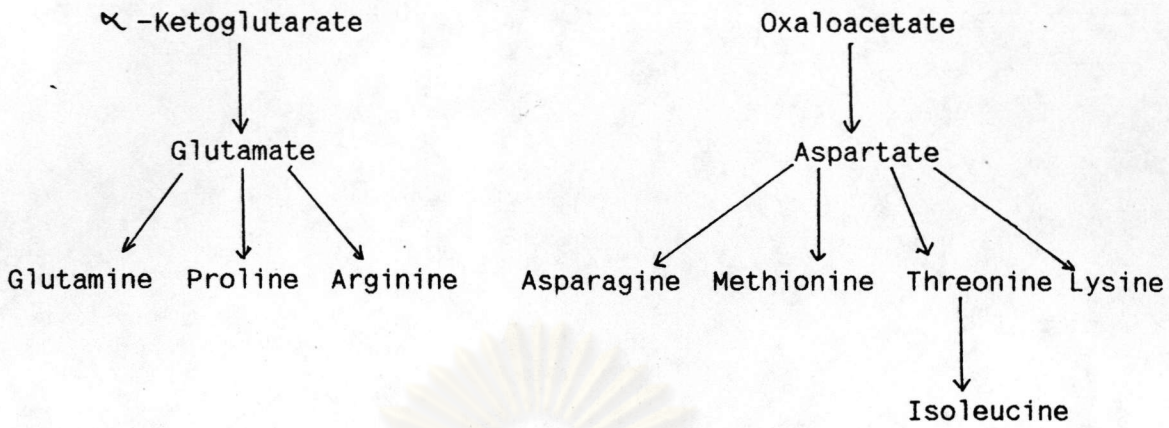



รูปที่ 5. แสดง วัฏจักรไกลออกซีเลต (Stryer, 1988)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 6. แสดง วัฏจักรกรดซิตริก (Stryer, 1988)




รูปที่ 7. แสดงการสร้างกรดอะมิโนจาก แอลฟา-คีโตกลูตาเรต ออกซาโลแอซีเตต (Stryer, 1988)

Samejima และ Myers (1958) ทำการทดลองเลี้ยง Chlorella pyrenoidosa และ Chlorella ellipsoidea ใน basal medium โดยให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผสมกับอากาศโดยมีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส โดยทำการเพาะเลี้ยงทั้งในที่มืด และ ในที่มีแสง โดยมีการเติมน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลายชนิด ได้แก่อะราบิโนส ไซโลส ไรโบส กลูโคส แมนโนส กาแลกโตส ฟรุกโตส มอลโตส ซูโครส แลกโตส กลีเซอรอล เซลโลไบโอส แมนนิทอล ไอ-อิโนซิทอล พบว่าในที่มืด Chlorella ทั้ง 2 ชนิดสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและกาแลกโตสได้เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าเลี้ยง Chlorella ด้วยกลูโคสพร้อมทั้งให้แสง แสงจะสามารถเร่งการเจริญของ Chlorella vulgaris ได้ (Killam and Myers, 1956) และเมื่อทำการทดลองเลี้ยงโดยเติมกรดแอซีติกลงไปพบว่า ที่ความเข้มข้น 0.004 โมลาร์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 กรดแอซีติกจะยับยั้งขบวนการหายใจได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการสังเคราะห์แสงได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.7 การเติม โซเดียมอะซิเตต 1 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งการเจริญของสาหร่าย

นอกจากนี้ Samejima และ Myers ได้ทำการทดลองใช้สารต่อไปนี้ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้แก่ ไกลซีน กรดแอล-แอสพาติก และ เกลือโซเดียม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ของฟอร์เมต แอซีเตต โพรพิโอเนต บิวทีเรต แลคเทต ซัคซิเนต แอลฟา-คีโตกลูตาเรต ไพรูเวต มาเลต ไกลโคลเลต ฟูมาเรต ทาร์เทรต มาโลเนต และ กลูตาเมต โดยมีค่าความเป็น กรด-ด่าง 5.6-5.7 ในการเลี้ยงพบว่า Chlorella ทั้ง 2 ชนิดจะใช้ได้เพียงแอซีเตตเท่านั้น ส่วนไกลโคเลตสามารถส่งเสริมการเจริญของ Chlorella ellipsoidea ได้เล็กน้อยแต่ Chlorella pyrenoidosa ไม่สามารถใช้ไกลโคเลตได้เลย (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4. แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะของ C. pyrenoidosa และ C. ellipsoidea ใน basal medium ความเป็นกรด-ด่าง 5.6-5.8 ให้คาร์บอนไดออกไซด์ 5% (v/v) ที่ 25 องศาเซลเซียส ด้วยแหล่งคาร์บอนและภายใต้สภาวะต่างๆ (Samejima and Myers, 1958)

| แหล่งคาร์บอน | สภาวะการให้แสง | C. pyrenoidosa | C. ellipsoidea |
|---|---|---|---|
| | | ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ($log_{10}$ unit/day) | |
| กลูโคส 1% (w/v) | มืด | 0.46 | 0.47 |
| กาแลกโตส 1% | มืด | 0.24 | 0.19 |
| โซเดียมอะซิเตต 0.1% | มืด | 0.27 | 0.23 |
| โซเดียมไกลโคเลต 0.1% | มืด | 0.00 | 0.02 |
| กลูโคส 0.5%+โซเดียมฟอเมต 0.1% | มืด | 0.036 | 0.00 |
| กลูโคส 0.5%+โซเดียมแอซีเตต 0.1% | มืด | 0.033 | 0.31 |
| กลูโคส 0.5%+โซเดียมโพรพิโอเนต 0.1% | มืด | 0.00 | 0.00 |
| กลูโคส 0.5%+โซเดียมบิวทิเรต 0.1% | มืด | 0.00 | 0.00 |
| Basal medium | มืด | 0.00 | 0.00 |
| Basal medium + แสง | สว่าง | 0.93 | 0.87 |

Basal medium ประกอบด้วย 1.25 $KNO_3$, 1.25 $KH_2PO$, 2.5 $MgSO_4.7H_2O$, 0.3 Na citrate, 0.004 $Fe_2(SO_4)_3$, 0.0029 $H_3BO_3$, 0.0018 $MnCl_2.4H_2O$, 0.00022

$ZnSO_4.7H_2O$, 0.00008 $CuSO_4.5H_2O$ และ 0.000018 $MoO_3$ (หน่วยทั้งหมดเป็น กรัมต่อลิตร) ปรับความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 5.6-5.8

และแสดงผลผลิตของ Chlorella ทั้ง 2 ชนิดต่อคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5. แสดงผลผลิตของ C. pyrenoidosa และ C. ellipsoidea ต่อแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส ให้คาร์บอนไดออกไซด์ 5% (v/v) ในที่มืด (Samejima and Myers, 1958)

| แหล่งคาร์บอน | แหล่งไนโตรเจน | ปริมาณผลผลิต (มก./มล.) | |
|---|---|---|---|
| | | C. pyrenoidosa | C. ellipsoidea |
| กลูโคส | ไนเตรต | 1.8 | 2.18 |
| กลูโคส | แอมโมเนีย | 2.05 | - |
| กลูโคส | ยูเรีย | 2.07 | 2.46 |
| กาแลคโตส | ไนเตรต | 1.55 | - |
| โซเดียมอะซีเตต | ไนเตรต | 0.194 | - |

นอกจากการทดลองหาแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนที่ให้ผลผลิตดีที่สุด ยังได้มีผู้ทำการทดลองหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ทำให้ Chlorella. สามารถเจริญได้ดีที่สุด ดังการทดลองที่จะกล่าวถึงต่อไปนี้

Endo และคณะ (1977) ทำการทดลองเลี้ยง Chlorella regularis S-50 ในสภาวะ Autotrophic ใน Basal medium และในสภาวะ Mixotrophic และ Heterotrophic ใน Basal medium โดยเติมโซเดียมแอซีเตต หรือกรดแอซีติกลงไป ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 500

มล. ที่ 36 องศาเซลเซียส โดยใช้อากาศที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืดหรือมีแสง (3000 ลักซ์) การทดลองแบ่งเป็น 2 แบบ คือ แบบแรกเลี้ยงแบบ Continuous โดยมีจำนวนเซลล์สูง แบบที่สองเลี้ยงแบบ Batch โดยมีจำนวนเซลล์น้อยใช้อาหารเดิมตลอด ไม่มีการดูดออก จากการทดลองพบว่าในการเลี้ยงแบบ Batch ในสภาวะ Heterotrophic เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแอซีติก ค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะเพิ่มขึ้น และจะเริ่มสูงสุดที่ 0.28 ชม.$^{-1}$ และการเจริญจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของกรดแอซีติกมากกว่า 40 มิลลิโมลาร์ และการเจริญในสภาวะ Autotrophic กับความเข้มแสงก็มีความสัมพันธ์เช่นเดียวกันกับข้างต้น คือ เมื่อเพิ่มความเข้มแสง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะเพิ่มขึ้น และ linear growth rate จะขึ้นกับความเข้มแสง ส่วนการเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic แบบ Batch (มีแสง + แอซีเตต) พบว่าอัตราการเจริญในสภาวะ Mixotrophic จะเป็นผลรวมของอัตราการเจริญในสภาวะ Autotrophic กับ Heterotrophic และเมื่อทดลองในแบบ Continuous ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน และสุดท้ายได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันข้อสรุปนี้อีกครั้งโดยใช้ 3-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea (CMU) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการยับยั้งการสังเคราะห์แสง พบว่า CMU 50 ไมโครโมลาร์ จะยับยั้งการเจริญในสภาวะ Autotrophic แต่ไม่มีผลต่อการเจริญในสภาวะ Heterotrophic รวมทั้งการเจริญในสภาวะ Mixotrophic จะมีอัตราการเจริญลดลงไปสู่ระดับของการเจริญในสภาวะ Heterotrophic ดังตารางที่ 6 ซึ่งจากตารางแสดงให้เห็นว่า การเจริญในสภาวะ Mixotrophic เป็นผลรวมของการเจริญในสภาวะ Autotrophic และ Heterotrophic

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6. แสดงอัตราการเจริญของ Chlorella regularis ในสภาวะการเลี้ยงต่าง ๆ

| ส่วนประกอบของอาหาร | สภาวะการให้แสง | อัตราการเจริญ (ΔVp/day) |
|---|---|---|
| Basal medium | แสง | 3.6 |
| Basal medium+50 uM CMU | แสง | 0 |
| Basal medium+10 mM กรดแอซีติก | มืด | 6.6 |
| Basal medium+10 mM กรดแอซีติก+50 uM CMU | มืด | 6.6 |
| Basal medium+10 mM กรดแอซีติก | แสง | 10.2 |
| Basal medium+10 mM กรดแอซีติก+50 uM CMU | แสง | 6.4 |

(ΔVp = ผลต่างของค่า pack cell volume (มล.ต่อลิตร)

CMU = 3-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea

แต่ทั้งนี้ การเจริญในสภาวะ Mixotrophic จะเป็นผลรวมของการเจริญในสภาวะ Autotrophic และ Heterotrophic ก็ต่อเมื่อแสงที่ใช้ในการเลี้ยงอยู่ต่ำกว่าจุดอิ่มตัวของการเจริญในสภาวะ Mixotrophic ซึ่ง Ogawa and Aiba (1981) พบว่าในการเลี้ยง Chlorella pyrenoidsa และ Chlorella vulgaris นั้น การเติมกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยเร่งการเจริญของสาหร่ายเฉพาะเมื่อแสงมีความเข้มไม่เกินจุดอิ่มตัวเท่านั้น ถ้าแสงมีความเข้มเกินจุดอิ่มตัว การเติมกลูโคสลงไปจะไม่มีผลกระตุ้นการเจริญเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด

และพบว่าแสงที่ความเข้ม 10 กิโลลักซ์ จะเป็นจุดอิ่มตัว นั่นคืออัตราการเจริญจำเพาะของ Chlorella vulgaris ในสภาวะ Mixotrophic จะมากกว่า Autotrophic เมื่อแสงมีความเข้มน้อยกว่า 10 กิโลลักซ์

การทดลองของ Ogawa และ Aiba พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของ Chlorella ในสภาวะ Mixotrophic จะเท่ากับผลบวกของอัตราการเจริญจำเพาะในสภาวะ Autotrophic และ Heterotrophic (ตาราง 7)

ตาราง 7. แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ ของ C.vulgaris ในสภาวะการเลี้ยงต่าง ๆ

| สภาวะการเลี้ยง | การเติม และไม่เติม 8 uM DCMU | อัตราการเจริญจำเพาะ ($ชม.^{-1}$) |
|---|---|---|
| Autotroph | - | 0.110 |
| | + | 0 |
| Heterotroph | - | 0.098 |
| | + | 0.110 |
| Mixotroph | - | 0.198 |
| | + | 0.113 |

DCMU = [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea]

ในการเลี้ยง Chlorella สามารถใช้แหล่งอาหารคาร์บอนได้หลายชนิดทั้งที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ไบคาร์บอเนต และสารอินทรีย์ เช่น กลูโคส กาแลกโตส และ กรดแอซีติก ในหลายสภาวะ ได้แก่ Autotrophic และ Mixotrophic ในที่มีแสง Heterotrophic ในที่มืด ซึ่งการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic มีแนวโน้มที่ให้ผลผลิตสูงกว่า เนื่องจากอัตราการเจริญในสภาวะ Mixotrophicเป็นผลรวมของอัตราการเจริญในสภาวะ Autotrophic และ Heterotrophic

แหล่งไนโตรเจน

สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนได้จากหลายแหล่ง เช่น เกลือแอมโมเนียม, เกลือไนเตรต และยูเรีย สาหร่ายจะเปลี่ยนไนเตรต และยูเรียให้อยู่ในรูปแอมโมเนียมก่อนนำไปใช้ ในกรณีที่สาหร่ายใช้เกลือแอมโมเนียม หรือไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน จะทำให้สภาวะความเป็นกรด-ด่าง เปลี่ยนแปลงไป โดยถ้าใช้ไนเตรตค่าความเป็นกรด-ด่างจะสูงขึ้น แต่ถ้าใช้แอมโมเนียมจะทำให้ ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง สำหรับยูเรีย จะทำให้ความเป็นกรด-ด่างของ

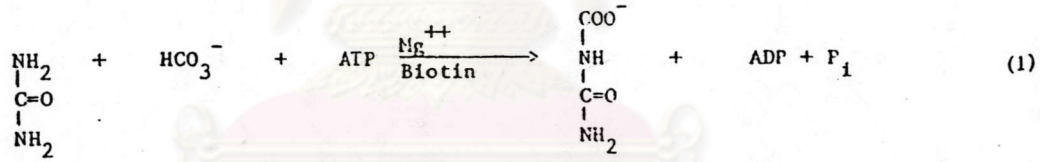
อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Oh-Hama, and Miyachi, 1988)

1. ยูเรีย

Becker และ Thompson (1962) พบว่า Chlorella vulgaris สามารถใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้โดยไม่มีการใช้เอ็นไซม์ urease

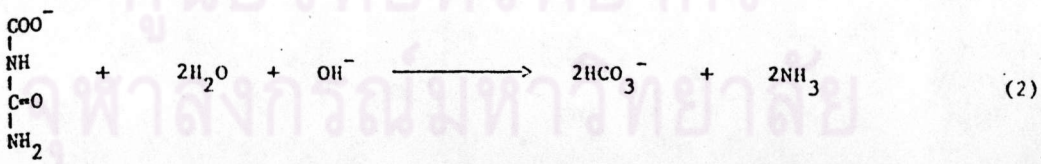
Thompson and Muenster ( 1971 ) พบว่า Chlorella ellipsoidea ใช้ ATP และเอ็นไซม์ urea amidolyase ให้เกิดปฏิกริยาการแยกสลายยูเรีย และพบว่า Chlorella vulgaris จะเปลี่ยนยูเรียให้เป็นแอมโมเนียมและไบคาร์บอเนตก่อนนำไปใช้โดยพลังงาน ATP และ เอ็นไซม์ urea amidolyase ซึ่งพบว่าประกอบด้วยเอ็นไซม์ 2 ระบบ เอ็นไซม์ระบบแรกคือเอ็นไซม์ urea carboxylase ซึ่งจะเปลี่ยนยูเรียให้เป็น allophanate ในการเกิดปฏิกริยาดังสมการ (1) และเอ็นไซม์ระบบที่สองคือ เอ็นไซม์ allophanate amidohydrolase ซึ่งจะทำการสลาย allophanate เป็น ไบคาร์บอเนต และ แอมโมเนียม ดังสมการ (2)

1) เอนไซม์ urea carboxylase



(1)

2) เอนไซม์ allophanate amidohydrolase



(2)

urea carboxylase ใน Chlorella pyrenoidosa จะถูกยับยั้งเมื่อมีแอมโมเนีย และการเจริญด้วยยูเรียจะกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์นี้ ในขณะที่ allophanate amidohydrolase จะมีตลอดเวลา

2. แอมโมเนียมและไนเตรต

Ahmad และ Hellebust (1990) ทดลองเลี้ยง Chlorella สายพันธุ์ UTEX27 พบว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic โดยใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน จะมีการสังเคราะห์แสงและการเจริญดีที่สุด แต่เมื่อเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนเป็นไนเตรต พบว่าความสามารถในการสังเคราะห์แสงและอัตราการเจริญจะลดลงมากกว่า 10 เท่า แต่ปริมาณโปรตีนจะไม่ลดลง แต่ถ้าเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic หรือ Heterotrophic โดยมีไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน สาหร่ายจะสามารถใช้ไนเตรตได้ใกล้เคียงกับใช้แอมโมเนียม ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจน 2 มิลลิโมลาร์ และพบว่า Chlorella สามารถใช้แอมโมเนียมภายใต้สภาวะ Photoautotrophic โดย Glutamine synthetase pathway

glutamate + $NH_4^+$ + ATP-----> Glutamine + ADP + Pi + $H^+$ (Stryer, 1988)

และภายใต้สภาวะ Heterotrophic และ Mixotrophic จะชักนำให้ใช้ NADH หรือ NADPH dependent glutamate dehydrogenase pathway

$NH_4^+$ + $\alpha$-ketoglutarate + NADPH + $H^+$ $\rightleftharpoons$ L-glutamate + $NADP^+$ + $H_2O$

โดยใช้เอ็นไซม์ glutamate dehydrogenase

ระดับของเอ็นไซม์ glutamine synthetase และ เอ็นไซม์ glutamate dehydrogenase ใน Chlorella autotrophica (clone 580) จะถูกควบคุมโดยแหล่งไนโตรเจนและ salinity ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เอ็นไซม์ glutamine synthetase จะมีมากในเซลล์ที่เลี้ยงในไนเตรตอิออน และจะมีมากสุดในเซลล์ที่ขาดไนโตรเจน และเอ็นไซม์ glutamine synthetase จะมีปริมาณลดลงเมื่อเพิ่ม salinity ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงในแอมโมเนียมอิออนจะมีเอ็นไซม์ NADPH-glutamate dehydrogenase activity มากโดยปริมาณจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มแอมโมเนียมอิออน ในขณะที่เอ็นไซม์ glutamine synthetase จะลดลงในภาวะเช่นนี้ (Ahmad และ Hellebust, 1984) ความเข้มข้นของเกลือ จะส่งเสริมการทำงานของเอ็นไซม์ NADPH-glutamate dehydrogenase ในขณะที่ระดับของเอ็นไซม์ NADH-glutamate dehydrogenase ต่ำแต่จะมีในทุกสภาวะที่กล่าวมา

Protein content ของสาหร่าย

เนื่องจาก Chlorella มีปริมาณโปรตีนสูงจึงมีการนำมาเป็นอาหารเสริมทั้งนี้ ปริมาณโปรตีนในสาหร่ายจะขึ้นอยู่กับ (Becker and Venkataraman, 1980)

1. วิธีวิเคราะห์
2. สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

ในสาหร่ายชนิดเดียวกันอาจมีปริมาณโปรตีนต่างกัน ถ้ามีสภาวะการเพาะเลี้ยงต่างกัน เช่น การขาดคาร์บอนจะทำให้ปริมาณโปรตีนลดลง แต่จะเพิ่มแป้งของสาหร่าย

3. สายพันธุ์ ที่ใช้
4. อายุของ culture และช่วงเวลาของวัน

พบว่า Scenedesmus ถ้าเก็บในตอนเช้าจะมีโปรตีนสูงกว่าที่เก็บในตอนเย็น 10-15 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์โปรตีนในสาหร่าย

ในปัจจุบันมีวิธีทางชีวเคมีหลายวิธีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ประเด็นสำคัญของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนก็คือ ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ได้จากวิธีชีวเคมีต่างๆ มักจะต่างกัน รวมทั้งยังมีข้อดีข้อเสียในแง่ของปริมาณโปรตีนปริมาณน้อยที่สุดที่จะวิเคราะห์ได้ (Sensitivity) และในแง่ของความคลาดเคลื่อนเนื่องจากปฏิกิริยาแทรกซ้อน (Interferences) จากสารเคมีอื่น ๆ ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างโปรตีน ดังนั้นในการที่จะเลือกวิธีหนึ่งวิธีใดมาใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน Chlorella นั้นจึงต้องเลือกให้เหมาะสมซึ่งวิธีที่จะเลือกมาวิเคราะห์มีได้หลายวิธี เช่น

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยปฏิกิริยาไบยูเรท

วิธีวิเคราะห์นี้ใช้หลักการที่ว่าพันธะเพพไทด์ 2 พันธะหรือมากกว่า 2 พันธะในโปรตีนจะทำปฏิกิริยากับคอปเปอร์ไอออนในสารละลายด่างได้สารสีม่วง ซึ่งสามารถวัดความเข้มข้นได้โดยหาค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ข้อดีของวิธีนี้ก็คือปริมาณที่ได้ไม่ขึ้นอยู่กับจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนที่มีอยู่สาหร่าย แต่ขึ้นกับจำนวนพันธะเพพไทด์ ดังนั้นจึงสามารถเลือกโปรตีนมาตรฐานตัวใดก็ได้มาเป็นมาตรฐาน ข้อเสียของวิธีนี้ก็คือสีของปฏิกิริยาจะคงที่อยู่ช่วงหนึ่ง แต่ถ้านานเกินไปสีจะเริ่มเข้มขึ้นตามเวลาที่ทิ้งไว้ รวมทั้งต้องใช้สารตัวอย่างโปรตีนปริมาณมากเมื่อเทียบกับการใช้วิธีอื่นในการวิเคราะห์ เพราะปริมาณโปรตีนที่น้อยที่สุดที่จะวิเคราะห์ได้

โดยวิธีนี้คือ 10 มิลลิกรัม (Layne, 1957) นอกจากนั้นวิธีนี้อาจถูกรบกวนโดยเกลือของแอมโมเนียม จากข้อเสียที่กล่าวมานี้จะเห็นว่า ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนจาก Chlorella เพราะ Chlorella ที่เลี้ยงได้มีปริมาณเซลล์น้อยกว่า 10 มก.รวมทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อของ Chlorella มีแอมโมเนียมไนเตรตปนอยู่ และ ในการทดลองจำนวนตัวอย่างมีจำนวนมากดังนั้นจะใช้เวลานานในการวิเคราะห์จะทำให้สีเข้มขึ้นได้

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี (Lowry, 1951)

ปฏิกิริยาเกิดคล้ายกับวิธีไบยูเร็ตคือ โปรตีนจับกับสารประกอบคอปเปอร์ และเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นของฟอสโฟโมลิบดิก-ฟอสโฟทังสติก โดยกรดอะมิโนไทโรซีน และทริพโทเฟนในโปรตีน (Layne, 1957)

ข้อดีคือ มีความไวกว่าวิธีการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ 280 นาโนเมตร 10 หรือ 20 เท่า ไวกว่าวิธีไบยูเร็ต 100 เท่า เหมาะที่จะใช้ในการวิเคราะห์ขนาดเล็ก ใช้วัดโปรตีนในช่วง 0.01-10 มก. แต่มีข้อเสียคือปริมาณสีของปฏิกิริยาจะแปรตามชนิดของโปรตีน ซึ่งขึ้นกับจำนวนของไทโรซีนและทริพโทเฟน ซึ่งคงที่น้อยกว่าวิธีไบยูเร็ต แต่คงที่มากกว่าการวัดด้วยการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และสีที่เกิดจะไม่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของโปรตีน นอกจากนี้วิธีนี้ต้องจับเวลาและควบคุมอุณหภูมิอย่างระมัดระวัง ทั้งนี้เพราะปฏิกิริยาจะเกิดช้าแต่สีจะจางเร็ว ดังนั้นจึงไม่เหมาะกับการทดลองที่มีจำนวนตัวอย่างมาก

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยการวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (Layne , 1957)

โปรตีนส่วนมากจะดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ 280 นาโนเมตร เนื่องมาจากไทโรซีนและทริพโทเฟน แต่ในขณะเดียวกันกรดนิวคลีอิกก็ดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เช่นกัน แต่จะดูดกลืนได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ดังนั้นในการวัดปริมาณโปรตีนที่ถูกต้องจึงต้องตัดค่าการดูดกลืนแสงของกรดนิวคลีอิกออกไป โดยใช้สูตร

ปริมาณโปรตีน (มก.ต่อ มล.) = $1.55\ OD_{280} - 0.76\ OD_{260}$

ดังนั้นข้อดีของวิธีนี้ก็คือใช้วิเคราะห์โปรตีนปริมาณน้อยได้โดยตรงโดยไม่ต้องใช้สารเคมีใดๆ มาทำปฏิกิริยากับโปรตีน สามารถนำตัวอย่างโปรตีนกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่ข้อเสียก็คือเครื่องมือมีราคาแพง และสารละลายบัฟเฟอร์รวมทั้งกรดนิวคลีอิกก็ดูดซับรังสีอุลตราไวโอเลตในช่วงความยาวคลื่น 260-280 นาโนเมตร เช่นกัน และรวมทั้งทริพโทเฟนและไทโรซีนมีจำนวนไม่เท่ากันในโปรตีน

ต่างๆ ดังนั้นการดูดกลืนรังสีอุลตราไวโอเลตต่อมิลลิกรัมโปรตีนจะเปลี่ยนแปลงตามชนิดของโปรตีน

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)

เป็นการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยอาศัยหลักการจับตัวกันของสี โคแมสซี่ บริลเลี้ยนท์ บลู จี-250 กับโปรตีน ทำให้สีเปลี่ยนจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตรไปเป็น 595 นาโนเมตร วิธีนี้ให้ผลละเอียดพอกับวิธีลอรี่ ใช้เวลาน้อย วิธีทดลองง่าย สีของปฏิกิริยาจะอยู่ได้นานประมาณ 1 ชั่วโมง รวมทั้งไม่ค่อยมีความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์เนื่องจากมีสารอื่นเจือปนในสารโปรตีนตัวอย่าง

5. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (Bradstreet, 1965)

เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในโปรตีน โดยการให้ความร้อนแก่สารตัวอย่างที่อยู่ในกรดซัลฟูริก เพื่อทำให้ไนโตรเจนในโปรตีนเปลี่ยนเป็น แอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นเติม โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น แล้วนำไปต้ม เพื่อทำให้ แอมโมเนียม ถูกปล่อยออกมาทำปฏิกริยากับ กรดบอริก เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน ข้อดีของวิธีนี้คือ เหมาะที่จะใช้วัดปริมาณโปรตีนในสาหร่ายเพราะสามารถวัดได้ทั้งโปรตีนที่ละลายน้ำและ โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ แต่ในขณะเดียวกัน วิธีนี้ก็มีข้อเสียคือ ปริมาณไนโตรเจนที่วัดได้ นอกจากจะมาจากโปรตีนแล้ว ยังเป็นไนโตรเจนที่มาจาก กรดนิวคลีอิก ด้วย ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะใช้วัดตัวอย่างที่มีปริมาณ กรดนิวคลีอิก สูง เพราะอาจทำให้ได้ปริมาณโปรตีนที่มากเกินจริง

ในการทดลองนี้เลือกใช้วิธี แบรดฟอร์ด และวิธี วัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต ซึ่งเป็นวิธีที่มี sensitivity สูง และใช้เวลาน้อย สะดวกต่อการวัดปริมาณโปรตีนในการทดลองที่มีจำนวนตัวอย่างมากๆ แต่ทั้งนี้ปริมาณโปรตีนที่วัดได้อาจจะต่ำกว่าค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดเพราะในการวัดจะวัดจากส่วนน้ำใสที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกโดยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ซึ่งจะวัดได้เฉพาะโปรตีนที่ละลายน้ำได้เท่านั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ความสำคัญและที่มาของหัวข้อการวิจัย

ปัจจุบันได้มีการนำ Chlorella มาใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์คือใช้เป็นอาหารเสริม เนื่องจาก Chlorella มีโปรตีนอยู่สูงถึง 55.6% (Kawaguchi, 1981) และได้มีการเลี้ยง Chlorella ในระดับอุตสาหกรรมในหลายประเทศ เช่น ไต้หวัน ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกา

ประเทศไทยมีการนำเข้า Chlorella ในรูปอาหารเสริมจากประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากยังไม่มีการผลิต Chlorella ในระดับอุตสาหกรรมในประเทศไทย Chlorella ที่นำเข้ามาจำหน่ายจะมีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นถ้ามีการผลิตในประเทศจะเป็นการลดปริมาณการนำเข้าได้ นอกจากนี้ประเทศไทยมีปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยงเช่น

1. แหล่งน้ำ ประเทศไทยมีแหล่งน้ำที่มีปริมาณน้ำมากพอ ที่สามารถนำมาใช้เลี้ยงได้อย่างเพียงพอตลอดปี

2. ปริมาณแสงต่อวัน เนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่ใกล้เส้นศูนย์สูตร ดังนั้นจึงมีช่วงกลางวันยาวกว่าประเทศในแถบซีกโลกเหนือ เช่น ญี่ปุ่น และไต้หวัน ซึ่งในฤดูหนาวจะมีช่วงวันที่สั้นมากทำให้สาหร่ายเจริญได้น้อยลง

3. อุณหภูมิ อุณหภูมิค่อนข้างสม่ำเสมอตลอดปีต่างจากบางประเทศที่ต้องหยุดการผลิตในฤดูหนาว

4. ราคาที่ดินและค่าแรง เมื่อเปรียบเทียบกับบางประเทศ ประเทศไทยมีที่ดินและค่าแรงที่ถูกกว่าประเทศที่พัฒนาแล้วอื่น ๆ

จากปัจจัยเหล่านี้จะเห็นว่าประเทศไทยมีแนวโน้มที่สามารถผลิต Chlorella ในระดับอุตสาหกรรมได้ แต่อย่างไรก็ตามการผลิต Chlorella อาจมีปัญหาเช่น

1. การปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ การเลี้ยง Chlorella ในระดับอุตสาหกรรมในบ่อเปิดนั้นมักมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น โปรโตซัว, Rotatoria และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Nakamura, 1981b) หรือสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่น

2. สายพันธุ์สาหร่าย เนื่องจากสภาพแวดล้อมของประเทศไทยแตกต่างจากประเทศอื่นดังนั้นสาหร่ายที่จะใช้เลี้ยงจึงต้องคัดเลือกให้เหมาะสม ตัวอย่างเช่น สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีความเหมาะสมในการเจริญที่ช่วงอุณหภูมิต่างกันดังได้กล่าวมาแล้ว

3. อาหารที่ใช้เลี้ยง เนื่องจาก Chlorella มีความต้องการคาร์บอนในปริมาณ

มาก (Oh-Hama, and Miyachi, 1988) ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องหาแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและให้ผลผลิตสูง

วัตถุประสงค์

1. งานวิจัยนี้ทำการเก็บตัวอย่างและแยก Chlorella sp. จากแหล่งน้ำธรรมชาติในกรุงเทพมหานคร เพื่อนำมาทำการเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการ โดยหาแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง Chlorella ที่แยกมาได้เพื่อให้ได้น้ำหนักแห้งสูง รวมทั้งทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสาหร่าย ที่ได้จากการเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนต่างๆ ซึ่งคาดว่าสามารถทำการเลี้ยง Chlorella ในระดับห้องปฏิบัติการได้

2. เลี้ยง Chlorella sp. ในสภาวะ Autotrophic, Heterotrophic และ Mixotrophic เพื่อหาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับสายพันธุ์ที่แยกได้ ในการเพิ่มน้ำหนักเซลล์และปริมาณโปรตีน

3. เปรียบเทียบการเลี้ยง Chlorella sp. โดยใช้แอมโมเนียมไนเตรตและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

ขอบเขตการวิจัย

องค์ประกอบของอาหารที่สำคัญและใช้เป็นปริมาณมากในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ได้แก่ คาร์บอน และไนโตรเจน ส่วนองค์ประกอบอื่น จะใช้ในปริมาณที่น้อยกว่า สำหรับสภาวะในการเลี้ยงสิ่งที่เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งคือแสง ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงทำการเลี้ยง Chlorella sp. สายพันธุ์ B.K.1 โดยเปรียบเทียบ ชนิดและปริมาณ ของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่ความเข้มแสง 3500 และ 1750 ลักซ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสภาวะการเลี้ยง Chlorella sp. ในระดับห้องปฏิบัติการ

2. เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลี้ยง Chlorella sp. เชิงพาณิชย์ในประเทศไทย