**1.ชุดโครงการ : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร**

**2.โครงการ : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร**

**กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพ**

**กิจกรรมย่อย : การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการผลิตสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้**

**3.ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : การศึกษาวิธีการสกัดสารละลายเซลล์แซบ(cell sap)ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีบางประการของสารสกัด**

**ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Study on extraction method of cyanobacterial cell and its components analysis**

**4. คณะผู้ดำเนินงาน**

**หัวหน้าการทดลอง** : นางประไพ ทองระอา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

**ผู้ร่วมงาน** : นางสาวศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

: นายภัสชญภณ หมื่นแจ้ง สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

: นางสาวกัลยกร โปร่งจันทึก สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

**5. บทคัดย่อ**

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถสังเคราะห์สารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และพัฒนาการเจริญเติบโตของพืชได้ อาทิเช่น ฮอร์โมน วิตามิน กรดอะมิโน โพลีเปปไทด์ และธาตุอาหาร เป็นต้น เพื่อให้ได้สารสกัดจากเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จึงทำการทดสอบวิธีการสกัดสารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืช จำนวน 2 วิธี คือวิธีสกัดเย็น และวิธีสกัดร้อน ทำการเปรียบเทียบค่าวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร และปริมาณกรดอะมิโนในสารสกัดของทั้งสองวิธี ผลการทดสอบพบว่า วิธีการสกัดทั้งสองวิธี ทำให้ได้ปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ในสารสกัดเซลล์ในปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนในด้านปริมาณกรดอะมิโนในรูป Total amino และ Free amino ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเซลล์นั้น พบว่าวิธีการสกัดเย็นมีผลทำให้ได้ปริมาณกรดอะมิโนทั้งในรูป Total amino และ Free amino สูงกว่าวิธีสกัดร้อน

**6. คำนำ**

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacteria) ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ที่ดำรงชีวิตอยู่อย่างอิสระสามารถเป็นประโยชน์ให้แก่พืชได้โดยการตรึงไนโตรเจนจากอากาศและเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนให้แก่ดินและพืช นอกจากนี้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินยังมีประโยชน์ด้านอื่นๆ คือสามารถสังเคราะห์สารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและพัฒนา การเจริญเติบโตของพืช (bioactive substance) ได้ เช่น ออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน วิตามิน โพลีเปปไทด์ และ กรดอะมิโน เป็นต้น (Whitton, 2000; Rodriguez *et al*., 2006) ซึ่งสารที่เป็น

ประโยชน์แก่พืชเหล่านี้ บางชนิดสามารถปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ในช่วงการเจริญเติบโต และบางชนิดอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งในการจะนำสาร bioactive substance เหล่านี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์คล้ายคลึงกับสารสกัดจากสาหร่ายทะเล(seaweed extract) จำเป็นต้องหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้เกิดการเสื่อมสภาพของสาร ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาวิธีการสกัดสารละลายเซลล์แซบจากเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่คัดเลือกได้ ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุอาหาร ปริมาณกรดอะมิโน ในสารสกัดเพื่อทราบปริมาณที่เป็นประโยชน์แก่พืช เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืชต่อไป

## 7. วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1.สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Anabaena cylindrica* DASHN01101 และ *Hapalosiphon* sp. DASHN05101

2. สารเคมีชนิด Analytical grade

-สำหรับเตรียมอาหารเหลว BG-11 ได้แก่ Magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$), Sodium carbonate anhydrous ( $Na_2CO_3$), Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$), Citric acid anhydrous, Ferric ammonium citrate ($FeNH_4$ citrate), Ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt ($Na_2$ EDTA) , Di-Potassium hydrogen phosphate anhydrous ($K_2HPO_4$) , Boric acid ($H_3BO_3$) ,Manganese sulphate monohydrate ($MnSO_4.H_2O$), Molybdenum trioxide ($MoO_3$), Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$), Copper (II) sulfate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$) , Potassium chromium sulfate ($K_2Cr_2(SO_4)_4$ .24 $H_2O$), Nickel sulfate hexahydrate($NiSO_4$. $6H_2O$), Cobalt (II) nitrate hexahydrate ($Co(NO_3)_2$ .$6H_2O$), Sodium tungstate dihydrate ($Na_2WO_4$. $2H_2O$), Titanium dioxide ($TiO_2$) , Ammoniummonovanadate ($NH_4$ $VO_3$)

3.วัสดุที่ใช้เพาะเลี้ยงและเก็บเซลล์สาหร่าย ได้แก่ ถังพลาสติกโพลีคาร์บอเนตขนาด 18.9 ลิตร, ปั๊มลม, ผ้ากรองแพลงตอนขนาด 30 ไมครอน

4. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ, ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส , ชั้นแสง

### วิธีการ

**1.การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและการสกัดสารละลายเซลล์แซบ**

นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถสร้างโปรตีนได้ดี 2 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนสูตร BG-11 ในถังพลาสติกโพลีคาร์บอเนตขนาด 18.9 ลิตร โดยใส่หัวเชื้อตั้งต้น(Starter) ปริมาตร 10 % ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสภาพควบคุม โดยให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ และอุณหภูมิ 25+1 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน ทำการเก็บเซลล์สาหร่ายโดยกรอง

ผ่านผ้ากรองแพลงตอน ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง พอหมาด จากนั้นทำการชั่งหาน้ำหนักสดเซลล์สาหร่าย และนำไปสกัดหาสารละลายเซลล์แซบ โดยวิธีการสกัดเย็น และวิธีการสกัดร้อน

1.1 วิธีการสกัดเย็น ดำเนินการตามวิธีการสกัดสาหร่ายสีเขียวของ Shaaban (2001) โดยนำเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการกรองและชั่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้ว ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตรเป็น 10 เท่าของน้ำหนักเซลล์สาหร่ายสด กวนเซลล์ให้เข้ากัน นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการละลายน้ำแข็ง และนำสารแขวนลอยเชื้อที่ได้ไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เก็บสารสกัดเซลล์ส่วนใส(clear cell sap) เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน 17 ชนิด ปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ ได้แก่ ไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ โพแทสเซียมที่ละลายน้ำได้ แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม เหล็ก แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี สมบัติทางกายภาพ ได้แก่ สี และค่าความเป็นกรด-ด่าง

1.2 วิธีการสกัดร้อน ดำเนินการตามวิธีการสกัดสาหร่ายทะเลของ Thirumaran *et al.* (2009) โดยนำเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการกรองและชั่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้วละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตรเป็น 10 เท่าของน้ำหนักเซลล์สาหร่ายสด กวนเซลล์ให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อนาน 1 ชั่วโมง ปล่อยให้สารแขวนลอยเชื้อเย็น นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เพื่อเก็บสารสกัดเซลล์ส่วนใสเพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน 17 ชนิด ปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ ได้แก่ ไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ โพแทสเซียมที่ละลายน้ำได้ แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม เหล็ก แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี สมบัติทางกายภาพ ได้แก่ สี และค่าความเป็นกรด-ด่าง

**2. การคัดเลือกวิธีการสกัดที่ทำให้ได้องค์ประกอบของธาตุอาหารและปริมาณกรดอะมิโนสูง**

ทำการเปรียบเทียบปริมาณธาตุอาหาร ปริมาณกรดอะมิโน และความเป็นกรด-ด่าง ในสารสกัดเซลล์ที่สกัดโดยวิธีการสกัดเย็น และวิธีการสกัดร้อน คัดเลือกวิธีการสกัดที่ทำให้ได้องค์ประกอบของปริมาณธาตุอาหารและปริมาณกรดอะมิโนสูง สำหรับนำไปใช้ทดสอบกับพืช

**ระยะเวลา** ตุลาคม 2554 - กันยายน 2555

**สถานที่ดำเนินการ** ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

**1.**ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณธาตุอาหาร และปริมาณกรดอะมิโนในสารสกัดจากเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเมื่อสกัดโดยวิธีสกัดเย็น และวิธีสกัดร้อน

ลักษณะสีของสารสกัดเซลล์สาหร่ายเมื่อสกัดโดยวิธีสกัดเย็นและวิธีสกัดร้อน พบว่ามีความแตกต่างกัน คือเมื่อสกัดวิธีเย็นสีของสารสกัดจะป็นสีม่วงแดง และเมื่อสกัดวิธีร้อนสีของสารสกัดจะเป็นสีน้ำตาล ที่เป็นเช่นนี้เป็นผลมาจากการสกัดวิธีเย็นไม่มีผลในการทำลายรงควัตถุในเซลล์สาหร่าย แต่เมื่อสกัดวิธีร้อน อุณหภูมิสูงมีผลต่อ

การสลายตัวของรงควัตถุในเซลล์สาหร่าย จึงทำให้สีของสารสกัดที่ได้แตกต่างกัน ส่วนความเป็นกรด-ด่าง ของสารสกัดเซลล์นั้นพบว่าวิธีสกัดเย็นและวิธีสกัดร้อน มีค่าเป็นกลางใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 1)

ในด้านผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร และปริมาณกรดอะมิโนของสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 2 สายพันธุ์ (*Hapalosiphon* sp.DASH N05101 และ *Anabaena cylindrica* DASH N01101) พบว่าวิธีการสกัดเย็นและวิธีการสกัดร้อนทำให้ได้ปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ในสารสกัดเซลล์ปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนในด้านปริมาณกรดอะมิโนในรูป Total amino และ free amino ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเซลล์นั้น พบว่าวิธีการสกัดเย็นมีผลทำให้ได้ปริมาณกรดอะมิโนทั้งในรูป Total amino และ Free amino มากกว่าวิธีสกัดร้อน ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกันในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งสองสายพันธุ์ (ตารางที่ 1 และ 2) และจากข้อมูลปริมาณกรดอะมิโนที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งสองสายพันธุ์นั้นพบว่า มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกับสารสกัดเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ส่วนปริมาณธาตุอาหารในสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินพบว่ามีปริมาณน้อยกว่าสาหร่ายสีเขียว (Shaaban *et al.*, 2001) และน้อยกว่าสาหร่ายทะเล *Sargassum wightii* (Sivasankari *et al*., 2006; Zodape *et al.,* 2009) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดสาหร่าย และแหล่งของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย

สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อเลี้ยงขยายในภาชนะเพาะเลี้ยงที่ใหญ่ขึ้นเพื่อเก็บผลผลิตเซลล์อาจต้องมีการคัดเลือกจากทั้ง 2 สายพันธุ์ว่าสายพันธุ์ใดมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี จึงคัดเลือกนำไปผลิตเพื่อใช้ทดสอบกับพืช

ตารางที่ 1 สมบัติทางกายภาพ เคมี และปริมาณกรดอะมิโน ในสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สายพันธุ์ *Hapalosiphon* sp.DASH N05101 และ *Anabaena cylindrica* sp.DASH N01101

| สมบัติทางกายภาพ เคมี และปริมาณกรดอะมิโน | *Hapalosiphon* sp. DASH N05101 | | *Anabaena cylindrica* sp. DASH N01101 | |
|---|---|---|---|---|
| | สกัดวิธีเย็น | สกัดวิธีร้อน | สกัดวิธีเย็น | สกัดวิธีร้อน |
| 1.สี | ม่วงแดงปนน้ำเงิน | น้ำตาล | ม่วงแดงปนน้ำเงิน | น้ำตาล |
| 2. pH | 7.0 | 7.1 | 7.0 | 7.1 |
| 3. ปริมาณธาตุอาหาร (มก./ล) [1/] | | | | |
| 3.1 N | 2.17 | 2.00 | 2.25 | 2.40 |
| 3.2 K | 7.93 | 10.18 | 24.00 | 24.72 |
| 3.3 Ca | 3.11 | 3.25 | 2.62 | 1.31 |
| 3.4 Mg | 5.65 | 5.66 | 14.87 | 15.34 |
| 3.5 Na | 3.97 | 3.67 | 2.62 | 1.31 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 3.6 Fe | ND | ND | ND | ND |
| 3.7 Mn | 0.23 | 0.076 | 0.50 | 0.25 |
| 3.8 Cu | 0.01 | 0.013 | 0.38 | 0.19 |
| 3.9 Zn | 0.06 | 0.028 | 0.13 | 0.066 |
| 4. ปริมาณรวมกรดอะมิโน 17 ชนิด ในรูป Free amino (มก./ล) [2/] | 258.93 | 104.90 | 267.93 | 168.25 |
| 5. ปริมาณรวมกรดอะมิโน 17 ชนิด ในรูป Total amino (มก./ล) [2/] | 1,002.10 | 931.10 | 5,677.40 | 2,243.05 |

ND = ตรวจไม่พบ

[1]/ วิเคราะห์โดยกลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา

[2]/ วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดอะมิโน 17 ชนิด ในรูป Free amino และ Total amino ในสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ *Hapalosiphon* sp.DASH N05101 และ *Anabaena cylindrica* sp.DASH N01101

| กรดอะมิโน [2/] (มก./ล) | *Hapalosiphon* sp. DASH N05101 | | | | *Anabaena cylindrica* sp. DASH N01101 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | สกัดวิธีเย็น | | สกัดวิธีร้อน | | สกัดวิธีเย็น | | สกัดวิธีร้อน | |
| | Free amino | Total amino | Free amino | Total amino | Free amino | Total amino | Free amino | Total amino |
| 1. Aspartic acid | 7.28 | 96.60 | 2.28 | 75.50 | 11.45 | 473.00 | 10.78 | 208.70 |
| 2. Serine | 13.65 | 52.60 | 2.40 | 47.00 | 9.78 | 338.40 | 4.65 | 136.35 |
| 3.Glutamic | 47.13 | 173.00 | 32.65 | 149.70 | 48.43 | 732.30 | 54.18 | 357.10 |
| 4. Glycine | 6.13 | 50.80 | 1.33 | 46.50 | 5.88 | 345.90 | 9.33 | 132.85 |
| 5. Histidine | 10.83 | 10.40 | 0.45 | 11.80 | 6.88 | 94.70 | Nd | 34.30 |
| 6. Arginine | 20.80 | 81.80 | 6.23 | 102.80 | 29.83 | 557.80 | 11.43 | 158.45 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7. Threonine | 11.45 | 71.50 | 2.28 | 51.90 | 12.65 | 366.70 | 3.18 | 150.95 |
| 8. Alanine | 23.15 | 85.60 | 4.38 | 80.30 | 31.33 | 466.80 | 9.13 | 168.10 |
| 9. Proline | 6.55 | 41.10 | 8.45 | 38.30 | 7.75 | 264.40 | 4.15 | 111.85 |
| 10. Cystine | ND | 0.40 | ND | 0.60 | 1.20 | 29.30 | 3.08 | 5.80 |
| 11.Tyrosine | 16.23 | 37.10 | 4.45 | 41.60 | 17.15 | 291.40 | 8.00 | 109.20 |
| 12. Valine | 13.55 | 52.10 | 3.05 | 25.90 | 13.90 | 308.50 | 6.50 | 111.60 |
| 13. Methionine | 10.48 | 10.60 | 5.28 | 24.90 | 9.00 | 26.20 | 4.33 | 24.55 |
| 14. Lysine | 13.85 | 51.70 | 9.83 | 42.90 | 28.55 | 326.20 | 19.05 | 149.05 |
| 15. Isoleucine | 19.03 | 70.30 | 11.58 | 69.50 | 18.50 | 328.80 | 2.15 | 118.00 |
| 16. Leucine | 23.75 | 77.90 | 7.60 | 79.80 | 6.58 | 500.60 | 13.00 | 174.15 |
| 17. Phenylalanine | 15.10 | 38.60 | 2.70 | 42.10 | 9.10 | 226.40 | 5.35 | 92.05 |
| ปริมาณรวม | 258.93 | 1,002.10 | 104.90 | 931.10 | 267.93 | 5,677.40 | 168.25 | 2,243.05 |

ND = ตรวจไม่พบ

[2]/ วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**9.สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ**

วิธีการสกัดสารละลายเซลล์แซบจากเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณธาตุอาหาร และปริมาณกรดอะมิโนสูงคือวิธีการสกัดเย็น ซึ่งสามารถคัดลือกและนำวิธีการสกัดดังกล่าวไปใช้สกัดเซลล์สาหร่ายเพื่อนำไปใช้ทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืชต่อไป

**10.การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์**

สามารถนำสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ได้ไปใช้ทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืชผัก อาทิเช่น การใช้แช่เมล็ด และฉีดพ่นทางใบ หรือใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมีในรูปปุ๋ยน้ำเพื่อเพิ่มการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารแก่พืช เป็นต้น

**11. คำขอบคุณ**

-

**12. เอกสารอ้างอิง**


Shaaban, M.M. 2001. Green micro water extract as foliar feeding to wheat plants. *Pakistan Journal of Biological Science*. 4(6):628-632

Sivasankari, S., V. Venkatesalu, M. Anantharaj and M. Chandrasekaran. 2005. Effect of seaweed extracts on the growth and biochemical constituents of *Vigna sinensis*. *Bioresource Technology*. 97:1745-1751

Thirumaran, G., M. Arumugam, R. Arumugam and P. Anantharaman. 2009. Effect of seaweed liquid fertilizer on growth and pigment concentration of *Cyamopsis tetrogonolaba*(L) Taub. *American-Eurasian Journal of Agronomy*. 2(2): 50-56

Whitton, B. A. 2000. Soils and rice-fields, pp.233-255. *In* B. A. Whitton and M. Potts(eds). The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers.

Zodape, S. T., S. Mukherjee, M.P. Reddy and D. R. Chaudhary. 2009. Effect of *Kappaphycus alvarezii*(Doty) ex silva. extract on grain quality, yield and some yield components of wheat(*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Plant Production*. 3(2): 97-101