รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Nostoc commune* เพื่อเป็นอาหารปลอดภัยโดยระบบอัจฉริยะ

The cultivating *Nostoc commune* algae to food safety by intelligent system

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2559

จำนวน 287,000 บาท

หัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชลินดา อริยเดช

ผู้ร่วมโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ จตุรงค์ล้ำเลิศ

รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา แดงปรก

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

1 /มีค. /2560

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Nostoc commune* เพื่อเป็นอาหารปลอดภัยโดยระบบอัจฉริยะ(The cultivating *Nostoc commune* algae to food safety by intelligent system) ซึ่งได้ดำเนินการสำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี ๒๕๕๙

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ จตุรงค์ล้ำเลิศ รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา แดงปรก และนางสาว จิตตนันท์ แก้วมณีสุข ที่มีส่วนร่วมในการดำเนินการวิจัยของโครงการนี้

ผู้วิจัย

สารบัญ

สารบัญตาราง

สารบัญภาพ

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Nostoc commune* เพื่อเป็นอาหารปลอดภัยโดยระบบอัจฉริยะ

The cultivating *Nostoc commune* algae to food safety by intelligent system

ชลินดา อริยเดช, สมเกียรติ จตุรงค์ล้ำเลิศ และ วิจิตรา แดงปรก

Chalinda Ariyadet[1], Somkiat Jaturonglumlert [2], Wichittra Daengprok [2]

[1]หลักสูตรสหวิทยาการเกษตร คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 50290

[2]วิศวกรรมอาหาร คณะวิศกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 50290

บทคัดย่อ

สาหร่าย *Nostoc commune* จัดเป็นอาหารโภชนาการสูง มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ซึ่งเป็นสารอาหารสำคัญในการเจริญของสาหร่าย มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ เช่น โปรตีน 20.84 วิตามิน บี1 0.43 กรัม แคลเซียม 1.54 เหล็ก 0.37 วิตามิน เอ 21.40 กรัมต่อ 100 กรัม และกรดอะมิโนจำเป็น 17 ชนิด โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Nostoc commune* ในระบบปิด โดยการเลือกใช้อาหารปรับปรุง BG11 (BlueGreen Medium) ของ Stanier (1971) และเติมคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ด้วยแสง และควบคุมค่า ความเป็นกรดเบสด้วยโซเดียมคลอไรด์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ สารแอลจีเนต 0.25% ใช้เติมเพื่อเพิ่มปริมาณเม็ดสี ไฟโคไซยานิน และ ไฟโคอีลิกตริน รวมถึงมีการควบคุมการให้แสง โดยใช้แสงสีขาวความเข้ม 90 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที แสงสีแดง 10 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าน้ำหนักแห้ง ไฟโคไซยานิน และโปรตีนในสภาวะแสงสีแดงมีค่าสูงกว่าในสภาวะแสงสีขาว โดยค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายภายใต้สภาวะการเลี้ยงในแสงสีแดงมีค่า 140 ไมโครกรัมต่อวันต่ออาหาร 100 ลิตร ค่าไฟโคไซยานิน มีค่า 2.8±0.03% และ 2.5±0.02% ค่าโปรตีนมีค่า 30.8±12.87 และ 29.43±12.95 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง การปนเปื้อนของสาหร่ายชนิดอื่นและจุลินทรีย์ลดลงภายใต้สภาวะแสงสีแดง ดังนั้นสามารถใช้เป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Nostoc commune* ในสภาวะแสงสีแดงเพื่อการค้าได้

คำสำคัญ: *Nostoc commune* สาหร่าย อาหารปลอดภัย ระบบอัจฉริยะ

Abstract

Abstract—*Nostoc commune* algae could be used for high value food. This algae is a nitrogen fixing ,so it's have high nutritional value, such as 20.84 gram / 100 g of protein, 0.43 grams of vitamin B1, 1.54 grams of calcium, 0.37 iron, and 21.40 micrograms / 100g of vitamin A. and 17 essential amino acids. This research aims to develop a technique for *Nostoc commune* production under laboratory conditions. Media was using modified BG11 (BlueGreen Medium) Stanier (1971) and CO_2 was used to increase the source for photosynthesis and pH sensor was to adjust pH of the optimum algae growth condition using NaCl and NaOH. Alginate 0.25% was filled in media for increased Phycocycanin and Phycoerythrin. Coincide with controlling the light source by use white light (90 $umol.M^{-2}.S^{-1}$) and red light (10 $umol.M^{-2}.S^{-1}$). Red light induced the higher concentration of Yeild, Phycocyanin and Protein. The resulted was shown low contamination of others algae and protozoa from the effects of pH control. Dry weight of *Nostoc commune* under red light condition have 140 µg/day/100 liter media and low contaminate of others algae under the red light condition. The Phycocyanin was 2.8±0.03% and 2.5±0.02%, the Protein was 30.8±12.87 and 29.43±12.95 mg/g.Dry weight in Red light and White light condition respectively. Which could be confirm that it clean for making safety food production. It could be conclusion that the controlling the factors for cultivation have the results of the high quality of production of *Nostoc commune*. This mean to have the idea for intelligent system to culture *Nostoc commune* at the commercial level.

Keywords— *Nostoc commune*, algae, food safety, intelligent system

คำนำ

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางวิจัยสามารถสร้างองค์ความรู้และการนำผลไปใช้ประโยชน์ได้จริงมากมาย ด้านอาหารเป็นยุทธศาสตร์ที่ได้รับการพัฒนามาก สาหร่ายเป็นตัวเด่นที่ได้รับความสนใจจากองค์กรอย่างหลากหลาย ทั้งด้านพลังงานทดแทน เช่น *Botryococus, Chlorella, Spirogyra และ Spirulina* การเกษตร เช่น ด้านปุ๋ยและการประมง ด้านสิ่งแวดล้อม ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำและอากาศ เช่น สาหร่ายไส้ไก่ (*Ulva*) จนถึงความสวยงาม ด้านครีมบำรุงผิวและวัสดุเจลหน้า เช่น *Spirogyra* หรือ สาหร่ายเตา ด้านอาหาร ใช้ในการรับประทานสดและการแปรรูป เช่น เป็นอาหารว่างที่นิยมบริโภค มีทั้งที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากจีน ญี่ปุ่น และเกาหลี ทั้งสาหร่ายทะเลและสาหร่ายน้ำจืด สาหร่ายสีน้ำตาล (*Laminaria*) และสาหร่ายสีแดง (*Porphyra*) หรือที่นิยมเรียกว่า จีฉ่าย มาทำอาหารพวกแกงจืด ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ พบว่า สาหร่ายทะเลเป็นแหล่งที่ดีของโปรตีน และไอโอดีน รวมถึงมีใยอาหารสูงด้วย สำหรับสาหร่ายน้ำจืดนิยมนำมาอัดเม็ดบรรจุขวด มีราคาค่อนข้างแพง สารอาหารที่เด่นในสาหร่ายน้ำจืด คือ โปรตีน วิตามิน เกลือแร่ โดยเฉพาะเบต้าแคโรทีน แต่สาหร่ายน้ำจืดจะไม่เป็นแหล่งของไอโอดีน (นุชนาถ รังคดิลกและคณะ, 2555) โดยสามารถนำมาใช้โดยตรง การสกัด และแปรรูป ซึ่งได้มาจากธรรมชาติและการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมปัจจัย สำหรับสาหร่าย *Nostoc commune* สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทั้งการเกษตรและเป็นอาหารคุณค่าสูง ด้านการเกษตรเป็นแหล่งเพิ่มไนโตรเจนกับดิน เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้ตรึงไนโตรเจนได้ ด้านการใช้เป็นอาหาร ก็เป็นที่นิยมแพร่หลาย เพราะมีคุณค่าทางอาหารสูง มีโปรตีน (กรัม/100 กรัม) 20.84 กรัม วิตามินบี 1 0.43, แคลเซียม 1.54, เหล็ก 0.37 มีวิตามินเอจากการเพาะเลี้ยงสูงถึง 21.40 ไมโครกรัม/100 กรัม ซึ่งมากกว่าในธรรมชาติมาก (2.31) กรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) ถึง 17 ชนิด (อาภารัตน์ มหาขันธ์และคณะ. 2548) มีการเพาะเลี้ยงทั้งในระบบปิดและระบบเปิด การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Nostoc commune* เพื่อเป็นอาหารปลอดภัยโดยระบบอัจฉริยะ จึงเป็นงานวิจัยที่คำนึงถึงความสามารถในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิด เพื่อความปลอดภัยจากการปนเปื้อนและมีระบบควบคุมการให้ผลผลิต การควบคุมปัจจัยการผลิตอย่างมีประสิทธิภาพ หลีกเลี่ยงภัยธรรมชาติและกำหนดผลผลิตตามต้องการ ผลผลิตที่ได้มีมาตรฐานสูงและปลอดภัย สามารถพัฒนาสู่อุตสาหกรรมและการแข่งขันในระดับนานาชาติได้ อีกทั้งเป็นระบบที่จะรองรับการเลี้ยงสาหร่ายชนิดอื่นๆที่มีความต้องการในระดับท้องถิ่นและอุตสาหกรรมได้ ถึงแม้ต้นทุนการผลิตจะสูงกว่าระบบเปิด แต่มีข้อดีในด้านการหลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงจากผลกระทบจากธรรมชาติ เช่น พายุ ฝน การปนเปื้อนต่าง ๆ นอกจากนี้สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งในธรรมชาติมีเพียงฤดูกาลเดียว

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Nostoc commune* ในระบบควบคุมปัจจัยที่มีประสิทธิภาพ
2) เพื่อการผลิตสาหร่าย *Nostoc commune* ที่เป็นอาหารปลอดภัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

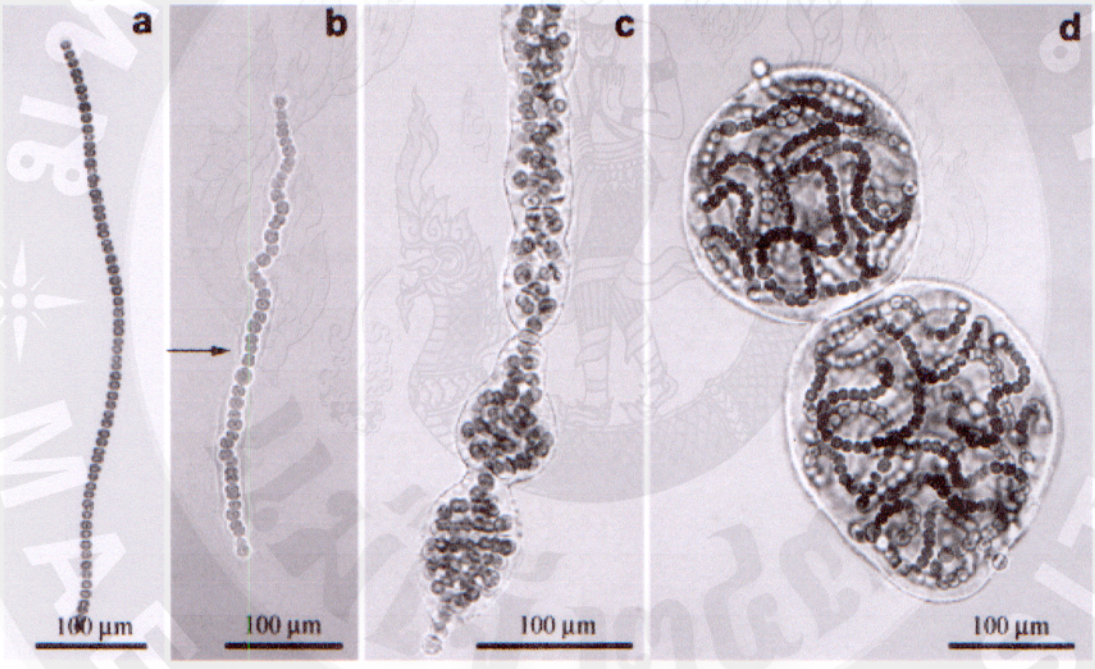
1) สามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีคุณภาพสูงและมีมาตรฐานปลอดภัย
2) ได้ระบบการเพราะเลี้ยงที่สามารถต่อยอดเชิงอุตสาหกรรม
3) สามารถเผยแพร่ ตีพิมพ์และจดสิทธิบัตร ในรูปการเพาะเลี้ยง ระบบการจัดการ และผลิตภัณฑ์

การตรวจเอกสาร

1) สาหร่าย *Nostoc commune*

จัดเป็น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green alga, cyanobacterium) มีลักษณะเป็นโคโลนีและมีเมือกห่อหุ้มขณะยังอ่อน (colony mucilaginous or gelatinous globuse or amorphus when young.) เมื่อแก่จะมีลักษณะกลม (Globus or hollow) เซลล์กว้าง 4.5-6 µm. Cell short คล้ายถังเบียร์ (barrel –shape). (Desikachary.1959) (ภาพที่ 1) ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (N_2-fixation) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nostoc commune* Vaucher แต่เนื่องจากสาหร่ายนี้มีลักษณะเป็นแผ่นวุ้นแบนบางคล้ายเห็ดหูหนูสีเขียวที่ขึ้นบนดิน และชาวบ้านนิยมเก็บไปทำลาบ จึงได้ชื่อประจำท้องถิ่นว่า "เห็ดลาบ" นอสตอค (*Nostoc commune* ; "ไข่หิน", "ดอกหิน", "เห็ดลาบ" (ไทย), "Koxianmi" (จีน) "Ishikurage" (ญี่ปุ่น); *N. flagelliforme*; "Fat tsai", "Facai", "Shi" (จีน) ; *Nostoc* spp., "Star shot", "Star jelly", "Witches' butter", "Fairies' butter" (ยุโรป) เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีการเจริญเติบโตแบบเป็นเส้นสายมีเมือกห่อหุ้ม บางชนิดดูคล้ายก้อนเยลลี่ ชนิดที่นิยมบริโภคมาก คือ *Nostoc commune* มีการบริโภคในหลายประเทศทั่วโลก เช่น โบลิเวีย, เอควาดอร์, ฟีจิ, อินโดนีเซีย, ญี่ปุ่น, เมกซิโก, มองโกเลีย และจีน โดยชาวจีนนิยมนำมาทำเป็นขนมหวาน ส่วน *Nostoc flagelliforme* เป็นอาหารที่มีราคาแพงซึ่งชาวจีนนิยมบริโภคเพื่อความเป็นสิริมงคลในวันขึ้นปีใหม่ สำหรับประเทศไทยในอดีตเคยมีการบริโภคนอสตอคโดยรู้จักกันในชื่อ "ไข่หิน" หรือ "ดอกหิน" แล้ว ยังมีสาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเยลลี่คล้ายนอสตอค แต่เมื่อดูใต้กล้องจุลทรรศน์จะ

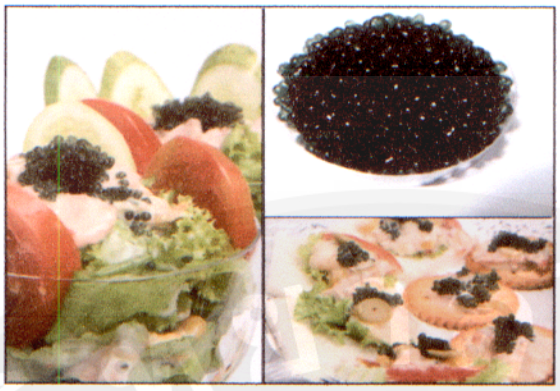
พบว่าเป็นเส้นสายที่มีการแตกแขนง ชาวบ้านในจังหวัดน่านนิยมนำมาบริโภคเพื่อแก้อาการร้อนใน โดยเรียกสาหร่ายชนิดนี้ว่า “ลอน” (*Nostochopsis* sp.) ส่วน “เห็ดลาบ” เป็นสาหร่าย *N. commune* ที่บริโภคได้ของประเทศที่เพิ่งมีการเปิดตัวโดยพบในเขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพันซึ่งเป็นป่าที่มีระบบนิเวศที่มีลักษณะเฉพาะตัวของอำเภอนาเชือก จังหวัดมหาสารคาม โดยการสำรวจของ ดร. อุษา กลิ่นหอม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พบว่าประชาชนในพื้นที่เก็บเห็ดลาบซึ่งเจริญเติบโตได้รวดเร็วในช่วงฤดูฝนมาบริโภค ส่วนชื่อ “เห็ดลาบ” นั้น ได้มาจากลักษณะของสาหร่ายที่เป็นแผ่นวุ้นสีเขียวคล้ายเห็ดหูหนู และการที่ชาวบ้านนิยมนำมาบริโภคโดยการทำเป็นลาบ วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารจากสาหร่าย “เห็ดลาบ” (*Nostoc commune*, Cyanophyta) (อาภารัตน์ มหาขันธ์และคณะ, 2548) (ภาพที่ 2)



a,b : ระยะที่เป็นเส้นสาย (Filament) c,d : ระยะเริ่มเป็นโคโลนี (Aseriated colonies)

ภาพที่ **1** *Nostoc commune*

ที่มา: Zhongyang et al., 2008



ภาพที่ **2** อาหารสาหร่าย *Nostoc commune*
ที่มา: อาภารัตน์ มหาขันธ์และคณะ, 2548

อนุกรมวิธาน สาหร่าย *Nostoc commune*

DIVISION : Cyanophyta
CLASS : Cyanophyceae
ORDER : Nostocales
FAMILY : Nostocaceae
GENUS : *Nostoc*
SPICIES : *Nostoc commune*

(Desikachary.1959)

2) เทคโนโลยีด้านการเพาะเลี้ยง (Cultivation Technology)

1. อาหารเพาะเลี้ยง Stock (Culture media)

เพื่อเป็นคลังรักษาสายพันธุ์ปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลง BG11 (BlueGreen Medium) Stanier (1971) ที่ใช้เลี้ยง Freshwater algae and protozoa และเติมสาร alginate เพื่อเพิ่มปริมาณ Phycocycanin and Phycoerythrin ในสาหร่าย (Pandey and Pandey. 2008)

2. อาหารเพาะเลี้ยงสร้างมวล (Mass culture media)

ใช้สูตรอาหาร BG-11 ดัดแปลง โดยมีส่วนประกอบของ $K_2HPO_4.3H_2O$ 0.020 กรัม/ลิตร, $MgSO_4.7H_2O$ 0.075 กรัม/ลิตร, $CaCl_2$ 0.036 กรัม/ลิตร, กรดซิติค 0.006 กรัม/ลิตร, เฟอริกแอมโมเนียมซิเตท 0.006 กรัม/ลิตร, EDTA 0.001 กรัม/ลิตร, Na_2CO_3 0.020 กรัม/ลิตร, NaCl 0.200 กรัม/ลิตร, ยูเรีย 0.200 กรัม/ลิตร, และ Trace metal mix A5 ตามสูตรเดิม ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.5 และค่าความเข้มแสงเท่ากับ 20 ไมโครไอสไตน์/ตารางเมตร/วินาที ส่งเสริมให้

สาหร่ายเห็ดลาบเจริญเติบโตได้ดี โดยที่มีชีวมวลเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 7.91 เท่าหลังจากทำการเพาะเลี้ยง 20 วัน (เจษฎา ทิพยะสุขศรีและคณะ. 2555)

3. ปัจจัยควบคุม

การเลี้ยงในระบบจำเป็นต้องให้แสงเทียมหรือแสงจากหลอดไฟ เนื่องจากสาหร่ายดำรงชีพด้วยการสร้างอาหารเองจากการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยชนิดของแสงและความเข้มเป็นปัจจัยที่ควบคุมการทำงานของเม็ดสี ซึ่งสาหร่ายหลายชนิดมีเม็ดสีหลายชนิดและรับความยาวคลื่นแสงได้แตกต่างกัน และส่งผลถึงการสร้างองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายได้แตกต่างกัน ความเข้มแสงจะเกี่ยวข้องกับพลังงานที่ได้รับ จะส่งผลต่อปริมาณพลังงานที่ใช้ในกระบวนการของเซลล์สาหร่าย ด้านอุณหภูมิ เป็นปัจจัยถึงสภาวะการทำงานหรือการดำรงชีพที่เหมาะสมกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีพในน้ำ จะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ เช่นเดียวกับค่าความเป็นกรดเบส

3) เทคโนโลยีด้านการเก็บเกี่ยว (Cutting-edge harvesting Technology)

เก็บเกี่ยวผลผลิตโดยสังเกตความหนาแน่นของสาหร่าย ตากแห้งและอบเพื่อควบคุมเชื้อปนเปื้อน การติดตามการเจริญในสาหร่ายสามารถวัดได้หลายรูปแบบ การวัดด้วย UV Spectrophotometer ที่ 560 nm. ประเมินค่ามวลชีวภาพได้ (Venkataraman, 1983) หรือนำไปหมุนเหวี่ยง 5000 rpm. 10 นาที รินสารละลายแล้วอบแห้งที่ 50°C - 60°C แล้วชั่งน้ำหนัก หามวล

มวลชีวภาพ(mg/l) = นำหนักก่อนอบ – น้ำหนักหลังอบ.

ปกติเก็บผลผลิตที่อายุ 25 วัน หรือ กรองผ่านถุงกรองและใช้น้ำชะล้างสารละลาย ผลผลิตควรเก็บในถุงพลาสติกซิปที่อุณหภูมิห้อง หรือ การเก็บโดยใช้ คลื่นความถี่ Ultrasonicที่ 80 kHz. (Kunshan Ultrasonic Inc. KQ80-TDE) 5 วินาที Ultrasonic power 48 W. pH 8-9 กรองแยกได้ 89-96% หรือ 2.0 mg/l (Zhang et al. 2006)

4) เทคโนโลยีสารสังเคราะห์ (Chemical Technology)

1. การสกัด Phycocyanin (Phycocyanin extraction technologies)

ใช้สารเคมีสกัด แบบของ Boussiba and Richmond.(1979) พบปริมาณ phycocyanin ในสาหร่าย *Spirulina platensis* ถูกควบคุมโดยปัจจัยแวดล้อมบางประการ (Colla, et al., 2007) พบว่าแสงสีแดงมีผลทำให้ปริมาณ phycocyanin ลดลง 16% แต่ความบริสุทธิ์กลับเพิ่มขึ้นถึง 33% เมื่อเทียบแสงธรรมดาสีขาว (Alfredo walter, et al., 2011) โดยใช้วิธีดังกล่าวกับสาหร่าย *Nostoc commune* phycocyanin ยังมีผลการควบคุม plaque ในหลอดเลือดแดง (arteries) ไม่เป็นพิษและมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ไวรัส สร้างภูมิคุ้มกันและยังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพ ปัจจัยแวดล้อมบางประการเช่นความร้อนและความเค็มมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของสาหร่ายเกลียวทอง (Ali and Saleh. 2012) มูลค่าสารสี phycocyanin ขึ้นกับความบริสุทธิ์ ในระดับ food

grade ราคาประมาณ 0.13 ดอลลาร์สหรัฐต่อกรัม ถ้าระดับ analytical grade จะมีราคาสูงถึง 25 ดอลลาร์สหรัฐต่อกรัม ทั้งนี้ต้องอาศัยกระบวนการพัฒนาการเลี้ยง การสกัด การคงรูปของสารประกอบ (Borowitzka. 1999)

2. การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Lowry's Method (Lowry et al., 1951)

ใช้ *Nostoc commune* 1 ml. ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ เติม 0.1N NaOH ให้ความร้อน 100°C ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ 1ml สด เติม สารประกอบ reagent (2% Na_2CO_3, 1% $CuSO_4$, and 2% Sodium potassium tartrate 1 ml. ทิ้งไว้ 10 นาที เติม folin เขย่า และทิ้งไว้ 30-60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm. เปรียบกับค่ามาตรฐาน.

5) เทคโนโลยีด้านการวิเคราะห์ผล (Analytical Technology)

ศึกษาเปรียบเทียบในชุดทดลอง

1. เปรียบเทียบปริมาณสาร Phycocyanin จุลินทรีย์และโปรตีนในการเพาะเลี้ยงในระบบแสงสีขาวและแสงสีแดง

2. เปรียบเทียบปริมาณผลผลิต ในการเพาะเลี้ยงในระบบแสงสีขาวและแสงสีแดง

อุปกรณ์และวิธีการ

ตารางที่ 1 อุปกรณ์และสารเคมี

หัวข้อ	สารเคมีและอุปกรณ์	วิธีการ
1. เชื้อ *Nostoc commune*	สาหร่าย ใช้สายพันธุ์ *Nostoc commune* Vauch. TISTR8160	สั่งซื้อจาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย วว.
2. อาหารเพาะเลี้ยง สารอาหารเลี้ยงStock	(1) $NaNO_3$ (2) K_2HPO_4 (3) $MgSO_4.7H_2O$ 4) $CaCl_2.2H_2O$ (5) Citric acid (6) Ammonium ferric citrate green (7) $EDTANa_2$ (8) Na_2CO_3 (9) Trace metal solution: H_3BO_3 MnCl2.$4H_2O$ $ZnSO_4.7H_2O$ $Na_2MoO_4.2H_2O$ $CuSO_4.5H_2O$ $Co(NO_3)_2.6H_2O$	สูตรอาหารดัดแปลง BG11 (BlueGreen Medium) Stanier (1971) และ เจษฎา ทิพยะสุขศรีและคณะ. (2555)
สารอาหารสร้างมวล	1) $K_2HPO_4.3H_2O$ 2) $MgSO_4.7H_2O$ 3) $CaCl_2$ 4) กรดซิติค 5) เฟอริกแอมโมเนียมซิเตท 6) EDTA 7) Na_2CO_3	

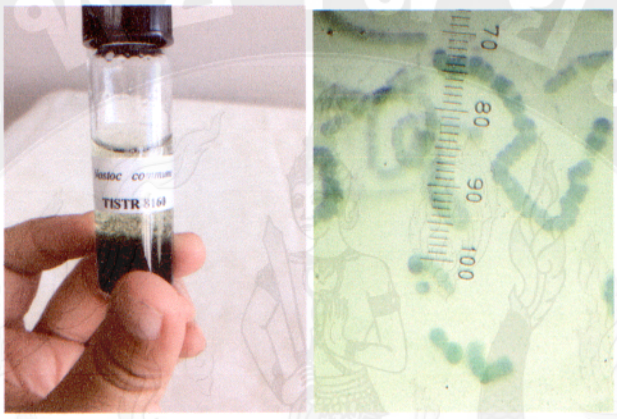
หัวข้อ	สารเคมีและอุปกรณ์	วิธีการ
3. อุปกรณ์เพาะเลี้ยง	1. ชุดให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ NaCl 2. Trace metal mix A5	
	3. ไฟ ฟลูออเรสเซน	
	4. ไฟ LED	
	5. ชุดปั๊มให้อากาศและหมุนเวียนน้ำ	
	6. เครื่องวัดอุณหภูมิในน้ำแบบ Digital	
	7. ชุดกรองปั๊มอากาศมือถือ	
	8. กระดาษกรอง GF/C	
	9. Flask ขนาด 500 ml. 1 lit	
	10. หม้อนึ่งความดัน	
	11. Plankton net	
	12. ถังไฟเบอร์กลาสขนาด 250 ลิตร	
	13. ตู้อบลมร้อน	
	14. Spectrophotometer	
	15. EC meter	
	16. pH meter	
	17. กล้องจุลทรรศน์	
	18. สไลด์และกระจกปิดสไลด์	
	19. ปิเปตและหลอดหยด	
	20. Ethanol	
	21. ขวดน้ำกลั่น	
	22. Ultrasonic	
	23. กระดาษฟรอยด์และพลาสติกเคลือบ	
	24. นำกลั่น	

หัวข้อ	สารเคมีและอุปกรณ์	วิธีการ
	25. Timer	
	26. Volumetric flask	
	27. กระบอกตวง	
	28. ถุงพลาสติกซิป	
	29. โกร่งบดยา	
4. การวิเคราะห์ Phycocyanin	1. K_2HPO_4 2. KH_2PO_4	Boussiba and Richmond.(1979)
5. การวิเคราะห์ โปรตีน	1. Na_2CO_3 2. $CuSO_4$ 3. Sodium potassium tartrate	วิธี Lowry's Method (Lowry et al., 1951)
6. ผลิตภัณฑ์อาหารจากสาหร่าย	1. Sodium Alginate 2. $CaCl_2$	Sphaerification
7. วิเคราะห์การปนเปื้อนของBacteria Coliform	1. Plate Count Agar(PCA)	Total plate count and Multiple tube
8. วิเคราะห์การปนเปื้อนของ Total Bacteria	1. Plate Count Agar(PCA)	Total plate count

วิธีการวิจัย

1. สาหร่ายในการเพาะเลี้ยง

สาหร่าย ใช้สายพันธุ์ *Nostoc commune* Vauch. TISTR8160 ราคา 640 บาท ต่อหลอด จำนวน 3 หลอด(ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 สายพันธุ์ *Nostoc commune* Vauch. TISTR8160
ที่มา: ชลินดา อริยเดช 2559 (ภาพ)

2. เทคโนโลยีด้านการเพาะเลี้ยง (Cultivation Technology)

1) อาหารเพาะเลี้ยง Stock

เพื่อเป็นคลังรักษาสายพันธุ์ปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงในภาชนะหลายแบบ เช่น ใน flak ในถ้วย ในอาหารแข็งและอาหารเหลว โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลง BG11 (BlueGreen Medium) Stanier et al. (1971) ที่ใช้เลี้ยง Freshwater algae and protozoa และมีการเปรียบเทียบการเติมสาร alginate 0.25%

สูตรอาหารดัดแปลง BG11 (BlueGreen Medium Stocks)

(1) $NaNO_3$ 15.0 g per litre

(2) K_2HPO_4 2.0 g per 500 ml

(3) $MgSO_4.7H_2O$ 3.75 g per 500 ml

(4) $CaCl_2.2H_2O$ 1.80 g per 500 ml

(5) Citric acid 0.30 g per 500 ml

(6) Ammonium ferric citrate green 0.30 g per 500 ml

(7) $EDTANa_2$ 0.05 g per 500 ml per 500 ml

(8) Na_2CO_3 1.00 g per 500 ml

(9) Trace metal solution: per litre

H_3BO_3 2.86 g

$MnCl_2.4H_2O$ 1.81 g

$ZnSO_4.7H_2O$ 0.22 g

$Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.39 g

$CuSO_4.5H_2O$ 0.08 g

$Co(NO_3)_2.6H_2O$ 0.05 g

การเตรียม Medium per litre นำ stock แต่ละตัวมาผสมและปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร ปรับ pH 7.1 ด้วย 1M NaOH หรือ HCl. อาหารแข็งใช้ เติมวุ้น 15.0 g per litre of Bacteriological Agar (Oxoid L11)*. Autoclave at 15 psi นาน 15 นาที. สัดส่วน stock ที่ใช้คือ

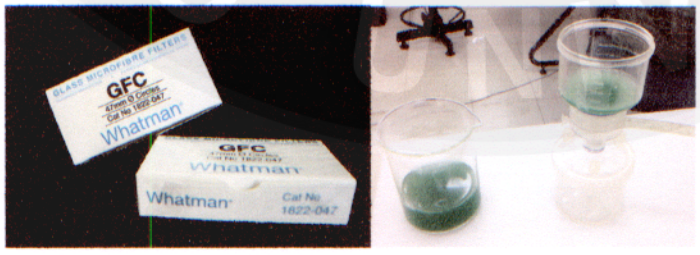
Stock solution 1 100.0 ml

Stock solutions 2- 8 อย่างละ 10.0 ml

Stock solution 9 จำนวน 1.0 ml

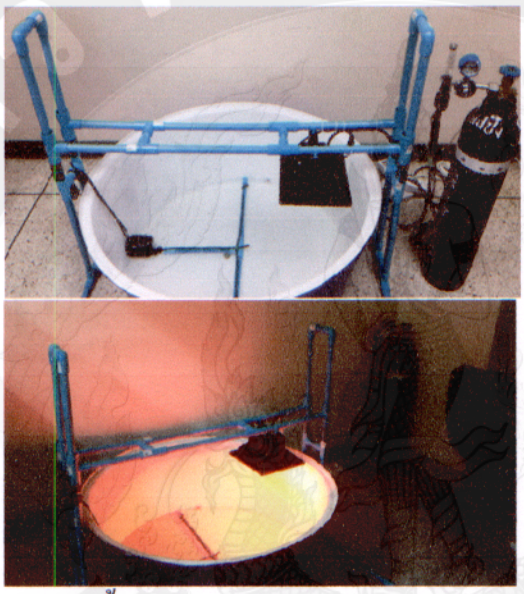
2) อาหารเพาะเลี้ยงสร้างมวล

โดยใช้สูตรอาหาร BG11 ดัดแปลง ในการเลี้ยงเพิ่มมวล โดยการเลี้ยงในระบบปิดในบ่อไฟเบอร์กลาส ขนาด 280 ลิตร ติดตั้งเครื่องทำน้ำวนในบ่อสร้างมวลโดยระบบการเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์และการให้แสงสีแดงจากพลังงานแสงอาทิตย์ (Solar Cell) พร้อมอุปกรณ์ วัดสารอาหาร pH ความชื้น และอุณหภูมิ การเก็บเกี่ยวและสาหร่ายกลม ใช้ตะแกรงร่อนขนาดช่องตามกำหนด (ภาพที่ 4)



ชุดกรองสาหร่าย ด้วยกระดาษกรอง GF/C

Timer สำหรับควบเวลาการให้แสงและการหมุนเวียนน้ำ Ultrasonic สำหรับการทดลองการเก็บสาหร่าย



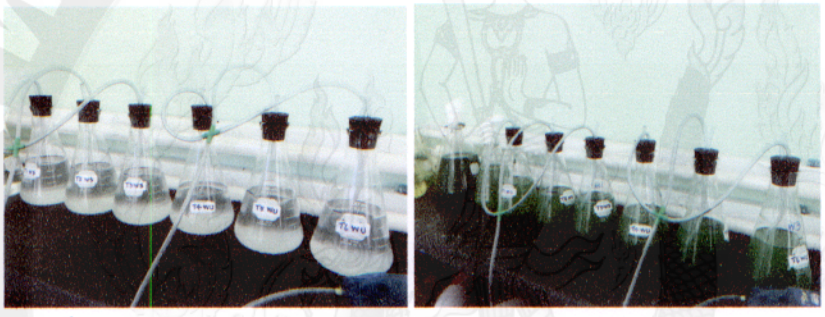
ชุดเพาะเลี้ยงสร้างมวลเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ภาพที่ 4 อุปกรณ์เสริมการเลี้ยง *Nostoc commune*

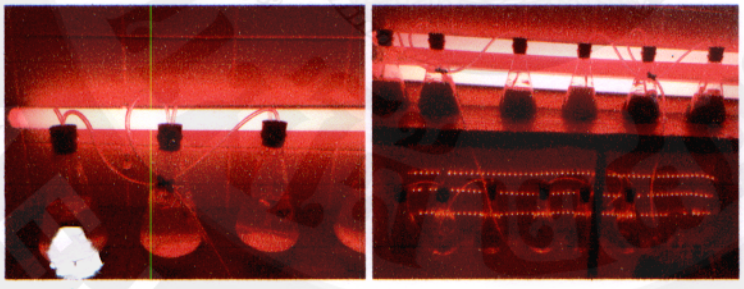
3) แสง แสงให้สลับ 12/12 ด้วยแสงสีขาวและแสงสีแดง โดยไฟ LED และเสริมไฟจากแหล่งพลังงานจากแสงอาทิตย์ในช่วงกลางคืน (Solar cells) โดยจัดชุดทดลองในแสง 2 ประเภท คือ แสงสีขาวและแสงสีแดงในอาหาร 4 ชุดทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 4)

ตารางที่ 2 ชุดการทดลองด้วยอาหารปรับปรุง BG11 ภายใต้สภาวะแสงสีขาวและแสงสีแดง

2 ประเภทแสง (Conditions)	4 การทดลอง (Treatments)	3 ซ้ำ (Duplicates)
White (W) Red (R)	1. BG11 +sodium alginate 0.25%	
	2. BG11	
	3. BG11– N+ sodium alginate 0.25%	
	4. BG11 - N	



ชุดให้แสงสีขาว



ชุดให้แสงสีแดง

ภาพที่ 5 ชุดการทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Nostoc commune* ในขวด 500 ml. ในสภาวะแสงสีขาวและแสงสีแดง

4) **อุณหภูมิ** 25+2 °C (Manigandam.2014)

5) **pH** 8.5-9 (Manigandam.2014)

3. เทคโนโลยีด้านการเก็บเกี่ยว (Cutting-edge harvesting Technology)

การติดตามการเจริญสามารถวัดได้โดยการหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ทำความสะอาดสาหร่ายหลังการกรองผ่านเครื่องกรองด้วยน้ำสะอาด แล้วอบแห้งที่ 50°C - 60°C นาน 2-3 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักทั้งก่อนและหลังอบ

มวลชีวภาพ(mg/l) = นำหนักก่อนอบ – น้ำหนักหลังอบ.

ปกติเก็บผลผลิตที่อายุ 30 วัน กรองผ่านถุงกรองและใช้น้ำชะล้างสารละลาย ผลผลิตควรเก็บในถุงพลาสติกซิปที่อุณหภูมิห้อง หรือ กล่องปิดสนิท

4. เทคโนโลยีสารสังเคราะห์ (Chemical Technology)

1) **การสกัด Phycocyanin (Phycocyanin extraction technologies)**

การสกัด phycocyanin โดยนำสาหร่าย 40 mg. หลังการเพาะเลี้ยง 25 วัน เติม phosphate buffer pH 7 จำนวน 10 ml. ทิ้งไว้ตู้เย็น 24 ชม. Centrifugation ที่ 35000 rpm. 10 °C 5 นาที. phycocyanin จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ใช้ spectrophotometrically ความยาวคลื่นที่ 620 nm ใช้ buffer เป็น Blank คำนวณค่าโดยแทนค่าในสูตร (Boussiba and Richmond.1979)

สูตรคำนวณ

$$\% \text{ pure C-Phycocyanin} = \frac{A620x(10)x(100)}{7.3x(mg.sample)\ x\ (\%dry\ weight)}$$

หมายเหตุ

Where 7.3 is Extraction coefficient of CPC at 620 nm.

3.66 is Extraction coefficient of CCC at 620 nm.

10 เป็นค่าปริมาตรทั้งหมด

100 คือค่าหา %

2) **การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี** Lowry's Method (Lowry et al., 1951)

ใช้ *Nostoc commune* 1 ml. ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ เติม 0.1N NaOH ให้ความร้อน 100°C ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ 1ml สด เติม สารประกอบ reagent (2% Na_2CO_3, 1% $CuSO_4$, and 2% Sodium potassium tartarate 1 ml. ทิ้งไว้ 10 นาที เติม folin เขย่า และทิ้งไว้ 30-60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm. เปรียบกับค่ามาตรฐาน.

3) **การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์**

โดยชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม เติมสารละลายเพปโทน (Peptone) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 225 มิลลิลิตร นำไปตีป่นด้วย เครื่องตีป่นอาหารนาน 2 นาที เจือจางตัวอย่างต่อๆไปจนได้ระดับ ความเจือจางที่ 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ด้วยสารละลายเพปโทนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 ปิเปตต์ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร PDA ใช้แท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อ เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่ว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บ่มจนครบ 5 วัน นับโคโลนีบนจานที่มีจำนวนโคโลนี 10-150 โคโลนี ถ้าไม่มีการเจริญ ให้บ่มต่ออีก 2 วัน รายงานผลเป็นค่า CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เทใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ แล้วเติมสารละลายเพปโทนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 225 มิลลิลิตร นำไปตีป่นด้วย เครื่องตีป่นอาหารนาน 2 นาที เจือจางตัวอย่างต่อ ๆไปจนได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ด้วยสารละลายเพปโทนความเข้มข้นร้อยละ 0.15 ปิเปตต์ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวของอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราและยีสต์ 2 ชนิด ที่มีผิวหน้าแห้ง ได้แก่ Acidified PDA และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดค่า aw 1 ชนิด (กลุ่มที่ได้รับตัวอย่างที่มีน้ำตาลสูงให้ใช้ MY 50 G และกลุ่มที่ได้รับตัวอย่างที่มีเกลือสูงให้ใช้ MY5-12 หรือ MY 10-12) ใช้แท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อ เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่ว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่ต้องคว่ำจาน ไม่ควรซ้อนกันมากกว่า 3 จาน เมื่อบ่มจนครบ 5 วัน นับโคโลนีบนจานที่มีจำนวนโคโลนี 10-150 โคโลนี ถ้าไม่มีการเจริญ ให้บ่มต่ออีก 2 วัน รายงานผลเป็นค่า CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร ถ้าไม่มีโคโลนีใดๆขึ้นเลยให้รายงานว่ามีเชื้อราและยีสต์น้อยกว่า 1 เท่า ของระดับความเจือจางต่ำสุด เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีและสังเกตลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน 2-3 โคโลนี ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด นำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ จากนั้น เขี่ยเชื้อมาลากบนผิวหน้าอาหารในหลอด PDA slant บ่มจนกระทั่งเชื้อเจริญและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อจำแนกชนิดต่อไป

4) **ผลิตภัณฑ์อาหารปลอดภัย**

ทดลองผลิตอาหารสาหร่าย *Nostoc commune* ในรูปของเจลลี่หรือ คาร์เวีย (Caviar)

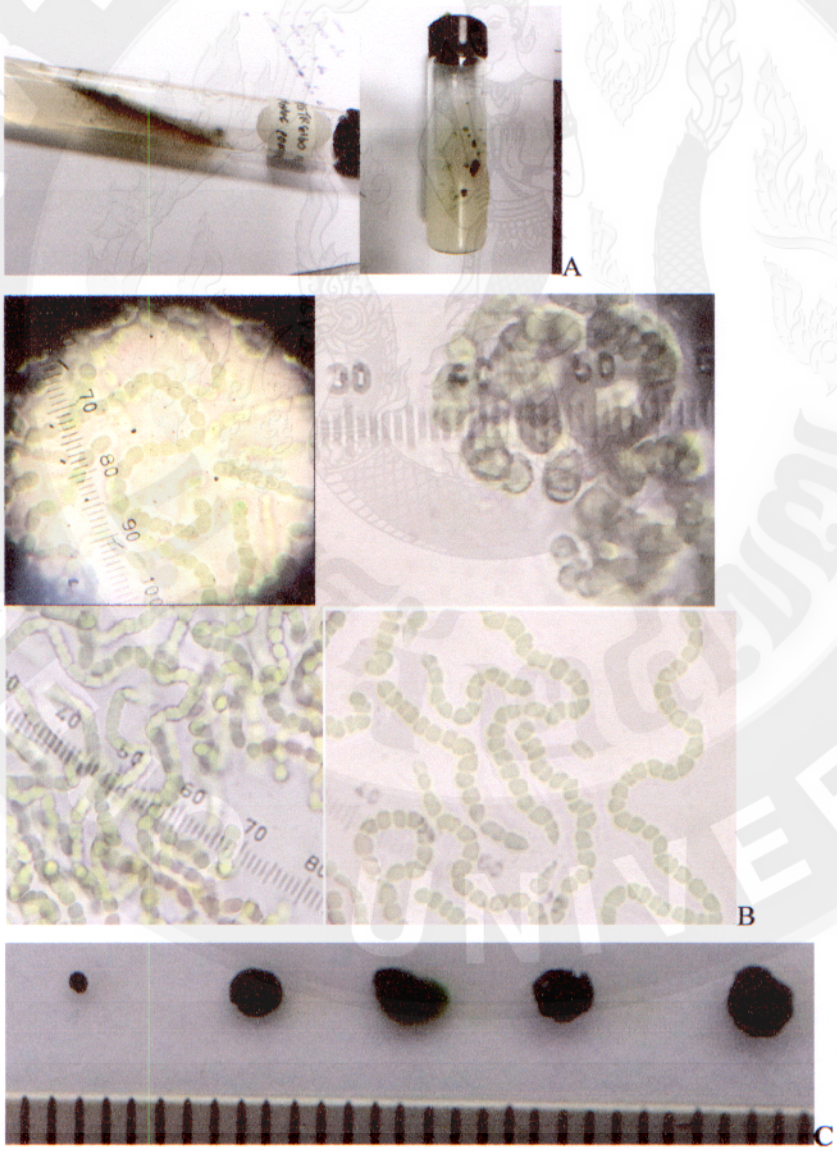
5. เทคโนโลยีด้านการวิเคราะห์ผล (Analytical Technology)

วิเคราะห์ผล ค่าต่างๆจากการทดลองโดยการใช้สูตรคำนวณทางสถิติ แบบ Independent t-test เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย และการเบี่ยงเบนมาตรฐานจากสูตรการคำนวณ

ผลงานวิจัย

1. สาหร่ายในการเพาะเลี้ยง

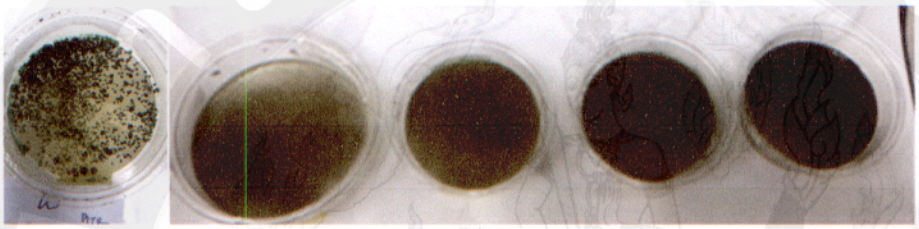
สาหร่าย ใช้สายพันธุ์ *Nostoc commune* Vauch. TISTR8160 ราคา 640 บาท ต่อหลอด จำนวน 3 หลอด ทำการกระตุ้นเชื้อด้วยอาหารปรับปรุง BG11 พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ดีบน พื้นผิวอาหารกึ่งแข็งในหลอดทดลอง ในเวลา 1 เดือน (ภาพที่ 6A) ส่องดูเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X พบว่าเซลล์มีความกว้าง 4.5-6 um. มีชีสห่อหุ้ม ลักษณะเซลล์เป็นรูปถังเบียร์ สีเขียวแกมน้ำเงิน (ภาพที่ 6B) เมื่อเลี้ยงต่อไป เซลล์จะเป็นกลุ่มก้อนกลมในสภาวะอาหารกึ่งแข็ง (ภาพที่ 6C)

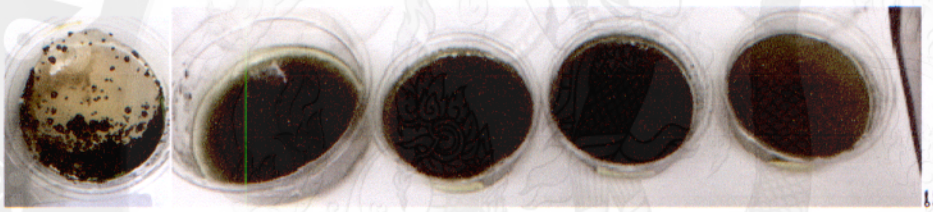


ภาพที่ 6 *Nostoc commune* Vauch. TISTR8160 รูปแบบต่าง ๆ

2. เทคโนโลยีด้านการเพาะเลี้ยง (Cultivation Technology)

ทำการทดลองเลี้ยงในภาชนะหลายแบบ ดังนี้ ถ้วยกลมเล็ก (ภาพที่ 7) และถาดกลม (ภาพที่ 9) ในสภาวะการให้แสงสีเปรียบเทียบการเจริญในแสงสีขาวและแสงสีแดงสาหร่ายระยะแรก ๆจะเป็นเส้นสาย เซลล์กว้าง 4.5-6 μm เมื่อแก่จะฟอร์มโคโลนีและมีขนาดใหญ่ขึ้น ลักษณะรูปร่างขึ้นกับชนิดของอาหารที่เลี้ยงแบบเหลวหรือกึ่งแข็ง ความเร็วของการไหลเวียนของน้ำ ในสภาวะน้ำนิ่งจะมีรูปร่างกลม บนอาหารกึ่งแข็งจะเจริญเป็นแผ่นคุมผิวหน้าอาหารและเป็นเส้นสายในน้ำไหลเวียนและอาหารเหลว (ภาพที่ 6)


แสงสีขาว


แสงสีแดง

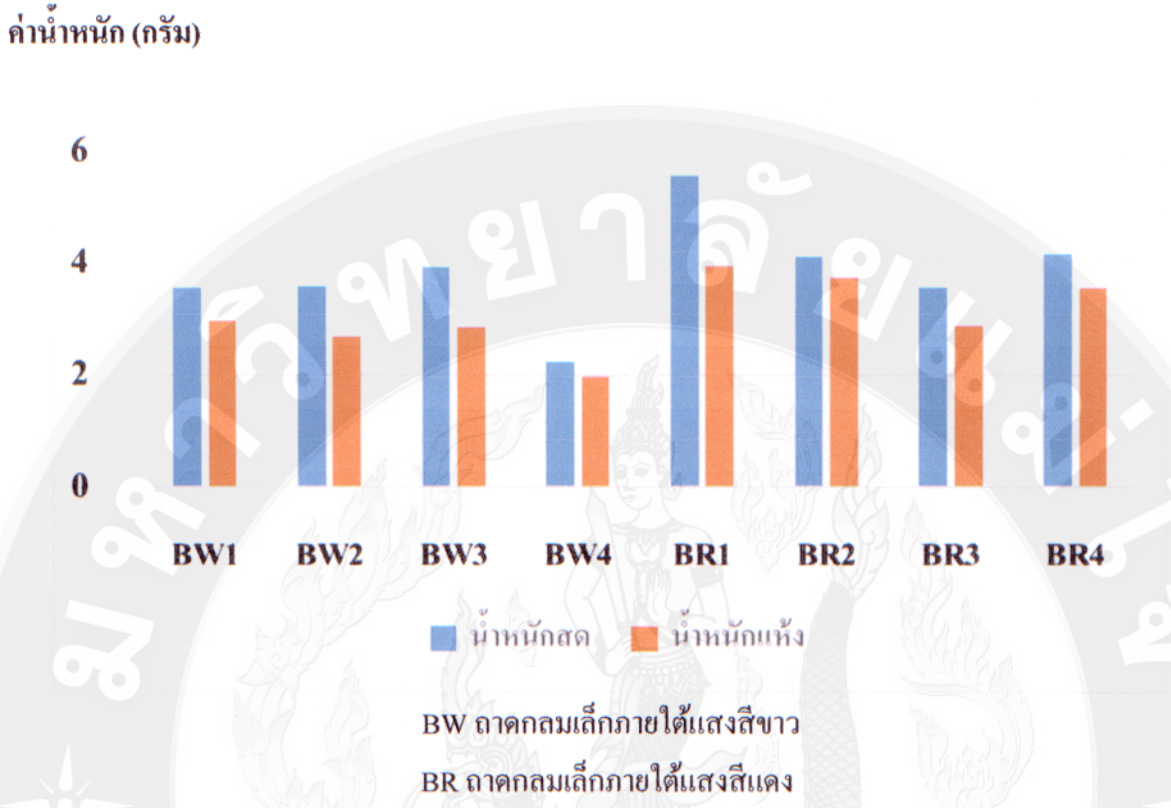
ภาพที่ 7 ทดลองเลี้ยงในภาชนะถาดกลมเล็กในสภาวะการให้แสงสีเปรียบเทียบการเจริญในแสงสีขาวและแสงสีแดง

พบค่าน้ำหนักสดของสาหร่ายในสภาวะแสงสีแดงมีค่าสูงกว่าในสภาวะแสงสีขาวตลอดช่วงการเลี้ยงในทุกการทดลอง (ตารางที่ 3 และภาพที่8)

ตารางที่ 3 แสดงค่าการเจริญของสาหร่าย *Nostoc commune* บนอาหารกึ่งแข็ง ภายใต้แสงสีขาวและแสงสีแดงในถาดกลมเล็ก

ค่ามวล (กรัม)	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง	%น้ำหนักแห้ง	ค่าเฉลี่ย
BW1	3.56	2.98	83.71	
BW2	3.58	2.69	75.14	
BW3	3.92	2.85	72.7	
BW4	2.24	1.98	88.39	**79.99**
BR1	5.57	3.95	70.92	
BR2	4.1	3.73	90.98	
BR3	3.56	2.87	80.62	
BR4	4.15	3.54	85.3	**81.96**

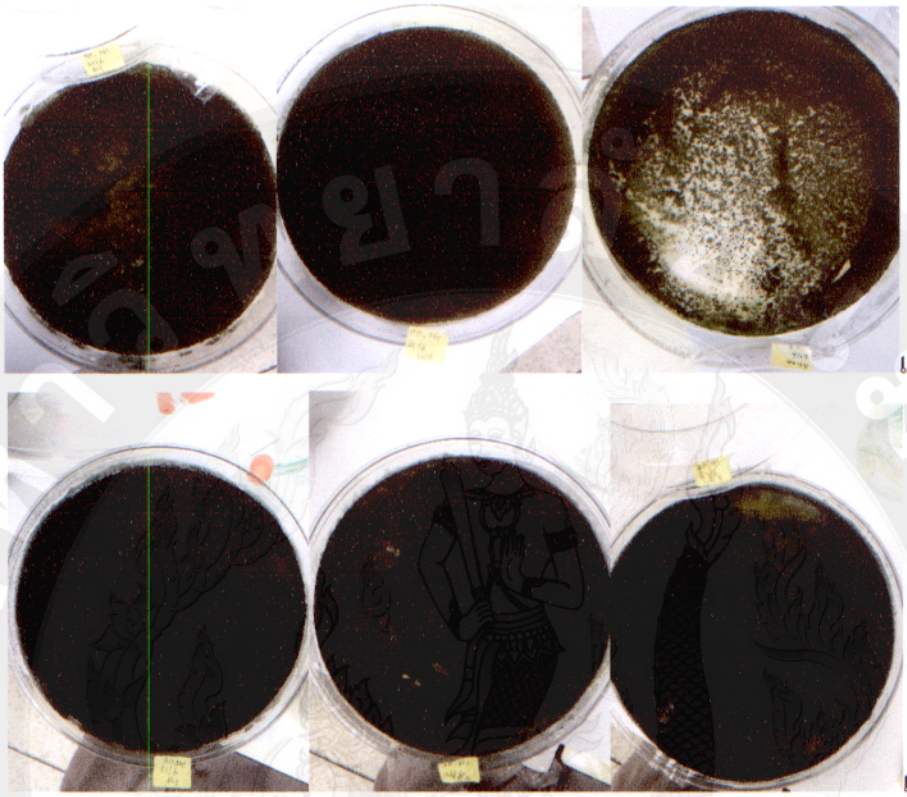
BW: ถาดกลมเล็กภายใต้แสงสีขาว BR: ถาดกลมเล็กภายใต้แสงสีแดง



BW ถาดกลมเล็กภายใต้แสงสีขาว

BR ถาดกลมเล็กภายใต้แสงสีแดง

ภาพที่ 8 กราฟค่าน้ำหนักสดและแห้งที่เลี้ยงในภาชนะถาดกลมเล็กในสภาวะการให้แสงสีขาว(W)และแสงสีแดง(R)

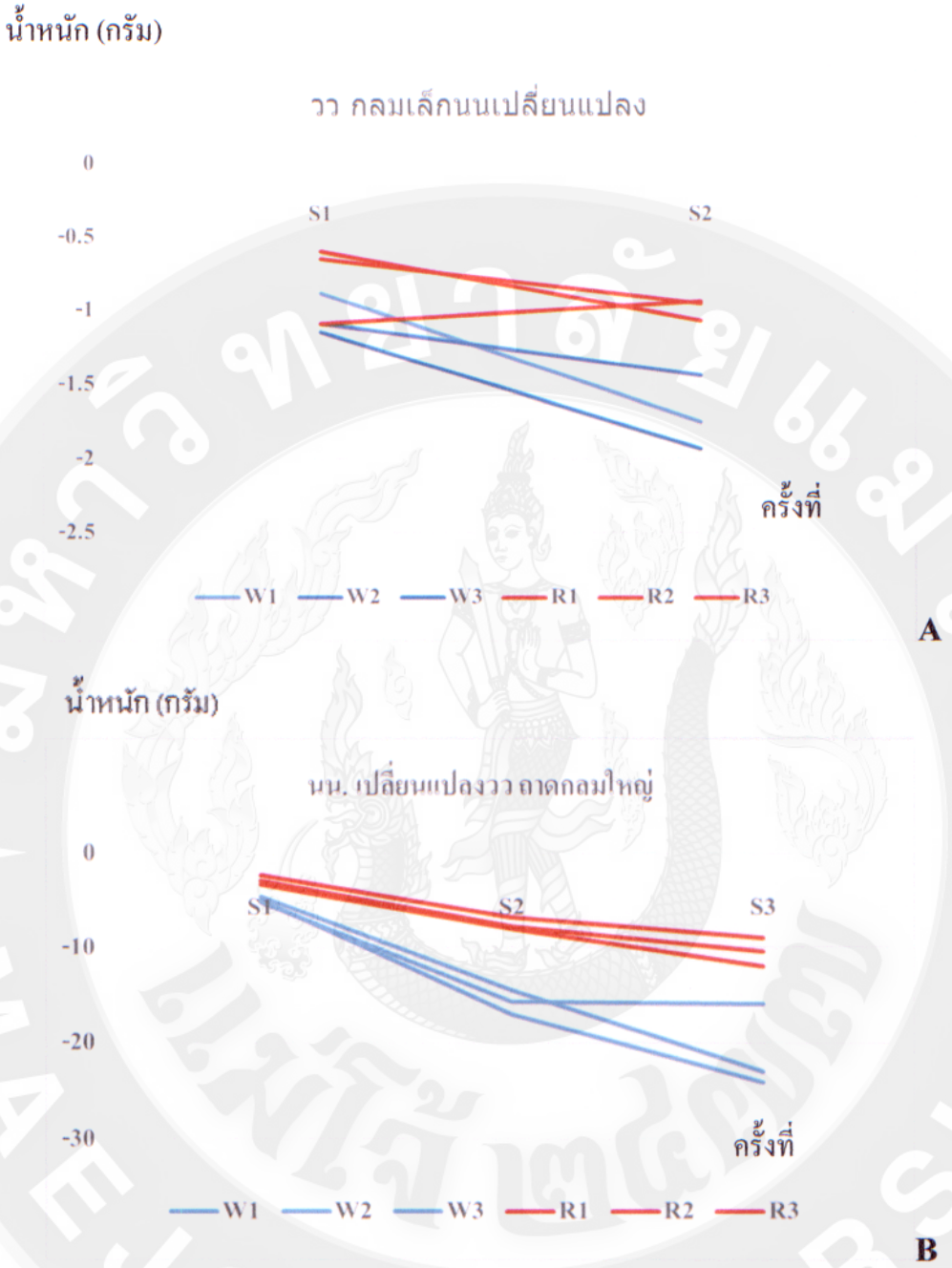


ภาพที่ 9 ทดลองเลี้ยงในภาชนะถาดกลมใหญ่ในสภาวะการให้แสงสีเปรียบเทียบการเจริญในแสงสีขาวและแสงสีแดง

ตารางที่ 4 แสดงค่าการเจริญของสาหร่าย *Nostoc commune* บนอาหารกึ่งแข็ง

โดยการเลี้ยงภายใต้แสงสีขาวและแสงสีแดง ในถาดกลมเล็ก (S)

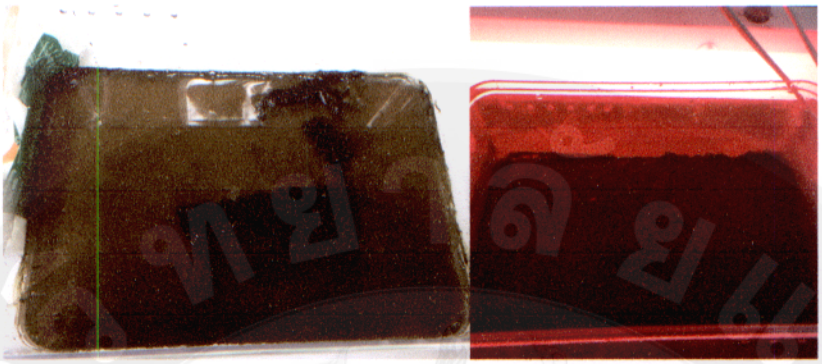
ค่าน้ำหนักสดสาหร่ายรวมภาชนะเลี้ยง(กรัม)/ครั้งที่ (S)		**S1**	**S2**	**S3**
ค่าของแสงสีขาว	**W1**	-4.96	-17.01	-24.09
	W2	-5.16	-15.71	-15.92
	W3	-4.56	-14.49	-23.05
ค่าของแสงสีแดง	**R1**	-2.83	-7.77	-10.33
	R2	-2.24	-6.74	-8.93
	R3	-3.22	-7.94	-12.01



ภาพที่ 10 กราฟแสดงค่าการเจริญของสาหร่าย *Nostoc commune* บนอาหารกึ่งแข็ง ภายใต้แสงสีขาวและแสงสีแดงในถาดกลมเล็ก(A)และถาดกลมใหญ่(B) จำนวน 3 ครั้ง (S)

ผลการทดลองในสภาวะการให้แสงสีเปรียบเทียบการเจริญในแสงสีขาวและแสงสีแดง พบค่าน้ำหนักสดของสาหร่ายในสภาวะแสงสีแดงมีค่าสูงกว่าในสภาวะแสงสีขาวตลอดช่วง

การเลี้ยงในทุกการทดลอง พบค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสาหร่ายในสภาวะแสงสีแดงมีค่าสูงกว่าในสภาวะแสงสีขาวเล็กน้อย



แสงสีขาว แสงสีแดง

ภาพที่ 11 ผลการเลี้ยงในถาดสี่เหลี่ยมแบบอาหารกึ่งแข็ง

ผลการเลี้ยงในถาดสี่เหลี่ยมแบบแบบอาหารกึ่งแข็ง พบการเจริญในสภาวะแสงสีแดงดีกว่าในแสงสีขาว

ตารางที่ 5 แสดงค่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ย (กรัม) เปรียบเทียบการเลี้ยงในแสงสีแดงและแสงสีขาวของสาหร่าย *Nostoc commune* ในภาชนะกลมเล็ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ในอาหารกึ่งแข็ง ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 20 วัน

Treatments	WNA	WN	WNoA	WNo	RNA	RN	RNoA	RNO
Dry Weight (กรัม)	0.025	0.037667	0.014333	0.013667	0.070333	0.0565	0.052333	0.036667
SD	0.0052915	0.020404	0.008622	0.006429	0.017474	0.034699	0.011504	0.011846
Average	0.022667±0.112				0.053958±0.018			

W= สภาวะการให้แสงสีขาว

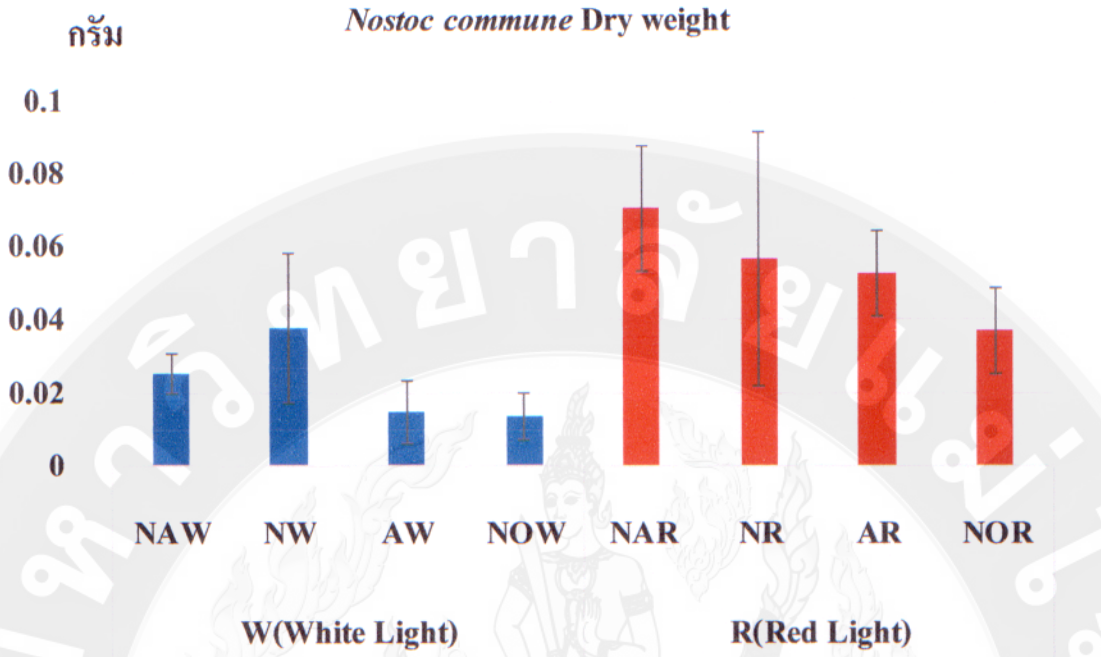
R =สภาวะการให้แสงสีแดง

NA= เสริมไนโตรเจน และ alginate

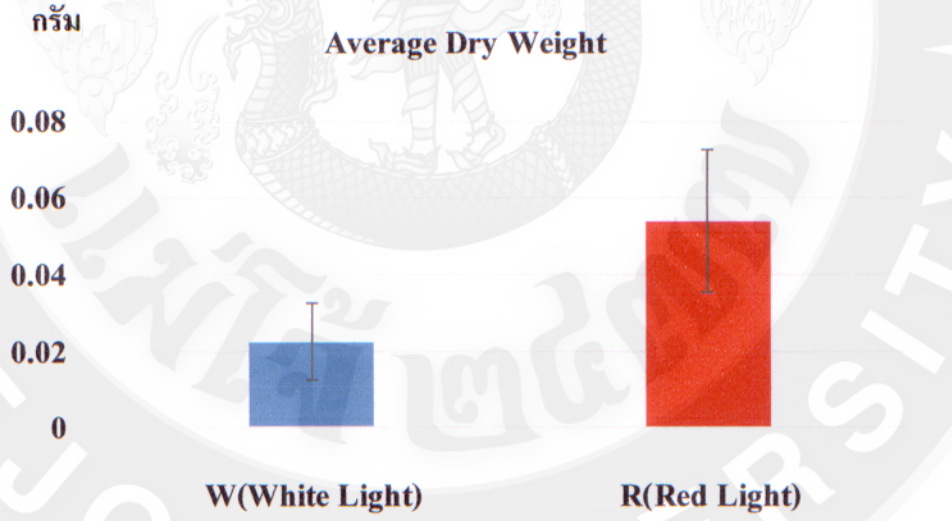
N=เสริมไนโตรเจน

NoA =เสริม alginate

NO=ไม่มีการ เสริมไนโตรเจน และ alginate



A



B

ภาพที่ 12 กราฟแสดงค่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ย (กรัม) ในสูตรอาหารต่าง ๆ (A) และค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของแสงสีขาวและแสงสีแดง (B)

พบค่าน้ำเฉลี่ยหนักแห้งของสาหร่ายในสภาวะแสงสีแดงมีค่าสูงกว่าในสภาวะแสงสีขาว และมีค่าสูงสุดในอาหารที่เสริมไนโตรเจน และ alginate

3. ผลผลิตสาหร่าย

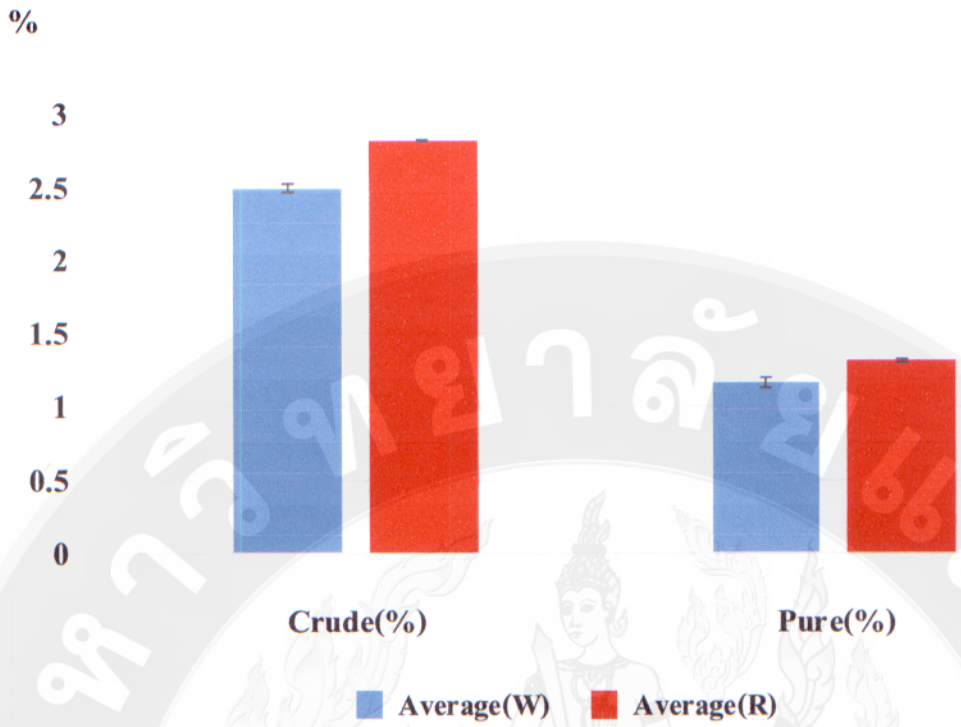
ภาพที่ 13 สาหร่าย *Nostoc commune* แห้งและผง

4. **เทคโนโลยีสารสังเคราะห์ (Chemical Technology)**

1) **ปริมาณ Phycocyanin (Phycocyanin extraction technologies)**

ตารางที่ 6 ปริมาณ Phycocyanin ในสาหร่าย *Nostoc commune*

Nostoc commune	**รวม**	**บริสุทธิ์**	**ค่าเฉลี่ยรวม**	**ค่าเฉลี่ยบริสุทธิ์**
Phycocyanin	**Crude (%)**	**Pure (%)**	**Crude (%)±SD**	**Pure (%)±SD**
แสงสีขาว W1	2.515	1.168		
W2	2.483	1.153		
W3	2.525	1.173	**2.508±0.02**	**1.165±0.01**
แสงสีแดง R1	2.860	1.328		
R2	2.812	1.306		
R3	2.790	1.296	**2.821±0.03**	**1.310±0.01**

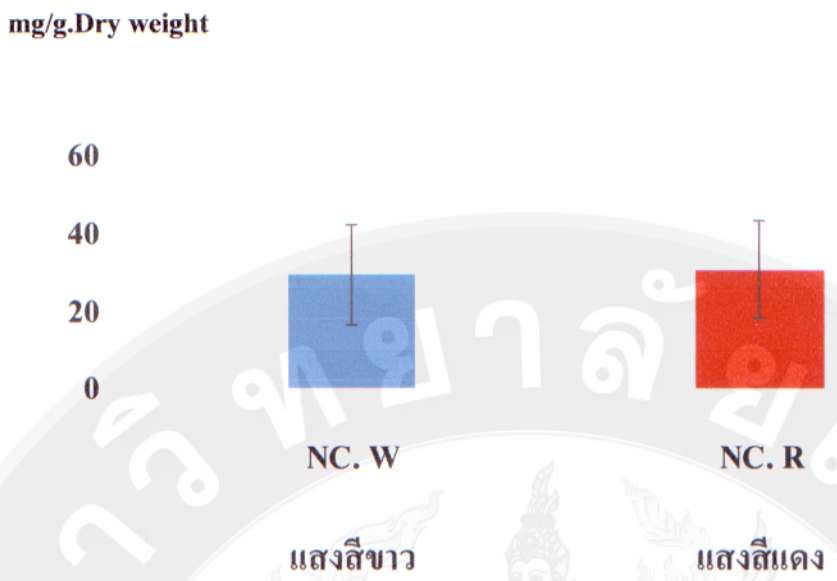


ภาพที่ 14 กราฟปริมาณ Phycocyanin ในสาหร่าย *Nostoc commune*

2) **ปริมาณโปรตีน**

ตารางที่ 7 แสดงค่าปริมาณโปรตีนในสาหร่ายแห้ง เปรียบเทียบการเลี้ยงในแสงสีแดงและแสงสีขาวของสาหร่าย *Nostoc commune* ในอาหารชนิดต่างๆ

Protein (mg/g.Dry weight)	แสงสีขาว NC. W	แสงสีแดง NC. R
1	40.17	41.00
2	38.59	40.00
3	25.01	27.00
4	8.80	10.00
5	34.59	36.00
Mean±SD	29.43±12.95	30.80±12.87

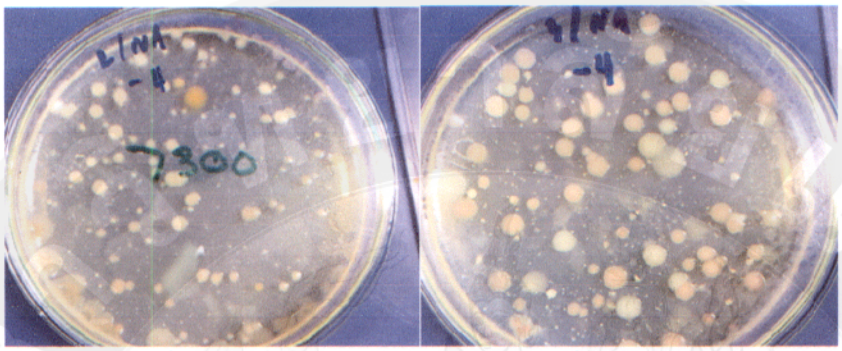


ภาพที่ 15 กราฟแสดงค่าปริมาณโปรตีนในแสงสีแดงและแสงสีขาวของสาหร่าย *Nostoc commune*

พบค่าปริมาณโปรตีนในสาหร่ายแห้งในสภาวะแสงสีแดงค่าสูงกว่าในสภาวะแสงสีขาว และมีค่าสูงสุดในอาหารที่เสริมไนโตรเจน

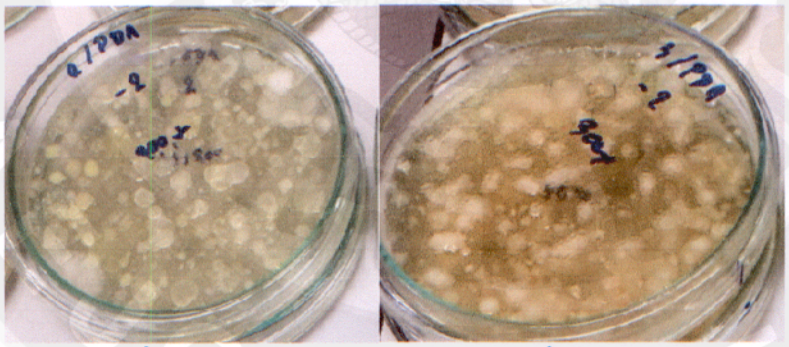
3) **ค่าการปนเปื้อนของจุลินทรีย์**

การวิเคราะห์การปนเปื้อนจุลินทรีย์ Total bacteria และ Coliform bacteria ในตัวอย่างและอาหารจากสาหร่าย *Nostoc commune*



แบคทีเรียที่พบในตัวอย่าง NR แบคทีเรียที่พบในตัวอย่าง NW

โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Total Coliform) Total fecal coliforms bacteria *(E.coli)*



ยีสต์และราที่พบในตัวอย่าง NW ยีสต์และราที่พบในตัวอย่าง NR

ภาพที่ 16 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในสาหร่าย *Nostoc commune*

ปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในสาหร่าย *Nostoc commune* ในรูปของผง พบว่าบางค่าเกินเกณฑ์มาตรฐานจุลินทรีย์ในอาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดย Total bacteria มีค่า 1.03×10^{8} ในแสงสีขาว และ 1.57×10^{8} ในแสงสีแดง ตรวจไม่พบ Coli form bacteriaและ *E.coli*

Total Yeasts and Mold มีค่าเกินมาตรฐานเล็กน้อย โดย มีค่า 2.18 x10^6 ในแสงสีขาว และ 1.88 x10^7 ในแสงสีแดง (ภาพที่ 16 และ ตารางที่ 8) ทั้งนี้อาจมีการปนเปื้อนจากขั้นตอนการตากแห้งแบบผึ่งลม ทำให้อยู่ในสภาพไม่ปลอดเชื้อ แต่ขั้นตอนการนำไปทำผลิตภัณฑ์ มีการทำให้ปลอดเชื้อก่อนการนำไปทขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 8 ตารางผลการตรวจปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนในสาหร่าย *Nostoc commune* ในสภาวะการเลี้ยงด้วยแสงสีขาวและแสงสีแดง

สาหร่าย *Nostoc commune*	Total bacteria	Coli form bacteria	Total Yeasts and Mold	*E.coli*
สภาวะแสงสีขาว	1.03 x10^8	>1,100	2.18 x10^6	ไม่พบ
สภาวะแสงสีแดง	1.57x10^8	<3.0	1.88 x10^7	ไม่พบ
ค่ามาตรกำหนดไม่เกิน***	<1x10^6	<100	<500ในรา <1x10^6ในยีสต์	<100

***เกณฑ์มาตรฐานจุลินทรีย์ในอาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

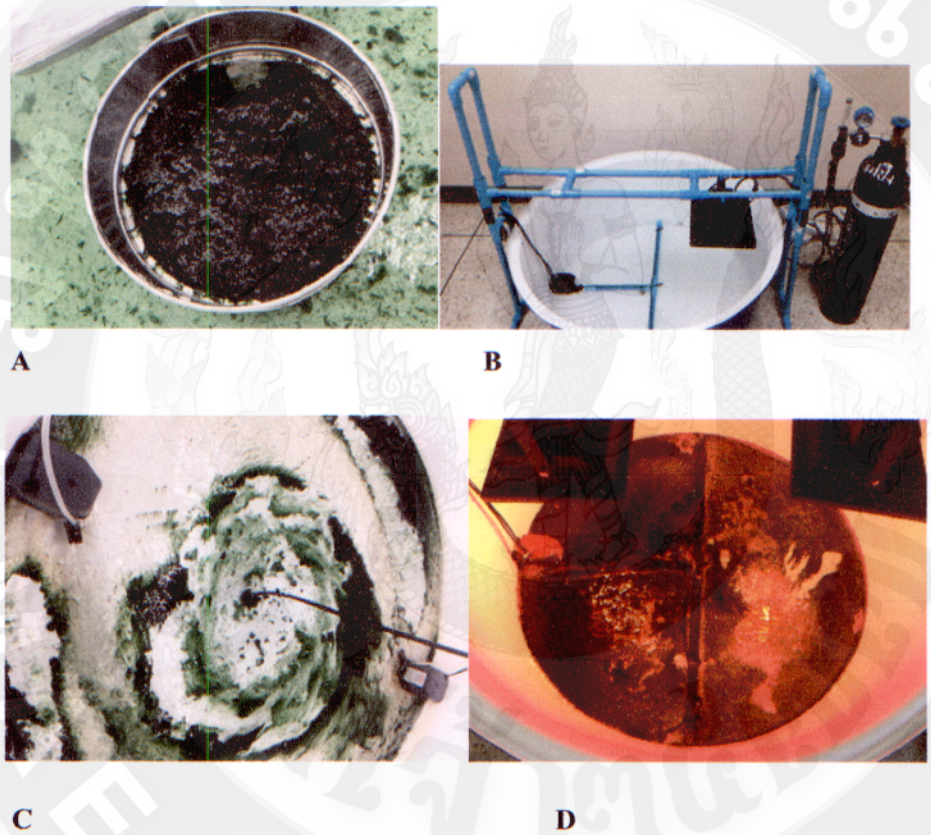
5. ผลการวิเคราะห์ผล (Analytical Results)

1) ค่าการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนักแห้งเฉลี่ย พบว่าไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีค่า $p<0.05$
2) ค่าการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของไฟโคไซยานินรวมเฉลี่ย พบว่าไม่มีความแตกต่าง พบว่าไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีค่า $p<0.05$
3) ค่าการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของไฟโคไซยานินบริสุทธิ์เฉลี่ย พบว่ามีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 99%มีค่า $p<0.01$
4) ค่าการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของโปรตีนเฉลี่ย พบว่าไม่มีความแตกต่างระดับความเชื่อมั่น 95% มีค่า $p<0.05$

ถึงแม้ข้อมูลส่วนใหญ่จะมีความแตกต่างกัน แต่พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีเพียงค่าไฟโคไซยานินบริสุทธิเฉลี่ยที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มแสงที่ใช้ในแสงสีแดงมีค่าต่ำกว่าแสงสีขาวมาก เนื่องจากในช่วงคลื่นที่ใช้สำหรับแสงสีแดง มีค่าความเข้มแสงต่ำ ค่าความเข้มแสงสูงสำหรับแสงสีแดง มีข้อจำกัดในการหาซื้อ ต้องนำเข้าและยังอยู่ในระหว่างการศึกษาวิจัยต่อไป

6. โรงเพาะเลี้ยง

ผลการทดลองการเลี้ยงเพิ่มมวล ใช้บ่อไฟเบอร์กลาส ขนาด 280 ลิตร ติดตั้งเครื่องทำน้ำวนในบ่อสร้างมวลโดยระบบการเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์และการให้แสงสีแดงจากพลังงานแสงอาทิตย์ (Solar Cell) พร้อมอุปกรณ์ วัดสารอาหาร pH ความชื้น และอุณหภูมิ การเก็บเกี่ยวและสาหร่ายกลม ใช้ตะแกรงร่อนขนาดช่องตามกำหนด



ภาพที่ 17 การเพาะเลี้ยงเพื่อสร้างมวลในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 280 มิลลิลิตร

7. ผลการใช้สาหร่ายในรูปผลิตภัณฑ์อาหาร

ภาพที่ 18 สาหร่าย *Nostoc commune* และผลิตภัณฑ์อาหารคาร์เวีย (Caviar)

สาหร่าย *Nostoc commune*

ผลิตภัณฑ์จากสาหร่าย *Nostoc commune* รูปของอาหาร Cavair โดยวิธี Spherification โดยใช้สารละลาย Alginate และ $CaCl_2$ ทำได้ง่าย และสามารถนำไปใช้ในการบริโภคได้หลายแบบ เช่น ทานเป็นขนมหวาน หรือ Topping บนข้าว (ภาพที่ 19)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Nostoc commune* ในระบบปิด โดยควบคุมปัจจัยบางประการ พบว่าปัจจัยบางประการมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญในสาหร่าย ทั้งด้านการสร้างมวลและองค์ประกอบเคมีในเซลล์ อาหารสูตรปรับปรุง BG11 ที่ไม่เติมไนโตรเจน จะมีผลต่อการเจริญและควบคุมการปนเปื้อนจากสาหร่ายชนิดอื่น เนื่องจาก *Nostoc commune* เป็นสาหร่ายที่ตรึงไนโตรเจนได้เอง โดยมีเซลล์ Heterocyst สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเพื่อเป็น Stock ควรเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง เพราะง่ายต่อการคัดเลือกโคโลนีได้ ส่วนการเลี้ยงเพื่อการเพิ่มมวลควรเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องด้วยเก็บเกี่ยวง่ายและอาหารสามารถหมุนเวียนมาใช้ได้ และในอาหารก็มีเชื้อสาหร่ายปนมาเลี้ยงต่อไปได้ ไม่ต้องใส่เชื้อใหม่ ลดปัญหาการติดอาหารเลี้ยงซึ่งมีลักษณะวุ้น เอาออกยาก ถ้าเป็นของเหลวสามารถใช้น้ำสะอาดซะล้างได้ง่าย ปัจจัยแสงก็มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย *Nostoc commune* เช่นกัน ค่ามวลชีวภาพ ค่าไฟโคไซยานิน ค่าโปรตีนของสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะแสงสีแดงมีค่าสูงกว่าชุดที่เลี้ยงภายใต้แสงสีขาวทั้งๆที่ความเข้มแสงของสีแดงหรือพลังแสงมีค่าต่ำกว่า ดังนั้นการทดลองนี้ สามารถใช้เป็นแนวทางในการจัดระบบการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมปัจจัยเพื่อเป็นระบบโรงงานเพาะเลี้ยงแบบอัจฉริยะได้

สรุปผลการวิจัย

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีในระบบการผลิตสาหร่าย *Nostoc commune* ในระบบปิด ภายใต้การควบคุมปัจจัยบางประการ สามารถควบคุมการเจริญและผลผลิตภายในเซลล์ของสาหร่าย *Nostoc commune* ได้ โดยควบคุมมวลชีวภาพ ปริมาณโปรตีน และปริมาณไฟโคไซยานิน ผลผลิตที่ได้มีความปลอดภัย จากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ สามารถใช้เป็นแนวทางในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมและนำไปใช้ประโยชน์ด้านการบริโภคได้

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1) เจษฎา ทิพยะสุขศรี, อุษา กลิ่นหอม และ อาภารัตน์ มหาขันธ์. 2555. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเห็ดลาบ (*Nostoc commune* Voucher) ในห้องปฏิบัติการ และการผลิตชีวมวลกลางแจ้ง. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย

2) นุชนาถุ รังคดิลก, สุมลธา หนูคาบแก้ว และ จุฑามาศ สัตยวิวัฒน์, 2555. เรื่องน่ารู้ของผลิตภัณฑ์สาหร่าย..ที่ไม่ควรมองข้าม. ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยา สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์.

3) อาภารัตน์ มหาขันธ์ อุษา กลิ่นหอม, มยุรี ตั้งธนานุวัฒน์, เจษฎา ทิพยะสุขศรี, วัชรี กัลยาลัง ,วิวัธน์ ปฐมโยธิน, พรภัทรา ศรีนรคุตร, ปุณณภา บุญยะภักดิ์, เกศรา แซ่โค้ว, สุวรรณา ศรีสวัสดิ์, วัลลภา อรุณไพโรจน์ และ เสียงทอง นุตาลัย. 2548. การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารจาก "สาหร่ายเห็ดลาบ" (*Nostoc commune*, Cyanophyta)/. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 70 หน้า

4) Alfredo W., Julio C. De Carvalho, Vanete T. S., Ana B. B. De Faria, Fanessa G. and Carlos R. S. 2011. Study of phycocyanin production from *Spirulina platensis* under different light spectra, Braz.Arch.Biol.Technol.,54:675-682.

5) Ali, S.K., Saleh, A.M. 2012. *Spirulina* - an overview, Review article. Int J Pharm Pharm Sci. 4(3), 9-15

6) Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae_ponds, tanks, tubes and fermenters. J. Biotechnol., 70, 313–321.

7) Boussiba S. and Richmond A. 1979. Isolation and purification of phycocyanins from the blue-green alga Spirulina platensis., Arch. Microbial. 120: 155-159.

8) Colla, L. M.; Reinehr, C. O.; Reichert, C.; Costa, J. A. V. (2007a), Production of biomass and nutraceutical compounds by Spirulina platensis under different temperature and nitrogen regimes. Biores. Technol. 98, 1489-1493.

9) Zhongyang Deng, Qiang Hu, Fan Lu, Guoxiang Liu, Zhengyu Hu. 2008. Colony development and physiological characterization of the edible blue-green alga, *Nostoc sphaeroides* (Nostocaceae, Cyanophyta). Natural Science 18 (2008) 1475–1483.

10) Desikachary, T.V.1959. Cyanophyta. Botany Department, University of Madras., Published.New Delhi : Indian Council of Agricultural, Dodds, W.K., D.A. Gudder and D. Mollenhauer 1995. The ecology of Nostoc. Journal of Phycology 31:2-18.

11) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagentB. J. Biol. Chem., 193: 267–275.

12) Pandey , U and Pandey , J .2008. Enchanced production of biomass, pigments and antioxidant capacity of a nutritionally important cyanobacterium *Nostochopsis lobatus*. Bioresource technology.99 (10): 4250-4523.

13) Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M & CohenBazire G (1971) Purification and properties of unicellular bluegreen algae (Order Chroococcales). Bacteriol. Rev.35: 171-205.

14) Venkataraman, L.V. (1983). A monograph on *Spirulina platensis*. Central Food Technological Research Institute, Mysore.

15) Zhang G., Wang B., Zhang P. and Wang L. 2006. Removal of algae by sonication–coagulation, J.Environ. Sci. Health Part A 41 (2006) 1379–1390).

ASIAN Community Knowledge Networks for the Economy, Society, Culture, and Environmental Stability

ASIAN Community Knowledge Networks for the Economy, Society, Culture, and Environmental Stability

2
session
7-10

Sornchai Mungthaison
Makha Khittasangka
Albert Lisec
Ali Akbar Zeinali

Chiang Rai Rajabhat Universty, Chiangrai, Thailand, 2018

Huntington University

MAPLE LEAF SCHOLAR AWARD

Presented to

Assistant Professor Dr. Chalinda Ariyadet

In recognition of your outstanding
contributions to international education
on behalf of the Canadian Scholars
Miyazaki, Japan, 8 - 12 July 2017

Presented by

Kevin R.E. McCormick

Dr. Kevin McCormick
Founder, Maple Leaf Scholars Program
Vice Chancellor and President
Huntington University

The 13th International Conference
in collaboration between
Chiang Rai Rajabhat University, Thailand
&
University of Miyazaki, Japan

CERTIFICATE OF ACHIEVEMENT

Research Presentation Awarded to:

Assistant Professor Chalinda Ariyadet, Ph.D.

as
Conference Participant

"ASIAN Community Knowledge Networks for the Economy, Society, Culture, and Environmental Stability"

Miyazaki, Japan, 8 - 12 July 2017

Assistant Professor Sornchai Mungthaisong, Ph.D.
President of Chiang Rai Rajabhat University, Thailand

Professor Tsuyomu Ikenoue, M.D.
President of University of Miyazaki, Japan

ที่ ศธ ๐๕๓๒.๑๓ /ว ๓๗๑๒

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย
ถนนพหลโยธิน อำเภอเมือง
จังหวัดเชียงราย ๕๗๑๐๐

๑๔ มิถุนายน ๒๕๖๐

เรื่อง รางวัล Maple Leaf Scholar Award

เรียน อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ด้วย มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย ร่วมกับ University of Miyazaki, Japan ร่วมกับ Kathmandu University, Nepal และ Huntington University, Canada จัดโครงการ ประชุมสัมมนาและนิทรรศการวิชาการนานาชาติ ครั้งที่ ๑๓ เรื่อง "เครือข่ายความรู้เพื่อความมั่นคงทางเศรษฐกิจ สังคม วัฒนธรรม และสิ่งแวดล้อมในภูมิภาคเอเชีย" "ASIAN Community Knowledge Networks for the Economy, Society, Culture, and Environmental Stability" ระหว่างวันที่ ๘ - ๑๒ กรกฎาคม ๒๕๖๐ ณ Sheraton Grande Ocean Resort, Miyazaki ประเทศญี่ปุ่น นั้น

ผลงานทางวิชาการ เรื่อง **Smart Culture for Nostoc Commune in Closed System** นำเสนอโดย **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชลินดา อริยเดช** ได้รับการคัดเลือกจากคณะกรรมการดำเนินการจัดประชุมและคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณากลั่นกรองคุณภาพบทความวิจัยหรือบทความทางวิชาการ (Peer Review) **ให้เป็นผลงานวิจัยและผลงานทางวิชาการดีเด่นเพื่อรับรางวัล Maple Leaf Scholar Award (รางวัล Maple Leaf Scholar Award เป็นรางวัลจาก Huntington University ประเทศ Canada ซึ่งเป็นมหาวิทยาลัยคู่สัญญาตามโครงการความร่วมมือทางวิชาการกับมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย)** โดยมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงรายได้จัดพิธีมอบรางวัล ณ Sheraton Grande Ocean Resort, Miyazaki ประเทศญี่ปุ่น ในวันที่ ๑๐ กรกฎาคม ๒๕๖๐ เวลา ๑๑.๓๐ - ๑๒.๐๐ น.

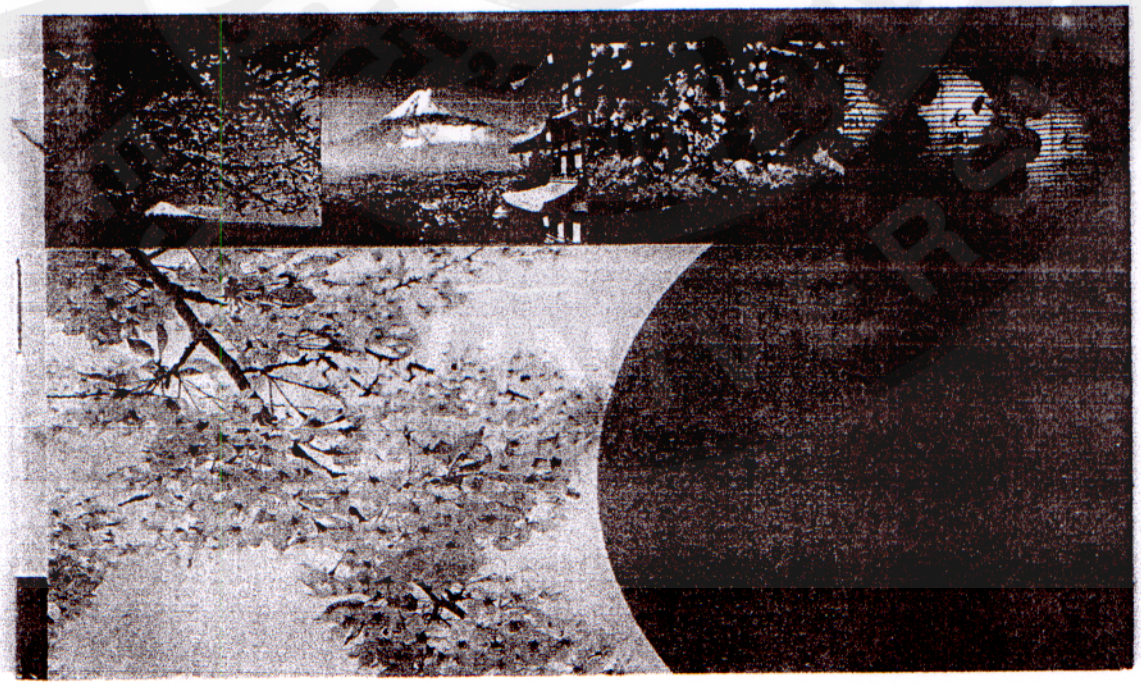
จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรชัย มุ่งไธสง)
อธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย

วิทยาลัยนานาชาติภูมิภาคลุ่มน้ำโขง
โทร ๐ ๕๓ ๗๗ ๖๓๐๖, ๐ ๕๓ ๗๗๖๐๐๐ ต่อ ๑๔๐๖
โทรสาร ๐ ๕ ๓๗๗ ๖๓๐๖
www.crru.ac.th

The Best Practice Awards
Maple Leaf Scholar Awards



Maple Leaf International Research Awards

This Award has been initiated by Professor Dr. Kevin McCormick, Vice Chancellor & President of Huntington University, in his determination that the Research Excellence Entitlement should have the possibility to transfer and implement the identified practices in situation and place different from the ones where they were observed.

In particular, The Award is given on behalf of the Canadian Scholars.

The Award Recipients are listed below:

1. ***Dr. Kitipong Tepjitara***
   Krabi Technical College, Thailand

2. ***Assistant Professor Dr. Nisakorn Klanarong***
   Department of Geography, Faculty of Humanities and Social Sciences, Thaksin University, Thailand

3. ***Assistant Professor Dr. Chalinda Ariyadet***
   Program in Agricultural Interdisciplinary,
   Maejo University, Chiangmai, Thailand

4. ***Assistant Professor Dr. Akkarapon Nuemaihom***
   Dean, Faculty of Humanities and Social Science,
   Buriram Rajabhat University, Thailand

5. ***Associate Professor Dr. Merites M. Buot***
   Department of Human Kinetics,
   College of Arts and Sciences,
   University of the Philippines Los Banos, Philippines

3. *Assistant Professor Dr. Chalinda Ariyadet*
Program in Agricultural Interdisciplinary,
Maejo University, Chiangmai, Thailand

Chalinda Ariyadet (Ph.D.)

Assistant Professor Dr. Chalinda Ariyadet has obtained her Ph.D. in Biology from Songklanakarin University, Thailand, in 2005. She has been teaching Biology at Bachelor level for nearly twenty years. She is the author of three Biology and Biotechnology books. Moreover, she presented the research and academic papers at international conferences in various countries including China, Vietnam, Malaysia, Sri Lanka, Indonesia, Korea, Japan, Australia and etc. At present she is teaching interdisciplinary Agriculture subjects, Graduated School at Maejo University, Thailand, and also holding the Program committee and correspondence of Master and Doctoral degree, Program in Agricultural Interdisciplinary of Gradated School.

Chalinda Ariyadet (Ph.D.)
Assistant Professor Dr. Chalinda Ariyadet
Maejo University, 63 Sansai-Phrao Road, Nongharn,
Sansai District, Chiang Mai, 50290 Thailand.
Phone: +66 81 4733748
Fax: +66 53875460-65
E-mail: chalinda.bio@gmail.com

Smart culture for *Nostoc commune* in closed system

Chalinda Ariyadet
Jittanan Kaewmaneesuk
Mongkol Thirabunyanon
Program in Agricultural Interdisciplinary, Maejo University, Chiangmai, Thailand
Correspondence Email: chalinda.bio@gmail.com 0814733748
Somkiat Jaturonglumler
Faculty Engineering and Ago-Industry, Maejo University, Chiangmai, Thailand

Abstract—*Nostoc commune* algae could be used for high value food. This algae is a nitrogen fixing ,so it's have high nutritional value, such as 20.84 gram / 100 g of protein, 0.43 grams of vitamin B 1, 1.54 grams of calcium, 0.37 iron, and 21.40 micrograms / 100g of vitamin A. and 17 essential amino acids. This research aims to develop a technique for *Nostoc commune* production under laboratory conditions. Media was using modified BG11 (BlueGreen Medium) Stanier (1971) and CO_2 was used to increase the source for photosynthesis and pH sensor was to adjust pH of the optimum algae growth condition under CO_2 adjustment. Alginate 0.25% was filled in media for increased Phycocycanin and Phycoerythrin. Coincide with controlling the light source by use white light (6500 Lux) and red light (840 Lux). Red light induced the higher concentration of protein. White light act an increase the growth of algae. The resulted was shown low contamination of others algae and protozoa from the effects of pH control. Dry weight of *Nostoc commune* under red light condition have 140 µg/day/100 liter media and low bacteria contaminate. Which could be confirm that it clean for making safety food production.

Keywords— Smart culture, *Nostoc commune*, closed system

I. INTRODUCTION

For last decade cyanobacteria have been receiving increasing interest due to their potential to produce a diverse range of chemicals and biologically active compounds, such as vitamins, carotenoid pigments, proteins, lipids and polysaccharides (Zhang et al., 1999). For exploration of these potentials of cyanobacteria it should be cultivated in commercial way. Globally researchers are trying to produce microalgae/cyanobacteria commercially (Belay 1997; Ben-Amotz 2004). Yet very little or primary information is available on detailed design criteria and inovation, location selection, scaling considerations, or constrains innvolved in large scale cultivation. *Nostoc commune* is blue-algae which human use for organic food source and contains high proteins with well-balanced amino acids. It is also rich in carbohydrates, vitamins, minerals, phenolics, pigments (chlorophyll, carotenoids and phycobilins) and poly-unsaturated fatty acids (Miranda et al. 1998; Anupama 2000). Nostoc commune algae could be used for high value food. This algae is a nitrogen fixing ,so it's have high nutritional value, such as 20.84 gram / 100 g of protein, 0.43 grams of vitamin B 1, 1.54 grams of calcium, 0.37 iron, and 21.40 micrograms / 100g of vitamin A. and 17 essential amino acids. *Nostoc* is an edible blue green algae used for health food and herbal medicine due to its nutritional values and antioxidant properties (Yi and Zuiun. 2014). *Nostoc* has been used as a source of proteins,

vitamin and unsaturated fatty acids for human and animals (Gao. 1998). However, wild type N. *commune* has been decreasing in quantity as a result of ever-growing market demand and environmental pollution. Therefore, artificial culture of N. *commune* is important as it can bring great social and economic benefits. (Yi Diao and Zujun Yang.2014).

II. MATERIAL AND METHODS

A. Technique purify *Nostoc commune*

The *Nostoc commune* stain was isolated from natural Mae Taeng clean and Shallow River. Located in Chiang Mai province. The sample was carried out to Program in Agricultural Interdisciplinary Lab, Maejo University. Pick cell technique sorting was used to separate the single colony from the sample and identification with Desikachary,1959 Textbook and confirm species to Standard species from TISTR 8160 (Fig.1). The colony was washed with distilled water and follow with Ethyl alcohol 10% Clorox 5% and then washing with distilled water done in 3 times replicated. The pure colony was transfer to culture in BG 11 modified, Slant agar media to growth under white light condition as the stock.

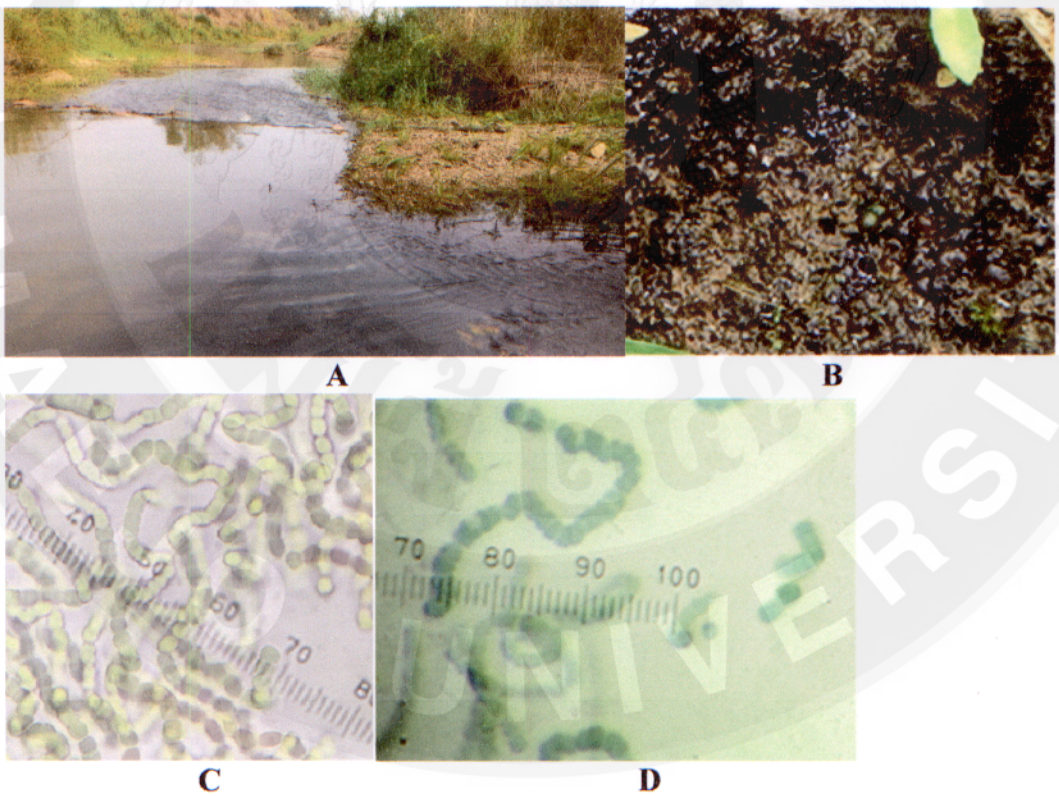


Figure 1. The study site (A) and *Nostoc commune* algae from Mae Taeng River (B, C) and Standard *Nostoc commune* species TISTR 8160(D)

***B.* Mass Culture Technique**

1) Culture Media Media was using modified BG11 (BlueGreen Medium) Stanier (1971) and sodium alginate 0.25% was filled in media for increased Phycocycanin and Phycoerythrin. The media consisted of $K_2HPO_4.3H_2O$ components of 0.020 g., $CaSO_2$ 0.036 g / liter, citric acid 0.006 g / l, ferrite ammonium citrate 0.006 g / l, EDTA 0.001 g / l, Na_2CO_3 0.020 NaCl 0.200 g / L, Urea 0.200 g / liter, and Trace metal mix A5. The original formula adjusted pH value to 7.5 and light intensity was 20 microns / square meter. /Second Encourage algae mushroom to grow well. The review of this media was record of the biomass was increased by an average of 7.91 times after culturing for 20 days (Jadesada Thipayasooksri et al. 2555). Alginate 0.25% was filled in media for increased Phycocycanin and Phycoerythrin.

2) Culture condition CO_2 was used to increase the source for photosynthesis and the source for mass production. (Manigandam.2014) and pH sensor was to adjust pH of the optimum algae growth condition under CO_2 adjustment. Coincide with controlling the light source by use white light (6500 Lux) and red light (840 Lux).White light and Red light 12/12 Turn off switch was used to control the growth. Temperature 25 $\pm$ 2 ºC (Manigandam.2014), (Fig.2).

3) Technique collecting and chemical analyses The sample was collect at 28 Day's cultivar, total yield was filled through 47 mm.circle GF/C Whatman Grass microfiber filter and the other was collect the mass by using 50 µm sieve and dried at low temperature (60˚C) than mortar to power particle by hand grinder. Collect the *Nostoc commune* for measure the biomass and some chemical content. The chemical was determination phycocyanin and protein content. Protein Estimation by Lowry's Method (Lowry et al., 1951). To validate Phycocyanin was extracted from the dry biomass of algae by using Low temperature method, this is a spectrophotometry method adapted to extract and quantify a relatively pure c-phycocyanin fraction (Boussiba and Richmond. 1979).

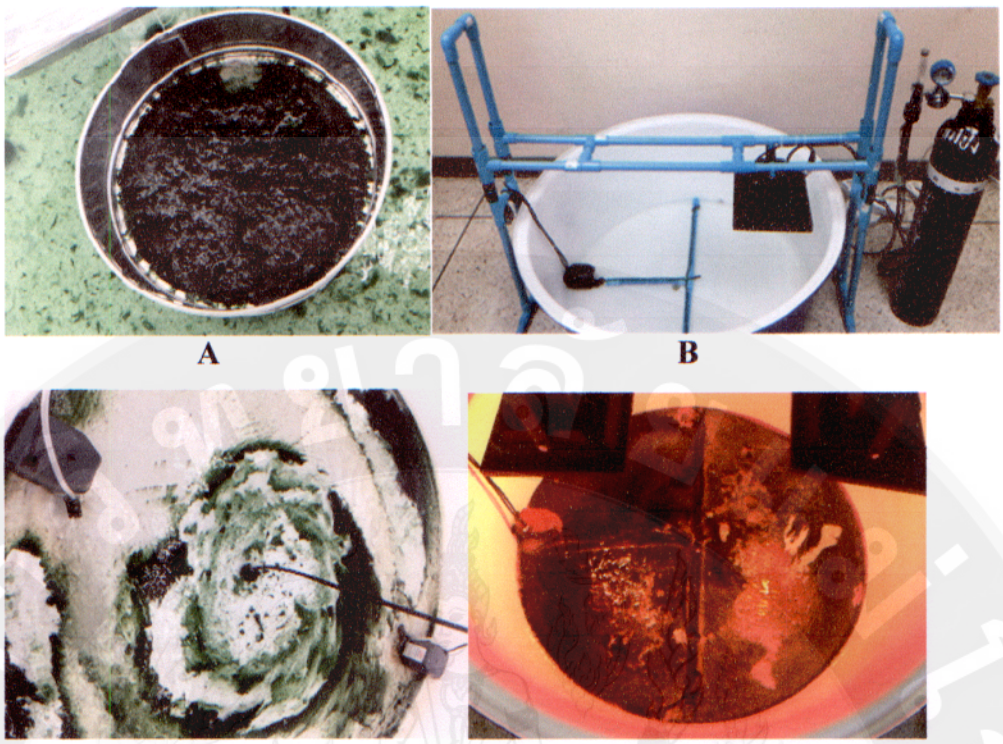


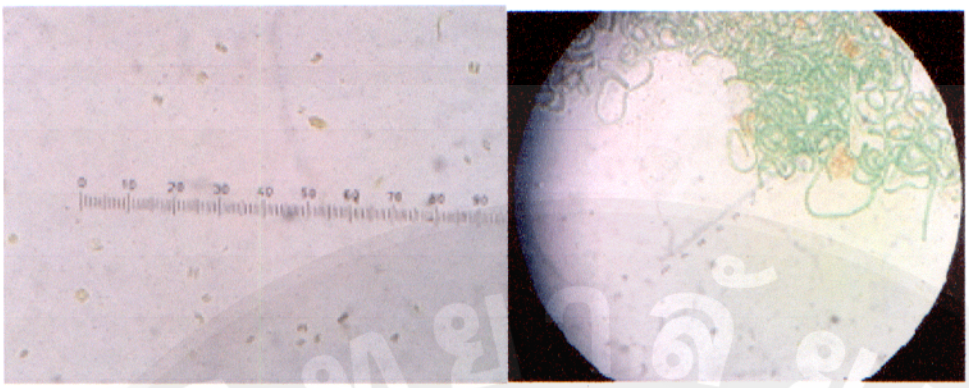
Figure 2. Aquaculture equipment for *Nostoc commune* A, 50 um sieve B, Culture tank C, White light condition D, Red light condition

C. Result and Discussion

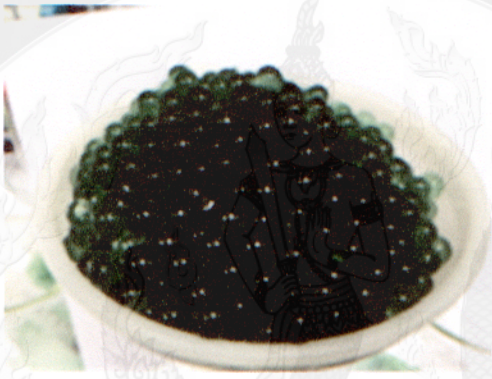
1) Biomass Production The high biomass of *Nostoc commune* have shown at Red light condition with the value of 140 µg/day/100 liter Dry weight.

2) Chemical content Phycocyanin under red light condition have the higher phycocyanin content than white light condition with the value of 1.923% and 1.624% respectively. Protein content have shown the high value in Red light condition with the value of 75.56+3,3 mg/g Dry weight

3) Food safety. In white light condition, green algae could be survive, cause of the ability to absorb the wave length of chlorophyll a in their cells In these condition not only the green algae contaminated but also some protozoa could be miss in these condition The resulted have shown the low contamination of bacteria in Closed system cultivation and have the lower in Red light condition. Which could be confirm that it clean for making safety powder and food production (Fig.3).



A B



C

Figure 3. The result of cultivar *Nostoc commune* A, Green algae contaminate B, Protozoa contaminate C, Safety food production (Spheroid- jelly food or algae Caviar)

***D.* Conclusion.** The Smart culture for *Nostoc commune* in closed system, under controlling the factors of cultivation by this research have shown the results of the idea to plant factory or make a large scale of *Nostoc commune* production.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thanks the office of Agricultural Research and Extension Maejo University for National Research Council of Thailand (NRCT) 2016 Research scholarship and also thanks to committee of the 13th. International Conference "ASIAN Community Knowledge Networks for the Economy, Society, Culture, and Environmental Stability" at University of Miyazaki, Japan for announce this presentation. Finally to grad thanks to Agricultural Interdisciplinary program and Maejo graduated school for support to join the conferences.

REFERENCES

1. Anupama, P. R. (2000). Value-added food: Single cell protein. Biotechnology Advances, 18, 459–479.
2. Belay A., 1997. Mass culture of *Spirulina* outdoors – the Earthrise experience. In: Vonshak A (ed) *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor & Francis, London, pp 131–158.
3. Ben-Amotz A. 2004 Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species. In: Richmond A (ed) Handbook of microalgal culture biotechnology and applied phycology. Blackwell, Oxford, pp 273–280.
4. Boussiba S. and Richmond A. 1979.Isolation and purification of phycocyanins from the blue-green alga Spirulina platensis., Arch. Microbial. 120: 155-159,
5. Diao Y i and Yang Zujun.2014. Evaluation of morphological variation and biomass growth of *Nostoc commune* under laboratory conditionsJournal of Environmental Biology, Vol. 35, 485-489.
6. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagentB. J. Biol. Chem., 193: 267–275.
7. Manigandam M. 2014. Mass Cultivation and Determination of Biochemical Composition of Spirulina platensis in three Different Medium. 2014. Int J Pharm Bio Sci July; 5(3): (B) Lo847 – 854.
8. Miranda, M. S., Cintra, R. G., Barros, S. B. M., & Filho, J. M. (1998). Antioxidant activity of the microalga Spirulina maxima. Brazilian. Journal of Medical and Biological Research, 31, 1075–1079
9. Stanier RY,and Van Niel CB.1941. The Main Outlines of Bacterial Classification. J Bacteriol. 1941 Oct;42(4):437–466. [PMC free article] [PubMed]
10. Zhang, X.-W., Zhang, Y. M., Chen, F. 1999. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. Process Biochem. 34: 477– 481.