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

นารินทร์ จันทร์สว่าง[1], สุขใจ ชูจันทร์[2] และ อาภารัตน์ มหาขันธ์[1]

[1]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

[2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

Abstract: Sugar Compositions of Polysaccharide of "Hed Lap" Alga (*Nostoc commune*, Cyanophyta)

Narin Chansawang[1], Sukjai Choojun[2] and Aparat Mahakhant[1]

[1]Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Klong Luang, Pathumthani 12120, [2]Department of Applied Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology (KMITL), Ladkrabang, Bangkok 10520

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

Key words: Cyanophyta, monosaccharide, extracellular polysaccharide, sugar compositions

บทนำ

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

สาหร่ายเห็ดลาบ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Nostoc commune* Vaucher เป็นสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (blue-geen alga, Cyanobacterium) ที่ตรึงไนโตรเจน (N_2-fixation)ได้ มีลักษณะเป็นแผ่นวุ้นแบนบางคล้ายเห็ดหูหนูสีเขียวที่ขึ้นบนดิน ชาวบ้านในพื้นที่ อ.นาเชือก จ.มหาสารคาม นิยมเก็บไปทำลาบ จึงได้ชื่อประจำท้องถิ่นว่า "เห็ดลาบ" โดยมีความเชื่อตามภูมิปัญญาท้องถิ่นว่าการบริโภคเห็ดลาบจะช่วยรักษาระบบกระเพาะอาหารและลำไส้ ถึงแม้นว่าสาหร่ายเห็ดลาบจะเจริญเติบโตบนดินเค็มในพื้นที่คุ้มครองทรัพยากรธรรมชาติป่าดูนลำพัน แต่เนื่องจากในฤดูฝน เมื่อเกิดฝนตกจะทำให้สาหร่ายที่ในหน้าร้อนหดตัวเป็นแผ่นบางกรอบคล้ายกระดาษ (ซึ่งเป็นระยะพักตัว, resting stage) ดูดซับน้ำฝน ขยายตัวและเจริญเติบโตโดยการแบ่งเซลล์แผ่ออกเป็นแผ่นวุ้นบาง ไม่มีรสชาติ มีเนื้อนิ่มหยุ่นแต่กรอบ

คล้ายสาหร่ายทะเล *Undaria pinnatifida* หรือ Wakame ที่นิยมบริโภคในญี่ปุ่น อย่างไรก็ตามสาหร่ายเห็ดลาบมีคุณสมบัติที่ดีกว่าคือไม่มีกลิ่นคาว ทำให้ชาวบ้านนิยมเก็บไปบริโภคเป็นประจำทุกปี ในฤดูฝนซึ่งเป็นเพียงฤดูกาลเดียวเท่านั้นที่สาหร่ายชนิดนี้จะแพร่และขยายพันธุ์ได้ จนเป็นที่น่าเกรงว่าความนิยมบริโภคสาหร่ายเห็ดลาบของชาวบ้านในท้องถิ่นจะเป็นสาเหตุให้สาหร่ายเห็ดลาบสูญหายไปจากพื้นที่ในที่สุด

ในการใช้ประโยชน์จาก *Nostoc* พบว่า *Nostoc* บางชนิดรับประทานได้ บางชนิดใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง โรคเก๊าต์ ลดโคเลสเตอรอลในซีรั่มได้อย่างมีนัยสำคัญในหนูทดลอง ซึ่งคาดว่าความสามารถในการลดโคเลสเตอรอลนี้น่าจะมาจากใยอาหารของ *Nostoc* (Hori et al., 1994) นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการบำบัดโรคตาบอดในเวลากลางคืน แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวกหรืออาการเจ็บป่วยที่ไม่รุนแรงต่างๆ มีการวิจัยพบว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนของ *N. flagelliforme* มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก (antitumer) ซึ่งคุณสมบัติต่างๆ เหล่านี้เป็นผลมาจากองค์ประกอบของสารพอลิแซ็กคาไรด์ ยังมีรายงานการวิจัยของ *N. commune* พบว่าองค์ประกอบหลักของสารพอลิแซ็กคาไรด์จากแหล่งธรรมชาติจะมีกลูโคส ไซโรส และกาแลคโตส ในสัดส่วน 2:1:1 โดยประมาณ (Huang et al., 1998)

พอลิแซ็กคาไรด์มีโมเลกุลขนาดใหญ่ สามารถใช้เป็นตัวจับในการดึงเอาโลหะหนักออกจากน้ำหรือชะโลหะหนักที่มีคุณค่าออกจากของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังให้ค่าความหนืดสูงและมีลักษณะเป็น pseudoplastic ใช้ประยุกต์ทางการเกิดสารแขวนลอย การเกิดอิมัลชันหรือสารให้ความข้นเหนียว (thickening agent) (De philippis et al., 2000)

รายงานดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นถึงคุณประโยชน์ของ *Nostoc* จากคุณสมบัติที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ อย่างไรก็ตามรายงานการวิจัยเหล่านี้เป็นของต่างประเทศทั้งสิ้น ยังไม่มีรายงานการศึกษา *N. commune* ในประเทศไทยเลย ดังนั้นการศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Nostoc* ในห้องปฏิบัติการจึงเป็นแนวทางในการพัฒนาองค์ความรู้เพื่อเพิ่มศักยภาพในการนำไปใช้ทางการแพทย์ เภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหารและอื่นๆ ได้อย่างยั่งยืน ในขณะเดียวกันข้อมูลที่ได้ยังสามารถใช้เปรียบเทียบกับรายงานการวิจัยของต่างประเทศ เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งยังเป็นการส่งเสริมให้ตระหนักถึงคุณค่าอาหารประจำท้องถิ่นและเกิดการอนุรักษ์สาหร่ายเห็ดลาบให้คงอยู่คู่ท้องถิ่น วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อ

1. เปรียบเทียบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ และที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BGA และ BG-11
2. เปรียบเทียบองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยสาหร่ายเห็ดลาบด้วยเทคนิค Gas Chromatography จากแหล่งธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน
3. เป็นองค์ความรู้ที่จะนำไปสู่การพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ เภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหารและอื่นๆ ได้
4. ตระหนักถึงคุณค่าของทรัพยากรชีวภาพและภูมิปัญญาประจำท้องถิ่น และเกิดการอนุรักษ์สาหร่ายเห็ดลาบให้คงอยู่คู่ท้องถิ่น

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์

1.1 ตัวอย่างสาหร่ายจากแหล่งธรรมชาติ

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

1.2 ตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในอาหารเหลว

นำเซลล์สาหร่าย *N. commune* ที่แยกได้สายพันธุ์เดี่ยวแล้ว (ปราศจากรา โปรโตซัว และสาหร่ายสายพันธุ์อื่นๆ) เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BGA (Antarikanonda et al., 1980) (ในสภาพการตรึงไนโตรเจน) และ BG-11 (Stainer

and Bazize, 1971) (ในสภาพที่ไม่มีการตรึงไนโตรเจน) ในถังคาร์บอย (carboy) ปริมาตร 8 ลิตร บ่มภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ด้วยอัตราการไหล 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 20 วัน จะได้สาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตในลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ทรงกลมห่อหุ้มของเหลวหนืดอยู่ภายในกลุ่มเซลล์ แยกตัวเซลล์จากอาหารโดยกรองผ่านตาข่ายแพลงก์ตอนขนาด 108 ไมครอน ล้างเซลล์ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แบ่งกลุ่มเซลล์สาหร่ายออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นกลุ่มเซลล์ทรงกลมที่มีของเหลวหนืดภายในนำไปทำแห้งแข็ง ส่วนที่สอง นำกลุ่มเซลล์สาหร่ายจากการเพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหาร จิ้มด้วยเข็มเพื่อให้กลุ่มเซลล์ที่ห่อหุ้มของเหลวหนืดแตกก่อนปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จะได้ของเหลวหนืดและส่วนของเซลล์สาหร่าย แยกทั้งสองส่วนด้วยการกรองผ่านแพลงก์ตอน แล้วนำส่วนที่เป็นเฉพาะของเหลวหนืด ทำแห้งแข็ง ส่วนอาหารเพาะเลี้ยง (culture broth) นำไปกรองผ่าน glass-fiber filter (Whatman เบอร์ GFC) แล้วนำมาลดปริมาตรลงด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

1.3 ตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายบนอาหารแข็ง

เขี่ยเซลล์สาหร่ายเห็ดลาบลงบนอาหารวุ้น BGA BGA+N (ดัดแปลงโดยการเติม $NaNO_3$) BG-11 และ BG-11-N (BG-11 ที่ปราศจากไนโตรเจน) ในจานเพาะเลี้ยงแก้ว ปิดขอบจานเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม บ่มภายใต้สภาวะเดียวกันดังที่กล่าวมาแล้ว จะได้เซลล์ที่มีการเจริญเติบโตในลักษณะเป็นก้อนวุ้นคล้ายเยลลี่ ล้างเซลล์ทั้งหมดให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น

2. การสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ออกจากเซลล์ กลุ่มเซลล์ของสาหร่าย ส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ อาหารเพาะเลี้ยง และพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ (Huang et al., 1998)

2.1 การสกัดด้วยเอทานอล

นำพอลิแซ็กคาไรด์แห้งจากรูปแบบที่แตกต่างกัน คือ แผ่นสาหร่ายจากธรรมชาติ จากกลุ่มเซลล์ทรงกลมที่มีของเหลวหนืดภายใน จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในของกลุ่มเซลล์สาหร่าย ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว จากกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะเป็นก้อนวุ้นคล้ายเยลลีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็ง และจากอาหารเพาะเลี้ยงเหลว มาสกัดด้วยเอทานอล 80% (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยใช้เอทานอล 40 มิลลิลิตรต่อกรัมสาหร่ายแห้งจากแหล่งธรรมชาติและ 100 มิลลิลิตรต่อกรัมแห้งจากเซลล์เพาะเลี้ยงและเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงใช้เอทานอล 40 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักแห้ง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้เวลาในการสกัด 3 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid (Dubois et al., 1956) ทำไดอะไลซ์ ในน้ำกลั่น 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส นำไปทำแห้ง

2.2 การสกัดด้วยน้ำร้อน

วิธีการสกัดเหมือนกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็นน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำร้อน 100 มิลลิลิตรต่อกรัมสาหร่ายแห้ง

2.3 การสกัดด้วย EDTA

วิธีการสกัดเหมือนกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น 0.1 โมลาร์ EDTA อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้ EDTA 40 มิลลิลิตรต่อกรัมสาหร่ายแห้ง

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลด้วยแก๊สโครมาโทรกราฟี (ดัดแปลงจาก Morvai et al., 1991 and Molnár-Perl and Horváth, 1997)

การหาปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิด จะใช้วิธีสารละลายมาตรฐานภายใน สำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทรกราฟี โดยมีสภาวะการวิเคราะห์สารตัวอย่าง ดังนี้ คอลัมน์ที่ใช้เป็น Dimethypolysiloxane (J&W Scientific) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร แก๊สพาฮีเลียม 50 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 200 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เครื่องตรวจสอบเป็น Mass Selective Detector

ผลการวิจัย

1. ปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้

เมื่อทำการเตรียมตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ และจากอาหารเพาะเลี้ยงเหลว นำมาสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอล น้ำร้อน และ EDTA แสดงผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากแหล่งสาหร่ายต่าง ๆ

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

EPS : Exopolysaccharides และ nd : not determined

จากผลการทดลองพบว่าส่วนใหญ่การใช้น้ำร้อนสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างกลุ่มเซลล์จากธรรมชาติจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งและอาหารเหลว ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและ EDTA ดังนั้นจึงเลือกใช้เฉพาะน้ำร้อนในการสกัดเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ (EPS) บนอาหารแข็ง

พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติที่สกัดด้วยน้ำร้อนให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าที่สกัดด้วยเอทานอลและ EDTA โดยให้ปริมาณเท่ากับ 12.18 10.40 และ 9.33 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้งสาหร่าย ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่านัยสำคัญเท่ากับ 0.05 พบว่า การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำร้อน เอทานอล และ EDTA ไม่ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อนให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าที่สกัดด้วยเอทานอลและ EDTA โดยให้ปริมาณ 53.03 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง และมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำร้อนสูงกว่าสูตรอาหาร BG-11-N BG-11 และ BGA+N ตามลำดับ ส่วนพอลิแซ็คคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ (EPS) จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็งสูตร BGA พบว่ามีพอลิแซ็กคาไรด์สูงถึง 79.48 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งพอลิแซ็กคาไรด์ คิดเป็น 1.50 เท่าของกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อน ในขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายบนอาหารแข็ง มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์คิดเป็น 1.90 และ 2.16 เท่า เมื่อเทียบกับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเพาะเลี้ยงเหลวทั้งสูตร BGA และ BG-11 ตามลำดับ แสดงว่าสาหร่ายที่สภาวะการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง มีการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BGA+N สกัดด้วยเอทานอล

ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อน และ EDTA โดยให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 27.54 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BGA BG-11 และ BG-11-N ที่สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BG-11 และ BG-11-N ที่สกัดด้วยน้ำร้อนจะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและ EDTA เช่นเดียวกัน โดยมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 42.62 และ 45.40 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ

พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งของเหลวหนืดที่อยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อนให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและ EDTA โดยให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 35.80 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงเหลวที่สกัดด้วยเอทานอล มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 41.74 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง พอลิแซ็กคาไรด์จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 20.88 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง จากการทดลองพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ มีปริมาณน้อยกว่าอาหารเพาะเลี้ยงเหลว แสดงว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยเซลล์สาหร่ายส่วนใหญ่จะถูกปลดปล่อยมากกว่าสะสมอยู่ภายใน โดยการปล่อยออกนอกเซลล์ลงสู่อาหารเพาะเลี้ยง

พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งของเหลวหนืดที่อยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร BG-11 สกัดด้วยน้ำร้อนให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและ EDTA เช่นเดียวกับสูตรอาหารเหลว BGA โดยให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 30.08 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงเหลวมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 36.78 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง พอลิแซ็กคาไรด์จากเฉพาะส่วนของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 18.57 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งของเหลวหนืดที่อยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BG-11 เมื่อเทียบกับพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งของเหลวหนืดที่อยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อนและ EDTA และจากอาหารเพาะเลี้ยงเหลวที่สกัดด้วยเอทานอล ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ พอลิแซ็กคาไรด์จากส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์ มีปริมาณน้อยกว่าอาหารเพาะเลี้ยงเหลว แสดงว่าเซลล์สาหร่ายมีการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์ เช่นเดียวกับสูตรอาหารเหลว BGA ในการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยสู่อาหารเพาะเลี้ยงเหลวทั้ง BGA และ BG-11 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงจากอาหารแข็งสูตร BGA BGA+N BG-11 และ BG-11-N พร้อมทั้งจากอาหารเหลวสูตร BGA และ BG-11 ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่เก็บมาจากธรรมชาติ เนื่องจากสาหร่ายที่ขึ้นตามสภาพธรรมชาตินี้อยู่ในแหล่งดินเค็ม ไม่ค่อยมีสารอาหารที่สมบูรณ์ ต้องรักษากระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ให้คงความมีชีวิตรอด จึงไม่มีพลังงานมากเพียงพอที่จะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ออกมามากเท่าการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Dodds et al., 1995)

จากการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติ กลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็งสูตร BGA ที่ไม่มีการเติมไนโตรเจน จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำร้อนในปริมาณที่มากกว่าสูตร BGA+ N ที่มีการเติมไนโตรเจน ให้ค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าสาหร่ายมีการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ในสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมไนโตรเจนมากกว่าสูตรที่มีการเติมไนโตรเจน ส่วนปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BG-11-N ไม่มีการเติมไนโตรเจน สกัดด้วยน้ำร้อน และสูตร BG-11 มีการเติมไนโตรเจน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าสามารถเลือกเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร BG-11 หรือ BG-11-N ก็ได้ ซึ่งให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ไม่แตกต่างกัน

พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็งสูตร BGA กับสูตร BG-11 ที่สกัดด้วยน้ำร้อน เอทานอล และ EDTA ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อน เทียบกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว

สูตร BG-11 ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตร BGA ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตร BG-11 ส่วนใหญ่การใช้ EDTA สกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็ง และจากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งของเหลวหนืดที่อยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำกว่าน้ำร้อนและเอทานอล ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติความมีขั้ว (polarity) น้อยกว่าน้ำและเอทานอล

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

ตารางที่ 2. เปรียบเทียบผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ที่ศึกษาครั้งนี้กับรายงานผลการศึกษาที่ผ่านมา

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

2. *ผลการวิเคราะห์น้ำตาลในสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทรกราฟี*

ปริมาณน้ำตาลจากสารตัวอย่างต่างๆ คำนวณจากเทคนิคสารมาตรฐานภายใน (internal standard) โดยใช้แมนนิทอลเป็นสารมาตรฐานภายใน การวิเคราะห์น้ำตาลในสารตัวอย่างใช้ค่า Retention time และการตรวจสเปคตรัมที่ตรงกับน้ำตาลมาตรฐาน ซึ่งสเปคตรัม เทียบจาก Library ของ Wiley7n.l การวิเคราะห์จะใช้พื้นที่ใต้กราฟในการคำนวณหาปริมาณน้ำตาล

การคำนวณค่าน้ำตาลเป็นอัตราส่วนโมลาร์ของน้ำตาลแต่ละชนิดเทียบกับน้ำตาลแมนโนสจากสาหร่ายที่เก็บจากธรรมชาติ สกัดด้วยน้ำร้อน แสดงดังตารางที่ 3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS Version 11 วิธี Duncan' s Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่านัยสำคัญ เท่ากับ 0.05

สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายเห็ดลาบที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารแข็งสูตร BGA กับ BG-11 ทั้งที่มีและไม่มีไนโตรเจน จากอาหารเหลว BGA กับ BG-11 และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BGA พบว่าให้องค์ประกอบน้ำตาล 11 ชนิด ได้แก่ ฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค อะราบิโนส และแรมโนส นั้นมีความแตกต่างจากการศึกษาของ Huang และคณะ (1998) ที่พบว่า *N. commune* ที่เก็บจากธรรมชาติมีองค์ประกอบน้ำตาลเพียง 4 ชนิด คือไซโลส แมนโนส กาแลคโตส และกลูโคส ส่วนสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงทั้งที่มีไนโตรเจนและไม่มีไนโตรเจน ให้องค์ประกอบน้ำตาล 8 ชนิด ได้แก่ ฟูโคส ไซโลส แมนโนส กาแลคโตส กลูโคส กรดกลูคิวโนนิค อะราบิโนสและแรมโนส ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจากสูตรที่มีไนโตรเจน (EPS) พบว่ามีน้ำตาล ฟูโคส ไซโลส แมนโนส กาแลคโตส กลูโคส กรดกลูคิวโนนิค และอะราบิโนส ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจากสูตรที่ไม่มีการเติมไนโตรเจน (EPS-N) พบน้ำตาลไซโลส แมนโนส กาแลคโตส กลูโคส และอะราบิโนส สาหร่าย *N. flagelliforme* ที่เก็บจากธรรมชาติ พบน้ำตาลไซโลส แมนโนส กาแลคโตส กลูโคส และอะราบิโนส ส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีและไม่มีไนโตรเจน พบแมนโนส กาแลคโตส กลูโคส และกรดกลูคิวโรนิค เหมือนกัน พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์จากสูตรที่มีและไม่มีไนโตรเจน พบแมนโนส กาแลคโตส และกลูโคส เหมือนกัน แต่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์จากสูตรที่มีไนโตรเจน จะพบไซโลส และกรดกลูคิวโรนิคอีกด้วย ส่วน *N. sphaeroides* ทั้งจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงจะพบไซโลส แมนโนส กาแลคโตส และกลูโคส เหมือนกัน แต่จากการเพาะเลี้ยงนั้นยังพบ แรมโนส และฟรุคโตส ด้วย

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

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

Fischer และคณะ (1997) และ Flaibani และคณะ (1989) ศึกษา *N. insulare* 54.79 *N. calcicola* 79WA01 และ *N.commune* UTEX584 พบน้ำตาลอะราบิโนส ฟูโคส กาแลคโตส กลูโคส แมนโนส แรมโนส ไซโลส กรดกาแลค-ทิวโรนิค กรดกลูคิวโรนิค แต่ไม่พบไรโบส

Gantar และคณะ (1995) ศึกษา *Nostoc* sp. 221 พบน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ ฟูโคส กลูโคส แมนโนส และกรดกลูคิวโรนิค

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

Moore และ Tischer (1964) ศึกษา *Nostoc* sp. พบน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ อะราบิโนส ฟูโคส กลูโคส และกรดกลูคิวโรนิค เมื่อเทียบผลการศึกษาที่ผ่านมากับผลการศึกษาในครั้งนี้ สรุปได้ดังตารางที่ 4

บทสรุป

เมื่อนำสาหร่ายเห็ดลาบที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง สาหร่ายสายพันธุ์เดี่ยวเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งซึ่งมีการเจริญเติบโตลักษณะเป็นก้อนวุ้นคล้ายเยลลี และที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร BGA และ BG-11 ซึ่งมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ทรงกลมห่อหุ้มของเหลวหนืดอยู่ภายในกลุ่มเซลล์ มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำร้อน เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ และ EDTA 0.1 โมลาร์ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อนให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดเท่ากับ 53.08 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง พอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ (EPS) จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็งสูตร BGA สกัดด้วยน้ำร้อน ให้พอลิแซ็กคาไรด์สูงถึง 79.48 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง คิดเป็น 1.5 เท่าของกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BGA พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BGA+N สกัดด้วยเอทานอล ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากสุด เท่ากับ 27.54 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BG-11 และ BG-11-N สกัดด้วยน้ำร้อนให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากสุดเท่ากับ 42.62 และ 45.40 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ พอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งมีของเหลวหนืดอยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BGA กับ BG-11 สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากสุด เท่ากับ 35.80 และ 30.08 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ อาหารเพาะเลี้ยงเหลวสูตร BGA กับ BG-11 สกัดด้วยเอทานอล ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 41.74 และ 36.78 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ สำหรับส่วนเฉพาะของเหลวหนืดภายในกลุ่มเซลล์จากอาหารเหลวสูตร BGA กับ BG-11 สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 20.88 และ 18.57 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ

จากการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติ ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายที่เก็บจากธรรมชาติ สกัดด้วยน้ำร้อน เอทานอล 80 เปอร์เซนต์ และ EDTA 0.1 โมลาร์ ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ใกล้เคียงกัน กลุ่มเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็งสูตร BGA ที่ไม่มีการเติมไนโตรเจน จะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำร้อนในปริมาณที่มากกว่าสูตรอาหาร BGA+N ที่มีการเติมไนโตรเจน ส่วนกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BG-11-N ไม่มีการเติมไนโตรเจน และสูตร BG-11 มีการเติมไนโตรเจน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใกล้เคียงกัน

การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร BGA BG-11 BG-11-N และจากกลุ่มเซลล์ห่อหุ้มรวมทั้งมีของเหลวหนืดอยู่ภายในจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารเหลวสูตร BGA กับ BG-11 ที่สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล และ EDTA ยกเว้นกลุ่มเซลล์จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BGA+N ที่สกัดด้วยเอทานอล ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อน การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตร BGA ที่สกัดด้วยน้ำร้อน ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร BG-11

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

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลจากพอลิแซ็กคาไรด์จากแหล่งเพาะเลี้ยงต่างๆ นั้นมีองค์ประกอบของน้ำตาลถึง 11 ชนิด แสดงถึงลักษณะของโครงสร้างที่มีความซับซ้อน ดังนั้นควรมีการศึกษามวลโมเลกุลของพอลิแซ็ก-คาไรด์ เพื่อใช้ในการประกอบกับโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์และควรมีการศึกษาคุณสมบัติด้านความหนืด สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ทำให้เกิดอิมัลชัน เกิดรูปเจลที่มีความยืดหยุ่น เกิดความหนืดของสารละลาย

อุตสาหกรรมการเกษตร ทำให้เกิดโครงสร้างดินที่ดีจากการรวมตัวของอนุภาคเม็ดดิน อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ช่วยให้การจับตัวของแป้งเสถียรขึ้น อุตสาหกรรมปิโตรเลียม ใช้ดันน้ำมันให้ขึ้นจากพื้นใต้ดิน เป็นต้น นอกจากนี้สาหร่ายเห็ดลาบมีคุณสมบัติในการปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์ สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ง่าย โดยไม่ต้องทำให้เซลล์แตก จึงเป็นการประหยัดต้นทุนการผลิต

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_646002

เอกสารอ้างอิง

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

De Philippis, R., C. Faraloni, M.C. Margheri, C. Sili, M. Herdman and M. Vincenzini. 2000. Morphological and biochemical characterization of the exocellular investments of polysaccharide-producing *Nostoc* from the Pasteur Culture Collection. *World J. Microbiol & Biotechnol.* 16: 655-661.

De Philippis, R., C. Sili and M. Vincenzini. 1996. Response of an exopolysaccharide-producing heterocystous cyanobacterium *Anabaena cylindrical*. *Plant physiol*. 80: 698-701.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Huang, A., Y. Liu, B.S. Paulsen and D. Klaveness. 1998. Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with differennt colony morphologies: comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharide from field colonies and suspension cultures. *J. Phycol*. 34: 962-968.

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

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

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

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

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

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

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

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

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