



การศึกษาสภาวะการเลี้ยงต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนและสัดส่วนไอโซเมอร์ของสาหร่าย

Dunaliella salina NUAC09 สายพันธุ์ไทย



ปฏิพัทธ์ สันป่าเป้า

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การศึกษาสภาวะการเลี้ยงต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนและสัดส่วนไอโซเมอร์ของสาหร่าย

Dunaliella salina NUAC09 สายพันธุ์ไทย



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตรการประมง

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การศึกษาสภาวะการเลี้ยงต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนและสัดส่วนไอโซเมอร์ของ
สำหรับ *Dunaliella salina* NUAC09 สายพันธุ์ไทย"

ของ ปฏิพัทธ์ สันป่าเป้า

ได้รับการพิจารณาให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมรักษ์ รอดเจริญ)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ทาวงศ์)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.สุพัฒน์ พลชา)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.ปิยวัฒน์ ปองผดุง)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ เขียวขจรเขต)

อนุมัติ

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มุณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การศึกษาสภาวะการเลี้ยงต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนและสัดส่วนไอโซเมอร์ของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> NUAC09 สายพันธุ์ไทย
ผู้วิจัย	ปฏิพัทธ์ สันป่าเป้า
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ทาวงศ์
กรรมการที่ปรึกษา	ดร.สุพัฒน์ พลชา ดร.ปิยวัฒน์ ปองผดุง
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2564
คำสำคัญ	ดุนาเลียเอลล่า, ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, ความเค็ม, ไบคาร์บอเนต, ซิส-เบต้าแคโรทีน, สภาวะการเลี้ยง

บทคัดย่อ

Dunaliella เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีความสำคัญสำหรับการผลิตสารรงควัตถุเบต้าแคโรทีนซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง โดยสารกลุ่มนี้ถูกนำไปใช้ทั้งในอุตสาหกรรมที่หลากหลายเช่น ด้านโภชนาการ เภสัชศาสตร์ เครื่องสำอาง และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็นต้น งานวิจัยนี้มุ่งเน้นเพื่อจัดจำแนกและระบุชนิดสาหร่ายด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา (พื้นที่ยีน 18S rDNA และพื้นที่ยีน ITS) รวมถึงศึกษาปัจจัยการเลี้ยงที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ปริมาณรงควัตถุ องค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน และกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ผลการทดลองพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย เช่น ขนาด สี ออกแกนเซลล์ และรูปร่างของเซลล์ มีความใกล้เคียงกับลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงมากกว่าร้อยละ 99 ของพื้นที่ยีน 18S rDNA และร้อยละ 95 ของพื้นที่ยีน ITS สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์การวิวัฒนาการของพื้นที่ยีน ITS ที่แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *D. salina* NUAC09 อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *D. salina* (ML = 93 % และ NJ = 85 %) ดังนั้นจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางอณูชีววิทยาจึงจำแนกสาหร่าย NUAC09 เป็น *D. salina* ในการศึกษาปัจจัยการเลี้ยงที่เหมาะสมในสูตรอาหารดัดแปลง Johnson ได้แก่ ไนโตรเจน (0.00, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 กรัมของ KNO_3 ต่อลิตร) ฟอสฟอรัส (0.000, 0.043, 0.053, 0.070 กรัมของ KH_2PO_4 ต่อลิตร) ความเค็ม (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 โมลาร์ของ NaCl) และไบคาร์บอเนต (0.00, 0.022, 0.043, 0.065, 0.086 กรัมของ NaHCO_3 ต่อลิตร) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) ทำการทดลองเลี้ยงสาหร่ายด้วยถังปฏิกรณ์

ชีวภาพชนิดท่อแบบให้แสง (photobioreactor) ระยะเวลาเลี้ยง 14 วัน และตรวจวัดการเจริญเติบโต ผลผลิตชีวมวล และปริมาณรงควัตถุ ทุก ๆ 2 วัน นอกจากนี้ตรวจวัดองค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์ของเบต้าแคโรทีนในสาหร่ายด้วยเทคนิค HPLC ผลของปัจจัยการเลี้ยงพบว่าเมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนตเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้จำนวนเซลล์ ค่าคลอโรฟิลล์ เอ และผลผลิตชีวมวลเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ขณะที่แคโรทีนอยด์มีปริมาณเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) เมื่อปัจจัยธาตุอาหารลดลง อย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีความเหมาะสมต่อจำนวนเซลล์ (3.49 - 6.09 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) การเจริญเติบโตจำเพาะ ($0.57 - 0.82 \mu$ ต่อวัน) และปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (6.46 - 18.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในระดับไนโตรเจน 2.00 กรัมของ KNO_3 ต่อลิตร ฟอสฟอรัส 0.070 กรัมของ KH_2PO_4 ต่อลิตร ความเค็ม 2.5 โมลาร์ของ NaCl และไบคาร์บอเนต 0.043 กรัมของ NaHCO_3 ต่อลิตร ส่วนองค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์ของเบต้าแคโรทีนพบไอโซเมอร์ที่เด่นชัดที่สุด คือ *all-trans* และ *9-cis* β -carotene และมีปริมาณ *9-cis* (27 - 329 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้งต่อกรัม) และกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (71 - 76%inhibition) สูงสุดในชุดการทดลองที่ขาดธาตุอาหาร ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าปัจจัยธาตุอาหารส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการเจริญเติบโต ปริมาณรงควัตถุ ปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน และฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 โดยสามารถนำไปประยุกต์กับการเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ในระดับเชิงพาณิชย์ แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาารูปแบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายยังมีความจำเป็นซึ่งจะช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตซิสเบต้าแคโรทีนให้สูงขึ้นได้

Title	STUDY OF CULTIVATION CONDITIONS ON β -CAROTENE PRODUCTION AND ITS ISOMERS RATIO OF THAI <i>DUNALIELLA SALINA</i> NUAC09
Author	PATHIPAT SUNPAPAO
Advisor	Assistant Professor Wittaya Tawong, Ph.D.
Co-Advisor	Supat Ponza, Ph.D. Piyawat Pongpadung , Ph.D.
Academic Paper	M.S. Thesis in Fisheries Science - (Type A 2), Naresuan University, 2021
Keywords	Dunaliella, Nitrogen, Phosphorus, Salinity, Bicarbonate, Cis β -carotene, Stress condition

ABSTRACT

Dunaliella is an important green microalga for the production of β -carotene pigment, which is the economically important substance and high effective radical scavenging capacity. Hence, there are several applications of this pigment in various industries such as nutritional supplements, pharmaceuticals, cosmetics and aquaculture. This study was focused on the identification of Thai *Dunaliella salina* NUAC09 based on morphological and molecular (18S rDNA and ITS region) analyses. Subsequently, nutrient factors affecting to growth performance, pigments content and β -carotene isomers and inhibition of scavenging activity of Thai *D. salina* NUAC09 have also been determined. The results showed that the morphological features of NUAC09 including cell dimension, cell structure, organelles, shape, and life cycle were closely related to the description of the genus *Dunaliella*. When compared sequence by BLAST analyses, *D. salina* NUAC09 shared more than 99% similarity of 18S rDNA and 95% similarity of ITS sequences with the strains identified as *D. salina*. Correspondingly, the ITS phylogenetic trees showed that a strain NUAC09 was grouped in to the *D. salina* clade (ML = 93% and NJ = 85%). Hence, all morphological and molecular results indicated that our strain NUAC09 could be classified as *D. salina*. In this study, nutrient factors within the modified Johnson's

medium such as nitrogen (0.00, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 g KNO₃/L), phosphorus (0.000, 0.043, 0.053, 0.070 g KH₂PO₄/L), salinity (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 M NaCl), and bicarbonate (0.00, 0.022, 0.043, 0.065, 0.086 g NaHCO₃/L) were optimized. Each experiment has been separately performed with a completely randomized experimental design (CRD). The cell in each experiment was cultured in photobioreactor system for 14 days and growth performance, biomass and pigment content were determined an interval of 2 days. Furthermore, β -carotene isomers composition analysis has been determined by HPLC analysis. The results revealed that increasing concentrations of each nutrient factors studied (nitrogen, phosphorus, salinity and bicarbonate) promoted the cell density, chlorophyll *a* content and biomass productivity of *D. salina* NUAC09. In contrast, the total carotenoid content was decreased ($p \leq 0.05$) in all experiments with the low concentration of each factor. Moreover, the results showed that the maximum cell growth (3.49 - 6.09 cell/mL), specific growth rate (0.57 - 0.82 μ /day) and chlorophyll *a* content (6.46 - 18.43 μ g/mL) occurred in the tested strain relating with the nitrogen 2.00 g KNO₃/L, phosphorus 0.070 g KH₂PO₄/L, salinity 2.5 M NaCl and bicarbonate 0.043 g NaHCO₃/L. Interestingly, our results showed that the most obvious β -carotene isomer was *all-trans* β -carotene and *9-cis* β -carotene found in our strain. Correspondingly, the maximum values of *9-cis* β -carotene isomer content (27 - 329 mg/g DW) and DPPH scavenging activity (71 - 76%inhibition) were obtained in the experiment for which each nutrient factor has been depleted. The present study suggests that nutrient factors affected to increasing growth, pigment contents and β -carotene isomer of *D. salina* NUAC09 and can be used as a guideline for commercial culture. However, the development of cultivation systems for *D. salina* are still needed to increase *cis* β -carotene yields.

ประกาศคุณูปการ

การจัดทำวิทยานิพนธ์นี้ของข้าพเจ้าคงไม่สามารถสำเร็จได้อย่างสมบูรณ์ หากขาดความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่านที่มีส่วนร่วมในส่วนสำคัญของงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ทาวงศ์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์นี้ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและสอนเทคนิคมากมายที่ใช้ในการทดลอง รวมไปถึงการให้คำปรึกษาแนะนำทั้งในเรื่องการเรียนและการดำเนินชีวิต สั่งสอนให้ข้าพเจ้าสามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการทดลองได้ด้วยตนเองอย่างมีเหตุผลและเป็นบุคคลสำคัญที่ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบพระคุณ ดร. ปิยวัฒน์ ปองผดุง และ ดร. สุพัฒน์ พลชา ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการที่ปรึกษาในการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งยังให้คำแนะนำและสอนเทคนิคมากมายที่ใช้ในการทดลอง ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ เขียวขจรเขต ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมรักษ์ รอดเจริญ ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคุณพรพิมล แสงจันทร์ นักวิทยาศาสตร์สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมงที่กรุณาช่วยจัดหาอุปกรณ์ที่ขาดแคลนในห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี ขอขอบคุณน้อง ๆ ห้องปฏิบัติการนิเวศวิทยา และการจัดการทรัพยากรทางน้ำทุกคนที่ผ่านมาที่ให้ความช่วยเหลือบางประการและทำให้ห้องปฏิบัติการมีสีสัน

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ของข้าพเจ้า ที่คอยสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกด้าน ทั้งการเรียน การดำรงชีวิต และยังคงให้ความรักและกำลังใจแก่ข้าพเจ้า บุคคลทั้งสามเป็นส่วนหนึ่งในความสำเร็จทุกก้าวของข้าพเจ้าเสมอมา

ปฏิพัทธ์ สันป่าเป้า

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุณูปการ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ฐ
สารบัญภาพ	ณ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.5 ระยะเวลาทำการวิจัยโครงการวิจัยฯ.....	4
1.6 สถานที่ใช้สำหรับการวิจัยฯ.....	4
1.7 สมมติฐานงานวิจัย.....	4
บทที่ 2	5
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 อนุมูลอิสระ (free radicals)	5
2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant).....	7

2.3 แคโรทีนอยด์ (carotenoid).....	9
2.4 เบต้าแคโรทีน (β -carotene)	9
2.5 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	13
2.6 สาหร่ายแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ	14
2.7 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายและการนำมาใช้ประโยชน์	16
2.8 ข้อมูลทั่วไปของสาหร่าย	19
2.9 สาหร่าย <i>Dunaliella</i>	22
2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสะสมเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย <i>Dunaliella</i>	26
2.10.1. คาร์บอน (carbon).....	28
2.10.2 ไนโตรเจน (nitrogen).....	30
2.10.3. ฟอสฟอรัส (phosphorus)	32
2.10.4. ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH).....	34
2.10.5. อุณหภูมิ (temperature).....	35
2.10.6 แสง (light).....	36
2.10.7. ความเค็ม (salinity)	38
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษารูปแบบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน.....	41
บทที่ 3.....	44
วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	44
3.1 กรอบแนวคิดของการศึกษา (conceptual framework of the study).....	44
3.2 พื้นที่ดำเนินการทดลอง.....	46
3.3 อุปกรณ์และสารเคมี.....	46
3.4 การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์.....	47

3.5 การเก็บตัวอย่าง การคัดแยก และรักษาสายพันธุ์สาหร่าย	47
3.6 การจำแนกและระบุชนิดสาหร่าย.....	48
3.7 สภาพที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย (cultivation conditions)	52
3.8 การศึกษาสภาวะการเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต และปริมาณรงควัตถุ.....	53
3.9 การเก็บข้อมูล.....	57
3.10 การวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน	60
3.11 การตรวจสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH activity	63
3.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	65
บทที่ 4	66
ผลการศึกษา	66
4.1 การจัดจำแนกสาหร่ายด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา	66
4.2 การจัดจำแนกสาหร่ายด้วยลักษณะทางอนุชีววิทยา.....	68
4.3 ผลของไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย	70
4.4 ผลของฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย	74
4.5 ผลของความเค็มที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย	78
4.6 ผลของไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย....	82
4.8 การศึกษาองค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย	90
4.9 ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่าย.....	105
บทที่ 5	115
บทสรุป	115
5.1 อภิปรายผล	115
5.1.1 การจัดจำแนกสาหร่ายด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา	115

5.1.2 ไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย	117
5.1.3 ฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย	119
5.1.4 ความเค็มที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย	121
5.1.5 ไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย.....	123
5.1.6 องค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย	126
5.1.7 ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่าย.....	128
5.2 สรุปผลการทดลอง	129
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	130
บรรณานุกรม	132
บรรณาณุกรม	133
ภาคผนวก.....	153
ภาคผนวก ก.....	154
ภาคผนวก ข.....	156
ภาคผนวก ค.....	160
ภาคผนวก ง	163
อภิธานศัพท์	165
ประวัติผู้วิจัย	166

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 สภาวะการเลี้ยงต่อปริมาณเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย <i>Dunaliella</i>	27
ตาราง 2 การศึกษาไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย	54
ตาราง 3 การศึกษาฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย	55
ตาราง 4 การศึกษาความเค็มที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย	55
ตาราง 5 การศึกษาไบคาร์บอเนตต่อการเจริญเติบโต และปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย..	56
ตาราง 6 การศึกษาไบคาร์บอเนตร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโต.....	57
ตาราง 7 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน all-trans β -carotene.....	62
ตาราง 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย <i>D. salina</i> NUAC09 ภายใต้การจำกัดสารอาหาร.....	68
ตาราง 9 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพื้นที่ยีน 18S rDNA และ ITS กับฐานข้อมูล.....	69
ตาราง 10 การเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย <i>D. salina</i> NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	74
ตาราง 11 การเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย <i>D. salina</i> NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน	78
ตาราง 12 การเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย <i>D. salina</i> NUAC09 ภายใต้ปริมาณความเค็มที่แตกต่างกัน	82

ตาราง 13 การเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย D. salina NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน.....	85
ตาราง 14 การเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย D. salina NUAC09 ภายใต้.....	89
ตาราง 15 ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ...	92
ตาราง 16 ปริมาณผลผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	92
ตาราง 17 ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน..	95
ตาราง 18 ปริมาณผลผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน	95
ตาราง 19 ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ระดับความเค็มที่แตกต่างกัน.....	98
ตาราง 20 ปริมาณผลผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายระดับความเค็มที่แตกต่างกัน	99
ตาราง 21 ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน	101
ตาราง 22 ปริมาณผลผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน	102
ตาราง 23 ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์.....	104
ตาราง 24 ปริมาณผลผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	105
ตาราง 25 กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่ายภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	107
ตาราง 26 กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่ายภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน	108

ตาราง 27 กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่ายภายใต้ ความเค็มที่แตกต่างกัน.....	110
ตาราง 28 กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่ายภายใต้ ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน.....	112
ตาราง 29 กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่ายภายใต้ ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์.....	114



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน.....	10
ภาพ 2 ลักษณะเซลล์ของสาหร่าย Dunaliella	23
ภาพ 3 การสะสมเบต้าแคโรทีนของเซลล์สาหร่าย Dunaliella	23
ภาพ 4 วิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ปฐมภูมิและทุติยภูมิในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก ...	25
ภาพ 5 การเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมที่กระตุ้นให้สาหร่ายสะสมแคโรทีนอยด์	27
ภาพ 6 กลไกของเซลล์ในการนำคาร์บอนไปใช้ของสาหร่ายขนาดเล็ก.....	29
ภาพ 7 กลไกของเซลล์ในการนำธาตุไนโตรเจนไปใช้ของสาหร่ายขนาดเล็ก	31
ภาพ 8 กลไกของเซลล์ในการนำธาตุฟอสฟอรัสไปใช้ของสาหร่ายขนาดเล็ก	33
ภาพ 9 กระบวนการสังเคราะห์แสงในสาหร่ายขนาดเล็ก	38
ภาพ 10 กลไกของเซลล์ในการปรับระดับความเค็มให้เหมาะสมในสาหร่ายขนาดเล็ก.....	39
ภาพ 11 กรอบแนวคิดของการศึกษา.....	45
ภาพ 12 ปฏิบัติการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	51
ภาพ 13 การเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง.....	53
ภาพ 14 โคโรมาโทแกรมของสารมาตรฐาน all-trans β -carotene	61
ภาพ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน.....	62
ภาพ 16 ลักษณะโครมาโทแกรมขององค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนในสาหร่าย ..	63
ภาพ 17 กราฟมาตรฐานของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid.....	64
ภาพ 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจน.....	67

ภาพ 19 แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของสาหร่าย NUAC09.....	70
ภาพ 20 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	72
ภาพ 21 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจน.....	72
ภาพ 22 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจน	73
ภาพ 23 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจน.....	73
ภาพ 24 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัส	76
ภาพ 25 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัส	76
ภาพ 26 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัส.....	77
ภาพ 27 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัส.....	77
ภาพ 28 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณความเค็ม.....	80
ภาพ 29 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณความเค็ม	80
ภาพ 30 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณความเค็ม.....	81
ภาพ 31 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณความเค็ม.....	81
ภาพ 32 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนต.....	83
ภาพ 33 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนต.....	84
ภาพ 34 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนต	84
ภาพ 35 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนต	85
ภาพ 36 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน..	87
ภาพ 37 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนต.....	88
ภาพ 38 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนต	88
ภาพ 39 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนต	89

ภาพ 40 โครมาโทแกรมไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจน.....	91
ภาพ 41 สัดส่วนไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจน.....	91
ภาพ 42 โครมาโทแกรมไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัส.....	94
ภาพ 43 สัดส่วนไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัส.....	94
ภาพ 44 โครมาโทแกรมไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ความเค็ม.....	97
ภาพ 45 สัดส่วนไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ความเค็ม	98
ภาพ 46 โครมาโทแกรมไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนคาร์บอนที่แตกต่างกัน.....	100
ภาพ 47 สัดส่วนไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนคาร์บอนที่แตกต่างกัน.....	101
ภาพ 48 โครมาโทแกรมไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนคาร์บอนที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	103
ภาพ 49 สัดส่วนไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนคาร์บอนที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	104
ภาพ 50 การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่าย NUAC09	106
ภาพ 51 การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่าย NUAC09	108
ภาพ 52 การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่าย NUAC09	110
ภาพ 53 การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่าย NUAC09	112
ภาพ 54 การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่าย NUAC09	114

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เบต้าแคโรทีน (β -carotene) เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่พบได้ในผลไม้และผักที่มีรงควัตถุเป็นสีส้มและสีเหลือง โดยเบต้าแคโรทีนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงเป็นสารตั้งต้นของกรดวิตามินเอ (Harvey and Ben-Amotz, 2020) และที่สำคัญมนุษย์และสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนจากร่างกายได้ (Ye et al., 2008) เบต้าแคโรทีนที่พบมีอยู่ด้วยกันสองรูปแบบคือ แบบซิส (*cis*) มีอะตอมที่เหมือนกันจัดอยู่ด้านเดียวกัน และแบบทรานส์ (*trans*) มีอะตอมที่เหมือนกันจัดอยู่ในตำแหน่งตรงข้ามกัน ซึ่งการจัดเรียงตัวของกลุ่มอะตอมที่แตกต่างกันส่งผลต่อคุณสมบัติและการออกฤทธิ์ของเบต้าแคโรทีน (Tafreshi and Shariati, 2009) ในปัจจุบันเบต้าแคโรทีนถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม อาหารเสริม เครื่องสำอาง และทางด้านเภสัชกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งการเสริมเบต้าแคโรทีนในอาหารจะทำให้สัตว์น้ำเศรษฐกิจมีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น เช่น ปลาแพนซีคาร์ป (Kaur et al., 2016) กุ้งกุลาดำ (Supamattaya et al., 2005) และปลานิล (Hu et al., 2006) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามเบต้าแคโรทีนที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่กล่าวมานั้นได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีมากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งจะอยู่ในรูปไอโซเมอร์ทรานส์ทั้งหมด (Marino et al., 2020) ขณะที่เบต้าแคโรทีนที่ผลิตจากธรรมชาติ เช่น แครอท ปาล์ม พริกไทย มะม่วง ฟัก มะเขือเทศ บล็อกโคลี่ ข้าวโพด ฟักทอง และสาหร่าย (Khuo et al., 2011) จะอยู่ในรูปไอโซเมอร์ซิสและทรานส์ (*cis* และ *trans*) จากหลายงานวิจัยพบว่าเบต้าแคโรทีนในรูปซิสมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่ารูปแบบทรานส์ (Levin et al., 1994 ; Relevo et al., 2015 ; Weinrich et al., 2019) และข้อสำคัญคือซิสเบต้าแคโรทีนไม่สามารถสังเคราะห์จากกระบวนการเคมีได้ (Xu et al., 2018) จากรายงานพบว่าปี 2017 มูลค่าของเบต้าแคโรทีนสูงถึง 439 ล้านดอลลาร์สหรัฐและในอนาคตปี 2026 ความต้องการเบต้าแคโรทีนจะเพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่า และมีมูลค่าสูงถึง 618 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Ludwig et al., 2021) ขณะที่ปัจจุบันประเทศไทยและทั่วโลกได้มีความตระหนักเกี่ยวกับนโยบายเรื่องความปลอดภัยของอาหาร (food safety) โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทยที่ต้องนำเข้าเบต้าแคโรทีนจากต่างประเทศเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเสริมและอุตสาหกรรมยา ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาตินี้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นแหล่งของทรัพยากรที่อุดมไปด้วยแคโรทีนอยด์จากธรรมชาติ (Zhang et al., 2014) โดยเฉพาะสาหร่ายสายพันธุ์ *Dunaliella* เป็นสาหร่ายทนความเค็มสูง (0.05–5.0 M NaCl) และเป็นแหล่งทรัพยากรขนาดใหญ่ในการผลิตเบต้าแคโรทีน (14 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง) (Srinivasan et al., 2018) จากรายงาน Interclinical Laboratories (2010) ของประเทศออสเตรเลียพบว่าจากน้ำหนักแห้ง 100 กรัมของชีวมวลสาหร่าย *D. salina* สามารถสกัดเบต้าแคโรทีนได้ถึง 2,100 มิลลิกรัม ในขณะที่เบต้าแคโรทีนที่ได้จากแครอทพบเพียง 8.3 มิลลิกรัมเท่านั้น (ประมาณ 1,000 เท่า) นอกจากนี้โครงสร้างของเบต้าแคโรทีนที่ผลิตจากสาหร่าย *Dunaliella* นั้นมีความหลากหลายของรูปแบบไอโซเมอร์ เช่น 9-*cis*, 13-*cis*, 15-*cis* และ *all-trans* เป็นต้น (Orset and Young, 2000) โดยมีอัตราส่วนของซิสเบต้าแคโรทีนมากกว่าร้อยละ 50 ของไอโซเมอร์ทั้งหมด (Weinrich et al., 2019) จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าปัจจัยที่มีผลต่ออัตราส่วนระหว่างซิสและทรานเบต้าแคโรทีน ได้แก่ ความเข้มข้น ความยาวคลื่นแสง ธาตุอาหาร อุณหภูมิและความเค็ม เป็นต้น (Orset and Young, 2000; Gomez et al., 2003; Hu et al., 2008; Xu et al., 2018; Xu and Harvey, 2019) ดังนั้นการผลิตสาหร่ายที่มีศักยภาพในการสะสมเบต้าแคโรทีนได้สูงจะสามารถลดการนำเข้าเบต้าแคโรทีนจากต่างประเทศได้

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบของเบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *Dunaliella* มีน้อย เนื่องจากขาดองค์ความรู้ในเชิงลึกในการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ซิสเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย ขณะที่ประเทศไทยนับว่าเป็นประเทศที่มีความได้เปรียบด้านทรัพยากรเนื่องจากมีความหลากหลายของระบบนิเวศสูง ทั้งพืชพรรณ และสิ่งมีชีวิต อีกทั้งมีรายงานการพบสาหร่าย *Dunaliella* บริเวณอ่าวไทย (Powtongsook et al., 1995; Bhumibhamon et al., 2003) ดังนั้นจึงเป็นโอกาสดีในการศึกษาเกี่ยวกับสาหร่ายที่มีคุณค่าชนิดดังกล่าว จากการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจากนาเกลือบริเวณอ่าวไทย พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อสาหร่าย *Dunaliella* จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ NUAC07, NUAC08, NUAC09, NUAC13 และ NUACB ตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบเบื้องต้นพบว่าสายพันธุ์ NUAC09 มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ที่สูง สำหรับงานวิจัยนี้มีความประสงค์ในการศึกษาการจำแนกและระบุชนิดของสาหร่ายด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา รวมถึงศึกษาการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต การสะสมรงควัตถุ และองค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน และฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย NUAC09 สายพันธุ์ไทยที่คัดแยกมาจากนาเกลือบริเวณอ่าวไทย และผลผลิตจากการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาและส่งเสริมการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อการผลิตซิสเบต้าแคโรทีนในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อจำแนกและระบุชนิดสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* สายพันธุ์ NUAC09 ต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย
3. เพื่อศึกษาองค์ประกอบไอโซเมอร์ของเบต้าแคโรทีนและอัตราส่วนของซิสต่อทรานส์ในสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09
4. เพื่อศึกษากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09

1.3 ขอบเขตการวิจัย

การศึกษานี้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ที่คัดแยกได้จากอ่าวไทย และผ่านการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่ามีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ที่สูง โดยทำการจำแนกและระบุชนิดของสาหร่ายด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี และอแกเนลล์ของเซลล์ จากนั้นศึกษาลักษณะทางอนุชีววิทยาของพันธุ์ 18S rDNA และ ITS และศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ หลังจากนั้นทำการศึกษาปัจจัยการเลี้ยง ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม ไบคาร์บอเนต และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่แตกต่างกันเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การสะสมแคโรทีนอยด์ และผลผลิตชีวมวลของสาหร่าย รวมถึงวิเคราะห์องค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนและกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายที่ถูกเลี้ยงในแต่ละปัจจัย เพื่อที่จะสามารถนำไปปรับใช้ในการเลี้ยงเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หลังจากสิ้นสุดการทดลองจะทำให้ทราบถึงสายพันธุ์ของสาหร่ายที่นำมาศึกษาและทราบสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 มีการเจริญเติบโต การผลิตแคโรทีนอยด์ สัดส่วนของซิสเบต้าแคโรทีน และกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระให้สูงขึ้นในระดับห้องปฏิบัติการ (lab scale) นำไปสู่การได้สายพันธุ์สาหร่าย *Dunaliella* สายพันธุ์พื้นเมืองของไทยที่สามารถเจริญเติบโต ผลิตแคโรทีนอยด์ ผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน (β -carotene profile) และกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระที่มีสูงเพื่อสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาหรือต่อยอดไปสู่การเลี้ยงสาหร่ายเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.5 ระยะเวลาทำการวิจัยโครงการวิจัยฯ

ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ประจำปี 2563 ระหว่างเดือนกันยายน 2563 ถึงเดือนมีนาคม 2564

1.6 สถานที่ใช้สำหรับการวิจัยฯ

- 1.6.1 เพาะเลี้ยงสาหร่ายดุนาเลียเอลล่าในห้องปฏิบัติการนิเวศวิทยาและการจัดการทรัพยากรทางน้ำ สาขาวิทยาศาสตร์การประมง มหาวิทยาลัยนเรศวร
- 1.6.2 ตรวจวัดปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์จากสารสกัดสาหร่าย ณ ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
- 1.6.3 ทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดสาหร่าย ณ ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

1.7 สมมติฐานงานวิจัย

- 1.7.1 สามารถจำแนกและระบุชนิดของตัวอย่างสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา
- 1.7.2 ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อการเจริญเติบโต การสะสมรงควัตถุ ผลผลิตชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09
- 1.7.3 ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อองค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์ของสาหร่าย *D. salina* NUAC09
- 1.7.4 ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย *D. salina* NUAC09

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุมูลอิสระ (free radicals)

อนุมูลอิสระเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) ซึ่งทำให้ไม่เสถียร (unstable) และว่องไวในการทำปฏิกิริยา ตัวอย่างอนุมูลอิสระ เช่น superoxide anion, hydroxyl radical, singlet oxygen, peroxy nitrite สามารถจับกับโมเลกุลหลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ เช่น โปรตีน ลิพิด และสารพันธุกรรมเพื่อให้เกิดความเสียหายของอนุมูลอิสระเกิดขึ้นตลอดเวลาในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจน ผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) เช่น การหายใจปริมาณเซลล์เพื่อสร้างพลังงาน ซึ่งเกิดในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) นอกจากนี้เกิดจากการที่เซลล์เกิดการบาดเจ็บและการอักเสบจากการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม เป็นต้น อย่างไรก็ตามการสร้างอนุมูลอิสระหรือการกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระทั้งจากอนุมูลอิสระและสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radicals) ของ ROS และ RNS (Halliwell, 2001) ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากซึ่งไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ที่ถูกสร้างขึ้นในการกำจัดทำให้เกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคหัวใจขาดเลือด โรคความจำเสื่อม โรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาท โรคภูมิแพ้ โรคความผิดปกติเกี่ยวกับสายตา รวมถึงการแก่ชรา (Dhawan, 2014; Sarms et al., 2010) การทำลายอนุมูลอิสระอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระพบในผัก ผลไม้ และร่างกายสร้างได้เองตามธรรมชาติ

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์ มีทั้งที่อยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) อนุมูลอิสระและไม่ใช่อนุมูลอิสระ ซึ่งจะไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดอนุมูลอิสระตลอดเวลาและเกิดเป็นลูกโซ่ในสิ่งมีชีวิตที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน พบแหล่งผลิตอนุมูลอิสระจากหลายแหล่ง ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (immune system cells) เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวระหว่างเกิดการอักเสบ โดยจะผลิออกมาในรูปของ ROS และ oxy-radicals เป็นส่วนมาก

นอกจากนี้ยังผลิตได้จากกระบวนการสร้างพลังงานภายในเซลล์ เช่น ภาวะความเครียด (stress) มลภาวะ (pollution) ต่าง ๆ ทั้งทางอากาศและทางน้ำ สารพิษ ได้แก่ แร่ใยหิน (asbestos) เบนซีน (benzene) คาร์บอนมอนอกไซด์ (carbon monoxide) คลอรีน (chlorine) ฟอมาดีไฮด์

(formaldehyde) โอโซน (ozone) ยาสูบ (tobacco smoke) ลูทีน (lutein) ยาฆ่าแมลง (pesticides) คลอโรฟอร์ม (chloroform) คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (carbon tetrachloride) ยาบางชนิด เช่น Adriamycin, bleomycin, mitomycin C, nitrofurantoin และ chlorpromazine รวมถึงแอลกอฮอล์ สารเติมแต่งอาหาร กาแฟ และอาหารปิ้งย่าง (Dhawan, 2014)

2.1.1 อนุมูลอิสระสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ

1) Oxygen – centered radicals ซึ่งสร้างจากมัยโตคอนเดรีย โดยกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transport chain) และระบบของหลอดเลือดที่มีความผิดปกติ (cardiovascular system) ซึ่งอนุมูลอิสระอยู่ในรูปของ superoxide anion, hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical และ singlet oxygen เป็นต้น

2) Carbon – centered radicals ได้แก่ peroxy และ alkoxy radicals

3) Nitrogen – center free radicals ได้แก่ nitric oxide (NO) และผลพลอยได้ (by product) ของ nitric oxide เช่น nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-), peroxy nitrite ($ONOO^-$), 3 nitro tyrosine และ nitrogen dioxide (Mut-Salud et al., 2010)

2.3.2 บทบาทสำคัญของสาร ROS และสาร RNS เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบจากสาเหตุการติดเชื้อ (infection) การสูบบุหรี่ (smoking) หรือได้รับสิ่งกระตุ้นอื่น ๆ เช่น สารพิษ (toxins) ยาบางชนิด ทำให้เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่ไปยัง extra vascular tissue ทำให้เกิด cell proliferation และ tissue repair regeneration โดยที่อนุมูลอิสระทั้งรูป ROS และ RNS ไปมีผลทำลายโครงสร้างของลิพิด และโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) และทำลายโครงสร้างของดีเอ็นเอ เกิดการกระตุ้น transcription factors ผ่าน signal transduction pathways เช่น mitogen-activated protein kinase (MAPK) และ protein kinase C (PKC) ทำให้เกิดอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่อง และการเกิดความไม่สมดุลกับสารต้านออกซิเดชัน ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress นำไปสู่การทำลายโครงสร้างของสารพันธุกรรมเกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) หรือเซลล์ถูกกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนมากเกิดมะเร็ง ทำให้กระทบต่อคุณภาพชีวิตนำไปสู่การเกิดโรค (Robert et al., 2010; Mut – Salud et al., 2010) ภาวะของการเกิดอนุมูลอิสระจำนวนมาก นำไปสู่การเกิดโรค ได้แก่ มะเร็ง โรคหลอดเลือดแดงแข็ง มาลาเรีย อาการลำไส้รั้ง โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ และการเสื่อมของระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน และโรคทางพันธุกรรม

2.1.3 ความเสื่อมชรา กับอนุมูลอิสระ

ความชราภาพเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในระบบต่าง ๆ ของร่างกายไปตามกาลเวลา ซึ่งทำให้สมรรถภาพ การทำงานของร่างกายลดลง ทฤษฎีด้านกลไกที่ก่อให้เกิดความเสื่อมชราคือถ้ามีอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม หรือเกิดจากการกระตุ้นด้วยปัจจัยภายนอก เช่น แสงแดด ความเครียด การนอนหลับที่ไม่เพียงพอ ความเจ็บป่วยเรื้อรัง จะทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อต่าง ๆ ต่อเยื่อผิวหรืออาจเข้าไปถึงนิวเคลียสของเซลล์ทำให้เกิดความเสื่อมชราขึ้น (Vaupel, 2010) หนึ่งในความเสื่อมชราที่เห็นได้ชัดและได้รับความสนใจเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ คือ การเสื่อมของผิว (Skin aging) เพราะเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน อาจเกิดจากปัจจัยภายนอกหรือภายในร่างกายเช่นปัจจัยทางพันธุกรรมทำให้ผิวหนังเปลี่ยนแปลงไปเกิดริ้วรอยแบบละเอียดหรือแบบลึก ผิวหนังแห้งหยาบและไม่มี ความยืดหยุ่นได้ โดยกลไกการเกิดริ้วรอยของผิวหนังอาจเกิดจากสิ่งกระตุ้น เช่น แสงอัลตราไวโอเลต การสูบบุหรี่ที่สามารถทำลายเนื้อเยื่อคอลลาเจนในผิวหนังทำให้เกิดริ้วรอยขึ้น (Nagata et al. 2010)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชสีเขียวและเหลืองที่อยู่ในกลุ่มแคโรทีนอยด์ จะช่วยทำให้การเกิดริ้วรอยลดลง (Nagata et al., 2010) สารแคโรทีนอยด์เป็นกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถพบได้ในผักและผลไม้ที่มีสีแดง สีส้ม และสีเหลือง เป็นต้น

รวมถึงยังสามารถพบได้ในสาหร่าย โดยที่ปริมาณชนิดและประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของสาหร่าย โดยสาหร่ายสีเขียวจัดว่าให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีน้ำตาลและสีแดง ตามลำดับ (Mohamed et al., 2012) สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสาหร่ายจะเป็นสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลและแคโรทีนอยด์ ซึ่งมีการนำมาใช้ในการป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหลอดเลือดและหัวใจ การลดการอักเสบและในด้าน การชะลอวัย เช่น ฟิวโคแซนทีน (fucoxanthin) แอสตาแซนธิน (astaxanthin) และ เบต้าแคโรทีน (β -carotene) ซึ่งจัดว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (Mohamed et al., 2012; Ngo, et al., 2011)

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009) สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (chelate)

กับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ (Sies, 1992) สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ (Chattopadhyay et al., 2010) โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) (Veliloglu et al., 1998) บทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร ปัจจุบันองค์กรที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหาร และยา ได้พยายามพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ เช่น สาหร่ายทะเล แบคทีเรีย เชื้อรา และพืชชั้นสูง (Chattopadhyay et al., 2010) อย่างไรก็ตามในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระอยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และส่วนที่สองคือ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือ เบต้าแคโรทีน (β -carotene) รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นพฤษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผักและผลไม้เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น (Shapoval and Gromovaia, 2003) ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย เช่น เอนไซม์คะตะเลส (catalase) กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส (glutathione peroxidase) และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) หรือสารประกอบ/โปรตีนบางอย่าง เช่น อัลบูมิน (albumin) บิลิรูบิน (bilirubin) เซอรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin) กลูตาไธโอน (glutathione) ทรานสเฟอริน (transferrin) ยูบิควินอล (ubiquinol) และยูเรต (urate) เป็นต้น สารเหล่านี้มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่าง ๆ ให้อยู่ในปริมาณพอเหมาะ แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินไปที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมดจะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า สภาวะออกซิเดชัน (oxidative stress) ขึ้นภายใต้สภาวะดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อของร่างกาย ถ้าหากเกิดการสะสมในปริมาณมากอาจนำไปสู่ความผิดปกติหรือพยาธิสภาพหลายอย่างตามมา

2.3 แคโรทีนอยด์ (carotenoid)

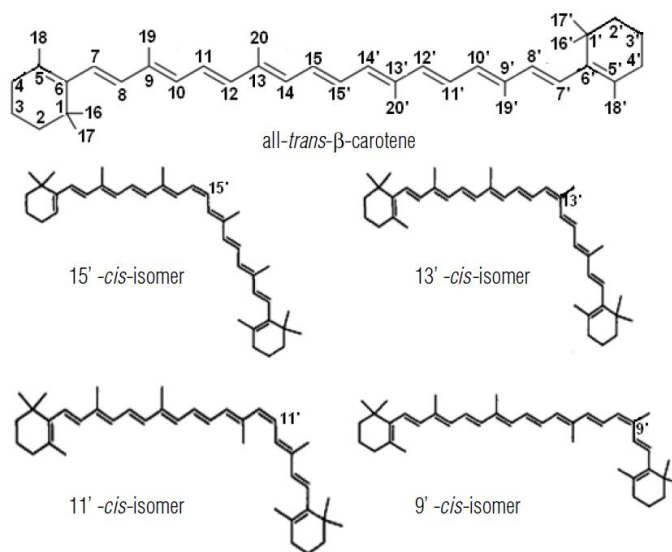
แคโรทีนอยด์เป็นสารประเภทอะลิฟาติก (aliphatic) อะลิฟาติก-อะลิไซคลิก (aliphatic alicyclic) หรือ แอโรมาติก (aromatic) โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วย กลุ่มไอโซพรีนที่มีคาร์บอน 5 ตัว (5 carbon isoprene groups) โดยทั่วไปจะอยู่ในรูปกลุ่มไอโซพรีน 8 โมเลกุลมาเชื่อมติดกัน มีกลุ่มเมทิล (methyl group) 2 กลุ่ม อยู่ติดกับศูนย์กลางของโมเลกุลในตำแหน่งที่ 1 และ 6 และกลุ่มเมทิลอื่นที่เหลืออยู่ในตำแหน่งที่ 1 และ 5 ของลำดับชุดของคาร์บอน-คาร์บอนพันธะคู่ (C-C double bonds) ประกอบอยู่ในระบบโครโมโฟริก (chromophoric) แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.3.1 แคโรทีน (carotene) มีสีส้ม เป็นสารจำพวกไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีออกซิเจนมีเพียงไฮโดรเจนและคาร์บอนในโมเลกุล (oxygen-free hydrocarbon) มี 3 ชนิด ได้แก่ แอลฟา เบต้าและเอปซีลอนแคโรทีน

2.3.1 แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) หรือออกซีแคโรทีนอยด์ (oxycarotenoid) มีสีเหลืองเป็นสารจำพวกอนุพันธ์ไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนรวมอยู่ด้วย (oxygenated derivative) ของแคโรทีน มีหลายชนิด เช่น ลูทีน (lutein) ฟูโคแซนทิน (fucoxanthin) มิกโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll)

2.4 เบต้าแคโรทีน (β -carotene)

เบต้าแคโรทีนเป็นสารสีแคโรทีนอยด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของแคโรทีน (carotenoid group) มีโครงสร้างทางเคมีประกอบไปด้วยเส้นสายคาร์บอนไม่อิ่มตัว 40 อะตอม (C-40 unsaturated hydrocarbon) สูตรโมเลกุลคือ $C_{40}H_{56}$ น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 536.9 มีจุดหลอมเหลว (melting point) เท่ากับ 184 องศาเซลเซียส มีพันธะคู่ 11 พันธะ เมื่อทำให้บริสุทธิ์จะมีลักษณะเป็นผลึกจะมีสีแดงหรือม่วง ถ้าละลายอยู่ในน้ำมันจะให้สีเหลืองถึงส้ม ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ของเบต้าแคโรทีนที่พบในธรรมชาติมี 4 รูปแบบ (isomerases) คือ *all-trans*, *9-cis*, *13-cis* และ *15-cis* (ภาพ 2) โครงสร้างและคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของ *all-trans* β -carotene จะละลายได้ยากในน้ำมัน และสารละลายอินทรีย์ จึงมีแนวโน้มจะตกผลึกได้ง่าย ในขณะที่ *9-cis* β -carotene สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ จึงมีแนวโน้มที่จะตกผลึกได้ยาก ซึ่งโดยทั่วไปสามารถเก็บรักษาไว้ได้ในรูปของน้ำมัน (Ben-Amotz and Avron, 1990) และอัตราส่วนของ *all-trans* กับ *9-cis* β -carotene จะแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด



ภาพ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน

ที่มา: Ye และคณะ (2008)

2.4.1 บทบาทของเบต้าแคโรทีนต่อมนุษย์

1) เป็นสารที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) และป้องกันแสง (photoprotection) เบต้าแคโรทีนเป็นรงควัตถุประกอบ (accessory pigment) ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำหน้าที่เป็นตัวถ่ายทอดพลังงานรังสีที่ได้รับแล้วส่งต่อไปยังคลอโรฟิลล์ เอ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วยรังสีจากแสง ซึ่งพบครั้งแรกในแบคทีเรีย *Rhodospseudomonas sphaeroids* เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมกับสายพันธุ์ที่เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งไม่มีแคโรทีนอยด์ พบว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ให้สัมผัสกับอากาศและแสง สายพันธุ์ที่เกิดการกลายพันธุ์จะหยุดการเจริญเติบโตเนื่องจากคลอโรฟิลล์ถูกทำลายและตายในที่สุด ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิมสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เป็นการพิสูจน์ว่าคลอโรฟิลล์ไวต่อการถูกทำลายได้ด้วยแสง หากไม่มีแคโรทีนอยด์ช่วยปกป้องเซลล์โดยทำหน้าที่เหมือนม่านกรองแสง (Gross, 1987)

2) เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (provitamin A) ในสัตว์ชั้นสูง โดยสารเบต้าแคโรทีน 1 โมเลกุล สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ 2 โมเลกุล ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ จะเห็นว่ากระบวนการนี้จะเกิดขึ้นในลำไส้เล็ก ถึงแม้ว่าเบต้าแคโรทีน 1 โมเลกุล สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ 2 โมเลกุล แต่ผลจากการทดสอบทางชีวภาพพบว่าเมื่อให้เพียงครึ่งโมเลกุลเท่านั้นที่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามิน เอ ได้ ดังนั้นเบต้าแคโรทีน ความเข้มข้น 0.6 ไมโครกรัม จะเท่ากับวิตามิน เอ 0.3 ไมโครกรัม หรือวิตามิน เอ 1 IU ขณะที่การบริโภควิตามินเอมากเกินไปจะเป็นพิษต่อร่างกาย อาจมีผลรุนแรงทำ

ให้ตับเสื่อมเพราะวิตามินเอจะคั่งอยู่มากในตับ แต่การบริโภคเบต้าแคโรทีนหรือสารตั้งต้นวิตามิน เอ (provitamin A) จากอาหารหรืออาหารเสริมไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย ถ้ารับประทานมากเกินไป จะส่งผลข้างเคียงคือทำให้ตัวเหลืองเท่านั้นหากเลิกรับประทานสีเหลืองก็จะหายไป (Van Loo-Bouwman et al., 2014)

3) เป็นสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) คือสามารถลดอนุมูลอิสระในร่างกายและจับออกซิเจนอะตอมเดี่ยวซึ่งมักจะพบมากในสภาพที่มีมลภาวะทางอากาศ จากคุณสมบัตินี้ทำให้มีความสนใจที่จะนำเบต้าแคโรทีนมาทำเป็นอาหารเสริมสุขภาพป้องกันร่างกายจากการทำลายของอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ ได้ เช่น โรคแก่ก่อนวัย โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจโรคต่อกระดูก และโรคระบบภูมิคุ้มกันทำงานผิดปกติ เป็นต้น

2.4.2 การใช้ประโยชน์จากเบต้าแคโรทีนต่อมนุษย์

1) สัตว์ธรรมชาติ เบต้าแคโรทีนมีสีเหลืองถึงส้ม และมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยใช้กับอาหารจำพวกไขมัน เนื่องจากไม่เป็นพิษ สะดวกในการละลายในไขมัน (Bramley et al., 1993) เช่น เนยแข็ง เนยเทียม มายองเนส น้ำมันปรุงอาหาร น้ำผลไม้ เครื่องดื่ม เจลลี่ ชูปังง ชูปังกระป๋อง น้ำผลไม้ นมเปรี้ยว และไอศกรีม เนื่องจากเบต้าแคโรทีนละลายน้ำได้ยากจึงมีเทคนิคต่าง ๆ ที่ทำให้ละลายในน้ำได้และใช้เป็นสารให้สีในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น น้ำเชื่อม ขนมอบัง ผลิตภัณฑ์จากไข่ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อ (Van Loo-Bouwman et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีการใช้เบต้าแคโรทีนผสมในอาหารสัตว์เพิ่มสีในสัตว์น้ำ เช่น ปลาแซลมอน ใช้ผสมอาหารไก่เพื่อเพิ่มสีในไข่แดง และอาหารวัวเพื่อปรับปรุงสุขภาพและระบบสืบพันธุ์ของวัวควาย (Borowitzka, 1988) และยังใช้เป็นสีเคลือบแคปซูลผสมในเครื่องสำอางต่าง ๆ (Bauernfeind, 1981)

2) ทางด้านเภสัชกรรม มีการใช้เบต้าแคโรทีนรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรค erythropoietin และprotoporphyrin เนื่องจากผู้ป่วยที่เป็นโรคดังกล่าวจะมีผิวหนังมีความไวต่อแสงมากเกินไปเมื่อถูกแสงจะทำให้เกิดออกซิเจนเดี่ยวไร้คู่ ไปทำลายเซลล์ของผิวหนังทำให้รู้สึกร้อนที่ผิวหนังตามด้วยผิวหนังคันและบวม (Van Loo-Bouwman et al., 2014) เช่นเดียวกับ Alaluf และคณะ (2002) ได้ศึกษาผลของการใช้เบต้าแคโรทีนที่สกัดจาก *D. salina* รักษาคนที่เป็นโรคผิวหนังพบว่า การรับประทานเบต้าแคโรทีน 50 มิลลิกรัมต่อวัน จะทำให้ผิวหนังมีสีเหลือง รวมถึงลดอาการแพ้ของผิวหนังสัมผัสกับแสงแดดได้

2.4.3 คุณสมบัติที่แตกต่างของเบต้าแคโรทีนที่ได้มาจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์

ปัจจุบันเบต้าแคโรทีนถูกแบ่งเป็น 2 ประเภทตามแหล่งที่มา คือ เบต้าแคโรทีนที่มาจากธรรมชาติ พบได้ในพืช ผัก ผลไม้ และสาหร่ายบางชนิด โดยจะมีรูปแบบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนที่ประกอบด้วยแบบ *cis* และแบบ *trans* β -carotene รวมกัน ขณะที่ปริมาณอัตราส่วนที่ต่างกันไป ส่วนเบต้าแคโรทีนอีกประเภท คือ เบต้าแคโรทีนที่มาจากสังเคราะห์ด้วยสารเคมี โดยจะมีไอโซเมอร์อยู่ในรูปของ *all-trans* β -carotene เท่านั้น ทำให้คุณสมบัติของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนแบบสังเคราะห์ทางเคมี หรือเบต้าแคโรทีนรูปแบบ *all-trans* นั้นละลายได้ยากในน้ำมันและเกิดการตกผลึกง่าย ทำให้เกิดสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต เมื่อเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของเบต้าแคโรทีนแบบ *cis* β -carotene ที่พบได้ในธรรมชาติสามารถละลายได้ดีในน้ำมัน ดังนั้นจะส่งผลต่อการตกผลึกได้ยาก จึงส่งผลทำให้เกิดสารตกค้างน้อยและไม่เป็นอันตราย (Ben-Amotz and Avron, 1990) จากงานวิจัยของ Nikookar และคณะ (2004) พบว่ารงควัตถุที่พบในสาหร่าย *D. salina* เป็นรงควัตถุชนิดเดียวกันกับที่พบในรงควัตถุของผักขมและแครอท นอกจากนี้มีหลายงานวิจัยยืนยันว่าการบริโภคเบต้าแคโรทีนจากธรรมชาตินั้นมีผลต่อการป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคสะเก็ดเงิน โรคจอประสาทตาเสื่อม และโรคอื่นๆ ได้ (Harari et al., 2008; Relevy et al., 2015) ขณะเดียวกันมีการรายงานว่าการบริโภคเบต้าแคโรทีนจากการสังเคราะห์ทางเคมีเป็นสาเหตุมีแนวโน้มต่อการเกิดโรคมะเร็งได้

Levin และ Mokady (1994) ศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสาร *9-cis* β -carotene ที่มาจากสาหร่าย *Dunaliella* เปรียบเทียบกับสารเบต้าแคโรทีนสังเคราะห์ *all-trans* ผลการทดลองพบว่าชุดการทดลอง *9-cis* เบต้าแคโรทีนจากสาหร่าย *Dunaliella* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ hydrogen peroxide ได้ดีกว่า (มากกว่า 1.3 ถึง 2.4 เท่า)

Murthy และคณะ (2005) ศึกษาการแสดงออกของการต้านอนุมูลอิสระของแคโรทีนอยด์จาก *D. salina* แบบเซลล์แห้ง ผลการศึกษาพบว่าการเสริมสาหร่าย *D. salina* ในอาหารให้กับหนูทดลองที่ความเข้มข้น 125 และ 250 ไมโครกรัมต่ออาหารหนึ่งกิโลกรัม ส่งผลทำให้ปริมาณของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ catalase (CAT) peroxidase (GPX) และ superoxide dismutase (SOD) ในหนูทดลองเพิ่มขึ้น คิดเป็นร้อยละ 54.0, 58.0 และ 90.0 เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่เสริมสารแคโรทีนอยด์เคมีสังเคราะห์

Shaish และคณะ (2006) ศึกษาผลของ *9-cis* β -carotene จากสาหร่าย *Dunaliella* ต่อการเพิ่มขึ้นของพลาสมา HDL-cholesterol ในกลุ่มผู้ป่วยออสมาศ ผลการศึกษาพบว่า การเสริม

สำหรับ *Dunaliella* แบบแห้งที่มีอัตราส่วนไอโซเมอร์ *cis* ต่อ *trans* β -carotene ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 นั้นมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของไขมันดีชนิด HDL-cholesterol มากถึงร้อยละ 25 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้เบต้าแคโรทีนในรูป *all-trans*

Relevy และคณะ (2015) ศึกษาผลของเบต้าแคโรทีนต่อการยับยั้งโรคภาวะหลอดเลือดแข็งตัวในหนูทดลอง ผลการศึกษาพบว่า การเสริม 9-*cis* β -carotene ที่สกัดจากสาหร่าย *Dunaliella* มีส่งผลต่อการลดลงของปริมาณปริมาณของคลอเรสเตอรอลประเภท non-HDL อย่างมีนัยสำคัญ (มากกว่าร้อยละ 39) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดความชุกควบคุมที่เป็น *all-trans* β -carotene นอกจากนี้ปริมาณคลอเรสเตอรอลชนิด non-HDL ที่ลดลงนั้นทำให้เกิดโรคภาวะหลอดเลือดแข็งที่ลดลงตามไปด้วย

นอกจากนี้การศึกษาของ Weinrich และคณะ (2019) พบว่าในแมลงวันสายพันธุ์ *Drosophila melanogaster* หลังได้รับสารเบต้าแคโรทีนในรูป 9-*cis* β -carotene ที่สกัดจากสาหร่าย *Dunaliella* ในอาหารนั้น ส่งผลต่อการทำงานของกระบวนการเมตาบอลิซึมในการผลิตสาร ATP และปริมาณของอัตราการหายใจปริมาณเซลล์ให้เพิ่มขึ้น รวมถึงกระตุ้นพฤติกรรมเคลื่อนไหวในแมลงวัน เมื่อเปรียบเทียบกับสารเบต้าแคโรทีนสังเคราะห์ (synthetic *all-trans* β -carotene)

2.5 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ได้มาจากพืชผัก เครื่องเทศ สมุนไพร และสาหร่ายนั้นกำลังได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดจากธรรมชาติ โดยสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิดได้แก่

2.5.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์ 5 ชนิดได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylated hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน อันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Pokorny et al., 2001)

2.5.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่า

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิกโดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น แชนโธน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชัน (functional group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูล H^- แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอล ที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe_2^+ และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) (Sanchez-Moreno et al., 2000) สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล ซึ่งพบในพืชพรรณธรรมชาตินานาชนิดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการ (in vitro) และในสิ่งมีชีวิต

2.6 สาหร่ายแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ

สาหร่ายเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีประวัติการค้นพบและความเป็นมายาวนานตั้งแต่ยุคสมัยหิน โดยสาหร่ายมีความแตกต่างจากพืชที่โตบนพื้นแผ่นดินตรงที่ไม่มีราก ไม่มีใบ และระบบลำเลียงอาหาร แต่จะใช้ระบบออสโมซิสดูดซึมอาหารเพื่อใช้ในการเติบโต สาหร่ายมีคุณสมบัติที่มีไขมันปริมาณน้อย มีโปรตีน เส้นใยอาหาร กรดไขมันไม่อิ่มตัว และวิตามิน เกือบร้อยละ 50 เช่น วิตามินบี 1 บี 12 บี 3 บี 5 บี 6 วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินดี ไอโอดีน แคลเซียม ฟอสฟอรัส และโซเดียม รวมถึงสาหร่ายยังมีสารพฤกษเคมีตามธรรมชาติ เช่น กลุ่มโพลีแซคคาไรด์ ไกลโคโปรตีน และสารต้านอนุมูลอิสระประสิทธิภาพสูงหลากหลายชนิดเช่น โพลีฟีนอล โทโคฟีรอล และแคโรทีนอยด์ (Gupta and Abu-Ghannam, 2011) นอกเหนือจากให้สารอาหารหลักแก่ร่างกาย สาหร่ายยังมีการศึกษาค้นคว้ากันอย่างกว้างขวางถึงประโยชน์ด้านสุขภาพต่าง ๆ ได้แก่

2.6.1 สารสกัดจากสาหร่ายจำพวกประเภท เทอปีน ฟีนอล และลิโปอิกแอซิดที่มีฤทธิ์ในการต้านการเติบโตของแบคทีเรียสามารถต้านการโตของแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Gupta and Abu-Ghannam, 2011)

2.6.2 เป็นแหล่งของอัลจิเนต (alginate) ซึ่งเป็นใยอาหารที่พบในสาหร่ายเท่านั้น ไม่พบในพืชชั้นสูงอื่น ๆ ช่วยยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอล ลดความดัน ช่วยในการทำงานของระบบย่อยอาหารและลำไส้ จึงมีการนำมาใช้ป้องกันการเกิดเมตาบอลิกซินโดรม (Holdt and Kraan, 2011)

2.6.3 ฟุคอนแดน (fucoxanthins) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารโพลีแซคคาไรด์ในผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาล มีรายงานการใช้ในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ต้านไวรัส กระตุ้น การทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ป้องกันการเกิดมะเร็ง และยังมีการใช้ป้องกันการเกิดอัลไซเมอร์และการชะลอความเสื่อมของร่างกาย เป็นต้น (Susan and Kraan, 2011)

2.6.4 สาหร่ายสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ใหญ่ ๆ ดังนี้

1) สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) สามารถพบได้ทั้งที่อยู่บริเวณพื้นทะเล ริมฝั่งทะเล หรืออยู่ในน้ำทะเล เช่นพวกไฟโตแพลงตอน เป็นต้น

2) สาหร่ายขนาดใหญ่ (macroalgae) หรืออาจเรียกว่าซีวีด (seaweeds) สามารถพบได้บริเวณริมฝั่งทะเลซึ่งจะเติบโตแตกต่างกันไปตามปริมาณความลึกของน้ำทะเล (Gupta and Abu-Ghannam, 2011) สาหร่ายที่ถูกค้นพบแล้วมีทั้งหมด 221 สายพันธุ์ ถูกจัดอยู่ในไฟลัมคลอโรไฟตา 32 สายพันธุ์ ไฟลัมเฟโอไฟตา 64 สายพันธุ์และไฟลัมโรโดไฟตา 125 สายพันธุ์ (Dhargalkar and Verlecar, 2009) นอกจากนี้สาหร่ายกว่า 145 สายพันธุ์ (66%) มีการนำมาใช้เป็นอาหารมาอย่างยาวนาน โดยความนิยมในการบริโภคในประเทศแถบเอเชีย เช่น ในประเทศญี่ปุ่น จีนและเกาหลีมีมากกว่าแถบยุโรป พบว่าปริมาณการบริโภคสาหร่ายในยุโรปอยู่ที่ประมาณ 70 ต้นต่อปี ในขณะที่ในญี่ปุ่นมีการบริโภคอยู่ที่ 97,000 ต้นต่อปี (Fleurence, et al., 2012)

2.6.5 สาหร่ายแบ่งออกเป็นกลุ่มตามโครงสร้างและสีของสารสังเคราะห์แสงได้ 3 กลุ่ม คือ

1) สาหร่ายสีแดง จัดอยู่ในไฟลัมโรโดไฟตา (Phylum Rhodophyta) ในสาหร่ายสีแดงจะมีรงควัตถุกลุ่มไฟโคอีริทริน (Phycoerythrin) และไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) อยู่มาก ซึ่งรงควัตถุเหล่านี้เองที่ทำให้สาหร่ายมีสีที่ต่างกัน (Gupta and Abu-Ghannam, 2011; Pangestuti, and Kim, 2011)

2) สาหร่ายสีน้ำตาล จัดอยู่ในไฟลัมเฟโอไฟตา (Phylum Phaeophyta) สาหร่ายสีน้ำตาลมีรงควัตถุกลุ่มแซนโทฟิลล์จำพวก ฟิวโคแซนทิน (fucoxanthin) ที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันที่ปริมาณเซลล์ และนอกจากนี้ผลจากการทดลองพบว่าฟิวโคแซนทินสามารถปกป้องเซลล์ผิวหนังจากการทำร้ายด้วยรังสียูวีบี นอกจากนี้ในสาหร่ายสีน้ำตาลยังมีสารสำคัญที่ช่วยรักษาบาดแผลที่ผิวหนังอีก

หลายชนิด เช่น แอลจีเนต (alginate) เป็นไฮโดรคอลลอยด์ กลุ่มโพลีแซคคาไรด์สามารถยับยั้งการเกิดแผลเป็น ช่วยเร่งการผสานกันของแผลที่ผิวหนัง และยังพบฟูคอยแดน (Fucoidan) ซึ่งเป็นสารประกอบซัลเฟตของโพลีแซคคาไรด์ที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังในกลไกการซ่อมแซมเซลล์ (Mohamed et al., 2012)

3) สาหร่ายสีเขียว จัดอยู่ในไฟลัมคลอโรไฟตา (Phylum Chlorophyta) ในสาหร่ายสีเขียวจะมีรงควัตถุกลุ่มคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บีในสัดส่วนเดียวกับพืชชั้นสูง อีกทั้งยังมีสารเบต้าแคโรทีนและสารแซนโทฟิลล์อีกด้วย (Gupta and Abu-Ghannam, 2011; Pangestuti and Kim, 2011) นอกจากนี้สาหร่ายเขียวยังพบสารแอสตาแซนธิน (Astaxanthin) เป็นรงควัตถุสีแดงเข้ม คล้ายสีของทับทิมอีกด้วย (Yuan et al., 2011) พบว่า แอสตา-แซนธินมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยวหรือค่าแสดงการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด โดยมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารเบต้าแคโรทีน สารโคเอนไซม์คิวเทน สารคาทีชิน วิตามินอีและวิตามินซี (Nishida, et al., 2007; Shimidzu, et al., 1996) ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยถึงการนำสารแอสตาแซนธินไปใช้ประโยชน์ด้านสุขภาพและความงามหลากหลายด้านอย่างต่อเนื่อง (Suganuma et al., 2010; Yamashita, 2002; Yuan et al., 2011)

2.7 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายและการนำมาใช้ประโยชน์

ปัจจุบันนี้มนุษย์ต้องประสบกับปัญหาสุขภาพมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการเสื่อมของอวัยวะก่อนวัยอันควร การเกิดโรคหัวใจ โรคภูมิแพ้ หรือแม้แต่ว่าความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง สิ่งกระตุ้นหลักที่ก่อให้เกิดปัญหาเหล่านี้มาจากการได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อม การบริโภคอาหารที่ไม่มีคุณค่าทางโภชนาการ รวมทั้งความเครียดจากปัญหาต่าง ๆ ในชีวิตประจำวัน สิ่งกระตุ้นดังกล่าวส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในร่างกาย การสะสมของอนุมูลอิสระที่มากเกินไปจนควรส่งผลให้ร่างกายเสียสมดุลและเป็นสาเหตุให้เกิดโรคในที่สุด ด้วยเหตุนี้ มนุษย์จึงพยายามเสาะหาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อนำมายับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในร่างกาย เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีอิเล็กตรอนอยู่ภายในโมเลกุลเป็นจำนวนมาก จึงสามารถให้อิเล็กตรอนกับโมเลกุลของอนุมูลอิสระ และส่งผลให้เกิดความเสถียรขึ้นภายในโมเลกุล รวมถึงหยุดการก่อตัวขึ้นใหม่ของอนุมูลอิสระ (Sies, 1992)

2.7.1 การใช้ประโยชน์ของสาหร่ายขนาดเล็ก มีอยู่ 7 รูปแบบ ได้แก่

1) การใช้สาหร่ายเป็นดัชนีชี้วัดระบบนิเวศ

สาหร่ายเป็นผู้ผลิตของระบบนิเวศในน้ำโดยสาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตเนื่องจากปัจจัยหลายประการ เช่น แสง ปริมาณสารประกอบคาร์บอน สารอาหาร เป็นต้น โดยแพลงก์ตอนสัตว์จะกินสาหร่ายเป็นอาหาร ซึ่งแพลงก์ตอนสัตว์เหล่านี้จะกลายเป็นอาหารของสัตว์น้ำอื่น ๆ ต่อไป และเมื่อสาหร่ายตายลง มวลชีวภาพของสาหร่ายยังเข้าสู่วัฏจักรการย่อยสลายโดยแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่มีในน้ำจึงอาจกล่าวได้ว่าสาหร่ายเป็นผู้ผลิตที่ถ่ายทอดพลังงานต่อไปในห่วงโซ่อาหาร (สรวิศ, 2543)

นอกจากนี้สาหร่ายยังสามารถใช้เป็นตัวดัชนีบ่งบอกคุณภาพน้ำ ซึ่งถือเป็นการตรวจวัดคุณภาพน้ำทางชีวภาพ โดยสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำสามารถทนต่อปัจจัยสิ่งแวดล้อมในแหล่งน้ำได้แตกต่างกัน บางชนิดสามารถปรับตัวในน้ำที่มีคุณภาพน้ำดี บางชนิดสามารถปรับตัวได้ดีในน้ำที่มีคุณภาพน้ำเสีย สัตว์น้ำส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการหายใจ สัตว์ส่วนมากชอบอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่สะอาด มีออกซิเจนสูง แต่ก็มีหลายชนิดอยู่ในที่ซึ่งมีออกซิเจนน้อยได้และบางชนิดก็ทนอยู่ได้ในที่เกือบไม่มีออกซิเจนเลย แหล่งน้ำที่เกิดการปนเปื้อนจะมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำลดลง เนื่องจากการใช้ออกซิเจนของจุลินทรีย์ ดังนั้นสัตว์ที่ต้องการออกซิเจนมากก็จะตายหรือหนีไป เหลือเฉพาะกลุ่มสัตว์ที่อาศัยอยู่ได้ในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนน้อยเราจึงใช้สัตว์เหล่านี้ตรวจคุณภาพน้ำได้ จากงานวิจัยของยูวดี และคณะ (2550) ได้ยกตัวอย่างชนิดของสาหร่ายที่สามารถบ่งบอกคุณภาพน้ำได้ ดังนี้

- สาหร่ายที่บอกคุณภาพน้ำดี ได้แก่ ไดโนบริออน (*Dinobryon* sp.) ยูแอสตรัม (*Euastrum* sp.) พินนูลาเรีย (*Pinnularia* sp.) คลอสเทรียม (*Closterium* sp.) เป็นต้น
- สาหร่ายที่บอกคุณภาพน้ำปานกลาง ได้แก่ ฟรากิลลาเรีย (*Fragilaria* sp.) วิคูล่า (*Navicula* sp.) เทตระอีดอน (*Tetraedron* sp.) ซิกเนมา (*Zygnema* sp.) เซอราเตียม (*Ceratium* sp.) เป็นต้น
- สาหร่ายที่บอกคุณภาพน้ำเสีย ได้แก่ ฟากัส (*Phacus* sp.) ออสซิลาทอเรีย (*Oscillatoria* sp.) ยูกลีนา (*Euglena* sp.) สไปรูลิना (*Spirulina* sp.) เป็นต้น

2) การใช้สาหร่ายในทางอุตสาหกรรมยา โดยจากการศึกษาของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Scytonema* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดได้ (Priyadarshani and Rath, 2012)

3) การใช้สาหร่ายในทางการเกษตรกรรม โดยใช้เพื่อผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizers) เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Nostoc*, *Anabaena*, *Scytonema* เป็นต้น เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเหล่านี้มีเมือกหนาหุ้มเซลล์ จึงเหมาะที่จะใช้เป็นวัสดุในการปรับปรุงคุณภาพดินและดูดเก็บความชื้นให้แก่พืช นอกจากนี้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิดยังมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศเพื่อใช้ในกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ ทำให้ไม่จำเป็นต้องให้สารอาหารอนินทรีย์ไนโตรเจนแก่สาหร่ายชนิดนี้ จึงได้มีงานวิจัยมากมายที่มีแนวคิดที่จะนำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนี้มาเป็นปุ๋ยชีวภาพให้นาข้าว เพื่อลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนซึ่งมีราคาแพง (Spolaore et al., 2006)

4) การใช้สาหร่ายเป็นอาหารสัตว์หรือเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ในประเทศแถบยุโรป นิยมใช้สาหร่ายทะเลเป็นอาหารสัตว์ เช่น กระป๋อง โค แพะ แกะ เนื่องจากสัตว์เหล่านี้มีน้ำย่อยพิเศษสามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของสาหร่ายซึ่งเป็นพวกเซลล์ลูโลสได้ นอกจากนี้ยังมักใช้สาหร่ายสไปรูลินาเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์น้ำเพื่อเร่งสี เนื่องจากสีที่เกิดขึ้นบนตัวปลาโดยทั่วไปจะเป็นสีของรงควัตถุที่เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ และเนื่องจากสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้เอง จึงจำเป็นต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น ดังนั้นความเข้มของสีที่ปรากฏบนผิวปลาจะขึ้นอยู่กับปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากอาหารนั่นเอง นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำบางชนิดมีความจำเป็นต้องใช้สาหร่ายเพื่อเป็นอาหารสัตว์น้ำทั้งในทางตรงและทางอ้อม โดยในทางตรงคือการใช้เป็นอาหารของลูกสัตว์น้ำ โดยเฉพาะลูกกุ้ง หรือหอยสองฝา และทางอ้อมคือการใช้สาหร่ายเป็นอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์ แล้วนำแพลงก์ตอนสัตว์ไปเป็นอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อน (Madeira et al., 2017)

5) การใช้สาหร่ายเป็นพืชพลังงานเพื่อการสกัดผลผลิตน้ำมัน (Demirbas and Demirbas, 2011) โดยค่าผลผลิตน้ำมันของพืชน้ำมันชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับของสาหร่าย ได้แก่ สาหร่าย (algae) ละหุ่ง (castor) มะพร้าว (coconut) ปาล์ม (palm) ดอกคำฝอย (safflower) ถั่วเหลือง (soy) และดอกทานตะวัน (sunflower) โดยมีค่าผลผลิตน้ำมันเท่ากับ 100,000, 1,413, 2,689, 5,950, 779, 446 และ 952 ลิตรต่อเฮคแตร์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการนำมาสกัดเพื่อให้ได้ผลผลิตน้ำมันในอนาคต ซึ่งนักวิจัยในประเทศไทยมีความตื่นตัวในการวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อการสกัดผลผลิตน้ำมันเช่นเดียวกัน โดยจากผลการวิจัยพบว่ามีสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตน้ำมันชีวภาพ ได้แก่ *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. และ *Carteria* sp. (ยุวดี, 2553)

6) การใช้เพื่อการดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Hsueh et al., 2007) โดยสาหร่ายขนาดเล็กสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งจากการศึกษาพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กจะเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.0 – 15.0 เมื่อความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น (Lam et al., 2012)

7) การใช้ในการบำบัดน้ำเสีย โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสาหร่ายขนาดเล็ก (*Oscillatoria* sp.) สามารถใช้ในการดูดซับตะกั่วในน้ำเสีย โดยสามารถดูดซับตะกั่วได้ 82.5 ± 6.7 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย (pH 5.0) (สุนิรัตน์, 2552) รวมทั้งยังสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ในรูปของซีโอดี (86 %) และสารอาหารในรูปของแอมโมเนียไนโตรเจน (52 %) และฟอสฟอรัสทั้งหมด (52 %) ในน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ (สุญา, 2551) นอกจากนี้ สาหร่ายขนาดเล็กยังมีศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์อื่น ๆ เช่น การทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อสกัดผลิตไขมัน โดยพบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. WUW05 มีอัตราการผลิตไขมันเชิงปริมาตรสูงเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (สมฤทัย, 2553) เป็นต้น

2.8 ข้อมูลทั่วไปของสาหร่าย

สาหร่าย (algae) เป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ สามารถอยู่ได้ทั้งในน้ำจืด น้ำทะเล อากาศ หรือแม้กระทั่งอยู่กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น จัดเป็นพืชชั้นต่ำ ไม่มีส่วนที่เป็นราก ลำต้น และใบที่แท้จริง (Chapman, 1970) สาหร่ายดำรงชีวิตอยู่ได้หลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นแพลงก์ตอนลอยอยู่ในมวลน้ำ หรือยึดติดกับพื้นทะเลหรือวัสดุอื่น ๆ เช่น กลุ่มของสาหร่ายหลายเซลล์ที่เรียกรวมว่า สาหร่ายทะเล (seaweeds) ประกอบด้วยโครงสร้าง 3 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่ ผนังเซลล์ นิวเคลียส และไซโตพลาสซึม มีรูปร่างลักษณะหลายแบบด้วยกัน สืบพันธุ์ได้ทั้งแบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศ มีความสำคัญต่อระบบนิเวศในฐานะเป็นผู้ผลิตโดยเป็นจุดเริ่มต้นของห่วงโซ่อาหาร นอกจากนี้สาหร่ายยังเป็นตัวตรวจวัดคุณภาพน้ำทางชีวภาพ ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวดัชนีบ่งบอกคุณภาพน้ำได้ สาหร่ายสามารถแบ่งออกได้เป็น 9 ดิวิชัน ได้แก่ Cyanophyta, Chlorophyta, Charophyta, Euglenophyta, Phaeophyta, Chrysophyta, Pyrrophyta, Cryptophyta และ Rhodophyta ตามลำดับ โดยปัจจุบันนิยมนำสาหร่ายมาบริโภคทั้งสาหร่ายทะเลและสาหร่ายน้ำจืดเนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ให้พลังงานน้อย ส่วนใหญ่มีปริมาณแคลอรี โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตไม่สูงมากนัก แต่มีแร่ธาตุและวิตามินซึ่งเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย นอกจากนี้ยังนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตวุ้น แอลจิเนต และคาร์ราจีแนน ใช้เป็นยา บำบัดคุณภาพน้ำทั้ง

จากโรงงานอุตสาหกรรม ใช้เป็นอาหารสัตว์หรือเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ ใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช และใช้เพื่อประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

2.8.1 การจัดจำแนกสาหร่าย

ในปัจจุบันนิยมแบ่งสาหร่ายออกเป็น 9 ดิวิชัน ได้แก่

1) Division Cyanophyta ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae, cyanobacteria) เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำจำพวกโปรคาริโอตที่มีขนาดเล็ก จึงไม่มีนิวเคลียสและผนังเซลล์ พบได้ทั่วไปทั้งในน้ำ บนดิน บริเวณชื้นแฉะ จัดเป็นแบคทีเรีย แต่มีลักษณะแตกต่างจากแบคทีเรียตรงที่มีคลอโรฟิลล์เอจึงสามารถสังเคราะห์แสงได้และให้ออกซิเจน โดยจากการศึกษาซากดึกดำบรรพ์หรือฟอสซิล (fossil) และหลักฐานอื่น ๆ อาจกล่าวได้ว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสิ่งมีชีวิตพวกแรกที่กำลังกำเนิดขึ้นบนโลกและผลิตออกซิเจนให้แก่บรรยากาศ สามารถพบได้ทั่วไปไม่ว่าจะในเขตร้อนเขตอบอุ่น ในน้ำหรือบนบก ที่แห้งแล้งหรือแม้กระทั่งยอดเขาสูง

2) Division Chlorophyta ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว (green algae) มีสีเขียวเหมือนหญ้า ส่วนประกอบของรงควัตถุจะเป็นเช่นเดียวกับที่พบในพืชชั้นสูง คือมีคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี เบต้าแคโรทีน และแซนโทฟิลล์ พบได้ทั่วไปทั้งในทะเล น้ำจืด และน้ำกร่อย รวมถึงบนพื้นดิน

3) Division Charophyta ได้แก่ สาหร่ายไฟ (stonewort, brittle worts) เป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะคล้ายพืชชั้นสูง มีส่วนคล้ายลำต้นซึ่งเห็นเป็นข้อและปล้องได้ชัดเจน มีรงควัตถุ คือคลอโรฟิลล์เอและบีอยู่ในคลอโรพลาสต์ สาหร่ายไฟยังมีชื่อที่ชาวบ้านเรียกกันทั่วไปว่า มาดไฟหรือสายร้อน เนื่องจากเชื่อว่าสาหร่ายไฟจะให้ความร้อนสูงทำให้น้ำบริเวณนั้นร้อน สาหร่ายไฟมีการแพร่กระจายกว้างขวางทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย ขึ้นอยู่ได้ในน้ำที่เป็นพืชทรายหรือโคลน โดยมีรากยึดเกาะ บางชนิดขึ้นในบริเวณที่เป็นหินปูน สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วมากจึงอาจปิดกั้นทางเดินของน้ำได้ แต่มีประโยชน์คือเพิ่มออกซิเจนให้แก่แหล่งน้ำและทำให้น้ำใส โดยสาหร่ายไฟสามารถตัดตะกอนไว้ได้ นอกจากนี้ยังให้ร่มเงาแก่สัตว์น้ำ และเป็นที่ยึดเกาะของสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ในน้ำ ซึ่งเป็นอาหารของปลา

4) Division Euglenophyta ได้แก่ สาหร่ายยูกลีโนอิด (euglenoids) แต่เดิมรวมอยู่ใน Division Chlorophyta เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์เอและบีเหมือนกัน แต่ภายหลังพบว่ามีความแตกต่างไปจากสาหร่ายสีเขียวประเภทอื่น ๆ เช่น อาหารสะสมจะอยู่ในรูปของแป้งที่ไม่ละลายน้ำ สามารถพบยูกลีโนอิดได้ทั่วไปทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม หรือตามที่มีน้ำแฉะ และจะยังพบมาก

ในแหล่งน้ำจืดที่มีพืชน้ำหรือสาหร่ายอินทรีย์อุดมสมบูรณ์ บางชนิดขึ้นอยู่บนสาหร่ายหรือซากเน่าเปื่อยของพืช บางชนิดอาศัยอยู่ในหนองบัวกลม ตัวแบน และสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ

5) Division Phaeophyta ได้แก่ สาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) สาหร่ายสีน้ำตาลมีสี ตั้งแต่สีเขียวมะกอก (olive green) ถึงสีน้ำตาลเข้ม (dark brown) โดยมี รงควัตถุคือ ฟิวโคแซนทีน (Fucoxanthin) อย่างไรก็ตาม กลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาลนี้มีลักษณะคล้ายกับสาหร่ายชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะกลุ่มสาหร่ายสีแดงที่บางชนิดมีสีน้ำตาลเช่นกัน ดังนั้นหากมองเพียงผิวเผินจะพบว่ามี ความคล้ายคลึงกันมาก โดยสาหร่ายสีน้ำตาลชอบขึ้นในเขตอบอุ่นและเขตร้อนมากกว่าเขตร้อน อาจพบว่า ขึ้นบนก้อนหินหรือบนสาหร่ายบางชนิด

6) Division Chrysophyta ได้แก่ สาหร่ายสีน้ำตาลแกมทอง (golden-brown algae) สาหร่ายสีเขียวแกมเหลือง (yellow-green algae) และไดอะตอม (Diatom) สาหร่ายทั้งสามพวกนี้มี ลักษณะเหมือนกันหลายอย่าง เช่น มีรงควัตถุจำพวกแคโรทีนอยด์มากกว่าคลอโรฟิลล์ แต่มี ส่วนประกอบของรงควัตถุ ผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน

7) Division Pyrrophyta ได้แก่ สาหร่ายไดโนแฟกเจลเลต (dinoflagellates) สามารถ พบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม ในลักษณะเป็นแพลงก์ตอน บางชนิดสามารถเรืองแสงในเวลา กลางคืน บางชนิดทำให้เกิดปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสีในทะเล ซึ่งเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำและ มนุษย์ที่บริโภคสัตว์น้ำนั้น ๆ โดยสาหร่ายไดโนแฟกเจลเลตที่เป็นอาหารของหอย ได้แก่ สกุล *Gonyaulax* เมื่อมีการบลูมทำให้เกิดกระแสน้ำแดงและสะสมอยู่ในหอย และเมื่อคนนำหอยมา รับประทาน จึงทำให้เกิดอาการชาตามลิ้น ริมฝีปาก และส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย จนทำให้ร่างกายเป็น อัมพาต และอาจร้ายแรงถึงขั้นทำให้เสียชีวิตได้

8) Division Cryptophyta ได้แก่ สาหร่ายคริปโตโมแนส (cryptomonas) เป็นดิวิชันเล็ก ๆ มีลักษณะแบนจากบนลงล่าง รูปร่างทรงรี ลักษณะไม่สมมาตร พบในน้ำจืดและน้ำเค็ม บางชนิดมี ความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ดี ปกติเป็นเซลล์เดี่ยว หรืออาจสร้างระยะที่มีเมือกหุ้ม อยู่เป็นอิสระ แต่มีบางชนิดอยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยสาหร่ายดิวิชันนี้มีส่วนทำให้ เกิดปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสี (red tide) เนื่องจากมีปริมาณสารอาหารที่มากจนเกินไปส่งผลทำ ให้การบลูมของสาหร่ายเกิดขึ้น

9) Division Rhodophyta ได้แก่ สาหร่ายสีแดง (red algae) มีจำนวนมากกว่าสาหร่าย ชนิดอื่น ๆ ส่วนใหญ่เป็นสาหร่ายทะเล เจริญเติบโตอยู่แถบชายฝั่งหรืออยู่ใต้ทะเลลึกที่แสงแดดส่องถึง มีขนาดตั้งแต่เล็กไปจนถึงใหญ่ ขึ้นอยู่กับลักษณะทางภูมิศาสตร์ โดยพวกที่มีขนาดใหญ่มักขึ้นอยู่ในเขต

อบอุ่นและเขตหนาว ส่วนในเขตร้อนมักมีขนาดเล็ก สาหร่ายสีแดงมักขึ้นติดพื้นหรือขึ้นบนสาหร่ายชนิดอื่น พวกที่ขึ้นในน้ำจืด มักขึ้นในที่น้ำไหลโดยยึดเกาะกับพื้น กิ่งไม้ รากไม้ หรือก้อนหิน

2.9 สาหร่าย *Dunaliella*

2.9.1 อนุกรมวิธาน และลักษณะทั่วไป

Dunaliella เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติในการสะสมเบต้าแคโรทีนสูง (Borowitzka et al., 1984) ค้นพบครั้งแรกโดย M.F. Dunal เมื่อปี ค.ศ.1837 ในขณะที่เซลล์มีสีแดงและอยู่ในน้ำทะเลที่มีความเค็มสูง จึงตั้งชื่อสาหร่ายชนิดนี้ว่า *Haematococcus salinus* ต่อมาในปี ค.ศ. 1905 Teodoresco พบว่าสาหร่ายชนิดนี้มีความแตกต่างจาก *Haematococcus* และ *Chlamydomonas* อย่างชัดเจนจึงได้ตั้งชื่อใหม่และมีการจัดลำดับทางอนุกรมวิธานดังนี้

Division Chlorophyta

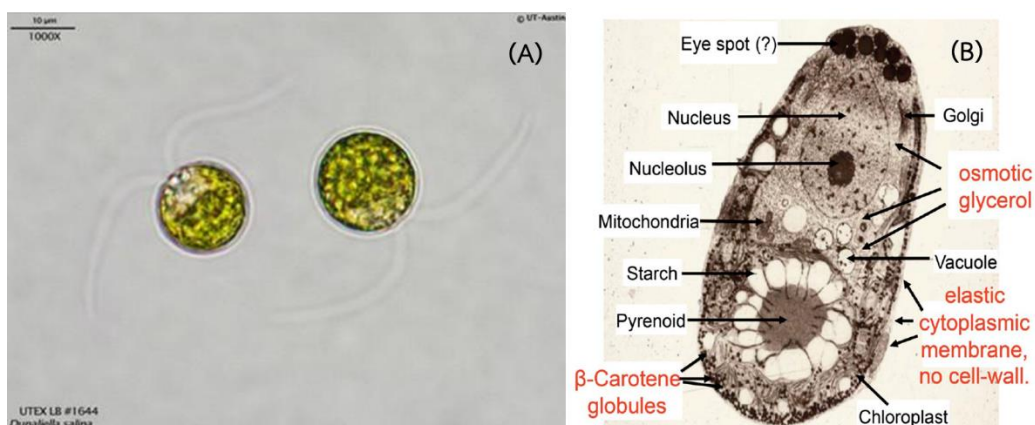
Class Chlorophyceae

Order Volvocales

Family Polyblepharidaceae

Genus *Dunaliella*

สาหร่าย *Dunaliella* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวมีแฟกเจลลา (หนวด) จำนวน 2 เส้น ความยาวเท่ากัน (ภาพ 2A) ตำแหน่งของแฟกเจลลาอยู่บนฐานเซลล์ด้านที่แหลมกว่า (anterior) ขนาดเซลล์ด้านยาวประมาณ 8.0 – 25.0 ไมโครเมตร ด้านกว้างประมาณ 5.0 – 15.0 ไมโครเมตร รูปร่างมีการเปลี่ยนแปลงได้อาจเป็นรูปไข่ รูปทรงกลม รูปทรงกระบอก หรือรูปกระสวย ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เช่น ความเข้มข้นแสงสูง หรือลักษณะเฉพาะแต่ละสายพันธุ์ สาหร่าย *Dunaliella* เป็นสาหร่ายที่ไม่มีผนังเซลล์ (lack of cell wall) แต่มีเมือกที่มีความเหนียวและยืดหยุ่นเป็นพิเศษเฉพาะตัวหุ้มเซลล์ไว้ (Oliviera et al., 1980; Klut et al., 1983) (ภาพ 2B) ถ้าพิจารณาจากรูปร่างภายนอกสาหร่าย *Dunaliella* จะมีลักษณะคล้ายกับ *Chlamydomonas* sp. ต้องใช้ กล้อง Electron micrograph ตรวจสอบ โดยจะพบว่าตำแหน่งของ Golgi bodies และ Mitochondrial profiles ของสาหร่าย *Dunaliella* จะแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp. (Peterfi and Manton, 1968)

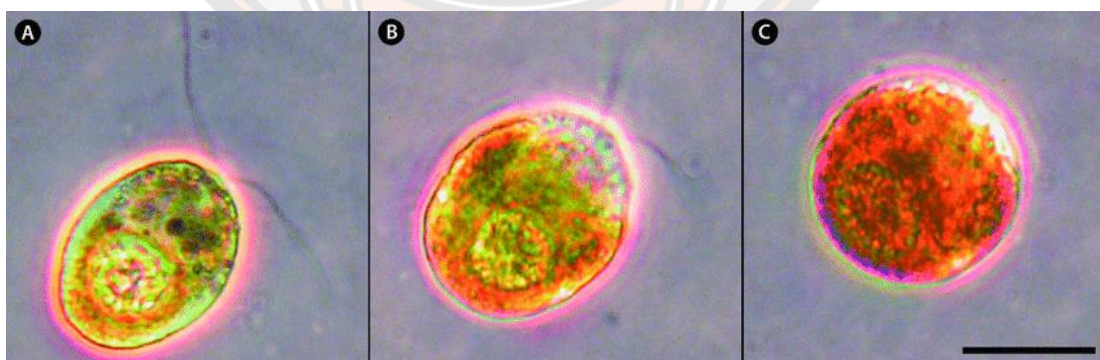


ภาพ 2 ลักษณะเซลล์ของสาหร่าย *Dunaliella*

โดย (A) แสดงลักษณะภายนอก และ (B) แสดงลักษณะภายในเซลล์ของสาหร่าย *Dunaliella*

ที่มา: Ben-Amotz และ Avron (1990)

สาหร่าย *Dunaliella* ภายในมีพรีนอยด์ขนาดใหญ่ มีคลอโรพลาสต์เป็นรูปกล้วย ในเซลล์สาหร่ายที่มีชีวิตผิวของคลอโรพลาสต์จะมีลักษณะเป็นรอยย่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ที่มีอายุมาก ๆ ในสาหร่าย *Dunaliella* บางชนิด เช่น *D. salina* คลอโรพลาสต์อาจมีการสะสมเบต้าแคโรทีนได้ในปริมาณสูงมาก โดยเก็บเอาไว้ภายในเม็ดน้ำมัน (carotene globule) ในที่ว่างระหว่างไทลาคอยด์ (interthylakoid space) จึงทำให้เซลล์ของสาหร่ายมีสีส้ม – แดง (Avron and Ben-Amotz, 1992) (ภาพ3)



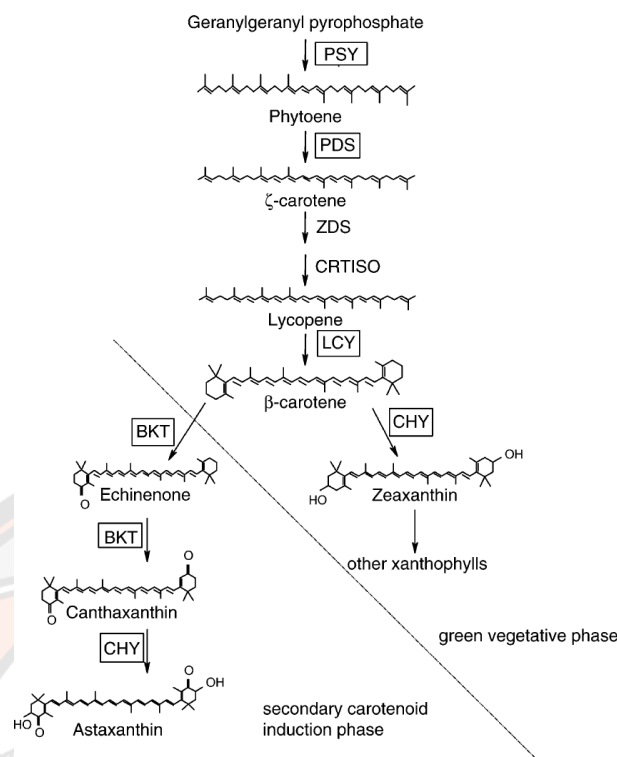
ภาพ 3 การสะสมเบต้าแคโรทีนของเซลล์สาหร่าย *Dunaliella*

ที่มา: Ramos และคณะ (2011)

2.9.2 กระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในสาหร่ายขนาดเล็ก

กระบวนการในการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ทางชีวภาพของสาหร่าย พบว่าจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ คือการรวมโมเลกุลของ geranylgeranyl diphosphate (GGPP) สองโมเลกุลเข้าด้วยกันเพื่อสร้างสารที่มีชื่อว่าไฟโตอิน (phytoene) ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์โมเลกุลแรกที่มีคาร์บอนในโมเลกุล 40 อะตอม ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นโดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีชื่อว่า phytoene synthase (PSY) (ภาพ 4) ขั้นตอนการสังเคราะห์สาร phytoene นี้มีการศึกษาพบว่าเป็นขั้นตอนสำคัญที่จะกำหนดปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดหรือที่เรียกว่ากระบวนการ rate limiting step ปฏิกิริยาถัดไปที่ทำให้ได้สารที่มีสีขึ้นเป็นโมเลกุลแรก เกิดขึ้นโดยการทำงานของเอนไซม์ phytoene desaturase (PDS) ทำให้ได้สารชื่อ lycopene ที่มีสีชมพูเป็นผลิตภัณฑ์ และเอนไซม์ lycopene cyclase (LCY) จะทำงานเป็นลำดับถัดไป โดยการสร้างโครงสร้างวงแหวนขึ้นที่ปลายทั้งสองข้างของโมเลกุล lycopene ทำให้ได้สารชื่อ β -carotene (Cunningham and Gantt, 1998) การสังเคราะห์ β -carotene นี้เองที่เป็นสารตั้งต้นหลักของการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ต่อไปในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ (Lotan and Hirschberg, 1995; Martin et al., 2008)

จากวิถีการสังเคราะห์จะพบว่าคีโตแคโรทีนอยด์จะสังเคราะห์ขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นเท่านั้น โดยจะมีการเติมหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่งของวงแหวนส่วนปลายทั้งสองข้างของโมเลกุล β -carotene (Huang et al., 2012) (ภาพ 4) โดยจากข้อเท็จจริงที่เกิดจากการศึกษาวิจัยในสาหร่ายหลายชนิดพบว่า เมื่อสาหร่ายได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการดำรงชีวิต เช่น การขาดสารอาหาร อุณหภูมิสูง และความเข้มแสงสูง เป็นต้น จะเกิดการกระตุ้นให้เอนไซม์ที่มีชื่อว่า β -carotene ketolase (BKT) ซึ่งทำหน้าที่เติมหมู่คีโตนให้กับโมเลกุลของ β -carotene ทำงาน โดยเอนไซม์ชนิดนี้มักมีกิจกรรมร่วมกับเอนไซม์ β -carotene hydroxylase (CHY) ที่ทำหน้าที่ในการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl functional group; ^-OH) ให้กับโมเลกุลของ β -carotene ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ในที่สุดนั่นคือสารแอสตาแซนธิน (astaxanthin) (Fan et al., 1995, Lotan and Hirschberg, 1995, Fraser et al., 1998)



ภาพ 4 วิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ปฐมภูมิและทุติยภูมิในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก

โดย (PSY) phytoene synthase (PDS) phytoene desaturase (LCY) lycopene β -cyclase (CHY) β -carotene hydroxylase (BKT) β -carotene ketolase

ที่มา: Vidhyavathi และคณะ (2008)

2.9.3 หน้าที่ของเบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *Dunaliella*

1) เป็นแหล่งเก็บสะสมคาร์บอน การสังเคราะห์แสงเป็นการใช้พลังงานรังสีจากแสงเพื่อเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาล ขบวนการนี้เกิดขึ้นได้เนื่องจากในเซลล์พืชหรือสาหร่ายมีรงควัตถุชนิดต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่ดูดพลังงานแสงไว้แล้วเปลี่ยนเป็นพลังงานเคมี ธรรมชาติจึงกำหนดให้เบต้าแคโรทีนเป็นสารที่ทำหน้าที่เป็นสารประกอบที่สะสมผลผลิตที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงและขบวนการเผาผลาญอาหารเอาไว้ ซึ่งเท่ากับว่าเบต้าแคโรทีนเป็นแหล่งสะสมคาร์บอนที่สำคัญ (Borowitzka and Borowitzka, 1988) เมื่อสารตั้งต้นของกลไกการเผาผลาญพลังงานอย่างน้อย 1 ชนิดหายไป ทำให้การเผาผลาญพลังงานถูกยับยั้งเซลล์จะถูกจำกัดอัตราการเจริญ ส่งผลให้เบต้าแคโรทีนซึ่งเป็นแหล่งสะสมคาร์บอนที่เหลือใช้จากการสังเคราะห์แสงถูกนำออกมาใช้ (Ben-Amotz and Shaish, 1992)

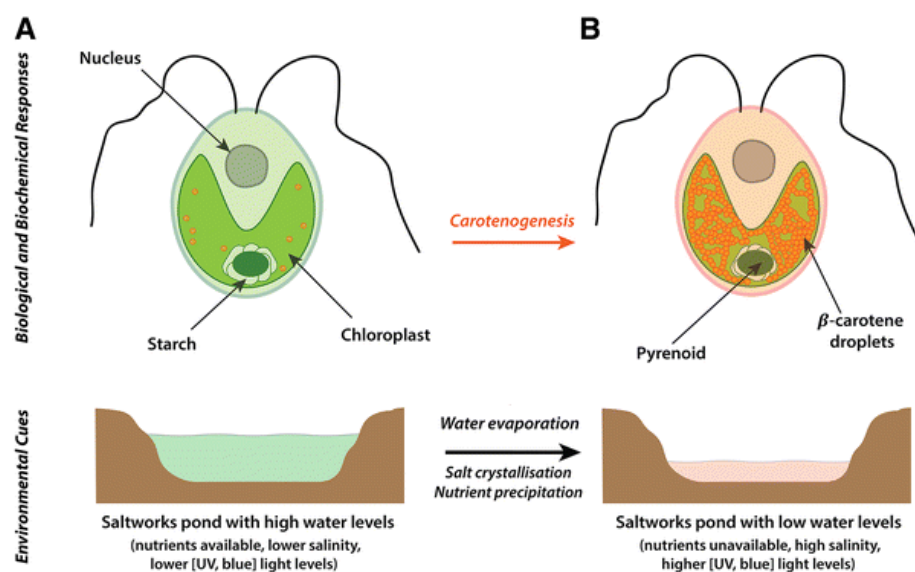
2) ป้องกันออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยว (singlet oxygen quencher) เบต้าแคโรทีนทำหน้าที่ป้องกันคลอโรฟิลล์จากการกระตุ้นของออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยวและป้องกันความเสียหายของคลอโรฟิลล์จากการถูกกระตุ้นอื่นใดที่อาจเกิดขึ้น (Avron and Ben-Amotz, 1992)

3) ป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วยรังสีที่มีความเข้มแสงสูง เบต้าแคโรทีนช่วยปกป้องเซลล์จากการทำลายของรังสีที่มีความเข้มแสงสูงภายใต้สภาวะการเจริญที่จำกัดโดยทำหน้าที่เป็นตัวกรองแสงคอยดูดรังสีที่มากเกินไป โดยพบว่าเบต้าแคโรทีนสามารถป้องกันแสงที่มีความเข้มแสงสูงซึ่งมีการแผ่รังสีของแสงในช่วงแสงสีน้ำเงิน (ความยาวคลื่นเท่ากับ 440 นาโนเมตร) และมีการป้องกันแสงที่มีความเข้มต่ำ ซึ่งมีการแผ่รังสีของแสงในช่วงแสงสีแดง (ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 675 นาโนเมตร) *D. bardawil* สายพันธุ์ที่ไม่สามารถสะสมเบต้าแคโรทีนและไม่มีเบต้าแคโรทีนสะสมอยู่ภายในเซลล์พบว่าไม่สามารถป้องกันเซลล์จากการทำลายของแสงและตายเมื่อสัมผัสกับแสงที่มีความเข้มสูง ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมเบต้าแคโรทีน สูงจะมีชีวิตรอดอยู่และมีการเจริญเติบโต (Ben-Amotz and Avron, 1983) ดังนั้นหน้าที่ของเบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *Dunaliella* จึงได้แก่การป้องกันแสงซึ่งอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงตามธรรมชาติของเม็ดน้ำมันที่อยู่โดยรอบคลอโรพลาสต์ที่มีรูปทรงคล้ายถ้วย ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวสามารถป้องกันอันตรายจากแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสะสมเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella*

จากอดีตจนถึงปัจจุบันพบว่าการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ และการสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *Dunaliella* ยังคงได้รับการสนใจจากนักวิจัยเสมอมา (ตาราง 1) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเหี่ยวนำการสังเคราะห์สารสียังมีสภาวะหลายอย่างที่ไม่สามารถคาดการณ์ได้ หรือยังไม่ได้รับการค้นพบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือปัจจัยทางกายภาพ และปริมาณสารอาหารที่สาหร่ายได้รับ เป็นต้น ซึ่งจะเป็นจุดสำคัญในการพัฒนาการเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella* ในปริมาณเชิงพาณิชย์

ในสภาวะปกติสาหร่ายจะมีการผลิตรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ในปริมาณต่ำ (ภาพ 5A) ซึ่งในกระบวนการผลิตสารสีจำเป็นต้องกระตุ้นให้สาหร่ายเกิดความเครียดเพื่อทำให้สาหร่ายผลิตรงควัตถุมากขึ้นกว่าปกติ เนื่องจากสาหร่ายที่ถูกเพาะเลี้ยงและเจริญเติบโตภายใต้สภาพแวดล้อมที่เป็นปฏิกิริยา (extreme condition) จะมีการเหี่ยวนำการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เพิ่มขึ้นเพื่อใช้ในการปกป้องเซลล์ (ภาพ 5B) โดยมีปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียดของสาหร่าย ได้แก่



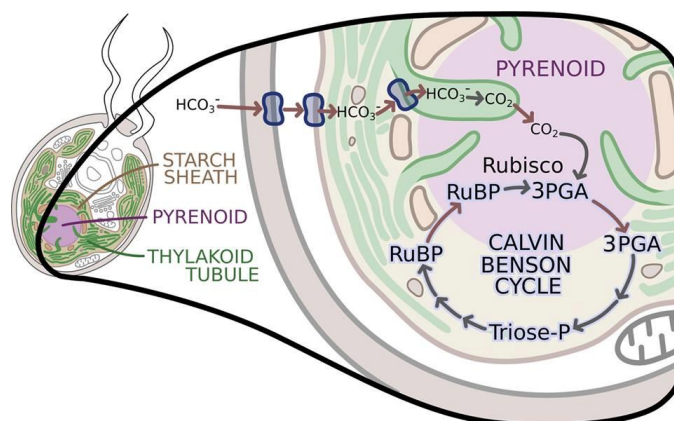
ภาพ 5 การเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมที่กระตุ้นให้สาหร่ายสะสมแคโรทีนอยด์
โดย (A) สภาวะที่มีระดับน้ำปกติ (B) สภาวะที่ระดับน้ำลดต่ำ
ที่มา: Varela และคณะ (2015)

ตาราง 1 สภาวะการเลี้ยงต่อปริมาณเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella*

Strains	Condition factors	Chlorophyll	Carotenoid	β -carotene	Reference
<i>D. salina</i>	1.0 – 3.0 M NaCl 25 °C ร่วมกับ 40 PPFD	–	12.9 mg/l	–	Gomez et al. (2003)
<i>D. salina</i>	0.5 – 4.0 M NaCl	1.3 g/mL	–	25.8 g/mL	Nikookar et al. (2004)
<i>D. salina</i>	26 °C ร่วมกับ 110 PPFD	1.80 mg/L	24.58 mg/L	–	Gomez and Gonzalez (2005)
<i>D. salina</i>	1.0 M NaCl and light	4.88 mg/L	–	34.62 mg/L	Mofeed (2015)
<i>D. salina</i>	Inorganic carbon (150 mM)	4.12 μ g/mL	7.10 μ g/mL	180 μ g/mg	Srinivasan et al. (2015)
<i>D. salina</i>	light, temperature, and nutrition	80 mg/L	–	117.99 mg/L	Wu et al. (2015)

Strains	Condition factors	Chlorophyll	Carotenoid	β -carotene	Reference
<i>D. salina</i>	phosphorus under nitrate limitation	19 mg/L	–	17.4 mg/L	Wongsansilp et al. (2016)
<i>D. salina</i>	nitrogen and sulfur deprivation	–	–	15 mg/g	Khademi et al. (2018)
<i>D. salina</i>	Macronutrient stressed (N, P, S)	1.02 μ g/mL	8.25 μ g/mL	192.8 μ g/mg	Srinivasan et al. (2018)
<i>D. salina</i>	2.5 M NaCl and KNO ₃	27.9 μ g/mL	177.1 μ g/mL	177.1 μ g/mL	Sathasivam et al. (2018)
<i>D. salina</i>	Blue-Red LED wavelength,	–	–	33.94 μ M	Han et al. (2019)
<i>D. salina</i>	2.5 M NaCl ร่วมกับ 200 PFD	11.05 μ g/ml	4.72 μ g/ml	3.06 μ g/ml	Wongsansilp et al. (2019)

2.10.1. คาร์บอน (carbon) เป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นสำหรับขนาดเล็กอย่างมาก เนื่องจากสาหร่ายต้องการนำคาร์บอนไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photoautotrophs) รวมถึงใช้สารอินทรีย์คาร์บอน (organic carbon) เพื่อการดำรงชีวิตของเซลล์ โดยคาร์บอนจะถูกสาหร่ายนำเข้าสู่เซลล์โดยเอนไซม์ carbonic anhydrase (CA) และนำเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างคาร์โบไฮเดรต ประเภตน้ำตาลกลูโคส และนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ในการสร้างพลังงานวัฏจักร Calvin cycle ต่อไป (ภาพ 6) โดยธรรมชาติแหล่งของคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำจืดจะมีเพียงพอแก่ความต้องการของสาหร่าย แต่ในน้ำทะเลหรือน้ำที่มีความเค็มสูงจะมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายอยู่ในน้ำจะต่ำมาก จากการศึกษาอัตราการสังเคราะห์แสงพบว่า ความแตกต่างของค่าพีเอช ความเข้มข้นของสารอินทรีย์คาร์บอนจะตรงข้ามกัน สาหร่าย *D. salina* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากทั้งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และไบคาร์บอเนต (HCO₃) การเพิ่มสารอินทรีย์คาร์บอนโดยการเพิ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ผสมในอากาศ หรือเพิ่มโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO₃) จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *D. salina* และการเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์จะทำให้พีเอชของน้ำลดลง และมีคาร์บอนไดออกไซด์ละลายในน้ำได้มากขึ้น (Borowitzka and Borowitzka, 1988)



ภาพ 6 กลไกของเซลล์ในการนำคาร์บอนไปใช้ของสาหร่ายขนาดเล็ก
ที่มา: Machingura และคณะ (2018)

Jeon และคณะ (2013) ประเทศเกาหลีใต้ทำการศึกษาผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella* ผลการทดลองพบว่า ปริมาณของผลผลิตชีวมวล และปริมาณไขมันรวมมีค่าสูงสุด เท่ากับ 521 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ภายใต้ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ปริมาณของกรดไขมัน (fatty acid) โดยเฉพาะกรดไขมันชนิด oleic acid และ elaidic acid มีปริมาณเพิ่มขึ้นถึง 2 เท่า เมื่อเทียบกับชุดทดลองที่ไม่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (0 เปอร์เซ็นต์)

Kim และคณะ (2017) ศึกษาผลของปริมาณโซเดียมไบคาร์บอเนตที่ต่างกัน (0 – 30 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) ต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย *Dunaliella salina* ประเทศเกาหลีใต้ การทดลองแรกพบว่าปริมาณไบคาร์บอเนต 5.0 กรัมต่อลิตรในสูตรอาหาร Johnson ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสูงสุด (มากกว่า 2.84 เท่า) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) ขณะที่การทดลองที่สองพบว่าการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (2 %) ในอาหาร หลังจากสิ้นสุดการทดลอง 18 วัน สาหร่าย *D. salina* มีการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบกับไบคาร์บอเนต (5.0 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) นอกจากนี้เมื่อวัดอัตราการนำคาร์บอนไปใช้ (carbon utilization) ในการเจริญเติบโตของสาหร่าย พบว่า *D. salina* สามารถนำไบคาร์บอเนตไปใช้ได้ถึงร้อยละ 91.4 ขณะที่ก๊าซ CO₂ ถูกนำไปใช้ได้เพียงร้อยละ 3.59 เท่านั้น

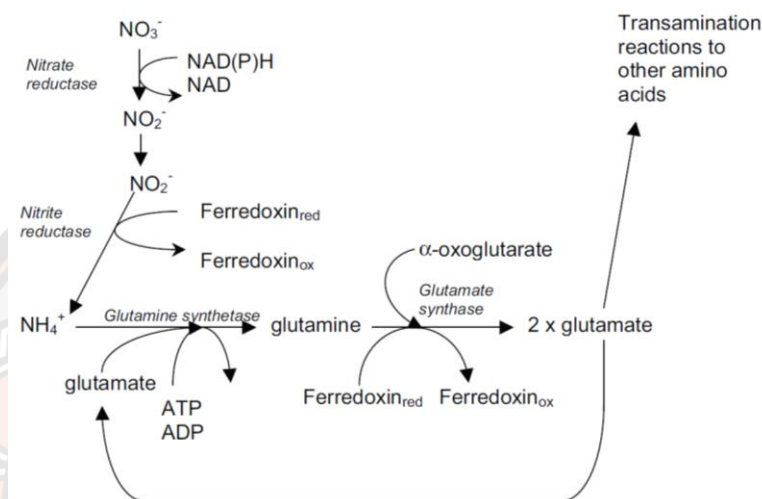
Srinivasan และคณะ (2014) ศึกษาผลของอนินทรีย์คาร์บอนต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนและกรดไขมันในสาหร่าย *Dunaliella* sp. ผลการศึกษาพบว่าปริมาณไบคาร์บอเนต 8.4 – 12.6 กรัมต่อ

ลิตร มีผลทำให้ปริมาณของเบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้น เท่ากับ 180.06 และ 8.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมในสาหร่าย *D. salina* และ *D. bardawil* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0.0 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร)

Srinivasan และคณะ (2018) ศึกษาผลของการเสริมไบคาร์บอเนตร่วมกับการขาดธาตุอาหารหลักต่อการเจริญเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่าย *Dunaliella salina* V-101 ผลการศึกษาพบว่าการเสริมไบคาร์บอเนต 8.4 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร ภายใต้การขาดสารอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของชีวมวล แคโรทีนอยด์ เบต้าแคโรทีน และลูทีน ซึ่งปริมาณการสะสมเบต้าแคโรทีนสูงสุดเท่ากับ 192.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับการขาดธาตุอาหารเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ไบคาร์บอเนตยังมีส่วนต่อการลดลงของปฏิกิริยา oxidative stress และ lipid peroxidation ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ โดยการไปเพิ่มการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ SOD, CAT และ APX ตามลำดับ

2.10.2 ไนโตรเจน (nitrogen) ธาตุไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบสำคัญของกรดอะมิโน โปรตีน โคเอนไซม์ กรดนิวคลีอิก และคลอโรฟิลล์ ธาตุไนโตรเจนจึงเป็นส่วนประกอบที่สำคัญส่วนหนึ่งของน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย รูปแบบของธาตุอาหารไนโตรเจนที่สาหร่ายทั่ว ๆ ไป นำมาใช้เป็นสารประกอบอนินทรีย์ ได้แก่ รูปไนเตรต (NO_3^-) ไนไตรท์ (NO_2^-) และแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) (Lachmann et al., 2019) โดยเริ่มจากเอนไซม์ nitrate reductase และ nitrite reductase ทำการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียก่อน จากนั้นเอนไซม์ glutamine synthase จะออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นสารตั้งต้นกลูตามีน และมีเอนไซม์ glutamate synthase เปลี่ยนสารดังกล่าวไปเป็นกลูตาเมต 2 โมเลกุล จากนั้นสาหร่ายจะนำไนโตรเจนไปสร้างกรดอะมิโนและโปรตีนต่อไป (ภาพ 7) นอกจากนี้การใช้ไนเตรตในรูปแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นมากกว่า 1 มิลลิโมลาร์ จะทำให้ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงสาหร่ายมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วและส่งผลให้สาหร่ายถูกยับยั้งการเจริญเติบโต (Kaplan et al., 1980) แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการขาดแคลนธาตุไนโตรเจน สาหร่ายจะพยายามปรับตัวโดยการลดการใช้ไนโตรเจนในเซลล์ลงทำให้ปริมาณไนโตรเจนในเซลล์ลดลง ส่งผลให้รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงลดลงทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลงด้วย (Richmond, 1986) สำหรับอาหารพบว่าไนเตรตจัดเป็นรูปแบบของไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella* (Ben-Amotz and Avron, 1983) เมื่อมีการจำกัดปริมาณไนเตรตที่ใช้ในการเจริญของสาหร่าย *D. salina* จะทำให้มีการสะสมเบต้าแคโรทีนมากขึ้น เนื่องจากการลดลงของปริมาณ

คลอโรฟิลล์อย่างรวดเร็วผลกระทบจากภาวะขาดแคลนไนโตรเจน กล่าวคือ การเจริญเติบโตภายใต้ภาวะไนโตรเจนที่จำกัดและความเข้มแสงสูงจะส่งผลให้เซลล์ของสาหร่ายมีปริมาณคลอโรฟิลล์ปริมาณเบต้าแคโรทีน และองค์ประกอบทางชีวเคมี (โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน) ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะเลี้ยงในอาหารปกติ (Avron and Ben-Amotz, 1992)



ภาพ 7 กลไกของเซลล์ในการนำธาตุไนโตรเจนไปใช้ของสาหร่ายขนาดเล็ก
ที่มา: Beardall และ Giordano (2009)

สรวิศ (2536) รายงานผลการศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรทที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *D. salina* พบว่าในระยะปรับตัว (log phase) อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์จะสูงที่สุด (7.7 ต่อ 1.0) โดยมีปริมาณของแคโรทีนอยด์สูงสุด 137 พิโคกรัมต่อเซลล์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) 10 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร J/1 ส่วนในระยะหยุดนิ่ง (stationary phase) จะมีอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น (8.8 ต่อ 1.0) ภายใต้ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) 20 เปอร์เซ็นต์ในอาหารสูตร J/1

Lv และคณะ (2016) ศึกษาการวิเคราะห์ทางสรีรวิทยา และการตอบสนองปริมาณอนุชีววิทยาของสาหร่าย *Dunaliella salina* ภายใต้การขาดธาตุอาหารหลัก ผลพบว่าการขาดธาตุไนโตรเจน (-N) เพียงอย่างเดียว ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (อาหารปกติ) ขณะที่การสะสมแคโรทีนอยด์รวมและเบต้าแคโรทีนมีค่าสูงที่สุด และมีอัตราส่วน

2.4 ต่อ1.0 เท่าของแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์ เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส (phosphorus) ขาดธาตุซัลเฟอร์ (sulfur) และอาหารสูตร Johnson (อาหารปกติ)

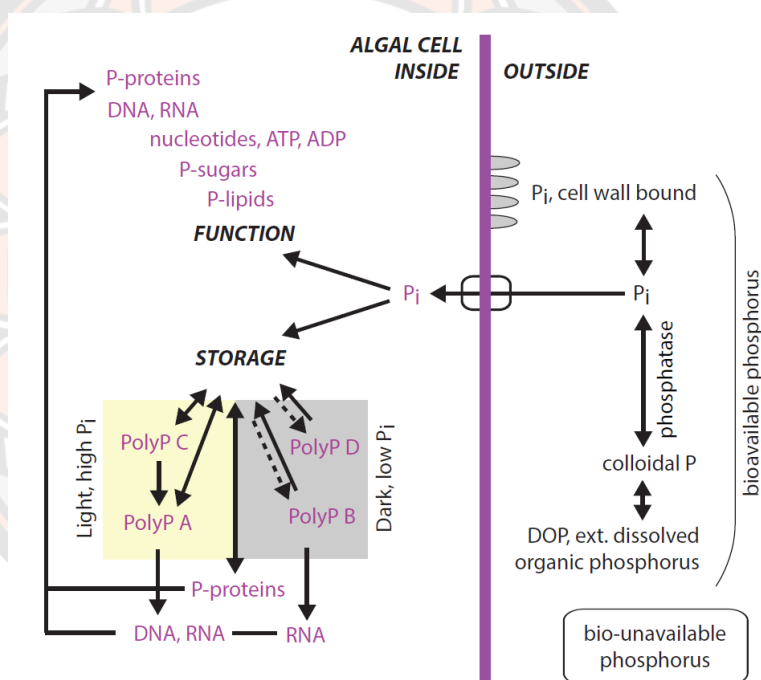
Wu และคณะ (2016) ทำการศึกษาผลของแสง อุณหภูมิ และธาตุอาหารหลักต่อการเจริญเติบโตและการสะสมรงควัตถุของสาหร่าย *Dunaliella salina* จำนวน 3 สายพันธุ์ โดยคัดแยกจากดินเค็มในประเทศไทย ผลพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *D. salina* KUXI และชุดการทดลองที่ขาดไนเตรท (KNO_3) แต่ทดแทนโดยการเติมปุ๋ยยูเรีย 0.12 กรัมต่อลิตร ร่วมกับไบคาร์บอเนต 1.5 กรัมต่อลิตร ส่งผลต่อการสะสมเบต้าแคโรทีนสูงสุด มีค่าเท่ากับ 61.20 มิลลิกรัมต่อลิตร

Mai และคณะ (2017) ศึกษาการสะสมของปริมาณไขมันในสาหร่ายสกุล *Dunaliella* โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลง (0.1 กรัมของปุ๋ย N P K ต่อลิตร) ผลการศึกษาพบว่าสาหร่าย *D. salina* และ *D. bardawil* มีการเปลี่ยนแปลงสีของเซลล์จากสีเขียวเป็นสีเหลือง-ส้ม ที่ระยะการเจริญเติบโตหยุดนิ่ง (stationary phase) ระยะเลี้ยงเวลาเพียง 9 วัน แสดงให้เห็นว่าเมื่อสารอาหารถูกจำกัดส่งผลต่อการลดลงของจำนวนเซลล์ ควบคู่ไปกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และปริมาณไขมันจะเพิ่มสูงขึ้น

Sathasivam และคณะ (2018) ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของโซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรทต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ที่คัดแยกจากดินเค็ม ประเทศไทย โดยเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์แบบใช้แสง (photobioreactor) ผลการทดลองพบว่าปริมาณโพแทสเซียมไนเตรท 0.5 กรัมต่อลิตร ส่งผลต่อปริมาณแคโรทีนอยด์และเบต้าแคโรทีนสูงสุด เท่ากับ 177 และ 116 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีปริมาณไนเตรท 1.0 กรัมต่อลิตร

2.10.3. ฟอสฟอรัส (phosphorus) เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย เนื่องจากทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งอิเล็กตรอนและสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ซึ่งสาหร่ายจะนำในรูปฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ (inorganic phosphorus) เท่านั้น (Solovchenko et al., 2015) โดยเอนไซม์ phosphatase และนำเข้าสู่เซลล์โดยผ่านพลาสมาเมมเบรน จากนั้นฟอสฟอรัสจะถูกนำไปใช้ในการสร้างสารพันธุกรรม พลังงาน และโปรตีน เป็นต้น (ภาพ8) โดยรูปแบบของฟอสฟอรัสที่สาหร่ายต้องการจะอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ฟอสเฟต (organic phosphate) เช่น H_2PO_4 หรือ HPO_4^{2-} เมื่อมีการขาดแคลนฟอสเฟตจะทำให้ โปรตีน คลอโรฟิลล์ เอ RNA และ DNA มีแนวโน้มลดลงทำให้ ATP ในเซลล์ลดลงและคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น (Richmond, 1986 and Becker, 1994) ปริมาณของฟอสฟอรัสที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *D. salina* คือฟอสฟอรัสในรูปของ

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ส่วน สรวิต (2536) รายงานว่าเมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 50 เปอร์เซ็นต์ของอาหารสูตร Johnson จะทำให้สาหร่ายมีอัตราส่วนแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์เท่ากับ 7.66 ในระยะ log phase และในระยะ stationary phase จะทำให้สาหร่ายมีอัตราส่วนของแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์เท่ากับ 6.84 ความเข้มข้นของฟอสเฟตที่เหมาะสมในอาหารขึ้นอยู่กับความสามารถในการทนทานของสาหร่ายแต่ละชนิด (Becker, 1994) ความเข้มข้นของฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *D. salina* คือ 0.020 ถึง 0.025 กรัมต่อลิตร และถ้าใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมากกว่า 5.0 กรัมต่อลิตร จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย ขณะที่ยังไม่มีรายงานผลที่มีต่อแคโรทีนอยด์ (Borowitzka and Borowitzka, 1988)



ภาพ 8 กลไกของเซลล์ในการนำธาตุฟอสฟอรัสไปใช้ของสาหร่ายขนาดเล็ก
ที่มา: Solovchenko และคณะ (2015)

Lv และคณะ (2016) ศึกษาผลการขาดธาตุอาหารหลักของสาหร่าย *Dunaliella salina* ประเทศจีน ผลพบว่าการขาดธาตุฟอสฟอรัส (phosphorus) ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (อาหารปกติ) ขณะที่ระยะเวลาการเลี้ยง 14 วัน การขาดปริมาณฟอสฟอรัสส่งผลต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนสูงสุด เท่ากับ 8.1 พิโคกรัมต่อเซลล์ เมื่อเทียบกับชุดการ

ทดลองที่ขาดธาตุไนโตรเจน (nitrogen) ขาดธาตุซัลเฟอร์ (sulfur) และชุดควบคุม (อาหารปกติ) นอกจากนี้ขาดฟอสฟอรัสยังส่งผลต่อการลดลงของกิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เช่น เอนไซม์ SOD และ CAT activity เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อาหารปกติ)

Wongsansilp และคณะ (2016) ศึกษาผลของปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างต่อการเจริญเติบโตและการผลิตรงวัตถุของสาหร่าย *Dunaliella salina* ที่คัดแยกจากดินเค็ม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย ผลพบว่าเมื่อระดับฟอสฟอรัส (NaH_2PO_4) ในอาหารเพิ่มขึ้นส่งผลให้จำนวนเซลล์ ผลผลิตชีวมวล การเจริญเติบโตเฉลี่ยจำเพาะ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และเบต้าแคโรทีน เพิ่มขึ้นตามไปด้วย ($p \leq 0.05$) โดยปริมาณฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตรงวัตถุของสาหร่าย *D. salina* KUXI เท่ากับ 0.008 กรัมของโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อลิตร นอกจากนี้เมื่อความเข้มข้นฟอสฟอรัสต่ำกว่า 0.001 หรือสูงกว่า 0.008 กรัมของโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อลิตร มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามมา

2.10.4. ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการตายของสาหร่าย การควบคุมค่า pH ที่เพิ่มสูงขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสง วิธีหนึ่งคือการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับน้ำทำให้สามารถเพิ่มไฮโดรเจนไอออน (H^+) ในน้ำได้ ทำให้ pH ของน้ำลดลง *Dunaliella salina* สามารถอยู่ในน้ำที่มีค่า pH ตั้งแต่ 5.5 ถึง 10.0 ถ้าหากค่า pH สูงหรือต่ำกว่าในช่วงนี้จะทำให้เกิดการตายของเซลล์หรือเซลล์เข้าสู่ระยะซิสต์ (cyst cell stage) เพื่อป้องกันการละลายเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Borowitzka and Borowitzka, 1988) พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญจะอยู่ในช่วง 7.0 ถึง 8.0 และค่า pH ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนเท่ากับ 7.0 (Celekli, 2006)

Celekli และ Donmez (2006) ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มแสง ความเค็ม และความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการสะสมเบต้าแคโรทีน ของสาหร่าย *Dunaliella* sp. ผลพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการสะสมเบต้าแคโรทีนสูงสุดคือปริมาณ pH เท่ากับ 7.0 ร่วมกับความเค็มที่ 20 เปอร์เซนต์โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มแสงที่ 48 $\text{kerg/cm}^2/\text{s}$ และปริมาณไนโตรเจน 0.5 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรตต่อลิตร โดยมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 4.2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และปริมาณเบต้าแคโรทีน เท่ากับ 1.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Dhaka และ Singh (2018) ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการเจริญเติบโตและการสะสมการชีวโมเลกุลของสาหร่าย *Dunaliella salina* โดยชุดการทดลองคือปริมาณ pH ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 6.0, 7.0, 8.0, 8.5 (ชุดควบคุม), 9.0 และ 10.0 ผลพบว่าปริมาณ pH ที่ 8.0 ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด ขณะที่ปริมาณคลอโรฟิลล์มีค่าลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น นอกจากปริมาณ pH ที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลต่อปริมาณแคโรทีนอยด์จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย และพบว่าปริมาณ pH ตั้งแต่ 8.5 ขึ้นไปลักษณะเซลล์สาหร่ายมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีส้ม

2.10.5. อุณหภูมิ (temperature) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *D. salina* อยู่ในช่วง 20 – 40 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิและแสงจะแปรผันตามกัน สาหร่าย *D. salina* สามารถทนและมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างมากตั้งแต่ -35 องศาเซลเซียส ถึง 40 องศาเซลเซียส (Borowitzka and Borowitzka, 1988) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายด้วยเช่นกัน นอกจากนี้มีรายงานวิจัยพบว่าเมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 10–15 องศาเซลเซียส มีผลต่อการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ 9-*cis* β -carotene ในสาหร่าย *Dunaliella bardawil* (Ben-Amotz 1996)

Gomez และ Gonzalez (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Dunaliella salina* โดยเฉพาะเลี้ยงภายใต้ปริมาณห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาพบว่าปัจจัยของอุณหภูมิมีผลกระทบมากกว่าปัจจัยความเข้มแสงต่อการสังเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยสาหร่าย *D. salina* จะสะสมแอลฟาแคโรทีนมากกว่า 3.5 เท่า ภายใต้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ขณะที่ภายใต้อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส สาหร่ายจะสะสมเบต้าแคโรทีนได้สูงสุด รวมถึงอัตราส่วนระหว่าง 9-*cis* ต่อ *all-trans* เบต้าแคโรทีนที่มากกว่า 1.0 เท่า

Ak (2008) ศึกษาผลของความเข้มแสง ความเค็ม และอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella viridis* ผลการศึกษาพบว่าที่ความเค็ม 2 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ ร่วมกับอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และความเข้มแสง 50 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ส่งผลทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโต คลอโรฟิลล์เอ และแคโรทีนอยด์สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 8.56×10^6 เซลล์ต่อมิลลิตร 2.84 ± 0.50 พิโคกรัมต่อเซลล์ และ 1.11 ± 0.05 พิโคกรัมต่อเซลล์

Wu และคณะ (2016) ศึกษาผลของปัจจัยความเข้มแสง อุณหภูมิ และธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตและการสะสมรงควัตถุของสาหร่าย *Dunaliella salina* จำนวน 3 สายพันธุ์ โดยคัดแยกจากดินเค็มในประเทศไทย ผลพบว่าระดับอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และความเข้มแสง 135 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาทีที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย และมีปริมาณ

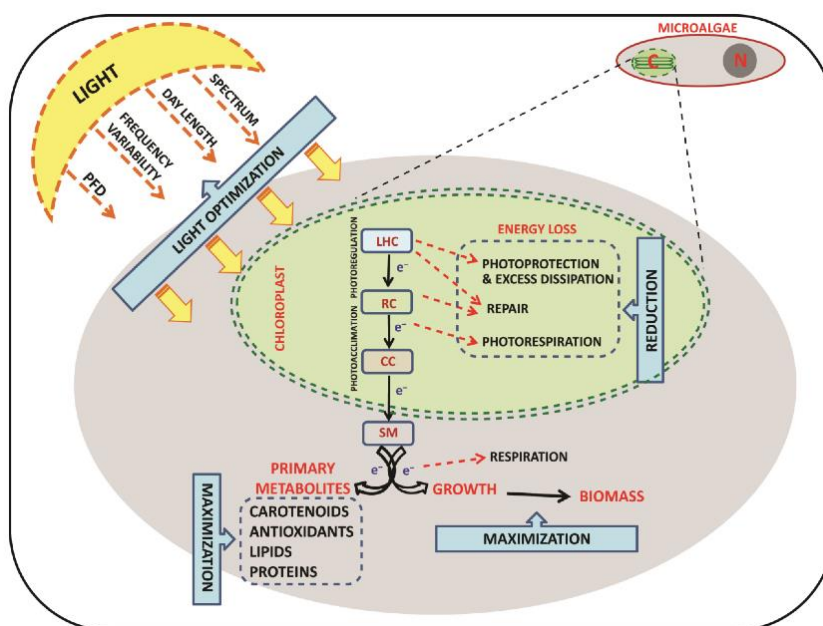
เบต้าแคโรทีนสูงสุด เท่ากับ 118.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์แบบ Orthogonal แสดงให้เห็นว่าผลของปัจจัยอุณหภูมิมีผลต่อการสะสมเบต้าแคโรทีนมากกว่าปัจจัยของความเข้มแสง และธาตุอาหาร

2.10.6 แสง (light) แสงมีความจำเป็นอย่างมาก เนื่องจากสาหร่ายต้องใช้พลังงานแสงในการสร้างอาหาร และพลังงาน โดยมีกระบวนการสังเคราะห์แสงที่สำคัญในการเปลี่ยนพลังงานแสงมาเป็นพลังงานเคมี ถ้าหากสาหร่ายได้รับแสงที่ไม่เพียงพอกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์จะทำงานช้าลง และสาหร่ายจะหยุดการเจริญเติบโต (ภาพ9) กิจกรรมการสังเคราะห์แสงของ *D. salina* ส่วนใหญ่เกิดจากแสงสีน้ำเงิน (ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 440 นาโนเมตร) มากกว่าแสงสีแดง (ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 675 นาโนเมตร) (Loeblich, 1982; Ben-Amotz and Avron, 1983) แสงเป็นสิ่งจำเป็นในการสังเคราะห์แสงของ *D. salina* โดยเฉพาะในการเลี้ยงในบ่อกลางแจ้งซึ่งไม่สามารถควบคุมแสงได้ส่วนใหญ่จะขึ้นกับแสงอาทิตย์ ในเขตอบอุ่นความเข้มแสงในฤดูร้อนท้องฟ้าแจ่มใสมาก ความเข้มแสงจะเป็นสองเท่าของวันที่ท้องฟ้าปกคลุมด้วยเมฆ แต่ในฤดูหนาวแม้จะมีอากาศแจ่มใสและแดดจัดความเข้มของแสงก็มีเพียง 1/4 ของความเข้มแสงในฤดูร้อน ความเข้มของแสง ขณะที่ Garcia-Gonzalez และคณะ (2005) กล่าวว่าวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการผลิต 9-*cis* β -carotene ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นควรเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella* ในสภาวะที่ความเข้มแสงต่ำและระบบการเลี้ยงแบบปิด (closed tubular photobioreactors)

นอกจากจะเปลี่ยนไปตามฤดูกาลและช่วงเวลาของวันแล้วยังขึ้นอยู่กับความลึกของน้ำสารแขวนลอยในน้ำ (total suspended solid) ซึ่งการเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* ในบ่อกลางแจ้งซึ่งมีปริมาณมากและมีความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่าในธรรมชาติปกติมาก ดังนั้นจึงมีการใช้ใบพัดในบ่อกลางแจ้งเพื่อให้น้ำในบ่อหมุนเวียน ทำให้ *D. salina* ที่อยู่ชั้นล่างของบ่อได้รับแสงเพียงพอป้องกันการตกตะกอนของเซลล์รวมทั้งยังเป็นการหมุนเวียนธาตุอาหารให้แก่เซลล์อีกด้วย ในสาหร่าย *D. salina* แคโรทีนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 4.5 – 10.0 เท่า (Borowitzka and Borowitzka, 1988) ส่วนปริมาณของคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี จะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มแสงมากจนถึงจุดอิ่มตัว โดย Smith และคณะ (1990) ได้ศึกษาการตอบสนองต่อการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย *D. salina* (เซลล์เขียว) ที่ได้รับแสงที่มีความเข้มสูง พบว่าในกลุ่มที่ได้รับแสงที่มีความเข้มแสงเท่ากับ 500 มิลลิโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ต่อกลอรอฟิลล์ บี เท่ากับ 210 แต่ถ้าชุดทดลองที่ได้รับแสงที่มีความเข้มแสง

เท่ากับ 1,700 มิลลิโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ต่อคลอโรฟิลล์ บี เท่ากับ 105 ต่อมา Gomez–Pinchetti และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์แสงของ *D. salina* ที่มีเบต้าแคโรทีนสูง (เซลล์ส้ม) กับเซลล์ที่มีเบต้าแคโรทีนต่ำ (เซลล์สีเขียว) พบว่าสาหร่ายเซลล์ส้มมีอัตราการปล่อยออกซิเจนที่ได้มาจากการสังเคราะห์แสงมากกว่าในสาหร่ายเซลล์เขียว และเซลล์เขียวจะถูกยับยั้งการสังเคราะห์แสงเมื่อได้รับแสงที่มีความเข้มของแสงมากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อตารางเมตรต่อวินาที ส่วนเซลล์ส้มสามารถต้านทานแสงที่มีความเข้มแสงสูงและไม่ถูกยับยั้งการปล่อยออกซิเจนแม้จะอยู่ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มของแสงสูงมากกว่า 2,000 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ก็ตาม จึงทำให้เซลล์ส้มมีอัตราการปล่อยออกซิเจนได้มากกว่าเซลล์เขียวอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นอัตราการปล่อยออกซิเจนจึงขึ้นอยู่กับความเข้มของแสง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Borowitzka และคณะ (1984) ที่ได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการสังเคราะห์แสงกับความเข้มของแสงของสาหร่าย *D. salina* พบว่าเมื่อเซลล์เขียวได้รับแสงที่มีความเข้มสูง (1,300 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) จะถูกยับยั้งการสังเคราะห์แสง ขณะที่เซลล์ส้มจะถึงจุดอิ่มตัวต่อการสังเคราะห์แสงที่ความเข้มแสงเท่ากับ 2,300 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เซลล์ส้มจึงมีอัตราการสังเคราะห์แสงได้สูงที่สุด นอกจากนี้ความเข้มแสงที่สาหร่ายได้รับยังมีผลต่ออัตราส่วนของ *all-trans* และ *9-cis* เบต้าแคโรทีนในสาหร่ายด้วย ซึ่งสาหร่าย *Dunaliella* จะมีไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนในรูปแบบของ *all-trans* อยู่ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และ *9-cis* ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณแสงที่สาหร่ายได้รับในช่วงการแบ่งเซลล์ (Becker, 1994)

นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อกลางแจ้งต้องเลี้ยงในพื้นที่และความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายที่เหมาะสม รวมถึงต้องทำการควบคุมปัจจัยหรือสภาวะต่าง ๆ เช่น โครงสร้างบ่อเลี้ยงสาหร่าย การหมุนเวียนกระแสน้ำและอาหารเลี้ยงสาหร่าย และปัจจัยสิ่งแวดล้อม เมื่อความหนาแน่นของเซลล์ต่ำกว่าจุดที่เหมาะสมกับการเจริญจะทำให้ปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนโดยเซลล์จะมีมากกว่า ซึ่งสภาวะความเข้มแสงสูงนี้เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์และทำให้อัตราการผลิตเบต้าแคโรทีนสูง การมีแสงแดดจัดและการขาดอาหารสำคัญต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนในบ่อ ถ้าระบบการเพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นของไนโตรเจนสูงจะทำให้การเพาะสาหร่ายมีความหนาแน่นมาก ทำให้เกิดการบดบังแสงกันเอง (Grobbelaar, 1995)

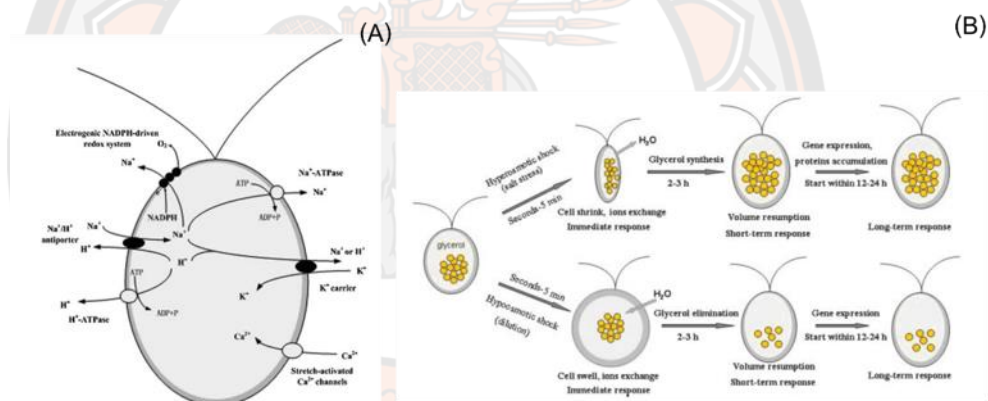


ภาพ 9 กระบวนการสังเคราะห์แสงในสาหร่ายขนาดเล็ก

ที่มา: Barra และคณะ (2014)

2.10.7. ความเค็ม (salinity) ความเค็มเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ต่อสาหร่ายทนเค็มสกุล *Dunaliella* ซึ่งสามารถเจริญอยู่ได้ในช่วงความเค็มตั้งแต่ 0.5 - 5.0 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ (Ahmed et al., 2017) โดยการเปลี่ยนแปลงความเค็มส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต ปริมาณรงควัตถุ และองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่าย (Charioui et al., 2017) ในสาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อความเครียดจากเกลือ โดยการเพิ่มประสิทธิภาพระบบการขนส่งไอออนของพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) เนื่องจากความเค็มส่งผลให้ปริมาณ Na^+ และ Cl^- ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น พลาสมาเมมเบรนจะทำการส่งการให้โปรตีนชนิด carrier protein ระบายไอออนออกจากเซลล์แบบแอนติพอร์ท (antiport) หรือ ในทิศทางตรงกันข้ามเพื่อให้เซลล์อยู่ในภาวะสมดุล (Chen and Jiang, 2009) (ภาพ 10A) ขณะเดียวกันจะมีการสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ เช่น สารกลีเซอรอล ซึ่งสารออสโมโพรเทคแทนต์จะมีส่วนช่วยในการปรับความดันออสโมติกทำให้ภายในและภายนอกเซลล์เกิดสภาวะสมดุล (osmotic regulation) (Ahmed et al., 2017) (ภาพ 10B) ในการเลี้ยงเพื่อการเจริญเติบโตความเค็มที่เหมาะสมสำหรับ *D. salina* คือ 120–180 ppt นอกจากนี้ได้มีการศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *D. salina* พบว่าการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยปริมาตรจะได้แคโรทีนอยด์มากที่สุดที่ความเค็ม 24 ร้อยละโซเดียมคลอไรด์ (w/v) หรือประมาณ 4

โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ โดยมีเบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้นจาก 10 – 260 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์โปรตีนเป็น 400 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์โปรตีน (Borowitzka *et al.*, 1984) ขณะที่ Richmond (1986) รายงานว่าที่ความเค็มสูงสาหร่ายที่เจริญอยู่จะถูกยับยั้งการเจริญทำให้การแบ่งเซลล์หยุดชะงักลง daughter cell จะถูกปล่อยออกมาจาก mother cell ช้าลงเพราะเกิดการชะงักการสังเคราะห์ DNA หรือลดอัตราการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (DNA) ของเซลล์ที่อยู่ในความเค็ม 200 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์ โดยพบว่าการแบ่งนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมจะเกิดขึ้นเพียง 1–2 ครั้งหรือไม่มีเลย ขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงที่ความเค็ม 1 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์ จะแบ่งได้ 8 เซลล์ ภายในเวลา 8 ชั่วโมง สำหรับ *D. salina* เซลล์สาหร่ายสามารถเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าได้ ในเวลาเพียง 5 ชั่วโมงเท่านั้น เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นอัตราการเจริญของสาหร่ายลดลงและสาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า ภายใน 3 วัน (Ben-Amotz and Avron, 1981)



ภาพ 10 กลไกของเซลล์ในการปรับระดับความเค็มให้เหมาะสมในสาหร่ายขนาดเล็ก โดย ระบบการขนส่งออสโมติกของพลาสมาเมมเบรน (A) และการสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ ที่มา: Chen และ Jiang (2009)

Boontaveeyuwat (1999) ศึกษาผลของปัจจัยต่อการเจริญของสาหร่าย *D. salina* เมื่อทำการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและในภาคเขาย่างกลางแจ้ง และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนในภาคเขาย่างกลางแจ้ง พบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายในห้องปฏิบัติการ ปริมาณความเค็มร้อยละ 9 โซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มแสง 8 กิโลลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ค่าพีเอช เท่ากับ 6.3 – 6.8 และอุณหภูมิ 20 – 24 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.65 ± 0.34 ต่อวัน และการลดปริมาณไนโตรเจนจะทำให้เซลล์มี

อัตราการเจริญลดลง และเมื่อเลี้ยงสาหร่ายในสภาพเขย่ากลางแจ้ง สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายคือ ความเค็ม 9 เพอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มแสง 50.5 กิโลลักซ์ ค่าความเป็นกรดต่าง 6.3–6.8 และอุณหภูมิ 32–35 องศาเซลเซียส ในเวลากลางวัน และ 28–30 องศาเซลเซียส ในเวลากลางคืน โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.72μ ต่อวัน ส่วนการสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายในสภาพเขย่ากลางแจ้ง พบว่าเมื่อใช้ความเค็ม 18 เพอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ จะทำให้เซลล์มีการสะสมเบต้าแคโรทีนสูงที่สุด โดยมีปริมาณเบต้าแคโรทีนเท่ากับ 37.9 พิกโคกรัมต่อเซลล์

Nikookar และคณะ (2004) ศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อการการเจริญเติบโต การสังเคราะห์รงควัตถุ และกิจกรรมของเอนไซม์ ascorbate peroxidase (APX) ของสาหร่าย *Dunaliella salina* ผลการศึกษาพบว่าความเค็ม 2.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ขณะที่การเพิ่มความเค็มจาก 0.5 – 4.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของคลอโรฟิลล์ เอ มีค่าเท่ากับ 0.3 ถึง 0.9 พิกโคกรัมต่อเซลล์ แต่ปริมาณเบต้าแคโรทีนลดลงจาก 3.6 ถึง 2.4 พิกโคกรัมต่อเซลล์ โดยเมื่อเซลล์อยู่ในระยะ Stationary phase การเพิ่มความเค็มมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของรงควัตถุ นอกจากนี้ปริมาณเบต้าแคโรทีนสูงสุด เท่ากับ 10.1 พิกโคกรัมต่อเซลล์ ที่ความเค็ม 4.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ และมีอัตราส่วนระหว่างเบต้าแคโรทีนต่อคลอโรฟิลล์ เท่ากับ 7.4 เท่า เมื่อความเค็ม เท่ากับ 2 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ สุดท้ายจากผลการวิเคราะห์ TLC chromatogram แสดงให้เห็นว่ารงควัตถุของสาหร่าย *D. salina* เหมือนกันกับรงควัตถุของใบผักขม และแครอท

Fazeli และคณะ (2006) ผลของระดับความเค็มต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *D. tertiolecta* DCCBC26 ที่คัดแยกจากน้ำเค็ม ผลพบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์รวมสูงสุด เท่ากับ 11.7 มิลลิกรัมต่อลิตรภายใต้ความเค็ม 0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ โดยสาหร่ายเจริญเติบโตอยู่ในระยะหยุดนิ่ง (stationary phase) ขณะที่เปอร์เซ็นต์ของ *all-trans* และ *9-cis* เบต้าแคโรทีนในระยะ exponential phase มีค่าสูงถึง 92 และ 32 เพอร์เซ็นต์ ภายใต้ความเค็ม 3.0 และ 0.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ อย่างไรก็ตามมีเพียง 23 เพอร์เซ็นต์เท่านั้นของ *9-cis* เบต้าแคโรทีนที่อยู่ในระยะหยุดนิ่งของสาหร่าย *D. tertiolecta* DCCBC26

Vo และ Tran (2014) ศึกษาผลของความเค็มและแสงต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella* ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ความเค็ม 1.5 และ 2.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ ร่วมกับความเข้มแสง 50 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที

Mofeed (2015) ผลของความเค็มและความเข้มแสงต่อการผลิตเบต้าแคโรทีน และปริมาณกลีเซอรอลในเซลล์ของสาหร่าย *Dunaliella salina* ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุด เท่ากับ 8.97×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ความเค็ม 2.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ ภายใต้ความเข้มแสง 200 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ขณะที่ความเค็ม 1.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์พบว่าสาหร่ายมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุด เท่ากับ 4.9 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณเบต้าแคโรทีนมีปริมาณสูงสุด เท่ากับ 34.62 มิลลิกรัมต่อลิตร

Charioui และคณะ (2017) ศึกษาผลของความเค็มต่อผลผลิตชีวมวลและแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Dunaliella* ที่คัดแยกได้จากน้ำเค็ม ผลการศึกษาพบว่าสามารถคัดแยกสาหร่ายได้ 3 สายพันธุ์ ซึ่ง *D. salina* DUN5 มีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด เท่ากับ 3.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายใต้ความเค็ม 2.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ ขณะที่ *D. salina* DUN4 มีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด เท่ากับ 3.2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Dunaliella* แต่ละสายพันธุ์มีการตอบสนองของลักษณะทางสรีรวิทยาต่อสภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน

Ahmed และคณะ (2017) ศึกษาการผลิตพลังงานชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* SA134 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (0.5 ถึง 2.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์) ผลการศึกษาพบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุด มีความหนาแน่นของเซลล์ 6.6×10^7 ถึง 7.17×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายใต้ความเค็ม 1.5 ถึง 2.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ ขณะที่การสะสมแคโรทีนอยด์และผลผลิตชีวมวลสูงสุด เท่ากับ 5.16 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1.2 กรัมต่อลิตร ที่ความเค็ม 2.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์

Hermawan และคณะ (2018) ศึกษาการเพิ่มขึ้นของปริมาณเบต้าแคโรทีน ของสาหร่าย *Dunaliella salina* โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Walne ที่มีความเค็มแตกต่างกัน (20, 30, 40 และ 50 ppt) ผลการศึกษาพบว่าที่สภาวะความเค็ม 30 ppt สาหร่ายมีการสะสมปริมาณเบต้าแคโรทีนสูงสุด เท่ากับ 2.31 มิลลิกรัมต่อลิตร และจำนวนเซลล์ เท่ากับ 30.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 10 วัน

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษารูปแบบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน

Ben-Amotz และคณะ (1988) ศึกษาสเตอริโอไอโซเมอร์ของเบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *Dunaliella* โดยใช้เทคนิค HPLC พบว่าปริมาณ *all-trans* และ *9-cis* β -carotene เท่ากับ 9.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ความเข้มแสง 100 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ขณะที่การ

เลี้ยงแบบกลางแจ้ง (outdoor) โดยใช้แสงธรรมชาติพบว่าปริมาณ *all-trans* และ *9-cis* β -carotene เพิ่มขึ้น เท่ากับ 50.0 และ 38.0 เปอร์เซ็นต์

Jimenez และ Pick (1993) ศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบไอโซเมอร์ของ เบต้าแคโรทีนและรงควัตถุในสาหร่าย *Dunaliella* โดยสายพันธุ์สาหร่ายที่นำมาศึกษา ได้แก่ *D. bardawil* และ *D. salina* ผลการศึกษาพบว่าสาหร่าย *D. salina* ที่เซลล์อยู่ในระยะหยุดนิ่ง (stationary phase) มีการสะสมปริมาณเบต้าแคโรทีนเพิ่มมากกว่า 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับระยะ ปรับตัว (log phase) ขณะที่องค์ประกอบของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนที่พบในไทลาคอยด์ (thylakoid) อยู่ในรูปแบบ *all-trans* β -carotene ทั้งหมด ซึ่งแตกต่างกันกับใน lipid globule ที่พบไอโซเมอร์ เช่น *all-trans* และ *9-cis* β -carotene ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 นอกจากนี้เมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะ ความเข้มแสงสูงจะมีปริมาณเบต้าแคโรทีนเพิ่มสูงขึ้น 20-30 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับใน ไทลาคอยด์

Jian-Guo และคณะ (1996) ศึกษาผลของไนเตรทและฟอสเฟตต่อการสะสมไอโซเมอร์ เบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *D. salina* ประเทศจีน พบว่ามีปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน total-*cis* (*9-cis*, *15-cis*) ต่อ *all-trans* สูงสุด เท่ากับ 60 ต่อ 39 เปอร์เซ็นต์ และ 63 ต่อ 36 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ปริมาณไนเตรท 0.1 กรัมต่อลิตร และ ฟอสเฟต 0.0 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้เมื่อนำ ปัจจัยทั้งสองมาเลี้ยงสาหร่ายร่วมกันพบว่าปริมาณ total *cis* เพิ่มขึ้นถึง 83 เปอร์เซ็นต์

Orset และ Young (2000) ทำการศึกษาความเข้มแสงต่อการปริมาณไอโซเมอร์ *9-cis* β -carotene ในสาหร่าย *D. salina* CCAP 19/30 พบว่าสาหร่ายมีอัตราส่วนของ *9-cis* ต่อ *all-trans* β -carotene เท่ากับ 2.0 ต่อ 1.0 ภายใต้ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตาราง เมตรต่อวินาที ขณะที่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มแสง 200 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำให้อัตราส่วนของ *9-cis* ต่อ *all-trans* ลดลง เท่ากับ 0.45 ต่อ 1.0 เท่า

Gomez และคณะ (2003) ทำศึกษาผลของความเค็มต่อการสะสมแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *D. salina* ประเทศชิลี โดยใช้สูตรของอาหารที่แตกต่างกัน ผลการศึกษาพบว่าจำนวนเซลล์ (1.1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาณแคโรทีนอยด์ (12.9 ± 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) และอัตราส่วน ระหว่าง *9-cis* ต่อ *all-trans* β -carotene (4.3 ต่อ 1.0) มีค่าสูงสุดภายใต้ความเค็ม 2.0 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ในอาหารสังเคราะห์สูตร ART

Gonzalez และคณะ (2005) ทำตรวจวัดปริมาณ *9-cis* β -carotene ของสาหร่าย *D. salina* ที่เพาะเลี้ยงในระบบปิดแบบกลางแจ้ง (closed tubular photobioreactor) พบว่าเมื่อ

ปริมาณแสงอาทิตย์เพิ่มสูงขึ้นปริมาณไอโซเมอร์ 9-*cis* ก็จะเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย ขณะที่ *all-trans* จะมีค่าลดลง โดยสาหร่ายมีปริมาณเบต้าแคโรทีนรูป 9-*cis* สูงสุด (มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์) ภายใต้ความเข้มแสง 322 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที หรือที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง

Hu และคณะ (2008) ทำการตรวจวัดปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนและประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่าย *D. salina* ที่เพาะเลี้ยงในประเทศไต้หวัน พบว่าองค์ประกอบของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนที่พบในสารสกัดสาหร่าย ได้แก่ 13-*cis*, *all-trans* และ 9-*cis* เท่ากับ 4.9, 138.2 และ 124.6 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH) ของสารสกัดสาหร่ายที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน *all-trans* β -carotene

Xu และคณะ (2018) ศึกษาศักยภาพการผลิตสารเบต้าแคโรทีนสาหร่าย *D. salina* จำนวน 5 สายพันธุ์ ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน (200 – 1,500 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) ผลพบว่าตรวจพบองค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนที่เด่นชัด 2 ชนิด ได้แก่ *all-trans* และ 9-*cis* ซึ่งเมื่อระดับความเข้มแสงสูงจะส่งผลให้ปริมาณไอโซเมอร์เพิ่มขึ้นตามไปด้วยในสาหร่าย *D. salina* ทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยปริมาณ *all-trans* และ 9-*cis* มีค่าสูงสุด เท่ากับ 1.3 – 3.5 และ 0.2 – 2.3 mg/L/day ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีนอกจากนี้ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี Principle component analysis (PCA) แสดงให้เห็นว่าปริมาณไอโซเมอร์มีความสัมพันธ์แปรผันตรงกับปริมาณแคโรทีนอยด์ ขณะที่แปรผกผันกับการเจริญเติบโต (SGR) ของสาหร่าย มีค่าความน่าเชื่อถือ เท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์

Xu และ Harvey (2019) ศึกษาผลของแสงสีแดงต่อการสังเคราะห์ไอโซเมอร์ 9-*cis* เบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *Dunaliella salina* ประเทศสหรัฐอเมริกา ผลพบว่าการให้แสงสีแดงที่ความเข้มแสง 500 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ส่งผลต่อการสังเคราะห์ 9-*cis* เบต้าแคโรทีนสูงสุด เท่ากับ 12.0 พิโคกรัมต่อเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับแสงสีขาวและแสงสีน้ำเงิน นอกจากนี้ภายใต้สีแดงพบว่าอัตราส่วนระหว่าง 9-*cis* ต่อ *all-trans* เบต้าแคโรทีน เท่ากับ 60 ต่อ 40 เปอร์เซ็นต์หรือมีสัดส่วนมากกว่า 2.5 ต่อ 1 เท่า ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง

จากงานวิจัยที่กล่าวมานั้นแสดงให้เห็นว่าการผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนนั้นมีปัจจัยหลักมาจากสภาวะการเลี้ยง เช่น ความเข้มแสงสูง ความเค็มสูง รวมถึงสภาวะการขาดสารอาหาร เป็นต้น ส่งผลทำให้สาหร่ายอยู่ในสภาวะเครียดและมีการเจริญเติบโตที่ลดลง จากนั้นสาหร่ายจึงมีวิธีการปรับตัวโดยการสังเคราะห์ปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะไอโซเมอร์ซิสเพื่อนำมาใช้ในการปกป้องอันตรายต่อเซลล์ให้สาหร่ายเจริญเติบโตต่อไปได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 กรอบแนวคิดของการศึกษา (conceptual framework of the study)

การศึกษาสภาวะการเลี้ยงต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนและสัดส่วนไอโซเมอร์ของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 สายพันธุ์ไทย มีทั้ง 5 ขั้นตอน ซึ่งมีรายละเอียดการดำเนินงานดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 การจำแนกและระบุชนิดสาหร่าย *D. salina* NUAC09 โดยเกณฑ์การจำแนกชนิดสาหร่ายนั้นจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้จากพื้นที่ของยีน ITS และ 18S rDNA จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลพันธุกรรม (GenBank) และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

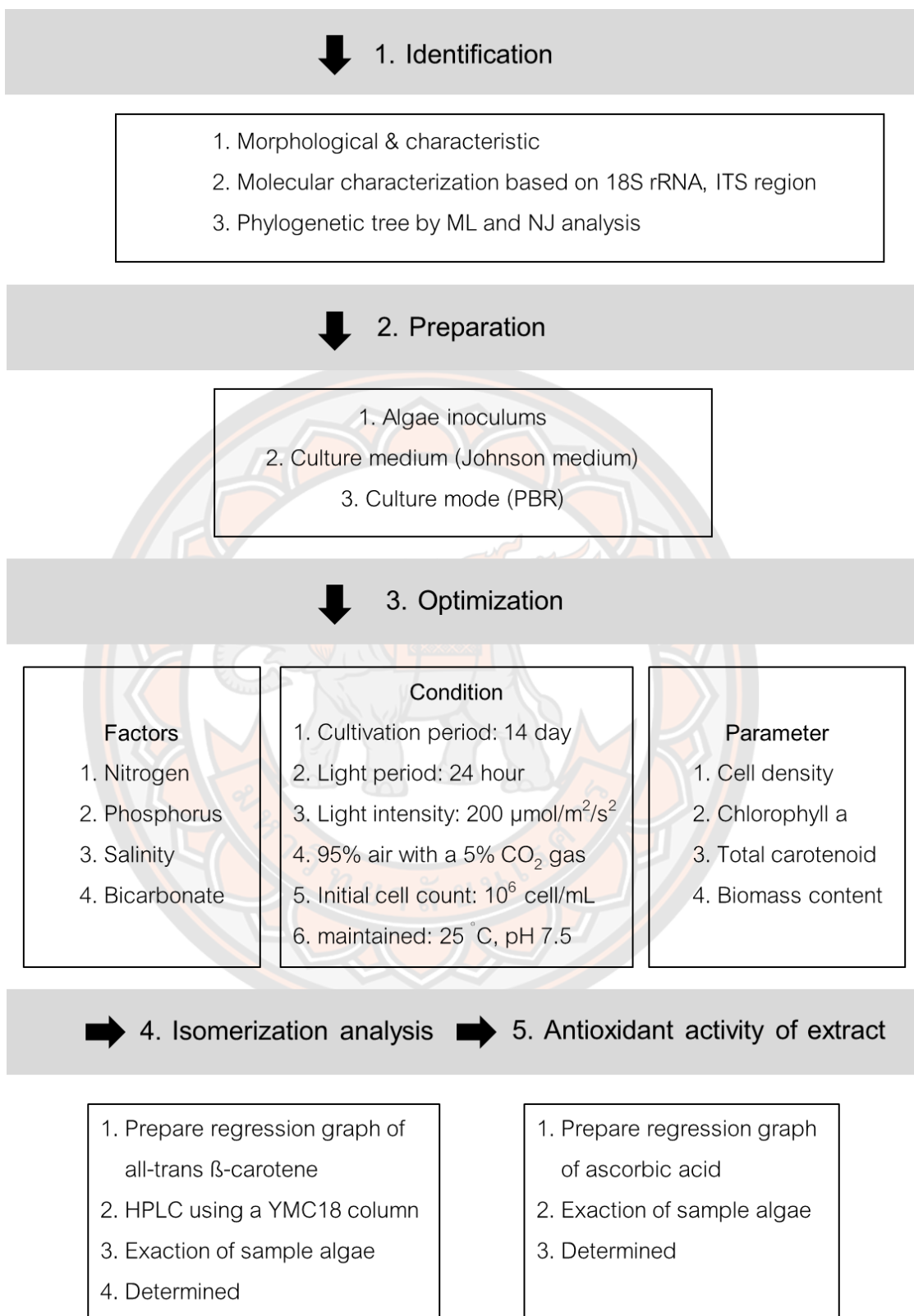
ขั้นตอนที่ 2 เริ่มจากการเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย *D. salina* NUAC09 จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร Johnson โดยหัวเชื้อสาหร่ายมีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10^6 ภายใต้ความเค็ม 1.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ จากนั้นเตรียมสถานที่ทดลอง วางแผนระบบการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดท่อแบบให้แสง (photobioreactor system) พร้อมทั้งกำหนดสภาวะที่ใช้เลี้ยงและพารามิเตอร์ที่ตรวจวัดตั้งแต่เริ่มการทดลองถึงสิ้นสุดการทดลอง ได้แก่ ความถี่ของการเก็บผลทดลอง ความเข้มแสง ระยะเวลาได้รับแสง ระบบให้อากาศร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดต่าง

ขั้นตอนที่ 3 ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยภายนอก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนตต่อการเจริญเติบโต การสะสมรงควัตถุ และผลผลิตชีวมวลของสาหร่าย *D. salina* NUAC09

ขั้นตอนที่ 4 ทำการศึกษองศาประกอบและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสารสกัดสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ของแต่ละปัจจัย โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ขั้นตอนที่ 5 ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH scavenging activity) และปริมาณสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ของแต่ละปัจจัย

ขั้นตอนที่ 6 นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง (ภาพ11)



ภาพ 11 กรอบแนวคิดของการศึกษา

3.2 พื้นที่ดำเนินการทดลอง

พื้นที่ทำการทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella* จะดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการนิเวศวิทยาทางน้ำ และการจัดการทรัพยากร สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

3.3 อุปกรณ์และสารเคมี

- 3.3.1 หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent tube) ขนาด 36 วัตต์ (Philips)
- 3.3.2 หลอดทดลองฝาเกลียวกันแหลม (centrifuge tube) ขนาด 2 มิลลิลิตร
- 3.3.3 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV–VIS spectrophotometer) (V-5100, China)
- 3.3.4 หลอดเลี้ยงสาหร่าย ขนาด 200 มิลลิลิตร
- 3.3.5 หม้อนึ่งแรงดัน (autoclave) ขนาด 50 ลิตร (SX700, Tomy, Japan)
- 3.3.6 บั๊มลม (air pump) ขนาด 25 วัตต์ (ACO 208, Hailea, China)
- 3.3.7 ตู้กระจก ขนาด 36 x 16 x 18 นิ้ว
- 3.3.8 ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 1.0, 5.0, 10.0 มิลลิลิตร
- 3.3.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (centrifuge) (Velocity14R, Dynamica, Australia)
- 3.3.10 เครื่องอิเล็กโทรโฟรีส แบบแนวนอน (Electrophoresis)
(JY-SPBT, JUNYI, China)
- 3.3.11 เครื่องวิเคราะห์เจล (Gel documentation) (P91DW, Mitsubishi, Japan)
- 3.3.12 โถดูดความชื้นแก้ว (desiccator) (DURAN, Germany)
- 3.3.13 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (SWEV069IW3A, Memmert, Germany)
- 3.3.14 เครื่องกรองสุญญากาศ (vacuum Filter) (Rocker 300, Rocker, Taiwan)
- 3.3.15 กระดาษกรองชนิด Gf/c microfiber filters ขนาด 47 มิลลิเมตร
(Whatman, England)
- 3.3.16 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ (compound microscope)
(YS Binocular, Nikon, Japan)
- 3.3.17 ขวดแก้วฝาเกลียว (duran bottle) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร (DURAN, Germany)
- 3.3.18 สไลด์นับเม็ดเลือด (hemocytometer) (BOE14V, Boeco, Germany)
- 3.3.19 คิวเวิร์กชนิดควอทซ์ (quartz cuvette) (Q11010, T-BOTA, China)

- 3.3.20 เครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)
- 3.3.21 คอลัมน์ (column) (YMC 30, Agilent, Europe GmbH)
- 3.3.22 แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) พร้อมหัวจ่าย (diffuser)
- 3.3.23 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) ขนาด 50 ลิตร (Model FD-5, Gold-Sim, USA)
- 3.3.24 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycle) (T100, Bio-Rad, USA)
- 3.3.25 สารเมทานอล (methanol) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Germany)
- 3.3.26 สารเอทานอล (ethanol) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Germany)
- 3.3.27 สารแอซีโตน (acetone) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Germany)
- 3.3.28 สารแอซีโตไนไตรท์ (acetonitrile) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Germany)
- 3.3.29 สารมาตรฐานเบต้าแคโรทีน (standard β -carotene, Sigma-Aldrich) (Merck KGaA, Germany)
- 3.3.30 สารฟอร์มาลีน (formalin) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์
- 3.3.31 สาร 2,2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma Aldrich, Merck KGa, Germany)
- 3.3.32 สารมาตรฐาน L-ascorbic acid (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Germany)

3.4 การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์

ทำความสะอาดเครื่องแก้ว และอุปกรณ์ต่าง ๆ โดยการนำมาล้างน้ำให้สะอาดแล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง จากนั้นนำเครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ทำสะอาดแล้วมาฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และนำมาอบด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5 การเก็บตัวอย่าง การคัดแยก และรักษาสายพันธุ์สาหร่าย

จากการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจากนาเกลือบริเวณอ่าวไทยจำนวน 3 จังหวัด ได้แก่ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และเพชรบุรี ตามวิธีการของ Pongpadung และคณะ (2020) จากนั้นทำการคัดแยกเชื้อสาหร่ายโดยใช้วิธีล้างเซลล์ด้วยไมโครปิเปต (micropipette washing method) นำเซลล์

สาหร่ายที่ได้ใส่ในหลอดแก้วที่มีอาหารเหลวสูตร D medium (Pick et al., 1986) ระดับความเค็ม 1.0 โมลาร์จากโซเดียมคลอไรด์ (ตารางภาคผนวก ข) วางหลอดแก้วในที่ที่มีแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 200 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ประมาณ 7–14 วัน เมื่อได้เชื้อสาหร่ายเพียงชนิดเดียวแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือทำให้เชื้อสาหร่ายเป็นแบบชนิดเดียว (unialgal culture) โดยใช้วิธีเชี่ยตัวอย่างสาหร่ายลงบนอาหารแข็งแล้วนำไปบ่มภายใต้ความเข้มแสง 200 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10–30 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีที่ไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียและราเพื่อใช้สำหรับทดสอบศักยภาพการเจริญเติบโตและการสะสมรงควัตถุ

โดยสามารถคัดแยกเชื้อสาหร่าย *Dunaliella* sp. NUAC ได้จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ NUAC07 กับ NUAC08 ซึ่งคัดแยกจากจังหวัดสมุทรสงคราม ส่วน NUAC09 กับ NUAC13 ซึ่งคัดแยกจากจังหวัดเพชรบุรี และ NUACB ซึ่งคัดแยกจากจังหวัดสมุทรสาคร ตามลำดับ ซึ่งพิจารณาจากลักษณะสัณฐานวิทยาทั่วไปของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ตามวิธีการของ Borowitzka และ Siva (2007) จากนั้นทดสอบการเจริญเติบโตและการผลิตรงควัตถุของเชื้อที่ไอโซเลทได้ด้วยอาหารเหลวสูตร Johnson (Abubakar et al., 2012) (ตารางภาคผนวก ข) ที่ความเค็ม 1.0 โมลาร์จากโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยทำตรวจสอบการเจริญเติบโต และการสะสมรงควัตถุ ทุก ๆ 2 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 มีจำนวนเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และปริมาณแคโรทีนอยด์สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้น NUAC09 จึงถูกคัดเลือกเพื่อนำมาใช้เป็นเชื้อตั้งต้น (initial culture) ที่มีศักยภาพในการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสำหรับการศึกษาอื่นต่อไป

3.6 การจำแนกและระบุชนิดสาหร่าย

3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย *Dunaliella* (Strain and materials)

นำหัวเชื้อสาหร่าย (unialgal culture) สายพันธุ์ *Dunaliella salina* NUAC09 จากคลังเก็บสายพันธุ์สาหร่าย คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร (Naresuan university algal collection; NUAC) ที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร D. medium (Pick et al., 1986) ที่ความเค็ม 1.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ โดยการใช้เข็มเชี่ยเชื้อ (loop) ตะลงบนโคโลนีสาหร่าย และนำมาแขวงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร Johnson ความเค็มอาหาร 1 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และค่า pH เท่ากับ 7.1 ± 2.0 นำมาวางบนชั้นที่ความเข้มแสง 50 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงเวลาได้รับแสงแบบต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง

(continuous photoperiod) อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน (Sathasivam et al., 2018) จากนั้นนำสาหร่ายไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่าง ๆ ต่อไป

3.6.2 การจำแนกโดยวิธีตามสัณฐานวิทยา (Morphological)

การจัดจำแนกสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ทำได้โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงร่วมกับอุปกรณ์ถ่ายภาพ ตามวิธีการของ Borowitzka และ Siva (2007) และทำการตรึงเซลล์สาหร่ายด้วยฟอร์มาลิน 2 เปอร์เซ็นต์ (Xu et al., 2018) จากนั้นทำการวัดขนาดความกว้างและความยาวของเซลล์สาหร่ายด้วยโปรแกรม Image J software (National institutes of Health, USA)

3.6.3 การจำแนกสาหร่าย *Dunaliella* ตามวิธีทางอนุชีววิทยา โดยใช้พื้นที่ยีน 18S rDNA และ Internal transcribed spacer (ITS)

1) การเตรียมสารพันธุกรรมต้นแบบ (DNA template)

การสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการ Phenol–chloroform extraction (Preetha et al., 2012) โดยเริ่มจากนำตัวอย่างสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ในอาหารเลี้ยงแบบเหลว (liquid medium) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย TE buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ปิดฝาสารละลายทั้งหมดทิ้งไป แล้วจึงนำมาเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 150 ไมโครลิตร พร้อมกับเติม SDS–EB buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ phenol, chloroform, isoamyl–alcohol ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จนสารละลายแยกชั้น จากนั้นนำสารละลายส่วนใสชั้นบนซึ่งมีสารพันธุกรรมละลายอยู่ถ่ายลงสู่หลอดทดลอง (microcentrifuge tube) หลอดใหม่ และเติมเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายข้างต้น และบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA) จากนั้นเทสารละลายทั้งหมดทิ้งแล้วเติมเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอน DNA อีกครั้งและปั่นเหวี่ยงเช่นเดิม เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงเทสารละลายทั้งหมดออกและทิ้งให้เอทานอลระเหยไปจนหมดประมาณ 15–20 นาที เมื่อตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้วทำการเติมน้ำกลั่นและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

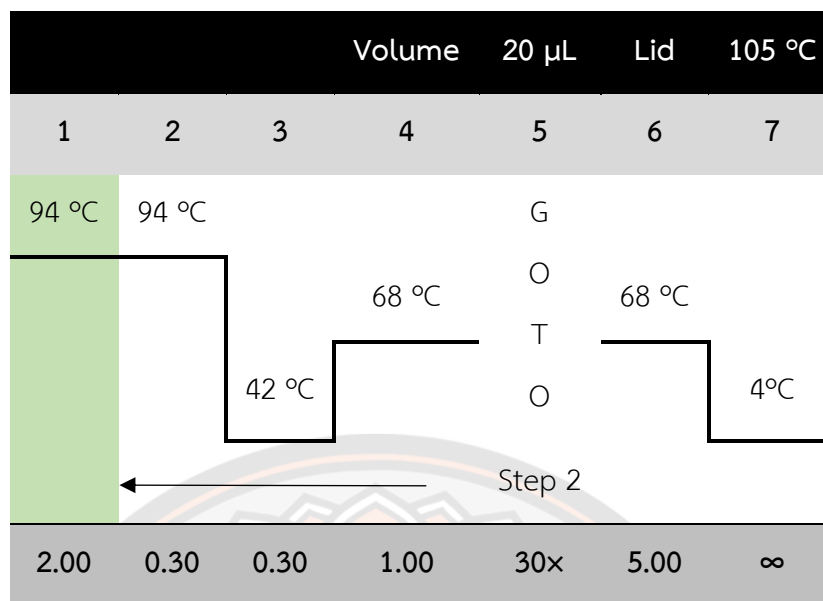
2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 1 เป็นต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพื้นที่ยีน 18S rDNA (18S ribosomal RNA) และพื้นที่ยีน ITS (Internal transcribed spacer) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ตามวิธีการของ Preetha และคณะ (2012) โดยพื้นที่ของยีน 18S rDNA ใช้ไพรเมอร์ยีน MA1 (5'-CGGGATCCGTAGTCATATGCTTGTCTC-3'), MA2 (5'-GGAATTCCTTCTGCAGGTTACCC-3') และพื้นที่ของ ITS ใช้ไพรเมอร์ยีน ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3') (White et al., 1990) ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย

- 1) น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 6.2 ไมโครลิตร
- 2) 2x Quick Taq HS DyeMix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
- 3) ไพรเมอร์#1 Forward ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร
- 4) ไพรเมอร์#2 Reverse ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร
- 5) ดีเอ็นเอต้นแบบของสาหร่าย 3 ไมโครลิตร

จากนั้นทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycle) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้ (ภาพ 12)

- 1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
- 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
- 3) annealing ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
- 4.) extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที



ภาพ 12 ปฏิบัติการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 นาที และเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจสอบผลการสังเคราะห์ rRNA ของพื้นที่ยีน 18S rDNA และพื้นที่ ITS บนเจลอะกาโรสตามวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ (Preetha et al., 2012)

3.6.4 วิธีการและขั้นตอนในการตรวจสอบดีเอ็นเอต้นแบบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

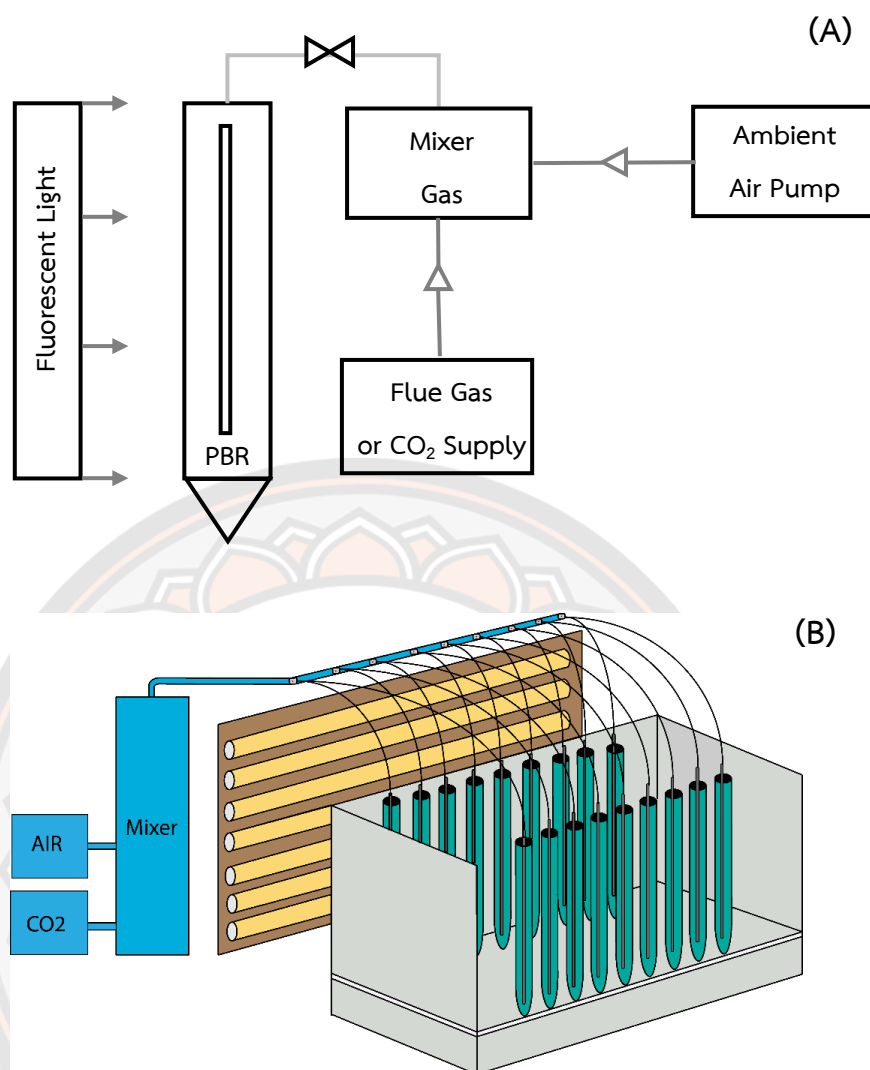
เตรียมผงวุ้น (agarose gel) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ใน 1×TAE buffer (40.0 mM Trisbase, 20.0 mM acetate, 2.0 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยตู้ไมโครเวฟ สังเกตจนเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ประมาณ 1–2 นาที นำออกมาตั้งที่อุณหภูมิห้องเพื่อลดอุณหภูมิ จากนั้นเติมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) จำนวน 1 มิลลิลิตร โดยเทเจลลงบนถาด (gel casting stand) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 20 – 30 นาที หรือจนกว่าเจลจะแข็งตัว ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสจะใช้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นระยะเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker ขนาด 100 – 1,500 bp ladder) ความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำเจลใส่ในกล่องพลาสติก แล้วนำไปถ่ายรูปโดยผ่านแสง UV (UV transilluminator) ภายใต้กล้องถ่ายรูป จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์ไปทำการอ่านข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ณ บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ต่อไป

3.6.5 วิธีการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 (accession no. MF359998) ที่ได้มาจัดเรียงเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลพันธุกรรม (GenBank) และวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) จากข้อมูลทางอนุชีววิทยาทำได้โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 และสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงจาก GenBank มาจัดเรียงตามวิธีการ CLUSTAL-W (Thompson et al., 1995) โดยใช้โปรแกรม BioEdit 7.0 (DNA sequence analysis software package) นำลำดับที่ได้จัดเรียงเรียบร้อยแล้วมาสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) และ Neighbor joining (NJ) ด้วยจำนวนซ้ำในการวิเคราะห์ (bootstrap) เท่ากับ 1,000 โดยใช้โปรแกรม MEGA5 (molecular evolutionary genetics analysis version 5.0) (Tamura et al., 2011) โดยใช้สาหร่าย *Chlamydomonas* เป็นสาหร่ายที่อยู่นอกกลุ่ม (outgroup)

3.7 สภาพที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย (cultivation conditions)

ในแต่ละการทดลองจะติดตั้งระบบเลี้ยงสาหร่าย โดยใช้หลอดแก้วขนาด 200 มิลลิลิตร (ภาพ 13) และมีปริมาตรในการเลี้ยงรวม 190 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร Johnson (ประกอบด้วย 1.0 M NaCl; MgCl₂ 1.5 g; MgSO₄ 0.5 g; KCl 0.2 g; CaCl₂ 0.2 g; KNO₃ 1.0 g; NaHCO₃ 0.043 g; KH₂PO₄ 0.035 g; Na₂EDTA 1.89 g; FeCl₃ 2.44 g; ZnCl₂ 4.1 mg; H₃BO₃ 61.0 mg; CoCl₂ 5.1 mg; CuCl₂ 4.1 mg; MnCl₂ 4.1 mg และ (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 38.0 mg) (Abubakar et al., 2012) (ตารางภาคผนวก ข) และหัวเชื้อสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 จำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรที่ใช้เลี้ยง ซึ่งจะมีปริมาตรเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10⁶ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงแบบต่อเนื่อง 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส (Ahmed et al., 2017) และให้อากาศที่มีส่วนผสมของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (อากาศ 95 เปอร์เซ็นต์ ต่อก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์) ด้วยอัตราการให้ (feed velocity) 50 มิลลิลิตรต่อนาที เลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 14 วัน



ภาพ 13 การเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง
โดย Side View (A) และ Top-view (B)

3.8 การศึกษาสภาวะการเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต และปริมาณรงควัตถุ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 โดยจะเป็นการศึกษาครั้งละปัจจัย ซึ่งแต่ละการทดลองวางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโต

ปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09

เลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรของ Johnson ที่มีปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจน (KNO_3) ที่แตกต่างกัน 5 ทริตเมนต์ๆ ละ 3 ซ้ำ ได้แก่ 0.00, 0.25, 0.50, 1.00 (ชุดควบคุม) และ 2.00 กรัมต่อลิตร (ตาราง 2) นำไปเลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงแบบต่อเนื่อง 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียสและให้อากาศที่มีส่วนผสมของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราการให้ (feed velocity) 50 มิลลิลิตรต่อนาที่ เลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 14 วัน

ตาราง 2 การศึกษาไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย

ชุดการทดลอง	ปริมาณไนโตรเจนในสูตรอาหารอาหาร	จำนวนซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 1	0.00 กรัม/ลิตร	3 ซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 2	0.25 กรัม/ลิตร	3 ซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 3	0.50 กรัม/ลิตร	3 ซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 4 (ชุดควบคุม)	1.00 กรัม/ลิตร	3 ซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 5	2.00 กรัม/ลิตร	3 ซ้ำ

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโต และปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09

เลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรของ Johnson ที่มีปริมาณความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (KH_2PO_4) ที่แตกต่างกัน 4 ทริตเมนต์ๆ ละ 3 ซ้ำ ได้แก่ 0.0, 0.035 (ชุดควบคุม), 0.053 และ 0.070 กรัมต่อลิตร (ตาราง 3) นำไปเลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงแบบต่อเนื่อง 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียสและให้อากาศที่มีส่วนผสมของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราการให้ (feed velocity) 50 มิลลิลิตรต่อนาที่ เลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 14 วัน

ตาราง 3 การศึกษาฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย

ชุดการทดลอง	ปริมาณฟอสฟอรัสในสูตรอาหารอาหาร	จำนวนซ้ำ
ทรีตเมนต์ที่ 1	0.00 กรัม/ลิตร	3 ซ้ำ
ทรีตเมนต์ที่ 2 (ชุดควบคุม)	0.035 กรัม/ลิตร	3 ซ้ำ
ทรีตเมนต์ที่ 3	0.053 กรัม/ลิตร	3 ซ้ำ
ทรีตเมนต์ที่ 4	0.070 กรัม/ลิตร	3 ซ้ำ

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของความเค็มที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโต และปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09

เลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรของ Johnson ที่มีปริมาณความเค็ม (NaCl) ที่แตกต่างกัน 7 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 5 ซ้ำ ได้แก่ 0.5, 1.0 (ชุดควบคุม), 1.5, 2.0, และ 2.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ (ตาราง 4) นำไปเลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงแบบต่อเนื่อง 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และให้อากาศที่มีส่วนผสมของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราการให้ (feed velocity) 50 มิลลิลิตรต่อนาที เลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 14 วัน

ตาราง 4 การศึกษาความเค็มที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย

ชุดการทดลอง	ปริมาณความเค็มในสูตรอาหารอาหาร	จำนวนซ้ำ
ทรีตเมนต์ที่ 1	0.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์	3 ซ้ำ
ทรีตเมนต์ที่ 2 (ชุดควบคุม)	1.0 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์	3 ซ้ำ
ทรีตเมนต์ที่ 3	1.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์	3 ซ้ำ
ทรีตเมนต์ที่ 4	2.0 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์	3 ซ้ำ
ทรีตเมนต์ที่ 5	2.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์	3 ซ้ำ

การทดลองที่ 4.1 การศึกษาผลของปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโต และ

ปริมาณของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09

เลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรของ Johnson ที่มีความเข้มข้นของไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) ที่แตกต่างกัน 5 ทริตเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ได้แก่ 0.00, 0.022, 0.043 (ชุดควบคุม), 0.065 และ 0.086 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร (ตาราง 5) นำไปเลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงแบบต่อเนื่อง 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตร ต่อวินาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียสและให้อาการด้วยอัตราการให้ (feed velocity) 50 มิลลิเมตรต่อนาที่ เลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 14 วัน

ตาราง 5 การศึกษาไบคาร์บอเนตต่อการเจริญเติบโต และปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย

ชุดการทดลอง	ปริมาณไบคาร์บอเนตในสูตรอาหารอาหาร	จำนวนซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 1	0.000 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร	3 ซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 2	0.022 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร	3 ซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 3 (ชุดควบคุม)	0.043 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร	3 ซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 4	0.065 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร	3 ซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 5	0.086 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร	3 ซ้ำ

การทดลองที่ 4.2 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณโซเดียมไบคาร์บอเนตร่วมกับก๊าซ

คาร์บอนไดออกไซด์ ต่อการเจริญเติบโต และปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย

Dunaliella salina NUAC09

จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าการใช้ไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.000 – 0.086 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ค่อนข้างต่ำ ประกอบกับงานวิจัยที่ผ่านมาว่าการเสริมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะส่งผลให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (Jeon et al., 2016; Kim, 2017) ดังนั้นจึงมีการศึกษาผลของไบคาร์บอเนตร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

เลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรของ Johnson ที่มีความเข้มข้นของไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) ที่แตกต่างกัน 6 ทริตเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ได้แก่ 0.00, 0.022, 0.032, 0.043 (ชุดควบคุม), 0.065 และ 0.086 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร

ร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 6) นำไปเลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงแบบต่อเนื่อง 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียสและให้อากาศที่มีส่วนผสมของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราการให้ (feed velocity) 50 มิลลิเมตรต่อวินาที เลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 14 วัน

ตาราง 6 การศึกษาไบคาร์บอเนตร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโต ปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย

ชุดการทดลอง	ปริมาณไบคาร์บอเนตในสูตรอาหารอาหาร	จำนวนซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 1	0.022 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร	3 ซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 2	0.032 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร	3 ซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 3 (ชุดควบคุม)	0.043 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร	3 ซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 4	0.065 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร	3 ซ้ำ
ทริตเมนต์ที่ 5	0.084 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร	3 ซ้ำ

3.9 การเก็บข้อมูล

ทำการเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ในแต่ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 14 วัน เก็บผลการทดลองทุก ๆ 2 วัน โดยพารามิเตอร์ที่ตรวจวัด ได้แก่ นับจำนวนเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และปริมาณแคโรทีนอยด์ หลังจากสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 14 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายทั้งหมด เพื่อนำไปวิเคราะห์พารามิเตอร์ ได้แก่ น้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ และองค์ประกอบของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.9.1 การนับจำนวนเซลล์โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (hemocytometer)

การนับเซลล์ทำได้โดยใช้สไลด์นับเซลล์เม็ดเลือด (hemocytometer) ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (NIKON, YS2, Japan) คำนวณตามสูตรและหาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ตามวิธีการของ Borovkov และคณะ (2019) ดังสมการ

การวัดจำนวนเซลล์ โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด ตามวิธีการของ Borovkov และคณะ (2019)

$$\text{เซลล์ต่อมิลลิลิตร (cell/mL)} = (C \times D \times 1000) / (A \times d \times F)$$

เมื่อ C คือ จำนวนสาหร่ายที่นับได้

A คือ พื้นที่ของกริด เท่ากับ 0.04 mL^2

d คือ ความลึกของพื้นที่ที่นับ เท่ากับ 0.1 mL

F คือ จำนวนช่องหรือตารางที่นับ

D คือ ค่าการเจือจาง

3.9.2 การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

นำสาหร่ายปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร มาตกตะกอนโดยการนำมาใส่ในหลอด micro centrifuged ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนที่เป็นอาหารออกจนเหลือเพียงส่วนที่เป็นตะกอนของสาหร่าย จากนั้นเติมแอสซิโตน 100 เปอร์เซ็นต์ (Torres et al., 2014) ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงนำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้ปิเปตแก้วดูดในส่วนของแอสซิโตน นำไปวัดคลอโรฟิลล์ เอ (Fazeli et al., 2006) และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (Borowitzka and Siva 2007) ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 452, 647 และ 664 นาโนเมตร ตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้คำนวณตามสมการดังต่อไปนี้

1) ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll *a*) ตามวิธีของ Fazeli และคณะ (2006)

$$\text{Chl} = 11.93 \times \text{Abs}_{664} - 1.93 \times \text{Abs}_{647} \times (\text{Ve}/\text{Vt})$$

เมื่อ Chl คือ ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

Abs_{664} คือ ค่าการดูดกลืนแสง 664 นาโนเมตร

Abs_{647} คือ ค่าการดูดกลืนแสง 647 นาโนเมตร

Ve คือ ปริมาตรสารละลายทั้งหมด (มิลลิลิตร)

Vt คือ ปริมาตรตัวอย่างสาหร่าย (มิลลิลิตร)

2) ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (Total carotenoid) ตามวิธีของ Borowitzka และ

Siva (2007)

$$C = Abs_{452} \times 3.86 \times (Ve/Vt)$$

เมื่อ C คือ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

Abs_{452} คือ ค่าการดูดกลืนแสง 452 นาโนเมตร

Ve คือ ปริมาตรสารละลายทั้งหมด (มิลลิลิตร)

Vt คือ ปริมาตรตัวอย่างสาหร่าย (มิลลิลิตร)

3.9.3 การเก็บเกี่ยวสาหร่ายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

หลังจากสิ้นสุดการทดลองระยะเวลา 14 วัน ทำการตรวจสอบน้ำหนักแห้งของสาหร่าย โดยใช้วิธีการในข้อ 1) หลังจากนั้นนำสาหร่ายส่วนที่เหลือไปทำการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนที่เป็นอาหารออกจนเหลือเพียงส่วนที่เป็นเซลล์ของสาหร่าย นำเซลล์สาหร่ายไปทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ ด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) (Model FD-5, Gold-Sim, USA) เพื่อกำจัดน้ำออกในปริมาณเซลล์แล้ว เก็บสาหร่ายแห้งไว้ที่ตู้เย็นแช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณและองค์ประกอบของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนต่อไป

1) การตรวจสอบน้ำหนักเซลล์แห้ง (biomass content)

เก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบต่อเนื่อง (continuous centrifuge) เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดเกลือออก จากนั้นนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (กรัมต่อลิตร; g/L) จากผลที่ได้นำไปคำนวณประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตซึ่งแสดงด้วยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; SGR) และ ระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time; t_d) ที่สภาวะการเลี้ยงต่าง ๆ โดยใช้สูตรตามวิธีการของ Srinivasan และคณะ (2018) ดังต่อไปนี้

น้ำหนักแห้งชีวมวล (dry biomass weight; g/L)

$$DW = SW/Vt$$

เมื่อ DW คือ น้ำหนักแห้งของตัวอย่างสาหร่าย (กรัมต่อลิตร)

SW คือ น้ำหนักของตัวอย่างแห้ง (กรัม)

Vt คือ ปริมาตรตัวอย่างสาหร่าย (ลิตร)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; μ /day)

$$\mu = \ln (N_2 / N_1) / (t_2 - t_1)$$

เมื่อ N_2 หรือ N_1 คือ ความหนาแน่นของเซลล์ที่วันเก็บผลการศึกษาดังกล่าว

T_2 หรือ T_1 คือ ระยะเวลาเก็บผลการศึกษาดังกล่าว

ระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time; t_d)

$$\text{Doubling time} = 0.693/\mu$$

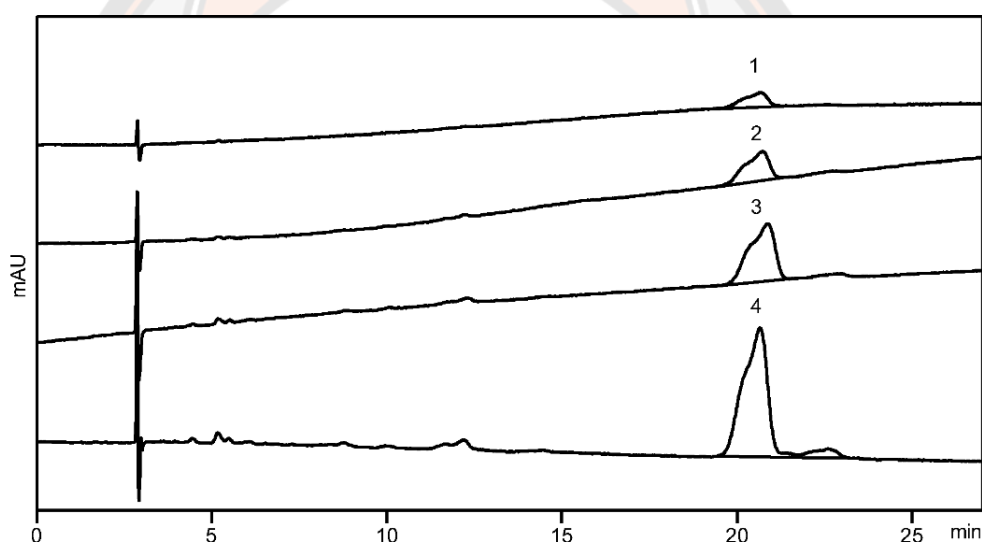
3.10 การวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน

การตรวจสอบองค์ประกอบของเบต้าแคโรทีน (β -carotene profile) ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) โดยจะแบ่งออกเป็นการเตรียมกราฟมาตรฐานเบต้าแคโรทีน การวัดแบบตรวจเช็คองค์ประกอบไอโซเมอร์ และวัดเชิงปริมาณของเบต้าแคโรทีนในสารสกัดตัวอย่างสาหร่ายซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.10.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานเบต้าแคโรทีน

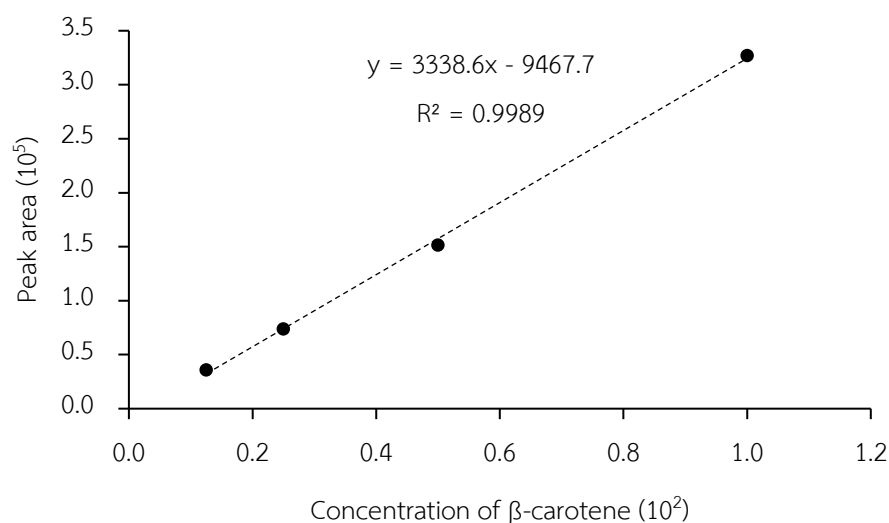
ซึ่ง 10 มิลลิกรัมของสารมาตรฐานทรานส์เบต้าแคโรทีน (Sigma-Aldrich, USA) นำมาทำละลายด้วย MTBE – MeOH (20 : 80) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีน ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 13.6, 25.0, 48.2 และ 100.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ppm) ตามลำดับ (**ภาพ 14 และ ตาราง 7**) นำสารละลายมาตรฐานซิสและทรานส์เบต้าแคโรทีนที่เตรียมไว้มาทำการฉีดสารสกัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (HPLC; Agilent 1200 series quaternary pump) โดยใช้ UV – vis photodiode array detector ชนิดคอลัมน์ที่ใช้ Acclaim C18 (5.0 μ m, 4.6 $\times$ 150

มิลลิเมตร) ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ MTBE – MeOH ในอัตราส่วน 20 ต่อ 80 ที่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิตรต่อนาที และระยะเวลาที่ฉีด 25 นาที ระบบที่ใช้ตรวจวัดสารเบต้าแคโรทีนจะใช้ช่วงคลื่นแสง 450 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้สร้างกราฟมาตรฐานโดยแทนพื้นที่ใต้พีคด้วยแกน Y (peak area) และแทนค่าความเข้มข้นของไอโซเมอร์สารมาตรฐานเบต้าแคโรทีนด้วยแกน X มีหน่วยเป็น mg/g DW หรือ ppm จากนั้นทำการคำนวณเพื่อสร้างสมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้น (R^2) เท่ากับ 0.999 และสมการที่ได้คือ $y = 3338.6x - 9467.7$ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมในการวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนด้วยสารมาตรฐาน *all-trans* β -carotene (ภาพ 15)



ภาพ 14 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน *all-trans* β -carotene

โดยความเข้มข้นของสารมาตรฐานเบต้าแคโรทีน ได้แก่ 13.6 (หมายเลข 1), 25.0 (หมายเลข 2), 48.2 (หมายเลข 3) และ 100.8 ppm (หมายเลข 4) ตามลำดับ



ภาพ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน *all-trans* β-carotene ในช่วงความเข้มข้น 14 ถึง 100 ppm

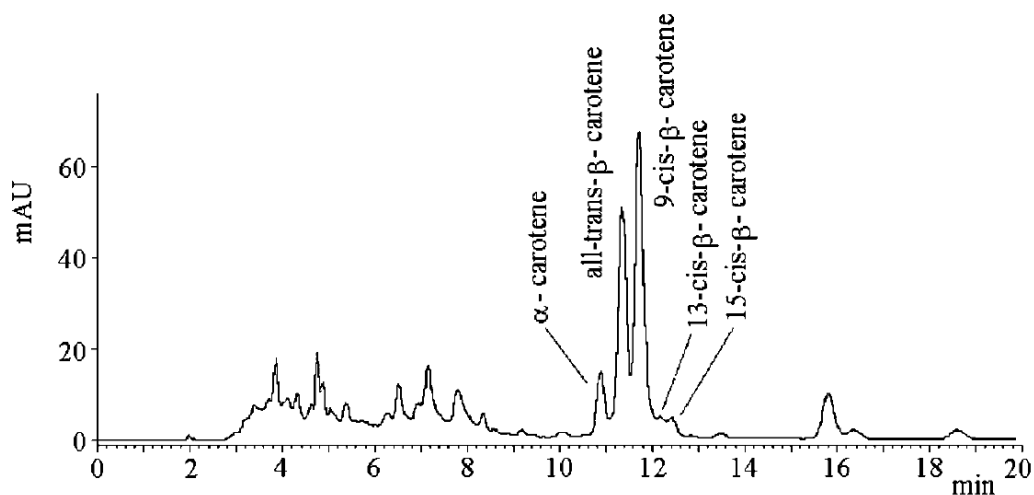
ตาราง 7 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน *all-trans* β-carotene

Sample Name	Retention time	Peak Area	Height	Concentration	Units
A	20.67	35852.0	746.0	13.6	ppm
B	20.72	73832.0	1521.0	25.0	ppm
C	20.87	151430.0	2998.0	48.2	ppm
D	20.60	326998.0	6746.0	100.8	ppm

3.10.2 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis)

ดัดแปลงตามวิธีการของ Xu และคณะ (2018) ทำการเตรียมสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 (ซึ่งปริมาณสาหร่ายแห้ง 10 กรัม นำไปสกัดด้วยสาร MTBE–MeOH อัตราส่วน 20 ต่อ 80 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง (filter membrane) ขนาดช่องผ่านสารละลาย 0.2 มิลลิเมตร เมื่อทำการกรองตัวอย่างเรียบร้อยแล้วฉีดตัวอย่างในปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้สภาวะตามข้อ 3.10.1 การระบุชนิดขององค์ประกอบเบต้าแคโรทีนในสารสกัดหยาบสาหร่ายจะถูกเปรียบเทียบกับของสารมาตรฐาน β-carotene ที่มีค่าเวลาการคงอยู่ retention time (RT)

ใกล้เคียงกันหรือเท่ากันซึ่งแสดงว่าเป็นสารเดียวกัน รวมถึงอ้างอิงตามผลการศึกษาอื่น ๆ ที่พบว่าไอโซเมอร์แบบทรานส์จะถูกตรวจสอบพบก่อนไอโซเมอร์ซิสเสมอ (ภาพ 16)



ภาพ 16 ลักษณะโครมาโทแกรมขององค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนในสาหร่าย

Dunaliella salina ด้วยเทคนิค HPLC/DAD

ที่มา: Bononi และคณะ (2002)

3.10.3 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis)

ทำการฉีดสารสกัดเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ตามสถานะข้อ 3.10.1 จากนั้นนำพีคที่ปรากฏหรือค่า retention time (RT) มาวัดขนาดพื้นที่ของแต่ละพีค (peak height; h) จากนั้นนำค่าพื้นที่พีคที่ได้มาคำนวณหาปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนที่พบโดยใช้สมการของกราฟมาตรฐานเบต้าแคโรทีน (Sigma-Aldrich, Inc.) (ภาพ 16)

3.11 การตรวจสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH activity

ดัดแปลงตามวิธีของ Nguyen และคณะ (2016) เป็นการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ คือ อนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซ (DPPH, diphenyl – picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวมีสีม่วง โดยใช้อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ของสาร DPPH ต่อสารหยาบสกัดสาหร่าย ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที เมื่อสาร DPPH ได้รับโมเลกุลของไฮโดรเจน (hydrogen atom) จากสารสกัดหยาบสาหร่ายที่ใช้ในการทดสอบ จะทำให้สีของปฏิกิริยาจากสีม่วงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และนำไปวัดค่า

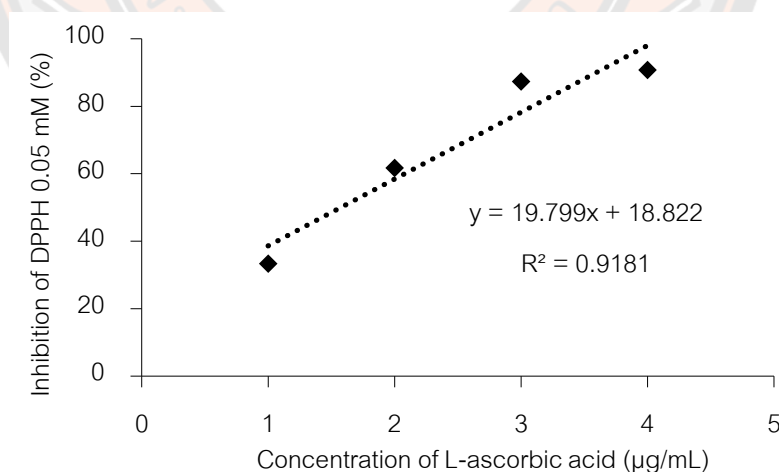
ดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 517 นาโนเมตร (nm) นำค่าที่ได้มาคำนวณร้อยละการยับยั้ง (inhibition of DPPH) ตามสมการดังนี้

$$\text{ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100 \text{ (Nguyen et al., 2016)}$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (ตัวทำละลายร่วมกับสาร DPPH)

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ (สารสกัดร่วมกับสาร DPPH)

การเตรียมกราฟทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH scavenging activity) ของสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid ที่ความเข้มข้น ช่วง 2.0 ถึง 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับค่าร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน มีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้น (R^2) เท่ากับ 0.9181 ซึ่งสมการที่ได้ คือ $y = 19.799x + 18.822$ เมื่อค่า x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid มีหน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ ppm และ y คือ ร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน (% Inhibition of DPPH) (ภาพ 17)



ภาพ 17 กราฟมาตรฐานของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid

3.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม น้ำหนักแห้งของชีวมวล การเจริญเติบโตเฉลี่ยจำเพาะ ค่าการเจริญเติบโตสองเท่า ปริมาณเบต้าแคโรทีน และร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดสำหรับ ในแต่ละทรีตเมนต์ มาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance; ANOVA) เมื่อพบความแตกต่างจะทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ปริมาณความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม R version 3.5.1 (R development core team, 2009)



บทที่ 4

ผลการศึกษา

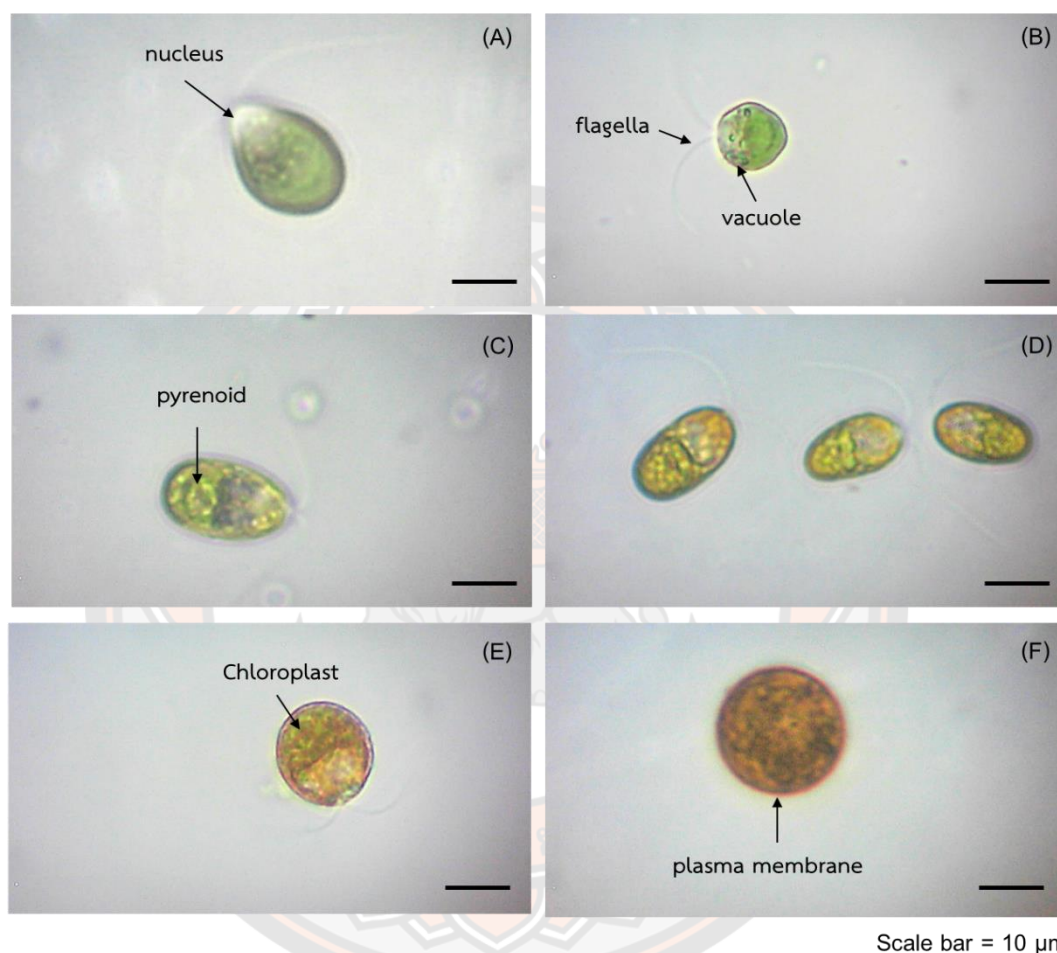
จากการศึกษาสภาวะการเลี้ยงต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนและสัดส่วนไอโซเมอร์ของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 สายพันธุ์ไทย โดยการศึกษาผู้วิจัยได้แบ่งผลการทดลองเป็น 4 หัวข้อ ได้แก่ (4.1) การจัดจำแนกสาหร่ายด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา (4.2) ผลของปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและการสะสมรงควัตถุ (4.3) การศึกษาองค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน และ (4.4) การศึกษาการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ซึ่งผลการทดลองแต่ละหัวข้อมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.1 การจัดจำแนกสาหร่ายด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยเมื่อเลี้ยงสาหร่ายในอาหารปกติที่มีความเค็ม 1.0 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ พบว่าสภาวะปกติเซลล์ (vegetative cells) จะมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว สีของเซลล์เป็นสีเขียวอ่อน ไม่มีผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ รูปร่างเซลล์มีลักษณะค่อนข้างกลมหรือรี (คล้ายรูปไข่) ขนาดช่วงความยาวปกติของเซลล์ (length size) เท่ากับ 14.5 – 16.1 ไมโครเมตร ขนาดช่วงความกว้าง (width size) เท่ากับ 8.7 – 10.2 ไมโครเมตร และมีแฟกเจลลาขนาดเท่ากัน (flagella) จำนวน 2 เส้น ขนาดความยาวแฟกเจลลาเฉลี่ย 24.28 ± 3.48 ไมโครเมตร (ตาราง 8) ภายในเซลล์พบคลอโรพลาสต์รูปถ้วย (chloroplast cup-shaped) ขนาดใหญ่อยู่บริเวณตรงกลางเซลล์ และพบไพรีนอยด์ (pyrenoid) มีลักษณะกลมใสเพียง 1 ไพรีนอยด์อยู่ค่อนข้างไปทางปลายด้านหนึ่งของเซลล์ นอกจากนี้ยังสังเกตพบแวคิวโอลอยู่บริเวณข้างเซลล์อย่างชัดเจน (ภาพ 18 A-B)

เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Johnson ที่ระดับความเค็ม 0.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ ร่วมกับการจำกัดไนโตรเจน (0.05 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรตต่อลิตร) เป็นระยะเวลา 16 วัน แสดงให้เห็นว่าในช่วงวันที่ 0 – 8 สาหร่ายมีลักษณะเช่นเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น (ภาพ 18 A-B) แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปพบว่าในวันที่ 8 – 12 ของการเลี้ยง เซลล์สาหร่ายเริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างคือเซลล์ส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นแบบวงรี (ความกว้างและความยาวเฉลี่ย เท่ากับ 7.6 และ 12.2 ไมโครเมตร) สีของเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลืองบริเวณผนังเซลล์ใกล้กับคลอโรพลาสต์จะมีสีส้ม

ปรากฏ รวมถึงสังเกตเห็นคลอโรพลาสต์ขนาดใหญ่อย่างชัดเจน (ภาพ 18 C และ D) หลังจากวันที่ 14 เป็นต้นไป พบว่าเซลล์สาหร่ายจำนวนมากมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นทรงกลมเรียกว่าเข้าสู่ระยะซิสต์ (cyst cells) มีขนาดช่วงความกว้างเพิ่มขึ้น เท่ากับ 12.0 – 20.3 ไมโครเมตร สังเกตไม่พบคลอโรพลาสต์และแฟกเจลลา รวมถึงมีการเปลี่ยนสีของเซลล์ไปเป็นสีส้มถึงแดง (ภาพ 18 E-F)



ภาพ 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจน

โดย ภาพ A (ลูกศรแสดง: นิวเคลียส) และภาพ B (ลูกศร: แฟกเจลลา แวกคิวโอล) ช่วงวันที่ 0 – 8 ของการเลี้ยงเซลล์จะอยู่ในระยะปรับตัวและมีสีเขียว ขณะที่ภาพ C และภาพ D (ลูกศรแสดง: ไพเรินอยด์) ช่วงวันที่ 8 – 12 เซลล์เกิดการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองถึงส้มแสดงถึงการสะสมเบต้าแคโรทีนภายใต้การจำกัดสารอาหาร และภาพ E และ F (ลูกศรแสดง: คลอโรพลาสต์ และพลาสมาเมมเบรน) หลังจากวันที่ 14 เซลล์เข้าสู่หยุดนิ่งหรือระยะซิสต์ รูปร่างทรงกลมและสีของเซลล์เปลี่ยนเป็นสีส้มถึงแดง

ตาราง 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ภายใต้การจำกัดสารอาหาร

Details	Cell cycle		
	lag phase	log phase	Stationary phase
Cell color	Green light	Yellow-green	Orange to red
Cell shape	Ovoid, spherical,	Some cell, spherical,	Most cell, ovoid
	Cylindrical	Cylindrical	
Length (μm)	14.5 – 16.1	10.9 – 13.7	–
Width (μm)	8.7 – 10.0	6.2 – 8.8	12.0 – 20.3
Flagella	Two, symmetry, 24.2 μm	Two, symmetry, 17.9 μm	Not clearly visible or diffuse
Cell wall	Lack of cell wall	Lack of cell wall	Lack of cell wall
Stigma	small	small	Not clearly visible
Pyrenoid	Not clearly visible, small	Clearly, one, Large	Clearly, one, Large
Chloroplast	Not clearly visible	One, Large, cup-shaped	One, Large, cup-shaped
Day of cultivation	0 – 8 day	8 – 12 day	≥14 day

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D., n=3) วัดขนาดและความยาวด้วยโปรแกรม image J

4.2 การจัดจำแนกสาหร่ายด้วยลักษณะทางอนุชีววิทยา

4.2.1 การจำแนกและการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rDNA และ internal transcribed spacer (ITS)

จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนของตำแหน่งยีน 18S rDNA และ internal transcribed spacer (ITS) ของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ด้วยไพรเมอร์ MA1F และ MA2R ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ (PCR product) ขนาดประมาณ 1,159 และ 703 pb และเมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงเปรียบเทียบ (BLAST search) กับฐานข้อมูลพันธุกรรม (GenBank) พบว่าสาหร่าย NUAC09 จัดอยู่ในสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA มีค่าร้อยละความเหมือน (% similarity) อยู่ระหว่าง 98.0 – 98.8 เปอร์เซ็นต์ โดยถือว่าเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง โดยจัดอยู่ในกลุ่มสาหร่าย *D. salina* CCAP 19/12, CCAP 19/25, UTEX LB 2538, CCAP 19/18, CCAP 19/30, MBTD-CMFRI-S089 และ CS265 ตามลำดับ (ตาราง 9) ขณะที่ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพื้นที่ยีน ITS พบว่า NUAC09 จัดอยู่ในกลุ่มสาหร่าย *D. salina* และมีค่าร้อยละความเหมือน อยู่ระหว่าง 93.3 – 95.2 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ CCAP 19/18, CCAP 19/30, CCAP 19/18, CCAP 19/12, CCAP 19/30 และ CCAP 19/25 ตามลำดับ (ตาราง

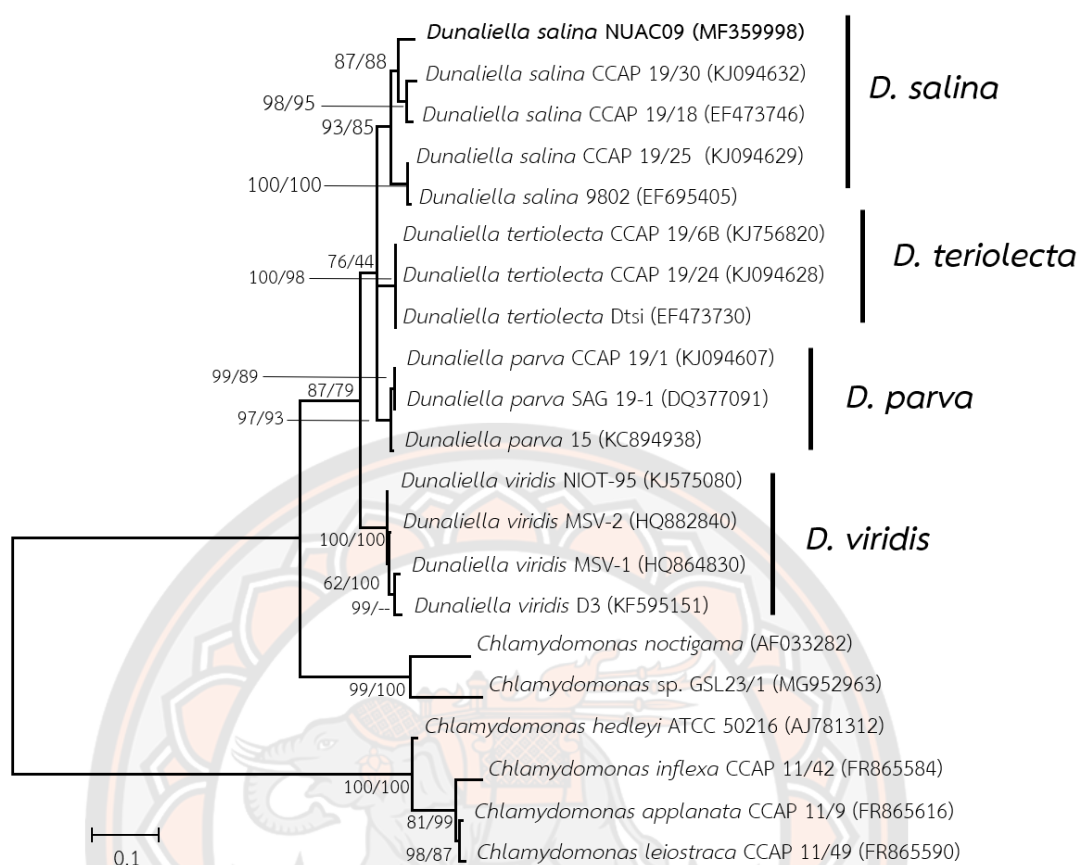
9) ดังนั้นจากผลการศึกษาพื้นที่ยีนทั้งสองแสดงให้เห็นว่ามีความสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันว่าสาหร่าย NUAC09 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับสาหร่ายสายพันธุ์ *Dunaliella salina*

จากนั้นได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะพื้นที่ยีน internal transcribed spacer (ITS) ของสาหร่าย NUAC09 มาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Maximum likelihood (ML) และ Neighbor joining (NJ) ผลการศึกษาพบว่าสาหร่าย NUAC09 ถูกจัดว่ามีความใกล้เคียงกันสูงสุดและอยู่ในกลุ่ม (clade) เดียวกันกับสาหร่าย *D. salina* CCAP 19/30, *D. salina* CCAP 19/18, *D. salina* CCAP 19/25 และ *D. salina* 9802 อย่างชัดเจนและมีค่าบูทสตรัปสูงสุด (high bootstrap value) เท่ากับ 93 (ML) และ 85 (NJ) เปอร์เซ็นต์ (ภาพ19) ในขณะที่สาหร่าย *D. teriolecta*, *D. parva* และ *D. viridis* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพื้นที่ยีน ITS นั้นมีความเหมาะสมในการจำแนกความแตกต่างของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ระดับชนิด (species) รวมถึงสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยฐานข้อมูลพันธุกรรม (BLAST search) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสาหร่าย *Dunaliella* NUAC09 อ้างอิงข้อมูลทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับอนุชีววิทยาภายใต้ชื่อ *D. salina* NUAC09

ตาราง 9 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพื้นที่ยีน 18S rDNA และ ITS กับฐานข้อมูลพันธุกรรม

No.	Accession	Scientific Name	Strain	Gene	Identify (%)	Nucleotide (bp)	location
1	KJ756842.1	<i>D. salina</i>	CCAP 19/12	18S	98.8	1,700	UK
2	MG022673.1	<i>D. salina</i>	CCAP 19/25	18S	98.7	2,160	UK
3	DQ009777.1	<i>D. salina</i>	UTEX LB	18S	98.0	2,088	USA
4	EF473745.1	<i>D. salina</i>	CCAP 19/18	18S	98.0	2,151	Italy
5	DQ447648.1	<i>D. salina</i>	CCAP 19/30	18S	98.0	2,185	France
6	JF708173.2	<i>D. salina</i>	MBTD-CMFRI-S089	18S	98.0	1,575	India
7	JN807321.2	<i>D. salina</i>	CS265	18S	98.0	1,575	India
8	EF473746.1	<i>D. salina</i>	CCAP 19/18	18S	95.2	1,241	Italy
9	JN797804.1	<i>D. salina</i>	-	ITS1	95.2	667	India
10	EU932917.1	<i>D. salina</i>	CCAP 19/30	ITS1	95.0	673	France
11	KJ094622.1	<i>D. salina</i>	CCAP 19/18	ITS1	94.8	648	England
12	KJ756826.1	<i>D. salina</i>	CCAP 19/12	ITS1	94.7	656	UK
13	KJ094632.1	<i>D. salina</i>	CCAP 19/30	ITS1	94.3	654	England
14	KJ094629.1	<i>D. salina</i>	CCAP 19/25	ITS1	93.3	705	England

หมายเหตุ % identify คือ ร้อยละความเหมือนของสาหร่าย (similarity), ขนาดความยาวของดีเอ็นเอ (base pair, bp)



ภาพ 19 แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของสาหร่าย NUAC09

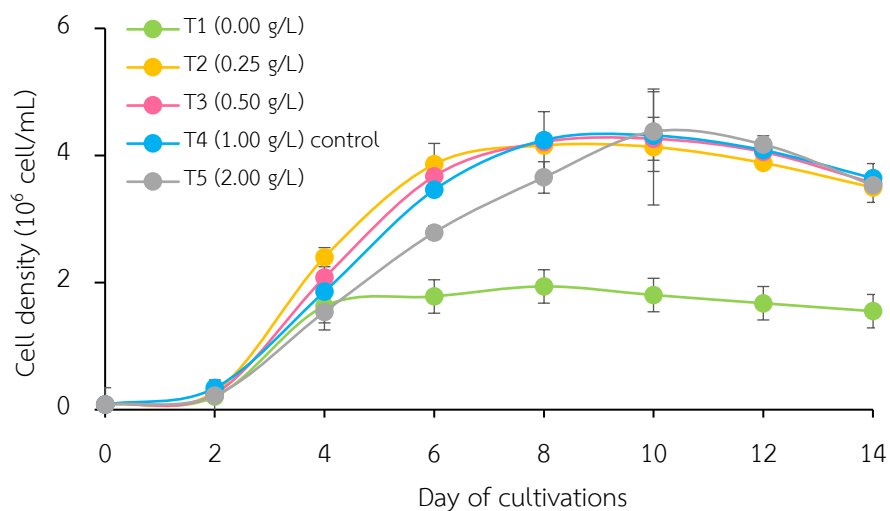
โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของพื้นที่ยีน ITS วิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum likelihood และ (ML) ร่วมกับวิธี Neighbor-joining (NJ) โดยมี *Chlamydomonas* เป็นสาหร่ายที่อยู่นอกกลุ่ม (outgroup)

4.3 ผลของไนโตรเจนที่ต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย

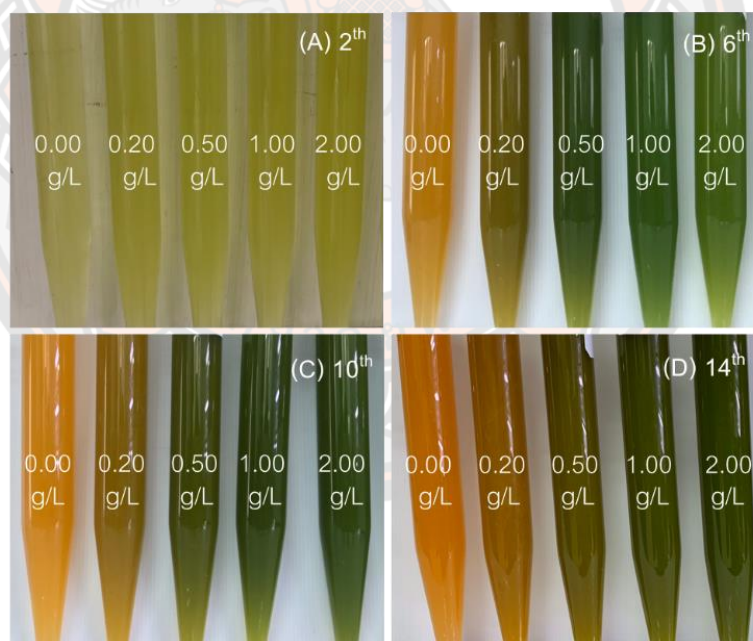
ทำการเพาะเลี้ยง *Dunaliella salina* NUAC09 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Johnson ที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของไนโตรเจนหรือโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ในอาหาร ได้แก่ 0.00 (T1), 0.25 (T2), 0.50 (T3), 1.00 (ชุดควบคุม T4) และ 2.00 (T5) กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่าย เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าชุดการทดลอง T1, T2, T3, T4 และ T5 (ภาพ 20) มีลักษณะการเจริญเข้าสู่ระยะปรับตัว (lag phase) ช่วงวันที่ 0 ถึง 2 จากนั้นจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง (log phase) ตั้งแต่วันที่ 2 ถึง 8 ของการทดลอง หลังจากนั้นเซลล์จะเข้าสู่ระยะหยุดนิ่ง (stationary phase) และจำนวนเซลล์จะเริ่มลดลงหลังจากวันที่ 12 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่สาหร่ายในชุดการทดลอง T1 (0.0 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรท

ต่อลิตร) เข้าสู่ระยะหยุดนิ่งตั้งแต่วันที่ 4 จากภาพ 20 แสดงให้เห็นว่าในวันที่ 10 ของการทดลอง สาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ชุดการทดลอง T5 (2.00 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรตต่อลิตร) มีจำนวนเซลล์สูงสุด เท่ากับ $4.38 \pm 0.63 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่จำนวนเซลล์ต่ำสุด คือ ชุดการทดลอง T1 (0.00 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรตต่อลิตร) เท่ากับ $1.94 \pm 0.08 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 ของการทดลอง ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้เมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น เซลล์สาหร่ายมีการเปลี่ยนสี จากสีเขียวเป็นสีส้มอย่างเด่นชัดภายใต้การขาดไนโตรเจน (0.0 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรตต่อลิตร) (ภาพ 21)

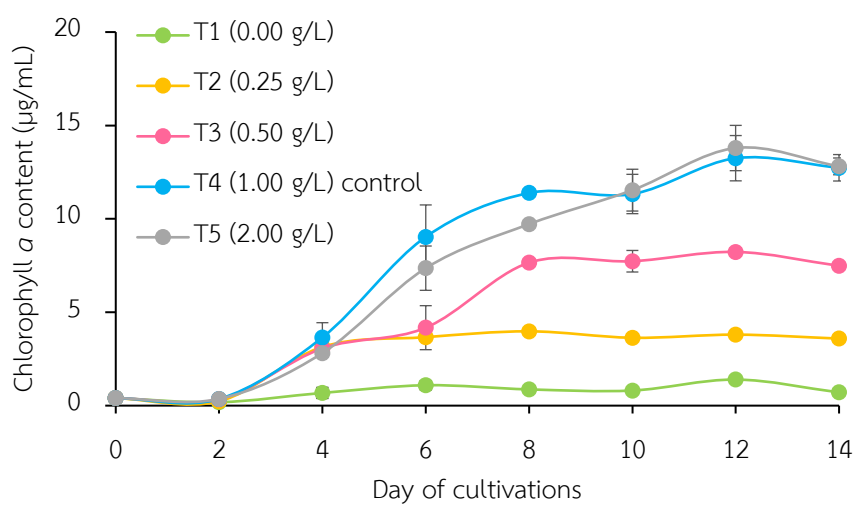
เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 14 วัน ปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T5 มีปริมาณเท่ากับ 12.81 ± 0.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3.63 ± 0.11 พิโคกรัมต่อเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม T4 ($p \leq 0.05$) ขณะที่ชุดการทดลอง T1 มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอต่ำสุด เท่ากับ 0.71 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.45 ± 0.07 พิโคกรัมต่อเซลล์ (ภาพ 22 และตาราง 10) สำหรับปริมาณแคโรทีนอยด์รวม มีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T2 ปริมาณเท่ากับ 53.14 ± 2.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 20.62 ± 1.38 พิโคกรัมต่อเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม T4 ($p \leq 0.05$) ขณะที่ชุดการทดลอง T1 มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่ำสุด เท่ากับ 25.94 ± 0.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 16.39 ± 2.45 พิโคกรัมต่อเซลล์ (ภาพ 23 และตาราง 10) อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์กับคลอโรฟิลล์เอ พบว่ามีค่าสูงสุด คือ ชุดการทดลอง T1 มีค่าเท่ากับ 36.60 ± 1.31 เท่า และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T5 มีค่าเท่ากับ 2.52 ± 0.12 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม T4 ($p \leq 0.05$) การเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดจากน้ำหนักแห้ง (biomass dry weight) พบว่ามีค่าสูงสุด คือ ชุดควบคุม T4 มีค่าเท่ากับ 6.89 ± 1.42 กรัมต่อลิตร และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T1 มีค่าเท่ากับ 3.47 ± 1.90 กรัมต่อลิตร ($p \leq 0.05$) อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยจำเพาะ (SGR) มีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T4 มีค่าเท่ากับ 0.81 ± 0.03 μ ต่อวัน และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T1 มีค่าเท่ากับ 0.44 ± 0.03 μ ต่อวัน ($p \leq 0.05$) ระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time, td) มีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T1 มีค่าเท่ากับ 1.56 ± 0.10 μ ต่อวัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม T4 ที่มีค่าต่ำสุด ($p \leq 0.05$) (ตาราง 10)



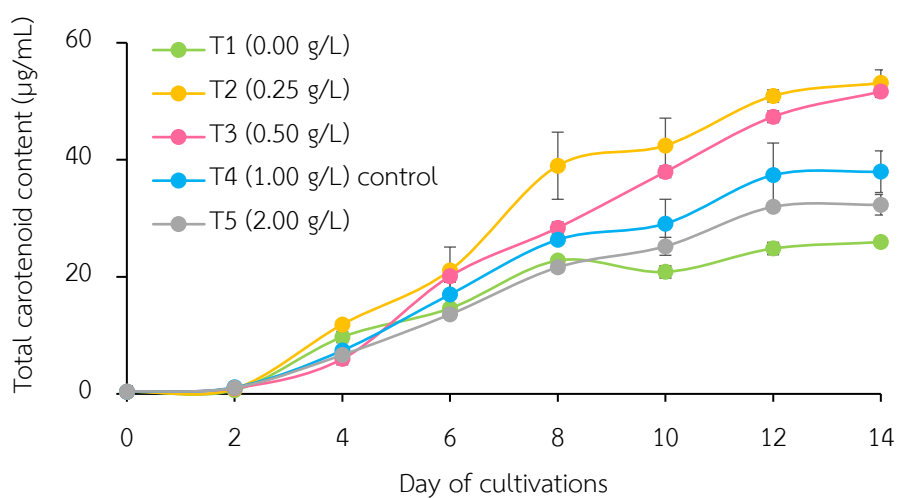
ภาพ 20 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน



ภาพ 21 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน โดย ภาพ (A) วันที่ 2; ภาพ (B) วันที่ 6; ภาพ (C) วันที่ 10 และภาพ (D) วันที่ 14 ตามลำดับ



ภาพ 22 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน



ภาพ 23 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน

ตาราง 10 การเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

Parameter	Concentrations of nitrogen (g KNO ₃ /L)					p-value
	T1 (0.0 g/L)	T2 (0.2 g/L)	T3 (0.5 g/L)	T4 (1.0 g/L)	T5 (2.0 g/L)	
Cell density (x10 ⁶ cell/mL)	1.94±0.08 ^b	4.16±0.01 ^a	4.26±0.34 ^a	4.31±0.44 ^a	4.38±0.63 ^a	0.00
Chlorophyll <i>a</i> (µg/mL)	1.39±0.28 ^d	3.98±0.12 ^c	8.23±0.22 ^b	13.25±1.21 ^a	13.79±1.21 ^a	0.00
Chlorophyll <i>a</i> (pg/cell)	0.72±0.13 ^c	0.90±0.18 ^c	1.94±0.10 ^b	3.08±0.59 ^a	3.27±0.71 ^a	0.00
Total carotenoid (µg/mL)	25.94±0.54 ^d	53.14±2.24 ^a	51.67±1.52 ^a	37.97±3.56 ^b	32.32±1.76 ^c	0.02
Total carotenoid (pg/cell)	13.38±0.25 ^a	12.09±3.29 ^{ab}	12.16±0.87 ^{ab}	8.83±1.75 ^{bc}	7.75±2.13 ^c	0.00
Carotenoid/Chlorophyll	19.08±3.74 ^a	13.38±0.96 ^b	6.28±0.22 ^c	2.87±0.10 ^d	2.36±0.28 ^d	0.00
Biomass dry weight (g/L)	3.47±1.90	3.60±1.75	4.47±2.14	6.89±1.42	5.21±1.19	0.17
Specific growth rate (µ/day)	0.44±0.03 ^c	0.61±0.09 ^b	0.60±0.09 ^b	0.76±0.03 ^a	0.82±0.00 ^a	0.00
Doubling time (t _d)	1.56±0.10 ^a	1.00±0.07 ^b	1.12±0.11 ^{bc}	0.86±0.03 ^c	0.93±0.12 ^c	0.00

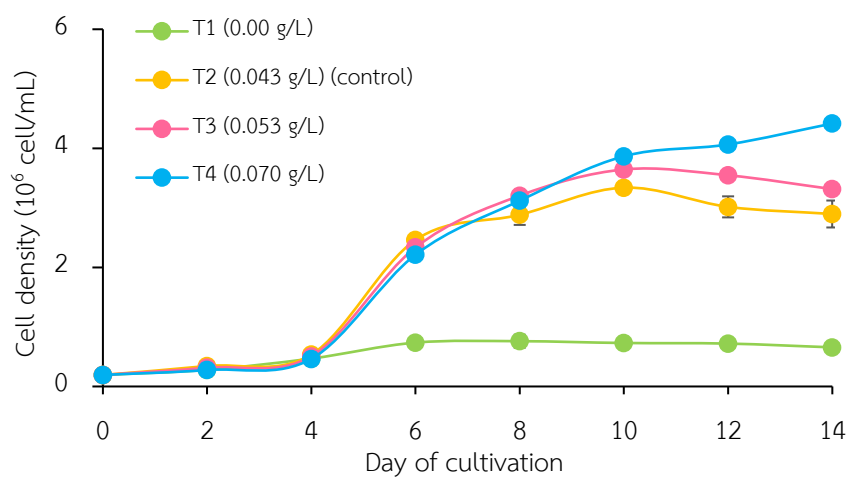
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D., n=3) ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

4.4 ผลของฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย

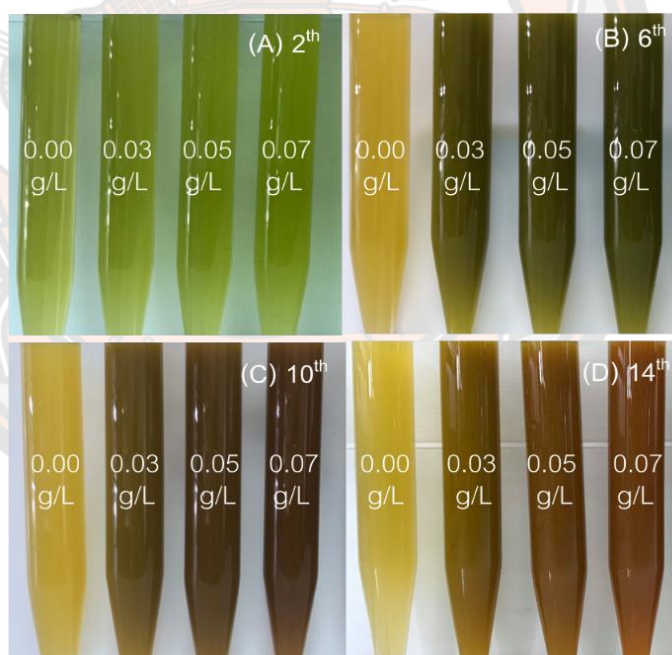
ทำการเพาะเลี้ยง *Dunaliella salina* NUAC09 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Johnson ที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของฟอสฟอรัสหรือโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH₂PO₄) ในอาหาร ได้แก่ 0.00 (T1), 0.035 (T2; ชุดควบคุม), 0.053 (T3) และ 0.070 (T4) กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่าย เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ในชุดการทดลอง T1, T2 (ควบคุม), T3 และ T4 (ภาพ 24) มีลักษณะการเจริญเข้าสู่ระยะปรับตัว (lag phase) ช่วงวันที่ 0 ถึง 4 จากนั้นจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง (log phase) ตั้งแต่วันที่ 4 ถึง 10 ของการทดลอง หลังจากนั้นเซลล์จะเข้าสู่ระยะหยุดนิ่ง (stationary phase) และจำนวนเซลล์จะเริ่มลดลงหลังจากวันที่ 10 ในชุดการทดลอง T2 และ T3 จนสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่ชุดการทดลอง T4 มีการเจริญอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 14 นอกจากนี้ชุดการทดลอง T1 พบว่าเข้าสู่ระยะหยุดนิ่ง (stationary phase) ตั้งแต่วันที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม T2 (p<0.05) นอกจากนี้เมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น เซลล์สาหร่ายมีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีเขียวเป็นสีส้มอย่างเด่นชัดภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่เพิ่มขึ้น (ภาพ 25)

จากภาพ 24 แสดงให้เห็นว่าในวันที่ 14 ของการทดลอง สาหร่าย *D. salina* NUAC09 ชุดการทดลอง T4 (0.07 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร) มีจำนวนเซลล์สูงสุด เท่ากับ $4.42 \pm 0.28 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม T2 ($p \leq 0.05$) ขณะที่จำนวนเซลล์ต่ำสุด คือ ชุดการทดลอง T1 (0.00 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร) เท่ากับ $0.66 \pm 0.03 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 ของการทดลอง

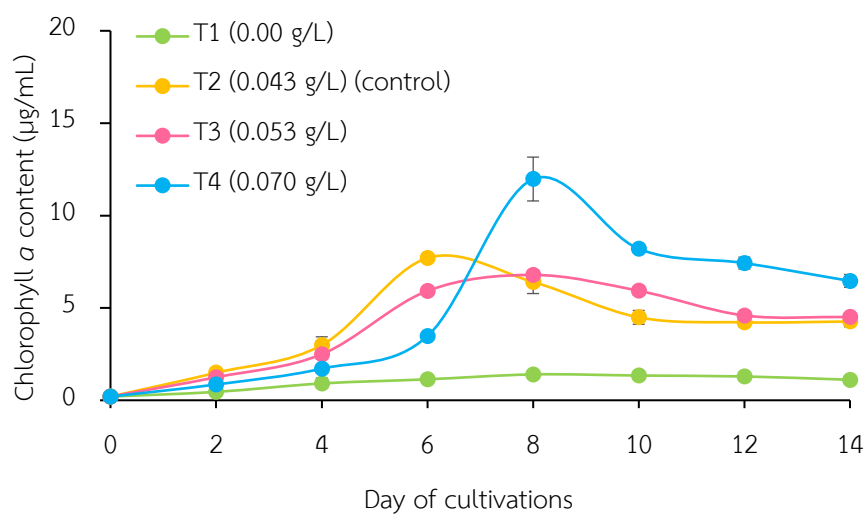
เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 14 วัน ปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T4 มีปริมาณเท่ากับ 6.46 ± 0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.47 ± 0.09 พิโคกรัมต่อเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม T2 ($p \leq 0.05$) ขณะที่ชุดการทดลอง T1 มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอต่ำสุด เท่ากับ 1.11 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.69 ± 0.05 พิโคกรัมต่อเซลล์ (ภาพ 26 และตาราง 11) สำหรับปริมาณแคโรทีนอยด์รวม มีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T4 ปริมาณเท่ากับ 40.86 ± 8.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 9.20 ± 1.33 พิโคกรัมต่อเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม T2 ($p \leq 0.05$) ขณะที่ชุดการทดลอง T1 มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่ำสุด เท่ากับ 10.55 ± 0.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 16.06 ± 0.75 พิโคกรัมต่อเซลล์ (ภาพ 27 และตาราง 11) อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์กับคลอโรฟิลล์เอ พบว่ามีค่าสูงสุด คือ ชุดการทดลอง T1 เท่ากับ 9.52 ± 0.63 เท่า และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T2 เท่ากับ 5.13 ± 2.95 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม T2 ($p \leq 0.05$) การเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดจากน้ำหนักแห้ง (biomass dry weight) พบว่ามีค่าสูงสุด คือ ชุดควบคุม T4 มีค่าเท่ากับ 21.3 ± 0.00 กรัมต่อลิตร และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T1 มีค่าเท่ากับ 6.05 ± 0.00 กรัมต่อลิตร ($p \leq 0.05$) อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยจำเพาะ (SGR) มีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T2 มีค่าเท่ากับ 0.66 ± 0.10 μ ต่อวัน และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T1 มีค่าเท่ากับ 0.38 ± 0.02 μ ต่อวัน ($p \leq 0.05$) ระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time, td) มีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T1 มีค่าเท่ากับ 1.84 ± 0.12 μ ต่อวัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม T2 ที่มีค่าต่ำสุด เท่ากับ 1.07 ± 0.18 μ ต่อวัน ($p \leq 0.05$) (ตาราง 11)



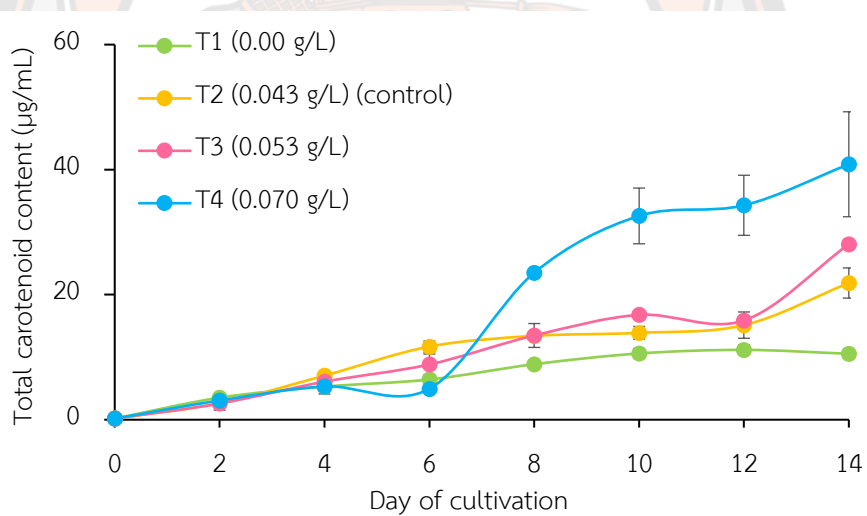
ภาพ 24 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน



ภาพ 25 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน โดยภาพ (A) วันที่ 2; ภาพ (B) วันที่ 6; ภาพ (C) วันที่ 10 และภาพ (D) วันที่ 14 ตามลำดับ



ภาพ 26 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน



ภาพ 27 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน

ตาราง 11 การเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน

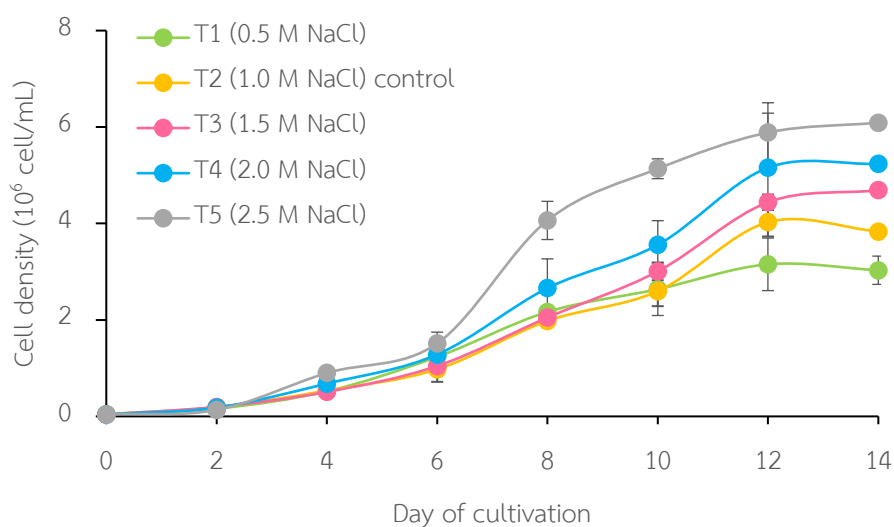
Parameter	Concentration of phosphorus (g KH ₂ PO ₄ /L)				p-value
	T1 (0.00 g/L)	T2 (0.035 g/L)	T3 (0.053 g/L)	T4 (0.070 g/L)	
Cell number (x10 ⁶ unit/mL)	0.66±0.03 ^c	2.90±0.23 ^b	3.32±0.06 ^b	4.42±0.28 ^a	0.00
Chlorophyll <i>a</i> (µg/mL)	1.11±0.03 ^c	4.26±0.31 ^b	4.51±0.00 ^b	6.46±0.35 ^a	0.00
Chlorophyll <i>a</i> (pg/cell)	1.69±0.05	1.49±0.27	1.36±0.03	1.47±0.09	0.11
Total carotenoid (µg/mL)	10.55±0.73 ^c	21.87±0.75 ^b	28.08±2.41 ^b	40.86±8.40 ^a	0.00
Total carotenoid (pg/cell)	16.06±0.75 ^c	7.61±0.72 ^b	8.46±0.56 ^b	9.20±1.33 ^a	0.00
Carotenoid/Chlorophyll	9.52±0.63 ^c	5.13±2.95 ^b	6.23±2.18 ^{ab}	6.32±7.05 ^a	0.00
Biomass dry weight (g/L)	0.61±0.00 ^d	2.00±0.00 ^c	2.06±0.00 ^b	2.13±0.00 ^a	0.00
Specific growth rate (µ/day)	0.38±0.02 ^b	0.66±0.10 ^a	0.62±0.07 ^a	0.57±0.03 ^a	0.00
Doubling time (t _d)	1.84±0.12 ^a	1.07±0.18 ^b	1.12±0.13 ^b	1.22±0.07 ^b	0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D., n=3) ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05)

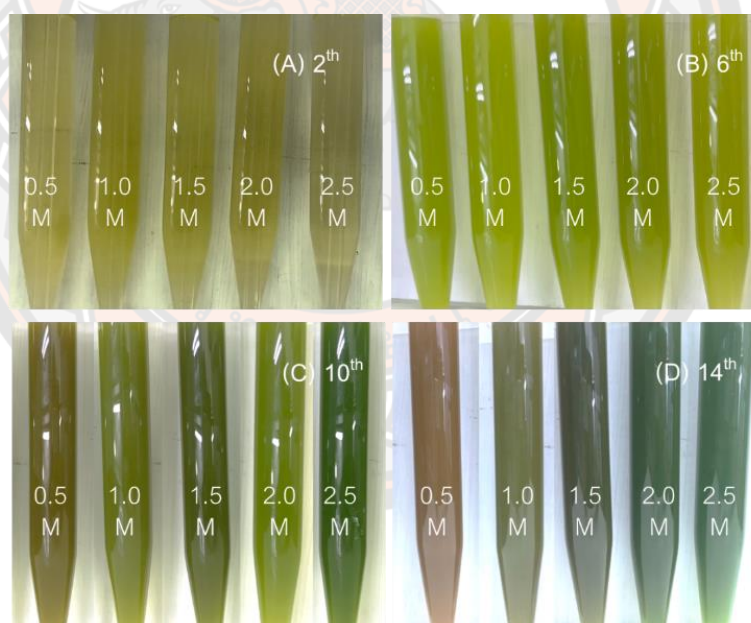
4.5 ผลของความเค็มที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย

ทำการเพาะเลี้ยง *Dunaliella salina* NUAC09 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Johnson ที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของความเค็ม หรือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในอาหาร ได้แก่ 0.5 (T1), 1.0 (T2; ชุดควบคุม), 1.5 (T3), 2.0 (T4) และ 2.5 (T5) โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับ จากนั้นทำการติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่าย เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ในชุดการทดลอง T1, T2, T3, T4 และ T5 (ภาพ 28) มีลักษณะการเจริญเข้าสู่ระยะปรับตัว (lag phase) ช่วงวันที่ 0 ถึง 4 จากนั้นจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง (log phase) ตั้งแต่วันที่ 4 ถึง 12 ของการทดลอง หลังจากนั้นเซลล์จะเข้าสู่ระยะหยุดนิ่ง (stationary phase) และจำนวนเซลล์จะเริ่มลดลงหลังจากวันที่ 12 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง นอกจากนี้เมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น เซลล์สาหร่ายมีการเปลี่ยนแปลงสี จากสีเขียวเป็นสีส้มอย่างเด่นชัดภายใต้ระดับความเค็ม (0.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์) (ภาพ 29)

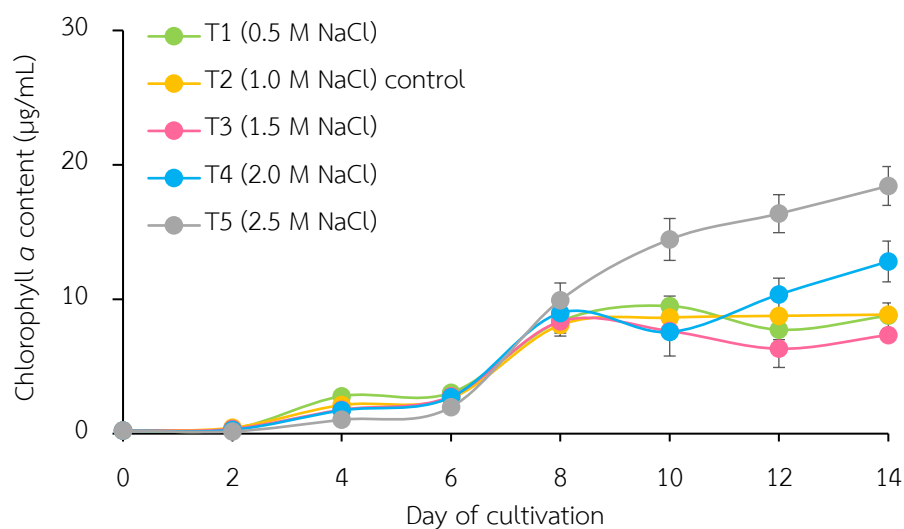
จากภาพ 28 แสดงให้เห็นว่าในวันที่ 14 ของการทดลอง สาหร่าย *D. salina* NUAC09 ชุดการทดลอง T5 ที่เลี้ยงในปริมาณความเค็ม 2.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ มีจำนวนเซลล์สูงสุด เท่ากับ $6.09 \pm 0.04 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดความเค็ม T2 ($p \leq 0.05$) ขณะที่จำนวนเซลล์ต่ำสุด คือ ชุดการทดลอง T1 ที่ปริมาณความเค็ม 0.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ $3.03 \pm 0.29 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 14 วัน ปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T5 มีปริมาณเท่ากับ 18.43 ± 1.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 6.14 ± 0.97 พิโคกรัมต่อเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดความเค็ม T2 ($p \leq 0.05$) ขณะที่ชุดการทดลอง T3 มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอต่ำสุด เท่ากับ 7.34 ± 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.56 ± 0.03 พิโคกรัมต่อเซลล์ (ภาพ 30 และ ตาราง 12) สำหรับปริมาณแคโรทีนอยด์รวม มีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T1 ปริมาณเท่ากับ 42.67 ± 4.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 7.01 ± 0.86 พิโคกรัมต่อเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดความเค็ม T2 ($p \leq 0.05$) ขณะที่ชุดการทดลอง T5 มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่ำสุด เท่ากับ 21.60 ± 1.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 7.19 ± 1.02 พิโคกรัมต่อเซลล์ ($p \geq 0.05$) (ภาพ 31 และ ตาราง 12) อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์กับคลอโรฟิลล์เอ พบว่ามีค่าสูงสุด คือ ชุดการทดลอง T1 มีค่าเท่ากับ 4.86 ± 0.20 เท่า และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T5 มีค่าเท่ากับ 1.17 ± 0.02 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดความเค็ม T2 ($p \leq 0.05$) การเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดจากน้ำหนักแห้ง (biomass dry weight) พบว่ามีค่าสูงสุด คือ ชุดการทดลอง T5 มีค่าเท่ากับ 1.56 ± 0.92 กรัมต่อลิตร และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T1 มีค่าเท่ากับ 5.75 ± 1.06 กรัมต่อลิตร ($p \leq 0.05$) อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยจำเพาะ (SGR) มีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T1 มีค่าเท่ากับ 0.63 ± 0.00 μ ต่อวัน และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T3 มีค่าเท่ากับ 0.52 ± 0.05 μ ต่อวัน ($p \leq 0.05$) ระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time, td) มีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T3 มีค่าเท่ากับ 1.33 ± 0.13 และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T1 มีค่าเท่ากับ 1.10 ± 0.00 เมื่อนำวิเคราะห์พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \geq 0.05$) (ตาราง 12)



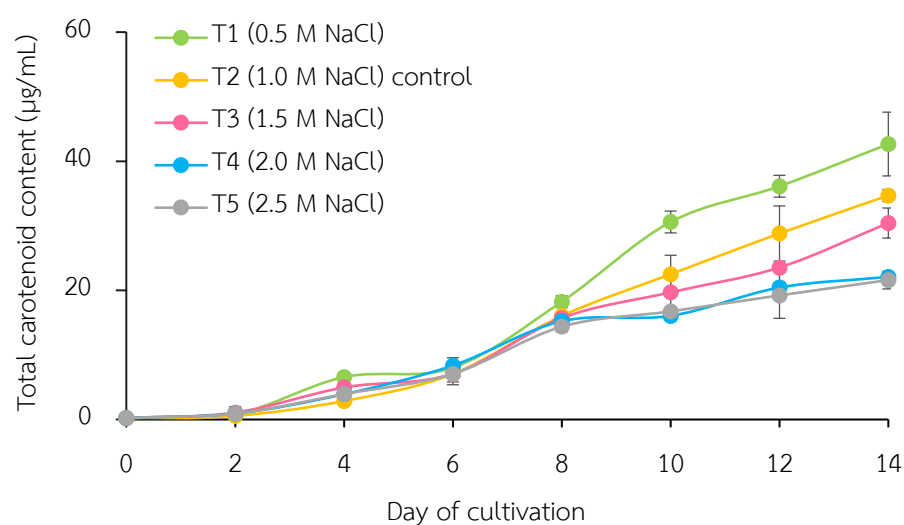
ภาพ 28 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณความเค็มที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน



ภาพ 29 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณความเค็มที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน โดยภาพ (A) วันที่ 2; ภาพ (B) วันที่ 6; ภาพ (C) วันที่ 10 และภาพ (D) วันที่ 14 ตามลำดับ



ภาพ 30 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณความเค็มที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน



ภาพ 31 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณความเค็มที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน

ตาราง 12 การเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ภายใต้ปริมาณความเค็มที่แตกต่างกัน

Parameter	Concentrations of salinity (M NaCl)					p-value
	T1 (0.5 M)	T2 (1.0 M)	T3 (1.5 M)	T4 (2.0 M)	T5 (2.5 M)	
Cell number ($\times 10^6$ unit/mL)	3.03 $\pm$ 0.29 ^d	3.83 $\pm$ 0.05 ^c	4.69 $\pm$ 0.06 ^b	5.24 $\pm$ 0.11 ^b	6.09 $\pm$ 0.04 ^a	0.00
Chlorophyll <i>a</i> (μ g/mL)	8.77 $\pm$ 0.96 ^c	8.86 $\pm$ 0.36 ^c	7.34 $\pm$ 0.17 ^c	12.81 $\pm$ 1.52 ^b	18.43 $\pm$ 1.45 ^a	0.00
Chlorophyll <i>a</i> (pg/cell)	2.93 $\pm$ 0.55 ^a	2.31 $\pm$ 0.12 ^b	1.56 $\pm$ 0.03 ^c	2.47 $\pm$ 0.40 ^{ab}	3.03 $\pm$ 0.26 ^a	0.00
Total carotenoid (μ g/mL)	42.67 $\pm$ 4.94 ^a	34.70 $\pm$ 0.93 ^b	30.43 $\pm$ 2.33 ^b	22.10 $\pm$ 0.21 ^c	21.60 $\pm$ 1.37 ^c	0.00
Total carotenoid (pg/cell)	14.22 $\pm$ 2.56 ^d	9.08 $\pm$ 0.48 ^{cd}	6.49 $\pm$ 0.44 ^c	4.26 $\pm$ 0.50 ^b	3.55 $\pm$ 0.25 ^a	0.00
Carotenoid/Chlorophyll	4.86 $\pm$ 0.20 ^a	3.92 $\pm$ 0.26 ^b	4.15 $\pm$ 0.33 ^b	1.72 $\pm$ 0.19 ^c	1.17 $\pm$ 0.02 ^d	0.00
Biomass dry weight (g/L)	0.58 $\pm$ 0.11 ^d	0.81 $\pm$ 0.12 ^c	1.13 $\pm$ 0.21 ^b	1.15 $\pm$ 0.14 ^b	1.56 $\pm$ 0.09 ^a	0.00
Specific growth rate (μ /day)	0.63 $\pm$ 0.00 ^a	0.56 $\pm$ 0.05 ^{ab}	0.52 $\pm$ 0.05 ^b	0.56 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.62 $\pm$ 0.04 ^a	0.04
Doubling time (t_d)	1.10 $\pm$ 0.00	1.25 $\pm$ 0.12	1.33 $\pm$ 0.13	1.23 $\pm$ 0.09	1.11 $\pm$ 0.07	0.05

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.D., n=3) ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p $\leq$ 0.05)

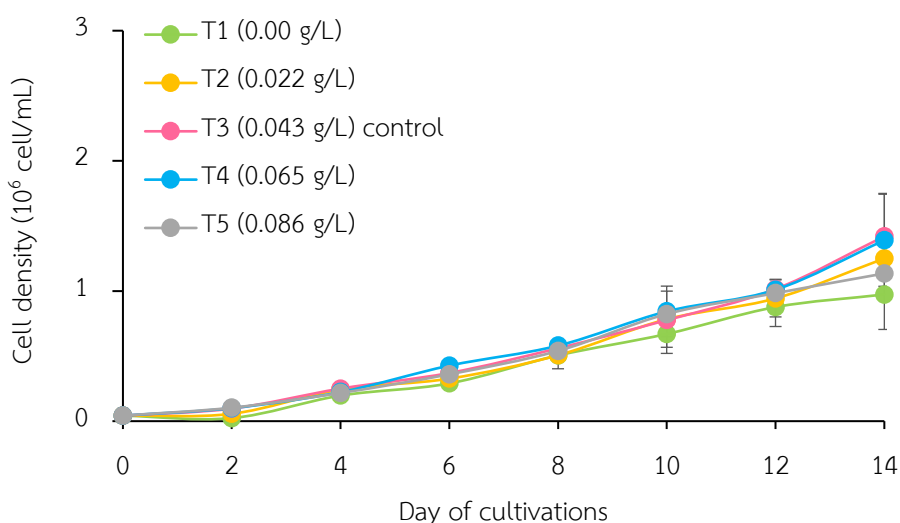
4.6 ผลของไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย

4.6.1 ผลของไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย

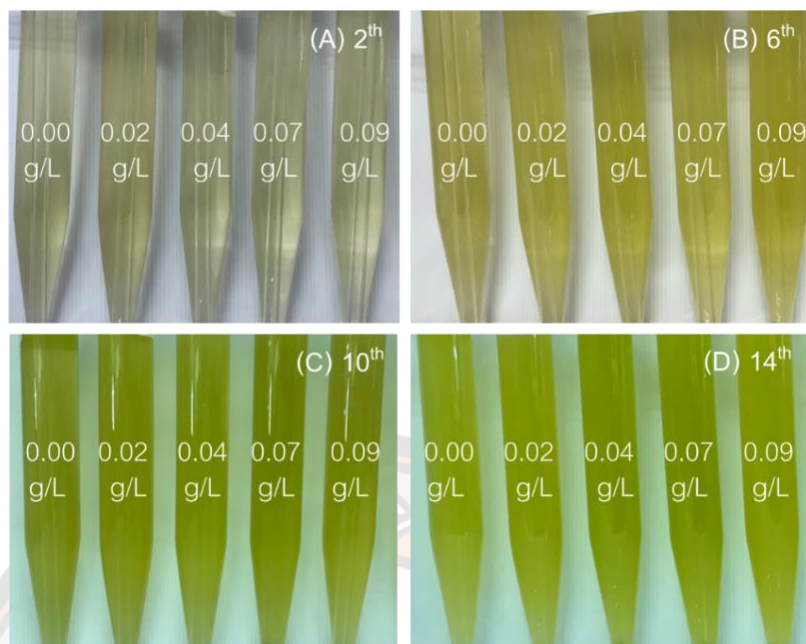
ทำการเพาะเลี้ยง *Dunaliella salina* NUAC09 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Johnson ที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) ในอาหาร ได้แก่ 0.00 (T1), 0.022 (T2), 0.043 (T3; ชุดควบคุม), 0.065 (T4) และ 0.086 (T5) กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่าย เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ในชุดการทดลอง T1, T2, T3, T4 และ T5 (ภาพ 32) มีลักษณะการเจริญเข้าสู่ระยะปรับตัว (lag phase) ช่วงวันที่ 0 ถึง 2 จากนั้นจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง (log phase) ตั้งแต่วันที่ 2 ถึง 14 ของการทดลอง นอกจากนี้เมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น เซลล์สาหร่ายมีการเปลี่ยนแปลงสีเพียงเล็กน้อย จากสีเขียวอ่อนเป็นสีเขียวเข้มภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่เพิ่มขึ้น (ภาพ 33)

จากภาพ 32 แสดงให้เห็นว่าในวันที่ 14 ของการทดลอง สาหร่าย *D. salina* NUAC09 ชุดควบคุม T3 (0.043 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) มีจำนวนเซลล์สูงสุด เท่ากับ $1.42 \pm 0.33 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่จำนวนเซลล์ต่ำสุด คือ ชุดการทดลอง T1 (0.00 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) เท่ากับ $0.97 \pm 0.27 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p $\geq$ 0.05)

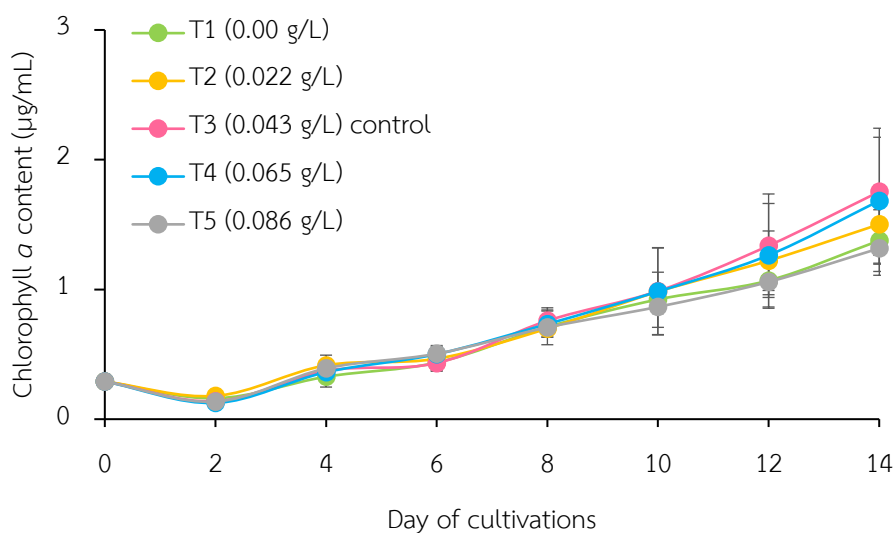
เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 14 วัน ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ มีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T3 เท่ากับ 1.75 ± 0.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และ 1.32 ± 0.03 พิโคกรัมต่อเซลล์ ขณะที่ชุดการทดลอง T1 มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอต่ำสุด เท่ากับ 1.32 ± 0.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และ 1.25 ± 0.06 พิโคกรัมต่อเซลล์ เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p \geq 0.05$) (ภาพ 34 และ ตาราง 13) สำหรับปริมาณแคโรทีนอยด์รวม มีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T3 ปริมาณเท่ากับ 5.36 ± 0.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และ 4.18 ± 0.28 พิโคกรัมต่อเซลล์ ขณะที่ชุดการทดลอง T1 มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่ำสุด เท่ากับ 4.33 ± 0.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และ 4.11 ± 0.46 พิโคกรัมต่อเซลล์ เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p \geq 0.05$) (ภาพ 35 และ ตาราง 13) อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์กับคลอโรฟิลล์เอ พบว่ามีค่าสูงสุด คือ ชุดการทดลอง T5 มีค่าเท่ากับ 3.43 ± 0.01 เท่า และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T4 มีค่าเท่ากับ 3.29 ± 0.60 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม T2 ($p \geq 0.05$) การเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดจากน้ำหนักแห้ง (biomass dry weight) พบว่ามีค่าสูงสุด คือ ชุดการทดลอง T1 มีค่าเท่ากับ 3.58 ± 0.18 กรัมต่อลิตร และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T2 มีค่าเท่ากับ 3.08 ± 0.00 กรัมต่อลิตร ($p \geq 0.05$) อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยจำเพาะ (SGR) มีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T4 มีค่าเท่ากับ 0.35 ± 0.05 μ ต่อวัน และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T1 และ T2 มีค่าเท่ากับ 0.25 ± 0.04 และ 0.25 ± 0.06 μ ต่อวัน ($p \geq 0.05$) ระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time, td) มีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T2 เท่ากับ 2.88 ± 0.67 และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T4 เท่ากับ 2.02 ± 0.25 และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \geq 0.05$)



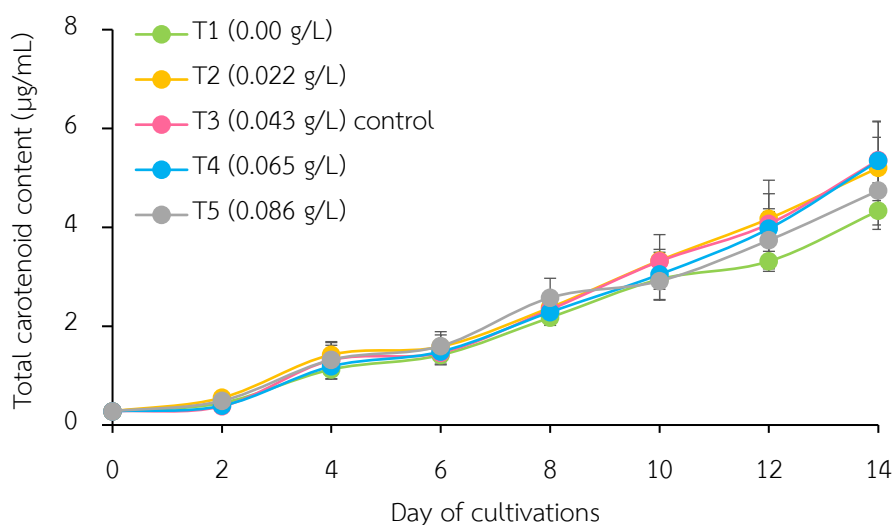
ภาพ 32 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน



ภาพ 33 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน โดยภาพ (A) วันที่ 2; ภาพ (B) วันที่ 6; ภาพ (C) วันที่ 10 และภาพ (D) วันที่ 14 ตามลำดับ



ภาพ 34 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน



ภาพ 35 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 14 วัน

ตาราง 13 การเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน

Parameters	Concentrations of bicarbonate (g NaHCO ₃ /L)					p-value
	T1 (0.00 g/L)	T2 (0.02 g/L)	T3 (0.04 g/L)	T4 (0.07 g/L)	T5 (0.09 g/L)	
Cell number (x10 ⁶ unit/mL)	0.97±0.27	1.25±0.16	1.42±0.33	1.39±0.35	1.14±0.03	0.26
Chlorophyll <i>a</i> (µg/mL)	1.38±0.24	1.50±0.30	1.75±0.23	1.68±0.49	1.32±0.21	0.40
Chlorophyll <i>a</i> (pg/cell)	1.32±0.04	1.25±0.12	1.32±0.03	1.24±0.02	1.25±0.06	0.39
Total carotenoid (µg/mL)	4.33±0.38	5.21±0.93	5.36±0.46	5.34±0.80	4.74±0.69	0.34
Total carotenoid (pg/cell)	4.11±0.46	3.88±0.01	4.18±0.28	3.64±0.04	4.43±0.32	0.06
Carotenoid/Chlorophyll	3.34±0.02	3.42±0.01	3.31±0.01	3.29±0.60	3.43±0.01	0.94
Biomass dry weight (g/L)	0.37±0.03	0.22±0.07	0.30±0.06	0.32±0.02	0.32±0.03	0.06
Specific growth rate (µ/day)	0.25±0.04	0.25±0.06	0.29±0.05	0.35±0.05	0.33±0.09	0.20
Doubling time (t _d)	2.76±0.41	2.88±0.67	2.40±0.38	2.02±0.25	2.18±0.65	0.24

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D., n=3) ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

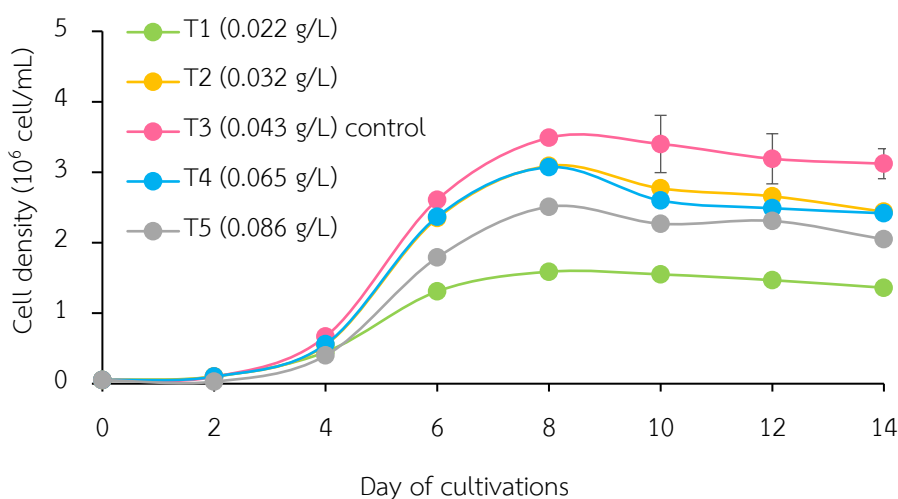
4.6.2 ผลของไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโต

และแรงกดดันของสาหร่าย

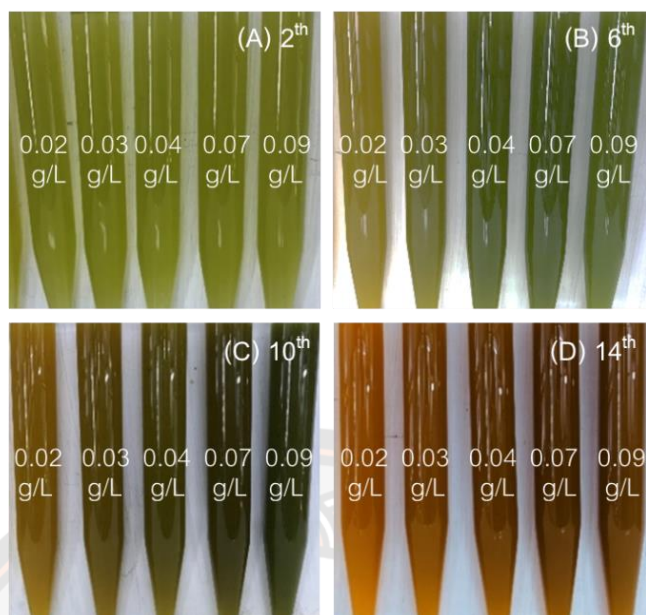
ทำการเพาะเลี้ยง *Dunaliella salina* NUAC09 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Johnson ที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) ในอาหาร ได้แก่ 0.022 (T1), 0.032 (T2), 0.043 (T3 ชุดควบคุม), 0.065 (T4) และ 0.086 (T5) กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่าย เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ในชุดการทดลอง T1, T2, T3, T4 และ T5 (ภาพ 36) มีลักษณะการเจริญเข้าสู่ระยะปรับตัว (lag phase) ช่วงวันที่ 0 ถึง 2 จากนั้นจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง (log phase) ตั้งแต่วันที่ 4 ถึง 14 ของการทดลอง จากภาพ 36 แสดงให้เห็นว่าในวันที่ 14 ของการทดลอง สาหร่าย *D. salina* NUAC09 ชุดควบคุม T3 ที่เลี้ยงในปริมาณไบคาร์บอเนต 0.043 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์สูงสุด เท่ากับ $3.49 \pm 0.01 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่จำนวนเซลล์ต่ำสุด คือ ชุดการทดลอง T1 ที่ปริมาณไบคาร์บอเนต 0.022 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์เท่ากับ $1.59 \pm 0.01 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้เมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น เซลล์สาหร่ายมีการเปลี่ยนแปลงสี จากสีเขียวเป็นสีส้มอย่างเด่นชัดภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่เพิ่มขึ้นร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ภาพ 37)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 14 วัน ปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T3 (0.043 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) เท่ากับ 12.11 ± 0.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3.47 ± 0.21 พิโคกรัมต่อเซลล์ ขณะที่ชุดการทดลอง T1 (0.022 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอต่ำสุด เท่ากับ 9.37 ± 0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5.90 ± 0.22 พิโคกรัมต่อเซลล์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ภาพ 38 และ ตาราง 14) สำหรับปริมาณแคโรทีนอยด์รวม มีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T3 (0.043 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) มีปริมาณเท่ากับ 65.03 ± 6.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 18.64 ± 1.82 พิโคกรัมต่อเซลล์ ขณะที่ชุดการทดลอง T1 (0.022 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่ำสุด เท่ากับ 50.30 ± 15.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 31.65 ± 9.85 พิโคกรัมต่อเซลล์ เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p \geq 0.05$) (ภาพ 39 และ ตาราง 14) อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์กับคลอโรฟิลล์เอ พบว่ามีค่าสูงสุด คือ ชุดการทดลอง T4 (0.07 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) มีค่าเท่ากับ 5.57 ± 0.21 เท่า และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T5 (0.09 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) มีค่าเท่ากับ 5.07 ± 0.36 เท่า ($p \geq 0.05$) อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย

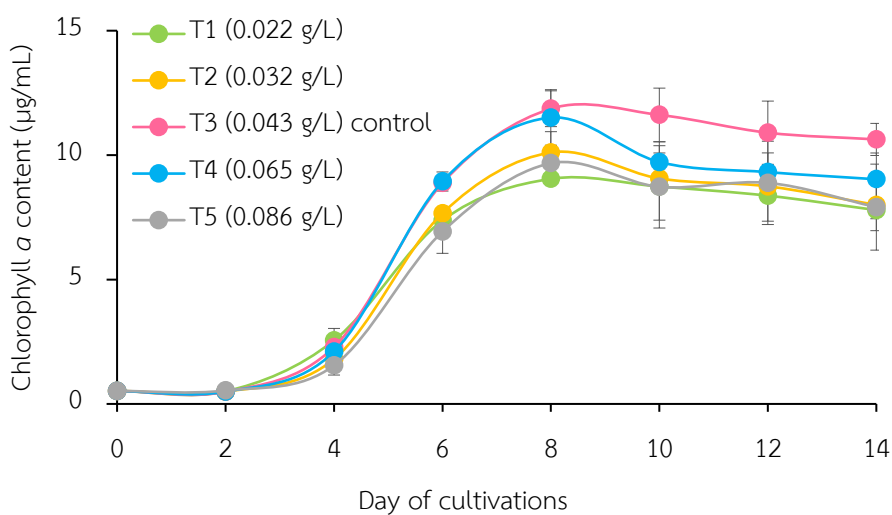
จำเพาะ (SGR) มีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T4 (0.043 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) มีค่าเท่ากับ 0.73 ± 0.01 μ ต่อวัน และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T5 (0.09 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) มีค่าเท่ากับ 0.64 ± 0.05 μ ต่อวัน ($p \leq 0.05$) ส่วนค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time, t_d) มีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T5 (0.09 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) เท่ากับ 1.09 ± 0.08 และมีค่าต่ำสุดในชุดควบคุม T4 (0.043 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) เท่ากับ 0.95 ± 0.01 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตาราง 14)



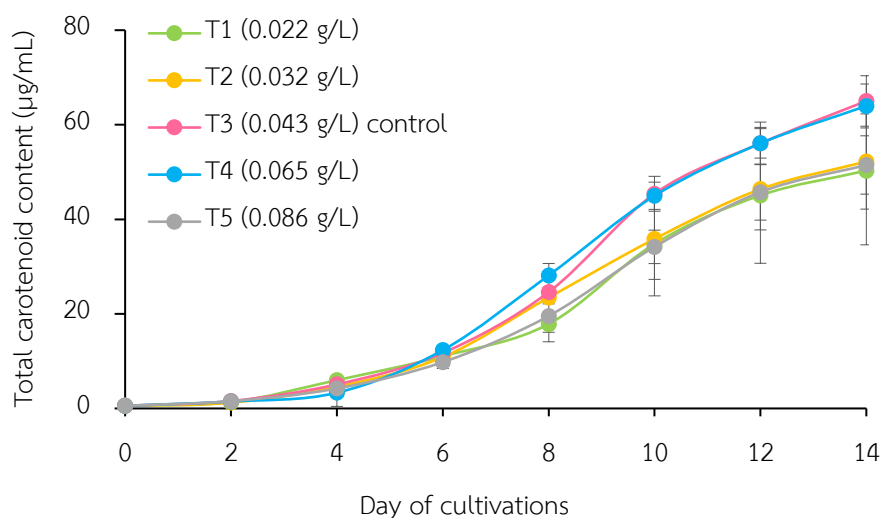
ภาพ 36 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน ร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นระยะเวลา 14 วัน



ภาพ 37 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นระยะเวลา 14 วัน โดยภาพ (A) วันที่ 2; ภาพ (B) วันที่ 6; ภาพ (C) วันที่ 10 และภาพ (D) วันที่ 14 ตามลำดับ



ภาพ 38 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นระยะเวลา 14 วัน



ภาพ 39 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นระยะเวลา 14 วัน

ตาราง 14 การเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

Parameter	Concentration of bicarbonate with carbon dioxide gas					p-value
	T1 (0.02 g/L)	T2 (0.03 g/L)	T3 (0.04 g/L)	T4 (0.07 g/L)	T5 (0.09 g/L)	
Cell density ($\times 10^6$ cell/mL)	1.59 $\pm$ 0.01 ^e	3.09 $\pm$ 0.01 ^b	3.49 $\pm$ 0.01 ^a	3.07 $\pm$ 0.01 ^c	2.51 $\pm$ 0.01 ^d	0.00
Chlorophyll <i>a</i> (μ g/mL)	9.37 $\pm$ 0.35 ^c	9.62 $\pm$ 1.03 ^c	12.11 $\pm$ 0.68 ^a	11.51 $\pm$ 1.12 ^{ab}	10.15 $\pm$ 0.63 ^{bc}	0.00
Chlorophyll <i>a</i> (pg/cell)	5.90 $\pm$ 0.22 ^a	3.11 $\pm$ 0.34 ^d	3.47 $\pm$ 0.21 ^{cd}	3.75 $\pm$ 0.37 ^{bc}	4.04 $\pm$ 0.25 ^b	0.00
Total carotenoid (μ g/mL)	50.30 $\pm$ 15.69	52.23 $\pm$ 10.07	65.03 $\pm$ 6.21	63.97 $\pm$ 4.65	51.49 $\pm$ 6.17	0.21
Total carotenoid (pg/cell)	31.65 $\pm$ 9.85 ^a	16.90 $\pm$ 3.29 ^b	18.64 $\pm$ 1.82 ^b	20.83 $\pm$ 1.53 ^b	20.51 $\pm$ 2.49 ^b	0.00
Carotenoid/Chlorophyll	5.34 $\pm$ 1.45	5.40 $\pm$ 0.66	5.36 $\pm$ 0.27	5.57 $\pm$ 0.21	5.07 $\pm$ 0.36	0.94
Biomass dry weight (g/L)	0.55 $\pm$ 0.05 ^b	0.69 $\pm$ 0.09 ^b	1.14 $\pm$ 0.12 ^a	1.18 $\pm$ 0.23 ^a	1.38 $\pm$ 0.31 ^a	0.00
Specific growth rate (μ /day)	0.67 $\pm$ 0.01 ^b	0.68 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.73 $\pm$ 0.01 ^a	0.72 $\pm$ 0.01 ^a	0.64 $\pm$ 0.05 ^b	0.00
Doubling time (t_d)	1.03 $\pm$ 0.02 ^{ab}	1.01 $\pm$ 0.01 ^{bc}	0.95 $\pm$ 0.01 ^c	0.96 $\pm$ 0.01 ^c	1.09 $\pm$ 0.08 ^a	0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.D., n=3) ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

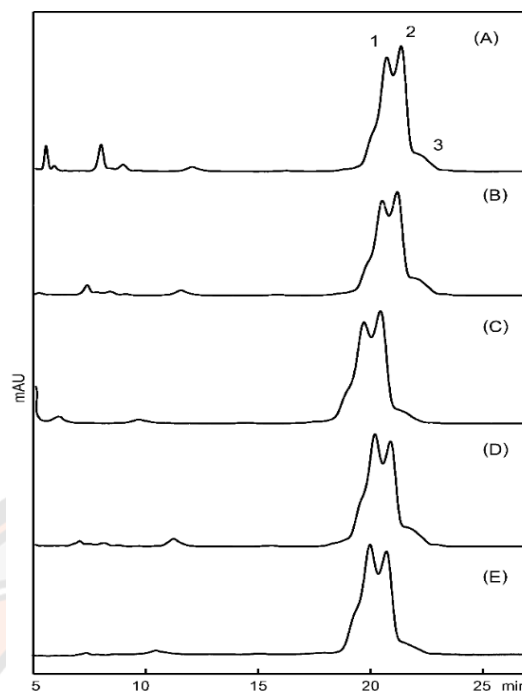
4.8 การศึกษาองค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย

ในการศึกษาองค์ประกอบและปริมาณของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสารสกัดสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร Johnson ภายใต้ปัจจัยที่แตกต่างกัน ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนต จากนั้นจึงนำสารสกัดมาวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

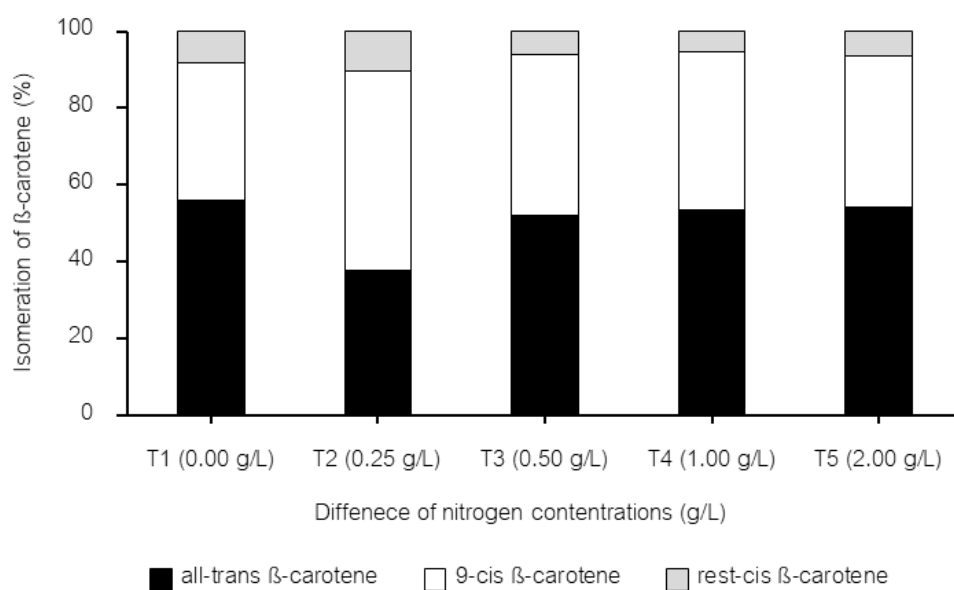
4.8.1 ผลของปริมาณไนโตรเจนที่ต่างกันต่อองค์ประกอบปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน

การศึกษาองค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ภายใต้ไนโตรเจนที่ต่างกัน (0.0 – 2.0 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร) พบว่าลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดเบต้าแคโรทีนจากสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่ต่างกัน ผลปรากฏที่บ่งชี้ได้ถึง 3 พีค (peak) ได้แก่พีค *all-trans* β -carotene, พีค *9-cis* β -carotene และพีค *rest-cis* β -carotene ที่เวลาการคงอยู่ (retention time; RT) เท่ากับ 20.8, 21.4 และ 22.1 นาที ตามลำดับ โดยพีค *all-trans* β -carotene ของสาหร่ายมีเวลาการคงอยู่ (RT) ตรงกับพีคของสารมาตรฐาน β -carotene (ภาพ 40)

ปริมาณไอโซเมอร์ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* จากสารสกัดเบต้าแคโรทีนของตัวอย่างสาหร่ายที่ศึกษา พบว่าระดับของไนโตรเจน (KNO_3) ในอาหารที่ต่างกัน ได้แก่ 0.0 (T1), 0.2 (T2), 0.5 (T3), 1.0 (T4) และ 2.0 (T5) กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร มีผลต่อสัดส่วนของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยชุดการทดลองที่มีปริมาณไอโซเมอร์ต่อเซลล์สูงสุด คือ ชุดการทดลอง T1 มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 519.0 ± 84.4 , 328.7 ± 53.9 และ 78.6 ± 21.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ($p \leq 0.05$) คิดเป็นร้อยละ 56.1, 35.5 และ 8.4 ตามลำดับ และมีอัตราส่วน *9-cis* ต่อ *all-trans* เท่ากับ 0.63 ต่อ 1 เท่า ขณะที่ชุดการทดลอง T5 มีปริมาณไอโซเมอร์ต่อเซลล์ต่ำสุด มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 125.8 ± 32.2 , 92.8 ± 33.2 และ 14.9 ± 3.4 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง คิดเป็นร้อยละ 54.3, 39.6 และ 6.5 ตามลำดับ และมีอัตราส่วน *9-cis* ต่อ *all-trans* เท่ากับ 0.72 , 1 (ภาพ 41 และตาราง 15) นอกจากนี้ในเชิงผลตอบแทนการผลิต (productivity) พบว่าเมื่อระดับของไนโตรเจนเพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาตรของไอโซเมอร์รวมมีค่าลดลง ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T1 มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 25.95, 16.43, 3.93 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ชุดการทดลอง T5 มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 6.29, 4.64, 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตาราง 16)



ภาพ 40 โครมาโทแกรมไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยหมายเลขแสดงไอโซเมอร์ ได้แก่ *all-trans* (1), *9-cis* (2) และ *rest-cis* β -carotene (3) ส่วนปริมาณไนโตรเจน ได้แก่ 0.00 (A), 0.25 (B), 0.50 (C), 1.00 (D) และ 2.00 (E) กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร



ภาพ 41 สัดส่วนไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

ตาราง 15 ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

Treatment	Concentration of nitrogen (g/L)	Concentration of isomers β -carotene (mg/g DW)			
		<i>all-trans</i>	<i>9-cis</i>	<i>rest-cis</i>	<i>9-cis/all-trans</i> ratio
T1	0.00 g/L	519.0 $\pm$ 84.4 ^a	328.7 $\pm$ 53.9 ^a	78.6 $\pm$ 21.2 ^a	0.63 $\pm$ 0.00 ^d
T2	0.25 g/L	253.8 $\pm$ 16.3 ^b	205.3 $\pm$ 16.6 ^b	39.7 $\pm$ 1.2 ^b	0.83 $\pm$ 0.00 ^a
T3	0.50 g/L	201.6 $\pm$ 28.3 ^b	155.3 $\pm$ 37.1 ^b	22.4 $\pm$ 7.5 ^c	0.80 $\pm$ 0.04 ^b
T4	1.00 g/L	125.8 $\pm$ 12.9 ^c	96.9 $\pm$ 1.3 ^c	12.6 $\pm$ 1.5 ^c	0.78 $\pm$ 0.08 ^b
T5	2.00 g/L	125.8 $\pm$ 32.2 ^c	92.8 $\pm$ 33.2 ^c	14.9 $\pm$ 3.4 ^c	0.72 $\pm$ 0.10 ^c
	p-value	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.D., n=3) ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p $\leq$ 0.05), *rest-cis* คือ 13-*cis*, 15-*cis*, 9'-*9-cis*

ตาราง 16 ปริมาณผลผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

Treatment	Concentration of nitrogen (g/L)	Concentration of isomers β -carotene (mg/L)		
		<i>all-trans</i>	<i>9-cis</i>	<i>rest-cis</i>
T1	0.00 g/L	25.95 $\pm$ 5.17 ^a	16.43 $\pm$ 3.30 ^a	3.93 $\pm$ 1.30 ^a
T2	0.25 g/L	12.40 $\pm$ 1.22 ^b	10.27 $\pm$ 1.01 ^b	1.99 $\pm$ 0.07 ^b
T3	0.50 g/L	10.08 $\pm$ 1.72 ^b	7.77 $\pm$ 2.27 ^b	1.12 $\pm$ 0.46 ^c
T4	1.00 g/L	6.29 $\pm$ 0.79 ^c	4.84 $\pm$ 0.08 ^c	0.63 $\pm$ 0.08 ^c
T5	2.00 g/L	6.29 $\pm$ 1.97 ^c	4.64 $\pm$ 2.03 ^c	0.75 $\pm$ 0.21 ^c
	p-value	0.00	0.00	0.00

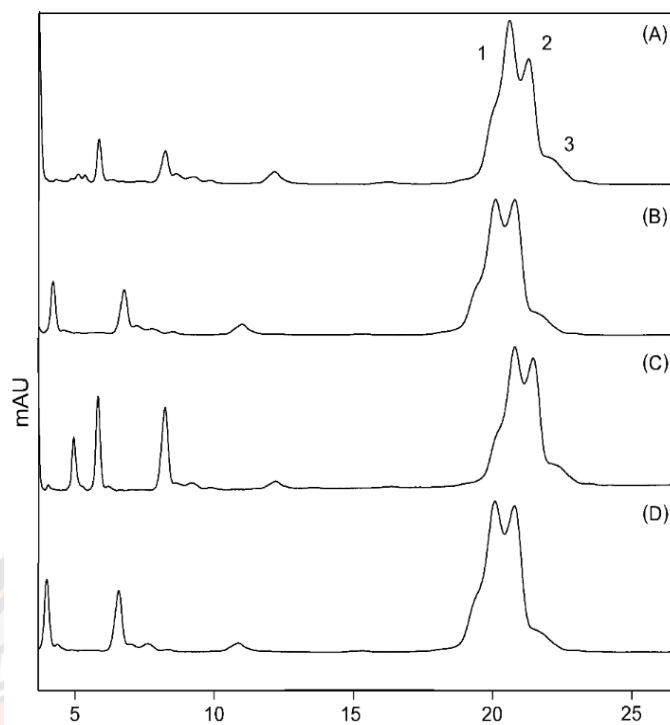
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.D., n=3) ที่แสดงในแนวตั้งที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p $\leq$ 0.05), *rest-cis* คือ 13-*cis*, 15-*cis*, 9'-*9-cis*

4.8.2 ผลของปริมาณฟอสฟอรัสที่ต่างกันต่อองค์ประกอบปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย

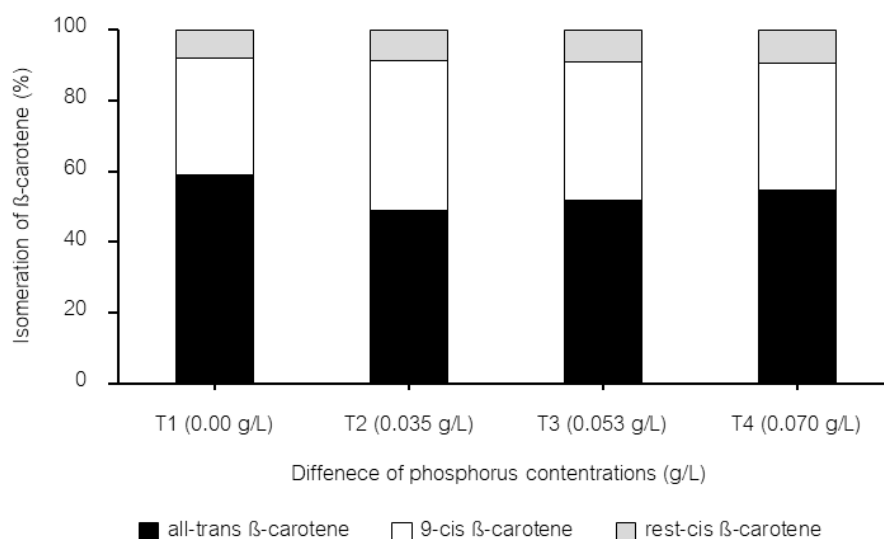
การศึกษาองค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน (0.00 – 0.07 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร) พบว่าลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดเบต้าแคโรทีนจากสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ฟอสฟอรัสที่ต่างกัน ผลปรากฏที่บ่งชี้ได้ถึง 3 พีค (peak) ได้แก่พีค *all-trans* β -carotene, พีค *9-cis* β -carotene และพีค *rest-cis* β -carotene ที่เวลาการคงอยู่ (retention time; RT) เท่ากับ 20.8,

21.5 และ 22.1 นาที่ ตามลำดับ โดยพืช *all-trans* β -carotene ของสาหร่ายมีเวลาการคงอยู่ (RT) ตรงกับพืชของสารมาตรฐาน β -carotene (ภาพ 42)

ปริมาณไอโซเมอร์ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* จากสารสกัดเบต้าแคโรทีนของตัวอย่างสาหร่ายที่ศึกษา พบว่าระดับของฟอสฟอรัสในอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.00 (T1), 0.035 (T2), 0.053 (T3) และ 0.070 (T4) กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร มีผลต่อสัดส่วนของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยชุดการทดลองที่มีปริมาณไอโซเมอร์ต่อเซลล์สูงสุด คือ ชุดการทดลอง T1 (0.00 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร) มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 178.0 ± 0.5 , 99.5 ± 7.0 และ 24.7 ± 1.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง คิดเป็นร้อยละ 58.9, 32.9 และ 8.2 ตามลำดับ และมีอัตราส่วน *9-cis* ต่อ *all-trans* เท่ากับ 0.56 ต่อ 1 เท่า ขณะที่ชุดการทดลอง T4 มีปริมาณไอโซเมอร์ต่อเซลล์ต่ำสุด *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 61.3 ± 5.9 , 39.8 ± 1.6 และ 10.7 ± 2.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง คิดเป็นร้อยละ 54.8, 35.7 และ 9.5 ตามลำดับ และมีอัตราส่วน *9-cis* ต่อ *all-trans* เท่ากับ 0.65 ต่อ 1 เท่า (ภาพ 43 และตาราง 17) นอกจากนี้ในเชิงผลตอบแทนการผลิต (productivity) พบว่าเมื่อระดับของฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาตรของไอโซเมอร์รวมมีค่าลดลง ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T1 มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 8.90, 4.98 และ 1.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ชุดการทดลอง T4 มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 3.13, 2.37 และ 0.55 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตาราง 18)



ภาพ 42 โครมาโทแกรมไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน โดยหมายเลขแสดงไอโซเมอร์ ได้แก่ *all-trans* (1), *9-cis* (2) และ *rest-cis* β -carotene (3) ส่วนปริมาณฟอสฟอรัส ได้แก่ 0.00 (A), 0.035 (B), 0.053 (C) และ 0.07 (D) กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร



ภาพ 43 สัดส่วนไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน

ตาราง 17 ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่ต่างกัน

Treatment	Concentration of phosphorus (g/L)	Concentration of isomers β -carotene (mg/g DW)			
		<i>all-trans</i>	<i>9-cis</i>	<i>rest-cis</i>	<i>9-cis/all-trans</i> ratio
T1	0.00 g/L	178.0 $\pm$ 0.5 ^a	99.5 $\pm$ 7.0 ^a	24.7 $\pm$ 1.2 ^a	0.56 $\pm$ 0.05 ^d
T2	0.035 g/L	111.3 $\pm$ 4.9 ^b	93.7 $\pm$ 2.4 ^a	18.3 $\pm$ 3.3 ^b	0.65 $\pm$ 0.04 ^c
T3	0.053 g/L	62.7 $\pm$ 1.2 ^c	47.4 $\pm$ 2.7 ^b	11.0 $\pm$ 0.9 ^c	0.76 $\pm$ 0.07 ^b
T4	0.070 g/L	61.3 $\pm$ 5.9 ^c	39.8 $\pm$ 1.6 ^c	10.7 $\pm$ 2.3 ^c	0.87 $\pm$ 0.04 ^a
	p-value	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.D. , n=3) ที่แสดงในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), *rest-cis* คือ 13-*cis*, 15-*cis*, 9'-9-*cis*

ตาราง 18 ปริมาณผลผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่ต่างกัน

Treatment	Concentration of phosphorus (g/L)	Concentration of isomers β -carotene (mg/L)		
		<i>all-trans</i>	<i>9-cis</i>	<i>rest-cis</i>
T1	0.00 g/L	8.90 $\pm$ 0.02 ^a	4.98 $\pm$ 0.43 ^a	1.23 $\pm$ 0.07 ^a
T2	0.035 g/L	5.57 $\pm$ 0.30 ^b	4.68 $\pm$ 0.15 ^a	0.92 $\pm$ 0.20 ^b
T3	0.053 g/L	3.13 $\pm$ 0.07 ^c	2.37 $\pm$ 0.17 ^b	0.55 $\pm$ 0.05 ^c
T4	0.070 g/L	3.07 $\pm$ 0.35 ^c	1.99 $\pm$ 0.10 ^c	0.54 $\pm$ 0.10 ^c
	p-value	0.00	0.00	0.00

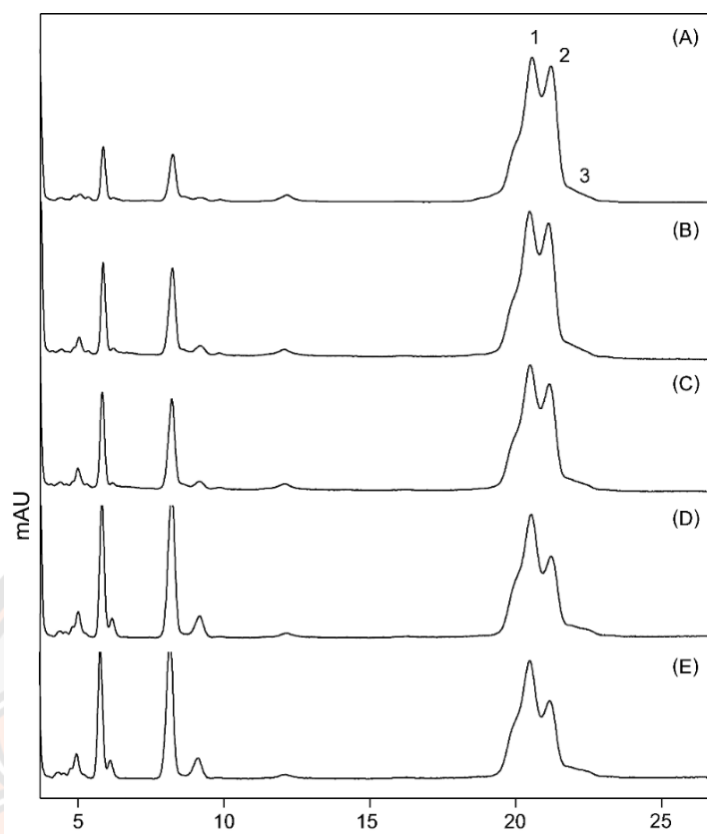
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.D. , n=3) ที่แสดงในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), *rest-cis* คือ 13-*cis*, 15-*cis*, 9'-9-*cis*

4.8.3 ผลของปริมาณความเค็มที่ต่างกันต่อองค์ประกอบปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย

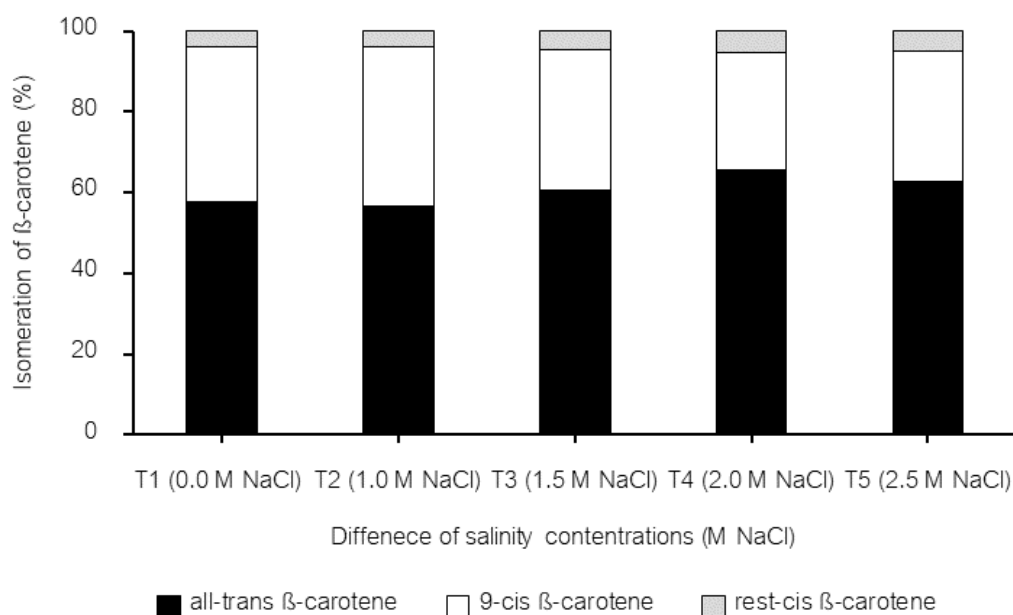
การศึกษาองค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ภายใต้ระดับความเค็มที่ต่างกัน (0.5 – 2.0 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์) จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 พบว่าลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดเบต้าแคโรทีนจากสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเค็มที่ต่างกัน ผลปรากฏที่บ่งชี้ได้ถึง 3 พีค (peak) ได้แก่พีค *all-trans* β -carotene, พีค *9-cis* β -carotene และพีค *rest-cis* β -carotene ที่เวลาการคงอยู่ (retention time; RT) เท่ากับ 20.77, 21.43 และ 22.08 นาที

ตามลำดับ โดยพีค *all-trans* β -carotene ของสาหร่ายมีเวลาการคงอยู่ (RT) ตรงกับพีคของสารมาตรฐาน β -carotene (ภาพ 44)

ปริมาณไอโซเมอร์ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* จากสารสกัดเบต้าแคโรทีนของตัวอย่างสาหร่ายที่ศึกษา พบว่าระดับของความเค็มในอาหาร ได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ มีผลต่อสัดส่วนของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยชุดการทดลองที่มีปริมาณไอโซเมอร์ต่อเซลล์สูงสุด คือ ชุดการทดลอง T1 (0.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์) มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 238.2 ± 69.9 , 156.5 ± 39.8 และ 16.1 ± 4.4 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง คิดเป็นร้อยละ 57.8, 38.3 และ 3.9 ตามลำดับ และมีอัตราส่วน *9-cis* ต่อ *all-trans* เท่ากับ 0.66 ต่อ 1 เท่า ขณะที่ชุดการทดลอง T5 (2.5 M NaCl) มีปริมาณไอโซเมอร์ต่อเซลล์ต่ำสุด มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 41.1 ± 8.8 , 18.0 ± 3.6 และ 3.3 ± 0.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง คิดเป็นร้อยละ 62.6, 32.5 และ 4.9 ตามลำดับ และมีอัตราส่วน *9-cis* ต่อ *all-trans* เท่ากับ 0.52 ต่อ 1 เท่า (ภาพ 45 และตาราง 19) นอกจากนี้ในเชิงผลตอบแทนการผลิต (productivity) พบว่าเมื่อระดับของความเค็มในอาหารเพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาตรของไอโซเมอร์รวมมีค่าลดลง ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T1 มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 11.91, 7.82 และ 0.81 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ชุดการทดลอง T5 มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 2.06, 0.90 และ 0.71 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตาราง 20)



ภาพ 44 โครมาโทแกรมไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสารร้าย NUAC09 ภายใต้ความเค็มที่แตกต่างกัน โดยหมายเลขแสดงไอโซเมอร์ ได้แก่ *all-trans* (1), *9-cis* (2) และ *rest-cis* β -carotene (3) ส่วนระดับความเค็ม ได้แก่ 0.5 (A), 1.0 (B), 1.5 (C), 2.0 (D) และ 2.5 (E) โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์



ภาพ 45 สัดส่วนไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ความเค็มที่แตกต่างกัน

ตาราง 19 ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ระดับความเค็มที่แตกต่างกัน

Treatment	Concentration of salinity (M NaCl)	Concentration of isomer β -carotene (mg/g DW)			
		<i>all-trans</i>	<i>9-cis</i>	<i>rest-cis</i>	<i>9-cis/all-trans</i> ratio
T1	0.5 M NaCl	238.2±69.9 ^a	156.5±39.8 ^a	16.1±4.4 ^a	0.66±0.03 ^a
T2	1.0 M NaCl	54.7±19.3 ^b	38.8±16.6 ^b	3.7±1.1 ^b	0.69±0.07 ^a
T3	1.5 M NaCl	45.1±0.6 ^b	26.1±0.6 ^b	3.3±0.0 ^b	0.57±0.01 ^b
T4	2.0 M NaCl	64.4±15.3 ^b	33.5±8.7 ^b	5.1±1.3 ^b	0.44±0.01 ^d
T5	2.5 M NaCl	41.1±8.8 ^b	18.0±3.6 ^b	3.3±0.5 ^b	0.52±0.01 ^c
	p-value	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D. , n=3) ที่แสดงในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$), rest-cis คือ 13-cis, 15-cis, 9'9-cis

ตาราง 20 ปริมาณผลผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายระดับความเค็มที่แตกต่างกัน

Treatment	Concentration of salinity (M NaCl)	Concentration of isomer β -carotene (mg/L)		
		<i>all-trans</i>	<i>9-cis</i>	<i>rest-cis</i>
T1	0.5 M NaCl	11.91 $\pm$ 4.28 ^a	7.82 $\pm$ 2.43 ^a	0.81 $\pm$ 0.27 ^a
T2	1.0 M NaCl	2.74 $\pm$ 1.18 ^b	1.94 $\pm$ 1.01 ^b	0.19 $\pm$ 0.07 ^b
T3	1.5 M NaCl	2.25 $\pm$ 0.01 ^b	1.31 $\pm$ 0.03 ^b	0.17 $\pm$ 0.00 ^b
T4	2.0 M NaCl	3.22 $\pm$ 0.54 ^b	1.68 $\pm$ 0.22 ^b	0.25 $\pm$ 0.03 ^b
T5	2.5 M NaCl	2.06 $\pm$ 0.94 ^b	0.90 $\pm$ 0.53 ^b	0.17 $\pm$ 0.08 ^b
	p-value	0.00	0.00	0.00

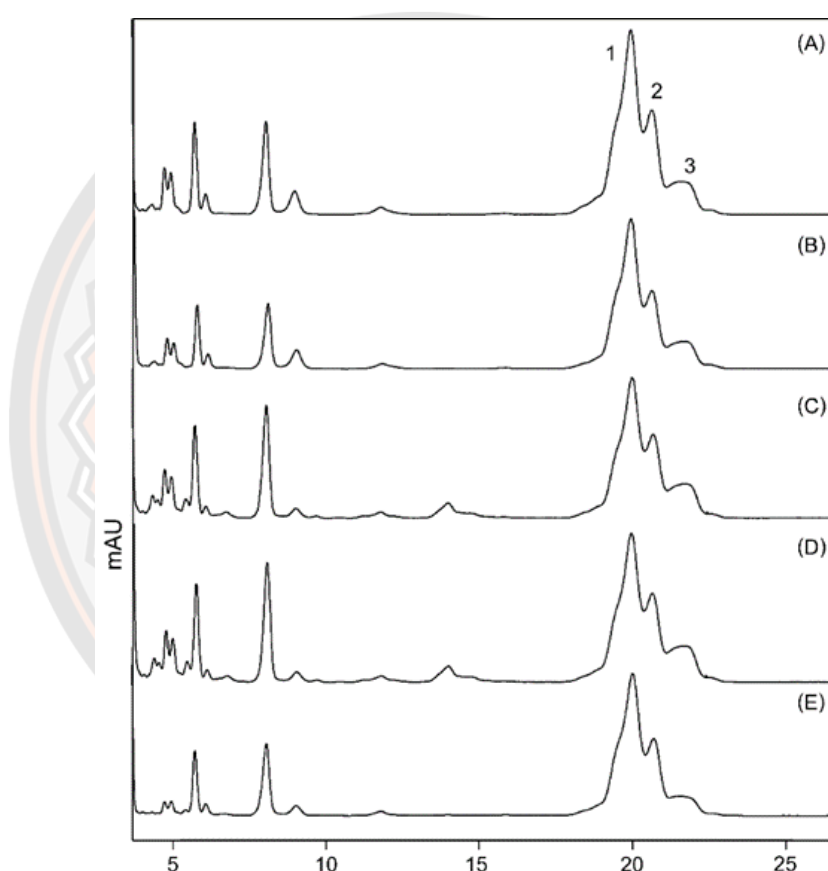
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.D. , n=3) ที่แสดงในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$), *rest-cis* คือ 13-*cis*, 15-*cis*, 9'-9-*cis*

4.8.4 ผลของไบคาร์บอเนตที่ต่างกันต่อองค์ประกอบปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย

การศึกษาองค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่ต่างกัน (0.000 – 0.086 g NaHCO₃/L) จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 พบว่าลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดเบต้าแคโรทีนจากสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่ต่างกัน ผลปรากฏที่บ่งชี้ได้ถึง 3 พีค (peak) ได้แก่พีค *all-trans* β -carotene, พีค *9-cis* β -carotene และพีค *rest-cis* β -carotene ที่เวลาการคงอยู่ (retention time; RT) เท่ากับ 20.22, 20.91 และ 22.02 นาที ตามลำดับ โดยพีค *all-trans* β -carotene ของสาหร่ายมีเวลาการคงอยู่ (RT) ตรงกับพีคของสารมาตรฐาน β -carotene (ภาพ 46)

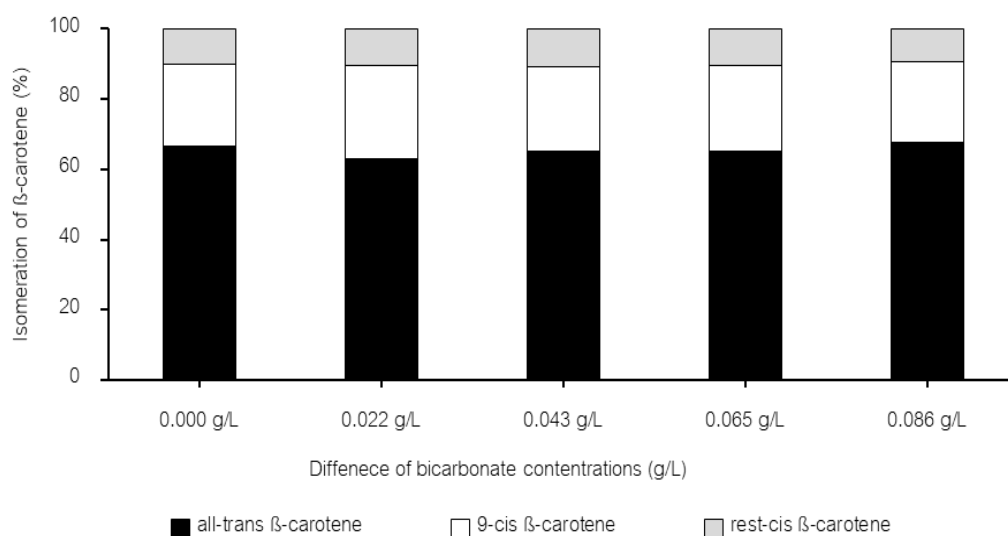
ปริมาณไอโซเมอร์ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* จากสารสกัดเบต้าแคโรทีนของตัวอย่างสาหร่ายที่ศึกษา พบว่าปริมาณไบคาร์บอเนตในอาหารที่ต่างกัน ได้แก่ 0.00 (T1), 0.021 (T2), 0.043 (T3), 0.053 (T4) และ 0.086 (T5) กรัมต่อลิตรโซเดียมไบคาร์บอเนต ไม่มีผลต่อสัดส่วนของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน ($p \geq 0.05$) โดยชุดการทดลองที่มีปริมาณไอโซเมอร์สูงสุด คือ ชุดการทดลอง T5 (0.086 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 140.6 $\pm$ 0.5, 46.0 $\pm$ 1.6 และ 19.7 $\pm$ 2.3 มิลลิกรัมต่อกรัม คิดเป็นร้อยละ 66.8, 23.3 และ 10.0 ตามลำดับ และมีอัตราส่วน *9-cis* ต่อ *all-trans* เท่ากับ 0.35 ต่อ 1 เท่า ขณะที่ชุดการทดลอง T1 (0.00 g/L NaHCO₃) มีปริมาณไอโซเมอร์ต่ำสุด มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 124.1 $\pm$ 5.8, 43.2 $\pm$ 1.3 และ 18.9 $\pm$ 6.4 มิลลิกรัมต่อกรัม คิดเป็นร้อยละ

ละ 67.7, 22.8 และ 9.5 ตามลำดับ และมีอัตราส่วน 9-*cis* ต่อ *all-trans* เท่ากับ 0.34 ต่อ 1 เท่า (ภาพ 47 และตาราง 21) นอกจากนี้ในเชิงผลตอบแทนการผลิต (productivity) พบว่าเมื่อระดับของไบคาร์บอเนตในอาหารเพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณของไอโซเมอร์รวมมีค่าเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ($p \geq 0.05$) โดยมีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T5 มีปริมาณ *all-trans*, 9-*cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 7.03, 2.37 และ 0.98 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ชุดการทดลอง T1 มีปริมาณ *all-trans*, 9-*cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 6.02, 2.23 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตาราง 22)



ภาพ 46 โครมาโทแกรมไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาย่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน

โดยหมายเลขแสดงไอโซเมอร์ ได้แก่ *all-trans* (1), 9-*cis* (2) และ *rest-cis* β -carotene (3) ส่วนปริมาณไบคาร์บอเนต ได้แก่ 0.00 (A), 0.02 (B), 0.04 (C), 0.07 (D) และ 0.09 (E) กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนต ต่อลิตร



ภาพ 47 สัดส่วนไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน

ตาราง 21 ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน

Treatment	Concentration of bicarbonate (g/L)	Concentration of isomer β -carotene (mg/g DW)			
		all-trans	9-cis	rest-cis	9-cis/all-trans ratio
T1	0.000 g/L	124.1 $\pm$ 5.8	43.2 $\pm$ 1.3	18.9 $\pm$ 6.4	0.35 $\pm$ 0.01 ^d
T2	0.022 g/L	114.9 $\pm$ 3.9	43.0 $\pm$ 7.6	21.5 $\pm$ 2.7	0.42 $\pm$ 0.05 ^a
T3	0.043 g/L	120.4 $\pm$ 1.5	44.6 $\pm$ 0.3	20.1 $\pm$ 2.6	0.37 $\pm$ 0.00 ^c
T4	0.065 g/L	135.1 $\pm$ 2.5	50.6 $\pm$ 8.2	21.5 $\pm$ 3.5	0.38 $\pm$ 0.01 ^b
T5	0.086 g/L	140.6 $\pm$ 0.5	46.0 $\pm$ 1.6	19.7 $\pm$ 2.3	0.34 $\pm$ 0.00 ^e
	p-value	0.03	0.25	0.82	0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.D. , n=3) ที่แสดงในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), rest-cis คือ 13-cis, 15-cis, 9'9-cis

ตาราง 22 ปริมาณผลผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน

Treatment	Concentration of bicarbonate (g/L)	Concentration of isomer β -carotene (mg/L)		
		<i>all-trans</i>	<i>9-cis</i>	<i>rest-cis</i>
T1	0.000 g/L	6.21 $\pm$ 0.35	2.16 $\pm$ 0.07	0.94 $\pm$ 0.36
T2	0.022 g/L	5.91 $\pm$ 0.00	2.48 $\pm$ 0.00	0.97 $\pm$ 0.00
T3	0.043 g/L	6.02 $\pm$ 0.00	2.23 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
T4	0.065 g/L	6.75 $\pm$ 1.49	2.53 $\pm$ 0.50	1.08 $\pm$ 0.18
T5	0.086 g/L	7.03 $\pm$ 0.00	2.37 $\pm$ 0.00	0.98 $\pm$ 0.00
	p-value	0.03	0.25	0.82

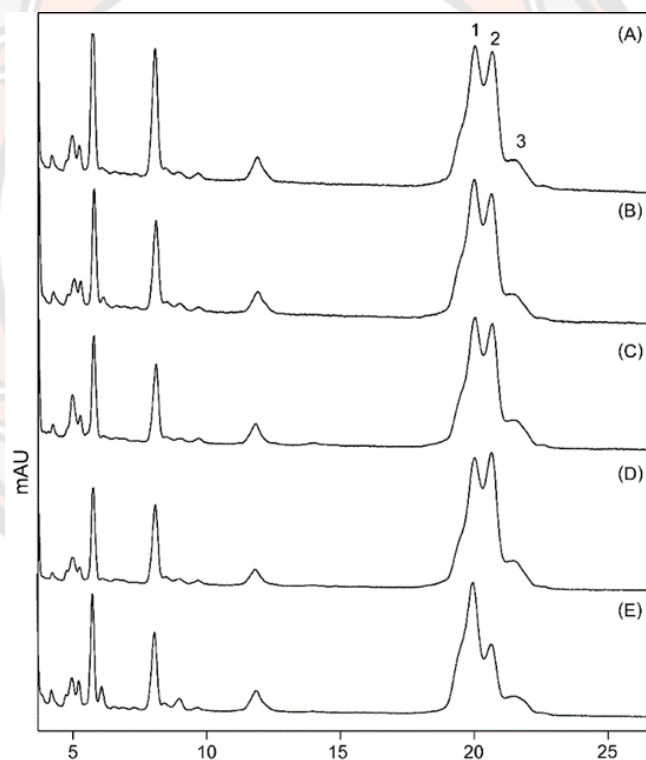
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.D. , n=3) ที่แสดงในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$), *rest-cis* คือ 13-*cis*, 15-*cis*, 9'-9-*cis*

4.8.5 ผลของไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อองค์ประกอบปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย

การศึกษาองค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 พบว่าลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดเบต้าแคโรทีนจากสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่ต่างกัน ผลปรากฏที่บ่งชี้ได้ถึง 3 พีค (peak) ได้แก่พีค *all-trans* β -carotene, พีค *9-cis* β -carotene และพีค *rest-cis* β -carotene ที่เวลาการคงอยู่ (retention time; RT) เท่ากับ 20.30, 20.94 และ 21.88 นาทีตามลำดับ โดยพีค *all-trans* β -carotene ของสาหร่ายมีเวลาการคงอยู่ (RT) ตรงกับพีคของสารมาตรฐาน β -carotene (ภาพ 48)

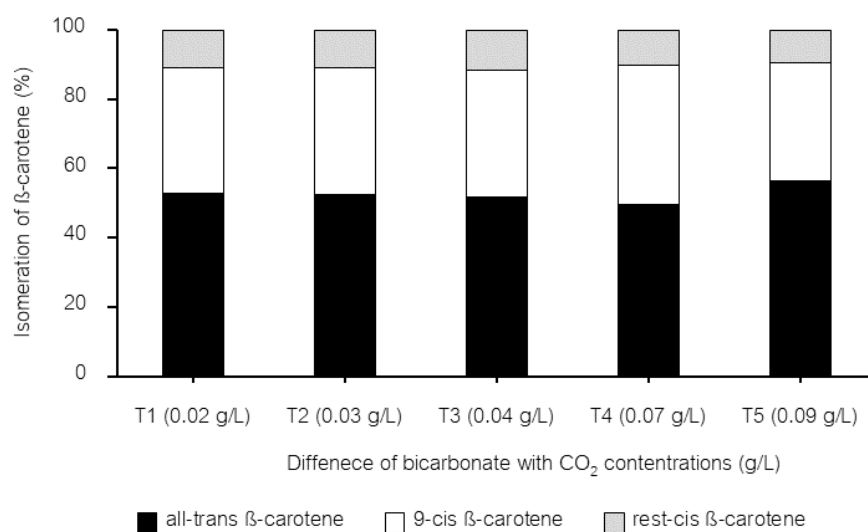
ปริมาณไอโซเมอร์ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* จากสารสกัดเบต้าแคโรทีนของตัวอย่างสาหร่ายที่ศึกษา พบว่าปริมาณไบคาร์บอเนตในอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.022 (T1), 0.032 (T2), 0.043 (T3), 0.065 (T4) และ 0.086 (T5) กรัมต่อลิตรร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลต่อสัดส่วนของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) โดยชุดการทดลองที่มีปริมาณไอโซเมอร์สูงสุด คือ ชุดการทดลอง T4 (0.07 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 32.49 $\pm$ 0.04, 26.50 $\pm$ 0.18 และ 6.78 $\pm$ 0.15 มิลลิกรัมต่อกรัม คิดเป็นร้อยละ 53.0, 36.2 และ 10.8 ตามลำดับ และมีอัตราส่วน *9-cis* ต่อ *all-*

trans เท่ากับ 0.68 ต่อ 1 เท่า ขณะที่ชุดการทดลอง T2 (0.03 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) มีปริมาณไอโซเมอร์ต่ำสุด มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 15.17 ± 0.01 , 10.55 ± 0.01 และ 3.15 ± 0.39 มิลลิกรัมต่อกรัม คิดเป็นร้อยละ 56.5, 33.9 และ 9.6 ตามลำดับ และมีอัตราส่วน *9-cis* ต่อ *all-trans* เท่ากับ 0.60 ต่อ 1 เท่า (ภาพ 49 และตาราง 23) นอกจากนี้ในเชิงผลตอบแทนการผลิต (productivity) พบว่าเมื่อระดับของไบคาร์บอเนตร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหารเพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณของไอโซเมอร์รวมมีค่าเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T4 มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 1.62, 1.33 และ 0.34 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ชุดการทดลอง T2 มีปริมาณ *all-trans*, *9-cis* และ *rest-cis* β -carotene เท่ากับ 0.76, 0.53 และ 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตาราง 24)



ภาพ 48 โครมาโทแกรมไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสายห่วย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

โดยหมายเลขแสดงไอโซเมอร์ ได้แก่ *all-trans* (1), *9-cis* (2) และ *rest-cis* β -carotene (3) ส่วนปริมาณไบคาร์บอเนต ได้แก่ 0.02 (A), 0.03 (B), 0.04 (C), 0.07 (D) และ 0.09 (E) กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร



ภาพ 49 สัดส่วนไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ตาราง 23 ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

Treatment	Concentration of bicarbonate (g/L)	Concentration of isomer β -carotene (mg/g DW)			
		<i>all-trans</i>	<i>9-cis</i>	<i>rest-cis</i>	<i>9-cis/all-trans ratio</i>
T1	0.02 g/L	17.20±0.10 ^d	11.76±0.01 ^d	3.52±0.45 ^{cd}	0.68±0.01 ^d
T2	0.03 g/L	15.17±0.01 ^e	10.55±0.01 ^e	3.15±0.39 ^d	0.70±0.00 ^c
T3	0.04 g/L	18.66±0.08 ^c	13.30±0.13 ^c	4.17±0.50 ^{bc}	0.71±0.01 ^b
T4	0.07 g/L	32.49±0.04 ^a	26.50±0.18 ^a	6.78±0.15 ^a	0.82±0.01 ^a
T5	0.09 g/L	26.08±0.07 ^b	15.65±0.00 ^b	4.45±0.06 ^b	0.60±0.00 ^e
	p-value	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D. , n=3) ที่แสดงในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$), rest-cis คือ 13-cis, 15-cis, 9'9-cis

ตาราง 24 ปริมาณผลผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

Treatment	Concentration of bicarbonate (g/L) with CO ₂	Concentration of isomer β -carotene (mg/L)		
		<i>all-trans</i>	<i>9-cis</i>	<i>rest-cis</i>
T1	0.02 g/L	0.86±0.01 ^d	0.59±0.01 ^d	0.18±0.01 ^{cd}
T2	0.03 g/L	0.76±0.00 ^e	0.53±0.00 ^e	0.16±0.00 ^d
T3	0.04 g/L	0.93±0.01 ^c	0.66±0.01 ^c	0.21±0.01 ^{bc}
T4	0.07 g/L	1.62±0.00 ^a	1.33±0.00 ^a	0.34±0.00 ^a
T5	0.09 g/L	1.30±0.00 ^b	0.78±0.00 ^b	0.22±0.00 ^b
	p-value	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D. , n=3) ที่แสดงในแนวตั้งที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$), *rest-cis* คือ 13-*cis*, 15-*cis*, 9'-9-*cis*

4.9ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่าย

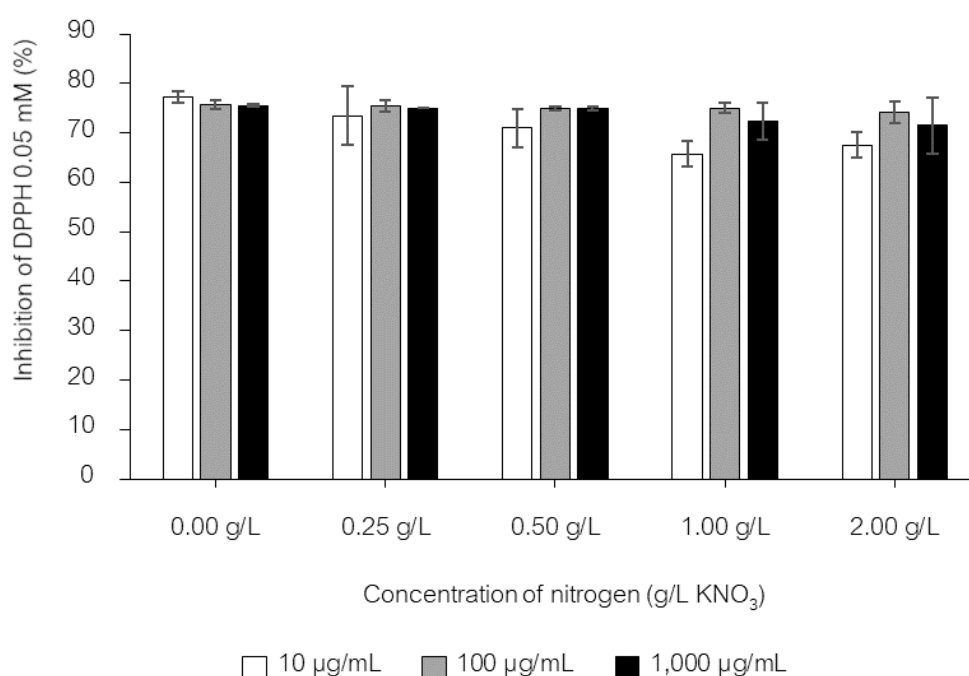
การทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร Johnson ภายใต้ปัจจัยที่แตกต่างกัน ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนต ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.9.1 ผลของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) จากสารสกัดสาหร่าย

Dunaliella salina NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.0 (T1), 0.2 (T2), 0.5 (T3), 1.0 (T4) และ 2.0 (T5) กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร โดยวิธี DPPH activity พบว่าการลดปริมาณของไนโตรเจนในอาหารส่งผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ภาพ 50) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่าย 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลให้ร้อยละความสามารถในการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้น 1.0 – 1.1 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยชุดการทดลองที่มีค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุดที่ความเข้มข้นของสารสกัด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ ชุดการทดลอง T1 (0.00 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร) เท่ากับ 77.3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดควบคุม T4 (1.00 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร) มีค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำสุด เท่ากับ 67.6 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$) (ภาพ 50 และตาราง 25)

นอกจากนี้เมื่อนำค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดมาคำนวณปริมาณของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) พบว่ามีสารสกัดในแต่ละชุดการทดลองมีค่าแตกต่างกัน ($p < 0.05$) (ตาราง 25) โดยความเข้มข้นสารสกัดยับยั้งจากชุดการทดลอง T2 (0.25 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรตต่อลิตร) ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด IC_{50} เท่ากับ 6.61 ± 0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดยับยั้งจากชุดควบคุม T4 (1.00 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรตต่อลิตร) สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ต่ำที่สุด IC_{50} เท่ากับ 7.60 ± 0.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 25)



ภาพ 50 การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสำหรับ NUAC09 ภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

ตาราง 25 กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่ายภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

Concentration of nitrogen	Inhibition DPPH of crude extract (%)			IC ₅₀ (µg/mL)
	10 µg/mL	100 µg/mL	1,000 µg/mL	
0.00 g/L	77.3±1.2 ^a	75.6±0.9	75.5±0.2	6.65±0.18 ^c
0.25 g/L	73.5±6.0 ^{ab}	75.5±1.1	75.0±0.0	6.61±0.20 ^c
0.50 g/L	71.0±3.9 ^{abc}	75.0±0.4	75.0±0.4	7.03±0.01 ^b
1.00 g/L	65.8±2.7 ^c	75.0±1.0	72.3±3.7	7.60±0.00 ^a
2.00 g/L	67.6±2.6 ^{bc}	74.1±2.3	71.5±5.7	7.39±0.01 ^a
p-value	0.01	0.63	0.42	0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D. , n=3) ที่แสดงในแนวนอนที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05), rest-cis คือ 13-cis, 15-cis, 9'9-cis

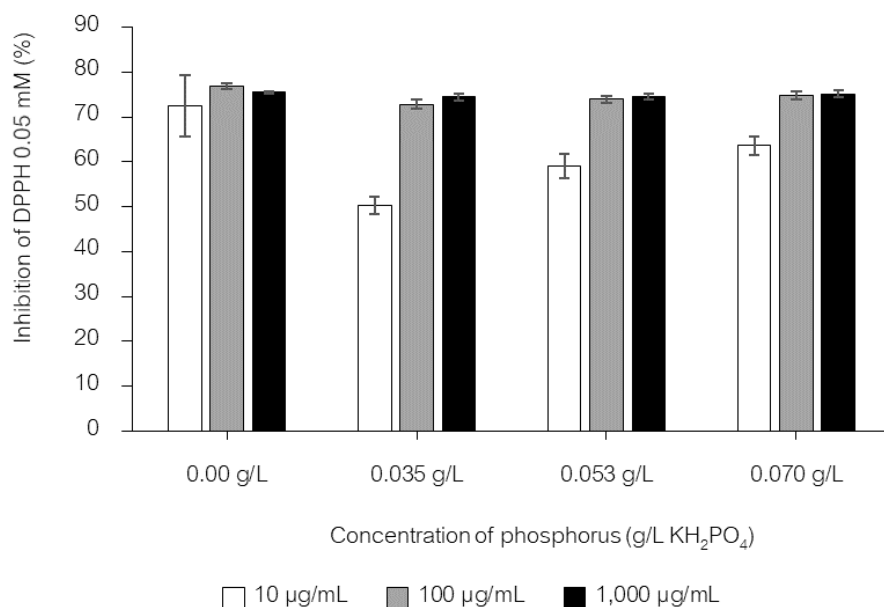
4.9.2 ผลของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) จากสารสกัดสาหร่าย

Dunaliella salina NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.00 (T1), 0.035 (T2), 0.053 (T3) และ 0.070 (T4) กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร โดยวิธี DPPH activity พบว่าการลดปริมาณของฟอสฟอรัสในอาหารส่งผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่าย 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลให้ร้อยละความสามารถในการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้น 1.0 – 1.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยชุดการทดลองที่มีค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุดที่ความเข้มข้นของสารสกัด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ ชุดการทดลอง T1 (0.00 g/L KH₂PO₄) เท่ากับ 72.4 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดการทดลอง T2 (0.035 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร) มีค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำสุด เท่ากับ 50.4 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05) (ภาพ 51 และตาราง 26)

นอกจากนี้เมื่อนำค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัด มาคำนวณปริมาตรของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) พบว่ามีสารสกัดในแต่ละชุดการทดลองมีค่าแตกต่างกัน (p<0.05) (ตาราง 26) โดยความเข้มข้นสารสกัดสาหร่ายจากชุดการทดลอง T1 (0.00 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร) ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด IC₅₀ เท่ากับ 6.89±0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดสาหร่ายจากชุดควบคุม T2 (0.035

กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร) สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด IC_{50} เท่ากับ 9.85 ± 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 26)



ภาพ 51 การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่าย NUAC09 ภายใต้อัตราส่วนของฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน

ตาราง 26 กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่ายภายใต้อัตราส่วนของฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน

Concentration of phosphorus	Inhibition DPPH of crude extract (%)			IC ₅₀ (µg/mL)
	10 µg/mL	100 µg/mL	1,000 µg/mL	
0.000 g/L	72.4±6.9 ^a	76.8±0.6 ^a	75.5±0.2	6.89±0.01 ^d
0.035 g/L	50.4±1.9 ^b	72.8±1.0 ^c	74.5±0.8	9.85±0.07 ^a
0.053 g/L	59.0±2.7 ^b	74.0±0.8 ^b	74.5±0.6	8.43±0.05 ^b
0.070 g/L	63.6±2.1 ^c	74.9±0.9 ^{bc}	75.1±0.8	7.82±0.05 ^c
P-value	0.00	0.00	0.21	0.00

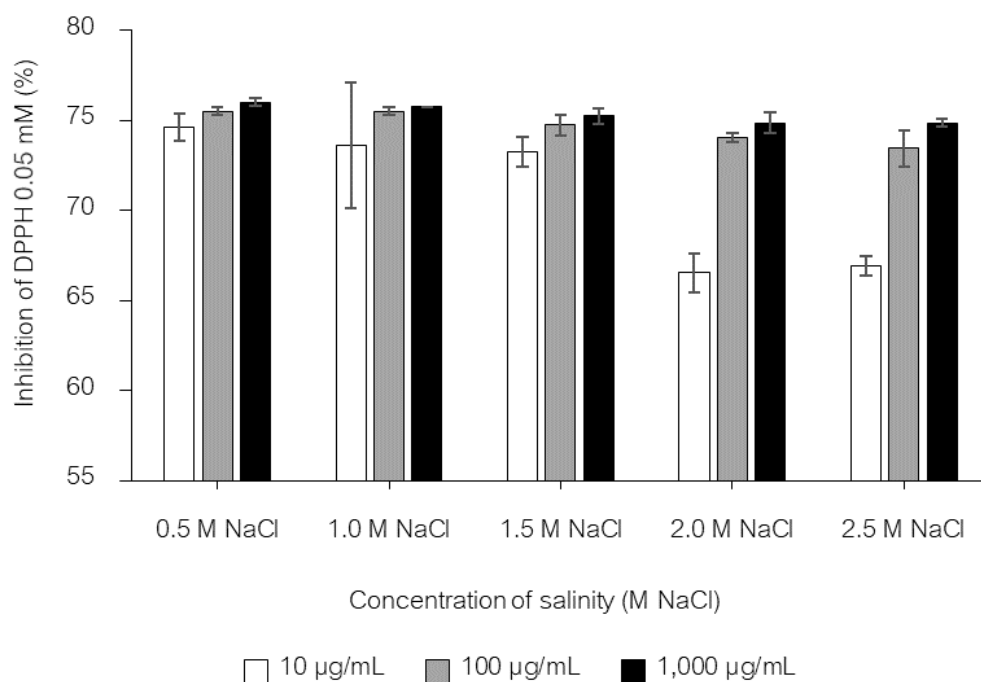
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D. , n=3) ที่แสดงในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05), rest-cis คือ 13-cis, 15-cis, 9'9-cis

4.9.3 ผลของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) จากสารสกัดสาหร่าย

Dunaliella salina NUAC09 ภายใต้ความเค็มที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ภายใต้ความเค็มที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.5 (T1), 1.0 (T2), 1.5 (T3), 2.0 (T4) และ 2.5 (T5) โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ โดยวิธี DPPH activity พบว่าการลดระดับความเค็มในอาหารส่งผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ภาพ 52) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่าย 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลให้ร้อยละความสามารถในการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้น 1.0 – 1.1 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยชุดการทดลองที่มีค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุดที่ความเข้มข้นของสารสกัด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ ชุดการทดลอง T1 (0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์) เท่ากับ 74.6 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดการทดลอง T4 (2.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์) มีค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำสุด เท่ากับ 66.5 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$) (ภาพ 52 และตาราง 27)

นอกจากนี้เมื่อนำค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัด มาคำนวณปริมาตรของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) พบว่ามีสารสกัดในแต่ละชุดการทดลองมีค่าแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) (ตาราง 27) โดยความเข้มข้นสารสกัดสาหร่ายจากชุดการทดลอง T1 (0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์) ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด IC_{50} เท่ากับ 6.74 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดสาหร่ายจากชุดการทดลอง T4 (2.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์) สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ต่ำที่สุด IC_{50} เท่ากับ 7.50 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 27)



ภาพ 52 การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่าย NUAC09 ภายใต้ความเค็มที่แตกต่างกัน

ตาราง 27 กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่ายภายใต้ความเค็มที่แตกต่างกัน

Concentration of salinity	Inhibition DPPH of crude extract (%)			IC ₅₀ (µg/mL)
	10 µg/mL	100 µg/mL	1,000 µg/mL	
0.5 M NaCl	74.6±0.8 ^a	75.5±0.2 ^a	76.0±0.2 ^a	6.74±0.03 ^b
1.0 M NaCl	73.6±3.5 ^a	75.5±0.2 ^a	75.8±0.0 ^{ab}	7.02±0.23 ^b
1.5 M NaCl	73.3±0.8 ^a	74.7±0.6 ^{ab}	75.3±0.4 ^{bc}	7.33±0.50 ^a
2.0 M NaCl	66.5±1.1 ^b	74.0±0.3 ^{bc}	74.9±0.6 ^c	7.50±0.01 ^a
2.5 M NaCl	66.9±0.5 ^b	73.5±1.0 ^c	74.9±0.2 ^c	7.12±0.35 ^b
p-value	0.00	0.00	0.00	0.00

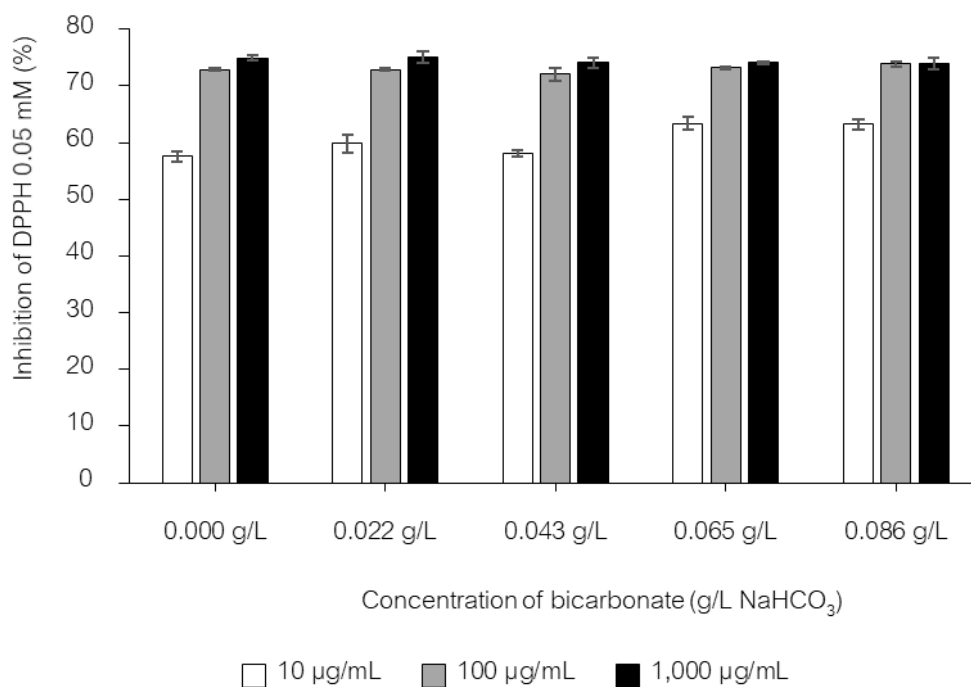
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D. , n=3) ที่แสดงในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05), rest-cis คือ 13-cis, 15-cis, 9'9-cis

4.9.4 ผลของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) จากสารสกัดสำหรับ

Dunaliella salina NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสำหรับ *Dunaliella salina* NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.00 (T1), 0.022 (T2), 0.043 (T3), 0.065 (T4) และ 0.086 (T4) กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร โดยวิธี DPPH activity พบว่าการลดปริมาณไบคาร์บอเนตในอาหารส่งผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ภาพ 53) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลให้ร้อยละความสามารถในการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้น 1.2 – 1.3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยชุดการทดลองที่มีค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุดที่ความเข้มข้นของสารสกัด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ ชุดการทดลอง T5 (0.065 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) เท่ากับ 63.3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดการทดลอง T1 (0.00 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) มีค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำสุด เท่ากับ 57.6 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$) (ภาพ 53 และตาราง 28)

นอกจากนี้เมื่อนำค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัด มาคำนวณปริมาตรของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) พบว่ามีสารสกัดในแต่ละชุดการทดลองมีค่าแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) (ตาราง 28) โดยความเข้มข้นสารสกัดหยาบจากชุดการทดลอง T5 (0.086 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด IC_{50} เท่ากับ 7.86 ± 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดหยาบจากชุดการทดลอง T1 (0.00 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ต่ำที่สุด IC_{50} เท่ากับ 8.63 ± 0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 28)



ภาพ 53 การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสำหรับ NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน

ตาราง 28 กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสำหรับภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน

Concentration of bicarbonate	Inhibition DPPH of crude extract (%)			IC ₅₀ (µg/mL)
	10 µg/mL	100 µg/mL	1,000 µg/mL	
0.000 g/L	57.6±1.0 ^c	72.8±0.2 ^{ab}	74.9±0.4	8.63±0.06 ^a
0.022 g/L	59.9±1.6 ^b	72.8±0.2 ^{ab}	75.0±1.0	8.32±0.03 ^b
0.043 g/L	58.1±0.5 ^{bc}	72.1±1.1 ^b	74.1±1.0	8.57±0.04 ^a
0.065 g/L	63.3±1.1 ^a	73.2±0.2 ^a	74.1±0.2	7.87±0.02 ^c
0.086 g/L	63.2±1.0 ^a	73.8±0.4 ^a	74.0±1.0	7.86±0.05 ^c
p-value	0.00	0.03	0.40	0.00

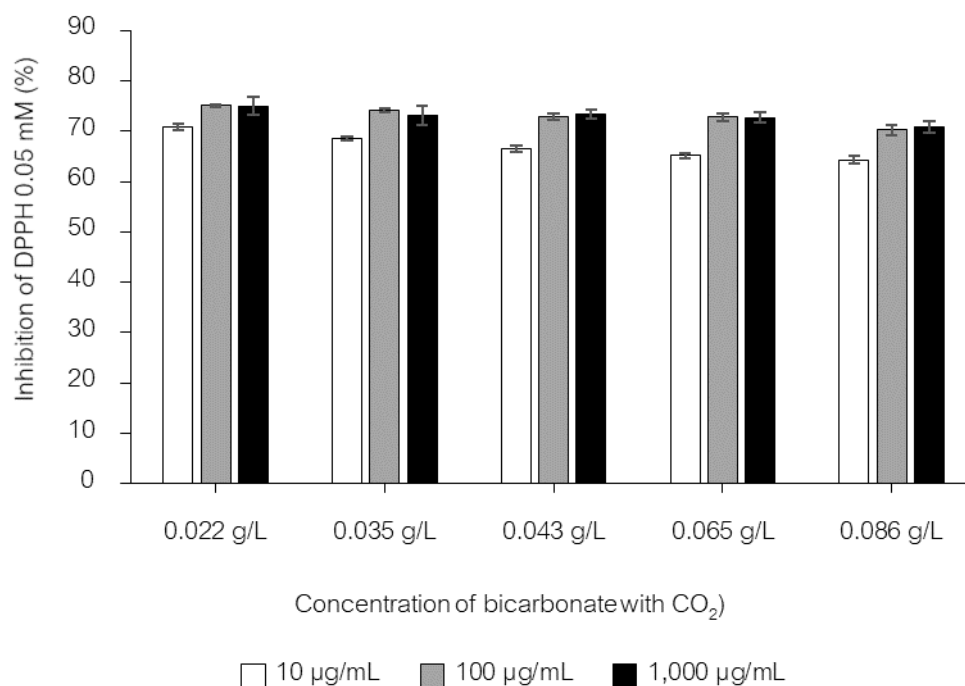
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D. , n=3) ที่แสดงในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05), rest-cis คือ 13-cis, 15-cis, 9'9-cis

4.9.5 ผลของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) จากสารสกัดสาหร่าย

Dunaliella salina NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ได้แก่ 0.022 (T1), 0.032 (T2), 0.043 (T3), 0.065 (T4) และ 0.086 (T5) กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร โดยวิธี DPPH activity พบว่าการลดปริมาณไบคาร์บอเนตร่วมกับการเสริมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหารส่งผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ภาพ 54) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่าย 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลให้ร้อยละความสามารถในการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้น 1.06 – 1.12 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยชุดการทดลองที่มีค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุดที่ความเข้มข้นของสารสกัด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ ชุดการทดลอง T1 (0.022 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) เท่ากับ 75.0 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดการทดลอง T5 (0.086 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) มีค่าร้อยละของความสามารถการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำสุด เท่ากับ 70.0 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$) (ภาพ 54 และตาราง 29)

นอกจากนี้เมื่อนำค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัด มาคำนวณปริมาตรของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (inhibitory concentration 50%; IC_{50}) พบว่ามีสารสกัดในแต่ละชุดการทดลองมีค่าแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) (ตาราง 29) โดยสารสกัดสาหร่ายจากชุดการทดลอง T1 (0.065 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) ร่วมกับการเสริมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด IC_{50} เท่ากับ 7.89 ± 0.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดสาหร่ายจากชุดการทดลอง T5 ที่มีปริมาณไบคาร์บอเนต (0.000 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) ร่วมกับการเสริมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ต่ำที่สุด IC_{50} เท่ากับ 8.69 ± 0.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 29)



ภาพ 54 การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสำหรับ NUAC09 ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ตาราง 29 กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสำหรับภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

Concentration of bicarbonate with CO ₂	Inhibition DPPH of crude extract (%)			IC ₅₀ (µg/mL)
	10 µg/mL	100 µg/mL	1,000 µg/mL	
0.022 g/L	70.9±0.6 ^a	75.1±0.2 ^a	75.0±1.8	8.69±0.00 ^a
0.035 g/L	68.5±0.4 ^b	74.2±0.4 ^a	73.2±1.9	8.35±0.00 ^b
0.043 g/L	66.5±0.7 ^c	72.9±0.6 ^b	73.3±1.0	8.61±0.00 ^c
0.065 g/L	65.1±0.6 ^d	72.8±0.8 ^b	72.7±1.0	7.89±0.00 ^d
0.086 g/L	64.2±0.8 ^d	70.3±1.0 ^c	70.9±1.2	7.91±0.00 ^e
p-value	0.00	0.00	0.06	0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D. , n=3) ที่แสดงในแนวดังที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05), rest-cis คือ 13-cis, 15-cis, 9'9-cis

บทที่ 5

บทสรุป

5.1 อภิปรายผล

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการจัดจำแนกและระบุชนิดสาหร่ายสายพันธุ์ไทยที่มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ด้วยเทคนิคทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา หลังจากนั้นทำการศึกษาผลของสภาวะการเลี้ยงทั้ง 4 ปัจจัย ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต, การสะสมรงควัตถุ และชีวมวลของสาหร่าย รวมถึงศึกษาองค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนที่มีมูลค่าสูงจากสารสกัดสาหร่าย พร้อมทั้งประเมินความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 สายพันธุ์ไทย ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

5.1.1 การจัดจำแนกสาหร่ายด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 พบว่ามีลักษณะทั่วไปคล้ายคลึงกับสาหร่าย *D. salina* เช่น มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างเซลล์เป็นแบบสมมาตร ทรงกลม ทรงรีหรือคล้ายไข่ เซลล์ปกติมีสีเขียว คลอโรพลาสต์เป็นรูปกล้วย มีแฟกเจลลาที่มีความยาวเท่ากัน จำนวน 2 เส้น มองเห็นไพรินอยด์ขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ (Borowitzka and Borowitzka, 1988) ขณะเดียวกัน *Dunaliella* เป็นสาหร่ายที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง รูปร่างและขนาดของเซลล์มีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ ตามสภาวะการเลี้ยง และนิเวศวิทยา โดยขนาดเซลล์ของสาหร่าย NUAC09 มีค่าเท่ากับ 8.7 – 16.1 ไมโครเมตรและมีขนาดเพิ่มขึ้น 1.2 – 1.3 เท่าเมื่อเพราะเลี้ยงในความเค็ม 0.75 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าในสภาวะอาหารปกติ *D. salina* จะมีขนาดเซลล์ยาว 2.8 – 40.0 ไมโครเมตรและกว้าง 1.5 – 20.0 ไมโครเมตร (Tafreshi and Shariati 2009, Preetha et al. 2012, Borovkov et al., 2019) เช่นเดียวกับ Borowitzka และ Siva (2007) ประเทศออสเตรเลียที่พบว่าสาหร่าย *D. salina* จำนวน 12 สายพันธุ์ มีขนาดของความกว้างและความยาวเซลล์ผันแปรตามระดับความเค็มในอาหารที่เพิ่มขึ้น ขณะที่จากการสังเกตและเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า NUAC09 ขาดลักษณะสำคัญของสาหร่าย *D. salina* คือสติกมา (stigma) มีลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็กสีแดงจะปรากฏบริเวณผนังของเซลล์ จำนวน 1 – 2 สติกมา (Nezhad and Mansouri, 2015) อย่างไรก็ตามการใช้ขนาดของเซลล์เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกชนิดสาหร่าย *Dunaliella* อาจไม่มีความถูกต้องและแม่นยำ เนื่องจาก

สาหร่ายมีขนาดเซลล์ที่แตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อมที่เจริญเติบโต นอกจากนี้มีการรายงานเกี่ยวกับการแพร่กระจายของสาหร่าย *Dunaliella* ในหลายพื้นที่ของประเทศไทย เช่น Sathaivam และ Juntawong (2013) ที่สำรวจพบสาหร่าย *D. salina* บริเวณพื้นที่ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ส่วน Wongsansilp และคณะ (2016) สำรวจพบสาหร่าย *D. salina* KU XI ในพื้นที่ดินเค็มจังหวัดบุรีรัมย์ของประเทศไทย ขณะที่ Powtongsook และคณะ (1995) ทำการคัดแยกและศึกษาลักษณะสาหร่าย *D. salina* ในประเทศไทย พบว่ามีสาหร่าย *D. salina* แพร่กระจายบริเวณชายฝั่งอ่าวไทย ได้แก่ จังหวัดชลบุรี จังหวัดจันทบุรี และจังหวัดสมุทรสงคราม รวมถึงทำการทดสอบว่ามีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์สูง ดังนั้นจากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นทำให้สามารถระบุได้ว่าสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 เป็นสาหร่ายในสกุล (genus) *Dunaliella* แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่กล่าวมาแล้วนั้นไม่เพียงพอต่อการระบุสาหร่ายจนถึงระดับชนิด (specie) ได้ เนื่องจากมีข้อจำกัด เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน การจัดจำแนกต้องอาศัยความรู้ความชำนาญ ในการพิจารณาโครงสร้างและลักษณะต่าง ๆ ของสาหร่ายเพื่อการจำแนกชนิดของสาหร่ายที่ถูกต้อง การใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยามาประกอบกับข้อมูลทางพันธุกรรมในการช่วยระบุชนิดของสาหร่ายให้ถูกต้องมากขึ้น

ในปัจจุบันมีวิธีการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตโดยใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาซึ่งมีความแม่นยำมากกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากลักษณะทางกายภาพของสิ่งมีชีวิตสามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยมีปัจจัยชักนำจากสิ่งแวดล้อม ขณะที่ลักษณะทางพันธุกรรมยังคงเดิม (Bornet et al., 2004) โดยวิธีที่นิยมศึกษาคือความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (similarity) ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่บริเวณตำแหน่งยีนที่มีความผันแปรสูงและแสดงลักษณะเฉพาะของสาหร่ายแต่ละชนิด โดยพื้นที่ยีนที่เหมาะสมนำมาจำแนกชนิดสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ได้แก่ พื้นที่ยีน 18S rDNA, ITS และ *rbcL* เป็นต้น (Preetha et al., 2012) โดยการทดลองนี้ทำการจำแนกสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 โดยศึกษาพื้นที่ยีน 18S rDNA และ ITS พบว่ามีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *D. salina* ซึ่งมีค่าร้อยละความเหมือนมากกว่า 95.2 เปอร์เซ็นต์พื้นที่ยีน ITS และ 98.8 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ยีน 18S rDNA (blast based on NCBI) ถือว่าเป็นค่าที่ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายนั้นจะยอมรับว่าเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันเมื่อมีความเหมือนมากกว่าร้อยละ 97.0 (Suutari et al., 2010) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบอาจมีวิวัฒนาการที่แยกจากกัน (ตาราง 9) สำหรับการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของสาหร่ายนิยมใช้ยีนในโอเปอรอน rRNA operon (RRN) เช่น พื้นที่ของยีน

18S rDNA เนื่องจากมีข้อดีคือเป็นยีนที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายมีอยู่ในแบคทีเรียกลุ่มยูคาริโอตทุกชนิด มีความผันแปรทางวิวัฒนาการต่ำ มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง และมีขนาดที่เหมาะสม (1.5 kb) เพียงพอที่จะใช้เป็นข้อมูลเพื่อนำมาจำแนกสายพันธุ์ในระดับสกุล แต่อย่างไรก็ตามพื้นที่ยีน 18S rDNA ไม่มีรูปแบบความแตกต่าง (polymorphism) จึงไม่เพียงพอจะนำมาจำแนกสายพันธุ์ *Dunaliella* ระดับชนิด โดยยีนที่มีลักษณะจีโนมไทรที่มีเฉพาะสูงและมีความเสถียรมากกว่าคือพื้นที่ยีน Internal transcribed spacer (ITS) เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความผันแปรต่ำภายในกลุ่มสายพันธุ์ และมีความผันแปรสูงระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ พบได้ในสายพันธุ์ทุกสายพันธุ์ (Hejazi et al., 2010) รวมถึงมีขนาดที่สั้นเมื่อเทียบกับพื้นที่ยีน 18S rDNA ทำให้การวิเคราะห์ sequencing นั้นง่าย และมีความเที่ยงตรง ดังนั้น ITS จึงถูกนำมาศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของสายพันธุ์ NUAC09 ซึ่งผลชี้ให้เห็นว่าตัวอย่างสายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ในสกุล *Dunaliella salina* และมีความเหมือนกับสายพันธุ์ต้นแบบที่สูงถึงร้อยละ 80 และมีความสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ใช้พื้นที่ยีน ITS ในการจำแนกชนิดของสายพันธุ์ *D. salina* (Borowitzka and Siva, 2007; Assuncao et al., 2012; Nezhad and Mansouri, 2016) ส่วน Henley และคณะ (2018) ที่ศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ *Dunaliella* โดยใช้พื้นที่ยีน ITS1 5.8S และ ITS2 พบว่าสายพันธุ์ *Dunaliella* sp. GSL2/1, GSL6/1, GSL6/2, 6/3 และ GSL6/4 จัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ *D. salina* นอกจากนี้ Preetha และคณะ (2012) ทำการศึกษาสายพันธุ์ *Dunaliella* จำนวน 10 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากบริเวณชายฝั่งทะเลประเทศอินเดีย โดยใช้พื้นที่ยีน ITS, 18S rDNA และ *rbcL* พบว่าสายพันธุ์ 5 ไอโซเลตถูกจัดเป็น *D. salina* ขณะที่อีก 3 สายพันธุ์ถูกจัดอยู่เป็น *D. viridis* ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าพื้นที่ยีน ITS สามารถระบุชนิดของสายพันธุ์สายพันธุ์ *Dunaliella salina* NUAC09 ในระดับ subclade ได้อย่างชัดเจน รวมถึงมีความสอดคล้องกับการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่อย่างไรก็ตามควรมีการตรวจสอบเพิ่มเติม เนื่องจากการแพร่กระจาย *Dunaliella* พบได้เพียงบางพื้นที่เท่านั้นทำให้ยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องของความซับซ้อนทางลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่น สายพันธุ์ซ่อนเร้น (cryptic species) เป็นต้น

5.1.2 ไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสายพันธุ์

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ทุกชนิด (Arumugam et al., 2013) โดยปกติสายพันธุ์จะนำไนโตรเจนเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในกระบวนการ

สังเคราะห์ด้วยแสง รวมถึงการสะสมเบต้าแคโรทีน (Andersen, 2005; Wu et al., 2015) จากการศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย สาหร่าย *D. salina* NUAC09 พบว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร Johnson ภายใต้ปริมาณไนโตรเจน 0.0 ถึง 2.0 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อจำนวนเซลล์ และปริมาณรงควัตถุ โดยไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลทำให้สาหร่าย *D. salina* NUAC09 มีจำนวนเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และผลผลิตชีวมวลเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับ Sathasivam และคณะ (2018) ที่รายงานว่า การเลี้ยง *D. salina* KU11 ในปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (0.2 – 1.0 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร) แสดงให้เห็นว่าปริมาณไนโตรเจน 1.0 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร ช่วยให้สาหร่าย *D. salina* KU11 มีการเจริญเติบโตสูงสุด เท่ากับ 1.45×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่การลดปริมาณไนโตรเจนให้เหลือเพียง 0.5 g KNO₃/L จะช่วยเพิ่มปริมาณแคโรทีนอยด์มากที่สุดเท่ากับ 177.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน Kharati-Koupaei และ Moradshasi (2016) รายงานว่าสาหร่าย *D. viridis* MSV-1 จากประเทศอิหร่าน ซึ่งเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิกที่ปริมาณความเข้มข้นไนโตรเจน 0.5 – 0.8 กรัมของโซเดียมไนเตรทต่อลิตร มีจำนวนเซลล์สูงสุด เท่ากับ 1.30×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากงานวิจัยที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าความเหมาะสมของปริมาณไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์สาหร่าย จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการขาดไนโตรเจนส่งผลต่อการเจริญเติบโตที่ลดลงของสาหร่าย ในทางกลับกันปริมาณไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้สาหร่ายมีระยะเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย (มากกว่า 14 วัน) แต่อย่างไรก็ตามก็ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของปริมาณไนโตรเจนสูงต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาครั้งนี้มีแนวโน้มว่าปริมาณไนโตรเจนที่ 2.0 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 สูงสุด ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์กับการเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ขณะที่ควรมีการศึกษาปัจจัยไนโตรเจนควบคู่กับปัจจัยอื่นๆ เพื่อให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายเพิ่มมากขึ้น

ในการศึกษารังนี้สาหร่าย *D. salina* NUAC09 มีค่าแคโรทีนอยด์สูงสุด (53.14 ± 2.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.25 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร โดยเมื่อเข้าสู่วันที่ 6 ของการเลี้ยงสาหร่ายเริ่มมีการเปลี่ยนสีของเซลล์เป็นสีเหลืองหรือสีส้มอ่อน สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ควบคู่ไปกับการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ ซึ่งบ่งชี้ถึงการเริ่มสะสมรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเบต้าแคโรทีน (Ben-Amotz et al. 1989) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sathasivam และคณะ (2018) พบว่าการจำกัดไนโตรเจน 0.25 กรัมของโพแทสเซียม

ไนเตรทต่อลิตร ทำให้สาหร่าย *D. salina* KU11 มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด เท่ากับ 160.5 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Gomez และคณะ (2003) พบว่าสาหร่าย *D. bardawil* ที่ได้รับโซเดียมไนเตรท 0.05 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 23.3 มิลลิกรัมต่อลิตรนอกจากนี้สาหร่ายสีเขียว *Haematococcus pluvialis* ที่ถูกจำกัดโพแทสเซียมไนเตรท 0.25 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร พบว่ามีปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Orosa et al., 2005) สำหรับอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์ สัดส่วนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เมื่อปริมาณไนโตรเจนลดลง เนื่องจากเมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะอาหารปกติเซลล์จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงและมีการสังเคราะห์รงควัตถุแคโรทีนอยด์ที่ต่ำ แต่เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดหรือจำกัดไนโตรเจนเซลล์จะถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์รงควัตถุแคโรทีนอยด์มากขึ้นเพื่อใช้ปกป้องเซลล์จากการขาดไนโตรเจนส่งผลทำให้อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์กับคลอโรฟิลล์เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย (Telfer et al., 2008) แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของไนโตรเจนร่วมกับปัจจัยอื่นเพื่อเหินย่นำการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ให้เพิ่มมากขึ้น

5.1.3 ฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย

ฟอสฟอรัสเป็นหนึ่งในธาตุอาหารที่สำคัญโดยตรงต่อการเจริญเติบโต กระบวนการสังเคราะห์แสง และการสะสมรงควัตถุของสาหร่าย (Masojidek et al., 2013) จากการศึกษาปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย สาหร่าย *D. salina* NUAC09 พบว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร Johnson ภายใต้ปริมาณฟอสฟอรัส 0.0 ถึง 0.086 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันส่งผลต่อจำนวนเซลล์ และปริมาณรงควัตถุ โดยฟอสฟอรัสที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลทำให้สาหร่าย *D. salina* NUAC09 มีจำนวนเซลล์ ปริมาณรงควัตถุ ผลผลิตชีวมวล และอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wongsansilp และคณะ (2016) ที่ศึกษาการจำกัดฟอสฟอรัส ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่าย *D. salina* KU XI พบว่าความเข้มข้นฟอสฟอรัส (NaH_2PO_4) ที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 9.8 ถึง 39.4 กรัมของโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อลิตร ทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยมีค่าสูงสุด เท่ากับ 2.4×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่ความเข้มข้นฟอสฟอรัสต่ำกว่า 9.8 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย เช่นเดียวกับรายงานของ Rhee (1980) และ Hill (2014) กล่าวว่าหากสาหร่ายได้รับปริมาณฟอสฟอรัสที่ไม่เหมาะสม (สูงหรือต่ำเกินไป) จะส่งผลต่อการเจริญเติบโต

ของสาหร่าย ซึ่งเมื่อความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในอาหารลดลงจะส่งผลให้กระบวนการต่างๆ ถูกยับยั้ง เช่น การบวนการเมตาบอลิซึม การขนส่งอิเล็กตรอนของปฏิกิริยาโฟโตฟอสโฟรีเลชัน การสังเคราะห์สารพลังงานสูง ATP วัฏจักรเคนวิน และวัฏจักรรีเจนเนอเรชันของ NADP^+ กับ NADPH เป็นต้น ซึ่งการลดลงของกระบวนการที่กล่าวมานั้นเป็นสาเหตุสำคัญต่อการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ของสาหร่ายและการผลิตรงควัตถุทั้งสิ้น (Jacob and Lawlor, 1993; Lippemeier, 2003) ในการศึกษาครั้งนี้สาหร่าย *D. salina* NUAC09 มีค่าแคโรทีนอยด์สูงสุด (40.86 ± 8.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) ที่ปริมาณฟอสฟอรัส 0.07 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร โดยเมื่อเข้าสู่วันที่ 14 ของการเลี้ยง พบว่าในชุดการทดลองที่มีปริมาณฟอสฟอรัส 0.00 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร สาหร่ายเริ่มมีการเปลี่ยนสีของเซลล์เป็นสีเหลืองอ่อน – สีส้ม ซึ่งสาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นควบคู่ไปกับการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ ซึ่งบ่งชี้ถึงการเริ่มสะสมรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเบต้าแคโรทีน (Ben-Amotz et al., 1989) โดยในชุดการทดลองที่ขาดฟอสฟอรัส (0.0 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร) สาหร่ายมีการเปลี่ยนสีเซลล์จากสีเขียวเป็นสีเหลืองอ่อน ตั้งแต่วันที่ 6 ควบคู่ไปกับการชะลอกระบวนการแบ่งเซลล์ (ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ที่ต่ำ) (Lippemeier, 2003) แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการขาดแคลนฟอสเฟตจะทำให้การเจริญเติบโต และปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง (Richmond, 1986 and Becker, 1994) โดยตามทฤษฎีแล้วคลอโรฟิลล์จะลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของธาตุอาหารต่ำ ซึ่งการผันแปรของปริมาณคลอโรฟิลล์สามารถบ่งชี้ถึงสภาวะการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ (Papageorgiou, 2007) นอกจากนี้อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์ สัดส่วนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นของฟอสฟอรัสลดลง สอดคล้องกับรายงานของสรวีศ (2536) กล่าวว่าสาหร่าย *D. salina* ในระยะ log phase มีอัตราส่วนแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์เท่ากับ 7.66 ต่อ 1 เท่า ที่ความเข้มข้นฟอสเฟต 0.018 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร ขณะที่ในระยะ stationary phase สาหร่ายมีอัตราส่วนของแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์เท่ากับ 6.84 ต่อ 1 เท่าเนื่องจากเมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะปกติเซลล์จะมีอัตราการเจริญและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ต่ำ แต่เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียด เซลล์สาหร่ายจะเริ่มสังเคราะห์รงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์เพื่อใช้ปกป้องเซลล์ทำให้อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย (Telfer et al., 2008) เนื่องจากโดยทั่วไปปริมาณฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กอยู่ในช่วง 0.0002 - 0.080 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร (Lippemeier et al., 2003) ขณะที่ในสาหร่ายสกุล *Dunaliella* พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ลดลงเมื่อฟอสฟอรัสต่ำกว่า 0.002 กรัมของโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อ

ลิตร และเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณฟอสฟอรัสสูงกว่า 0.009 กรัมของโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อลิตร (Wongsansilp et al., 2016) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาอื่น ๆ นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสกุลอื่นๆ พบว่าปริมาณฟอสฟอรัสที่สูงเกินไปส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต (Roha et al., 2008) ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาครั้งนี้มีแนวโน้มว่าปริมาณฟอสฟอรัสที่ 0.070 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสะสมรงควัตถุของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 สูงสุด ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์กับการเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ขณะที่ควรมีการศึกษาปัจจัยฟอสฟอรัสควบคู่กับปัจจัยอื่นๆ เพื่อให้การเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่ายเพิ่มมากขึ้น

5.1.4 ความเค็มที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย

ความเค็มเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ต่อสาหร่ายทนเค็มสกุล *Dunaliella* เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความเค็มส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต, ปริมาณรงควัตถุ และองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่าย (Charoui et al., 2017) ในสาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อความเครียดจากเกลือ (the key enzyme genes) โดยการเพิ่มประสิทธิภาพระบบการขนส่งไอออน และการสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ (Chen and Jiang, 2009) ซึ่งสารออสโมโพรเทคแทนต์จะมีส่วนช่วยในการปรับความดันออสโมติก (osmotic regulation) (Ahmed et al., 2017) ขณะที่ปริมาณ Na^+ และ Cl^- ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นตามด้วยการไหลออกของไอออน Na^+ เกิดขึ้นแบบแอนติพอร์ท (antiport) ระหว่าง Na^+ และ K^+ เพื่อให้เซลล์อยู่ในภาวะสมดุล (Chen and Jiang, 2009) จากการศึกษาปริมาณความเค็มที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย สาหร่าย *D. salina* NUAC09 พบว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร Johnson ภายใต้ปริมาณความเค็ม 0.5 – 2.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ (28.22 – 141.1 กรัมของโซเดียมคลอไรด์ต่อลิตร) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณความเค็มที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อจำนวนเซลล์ ปริมาณรงควัตถุ และอัตราการเจริญเติบโต โดยปริมาณความเค็มที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลทำให้สาหร่าย *D. salina* NUAC09 มีจำนวนเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ ผลผลิตชีวมวล และอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mofeed (2015) ศึกษาผลของความเค็มและความเข้มแสงต่อปริมาณเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *D. salina* ผลพบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุด เท่ากับ 8.97×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ปริมาณความเค็ม 2.0 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ ภายใต้ความเข้มแสง 200 ไมโครโมลโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เช่นเดียวกับงานวิจัย

ของ Ahmed และคณะ (2017) ที่ศึกษาปริมาณชีวมวลของสาหร่าย *D. salina* SA134 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเค็มที่แตกต่างกัน (0.5 ถึง 2.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์) พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุด มีความหนาแน่นของเซลล์ 6.57×10^7 ถึง 7.17×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายใต้ความเค็ม 1.5 ถึง 2.0 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ ขณะที่แตกต่างกับผลการศึกษาของ Sathasitvam และคณะ (2018) ได้ทำการทดลองผลของปริมาณความเค็มที่แตกต่างกัน (1.0 ถึง 3.0 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์) ต่อการสะสมแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *D. salina* KU11 พบว่าที่ปริมาณความเค็ม 1.0 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตสูงสุด เท่ากับ $1.85 \pm 0.21 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากงานวิจัยที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าความเหมาะสมของปริมาณความเค็มต่อการเจริญเติบโตแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์สาหร่าย ขณะที่ปริมาณคลอโรฟิลล์จะผันแปรตามการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยสาหร่ายมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดที่ปริมาณความเค็มที่ 2.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 18.43 ± 1.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับ Gibor และคณะ (1956) ที่กล่าวว่าเมื่อคลอโรฟิลล์ลดลงจะส่งผลทำให้ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น เนื่องจากคลอโรฟิลล์เป็นองค์ประกอบหลักที่สาหร่ายใช้สังเคราะห์แสงเพื่อนำกลับมาใช้เป็นพลังงานให้ตัวเอง เมื่อคลอโรฟิลล์ถูกทำลายไปจะทำให้สาหร่ายอยู่ในสภาวะเครียดจึงส่งผลทำให้แคโรทีนอยด์ซึ่งมีลักษณะเป็นพันธะคู่เข้ามาทำหน้าที่แทนเพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ของสาหร่ายถูกทำลายไปแสดงให้เห็นว่าคลอโรฟิลล์มีความสัมพันธ์ต่อการเจริญเติบโตและการสะสมแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่าย จากผลการทดลองนี้และงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีรูปแบบการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เนื่องจากเป็นสาหร่ายที่สามารถเจริญเติบโตในช่วงความเค็มที่หลากหลาย (0.5 – 5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์) และไม่มีความจำเพาะเจาะจงที่แน่ชัด รวมถึงความแตกต่างของลักษณะทางนิเวศวิทยาและถิ่นที่อยู่อาศัย ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากผลการศึกษานี้มีแนวโน้มว่าปริมาณความเค็ม 2.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *D. salina* NUAC09 แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยความเค็มร่วมกับปัจจัยอื่นเพื่อปรับปรุงการเจริญเติบโต และการสะสมรงควัตถุของสาหร่ายให้สูงขึ้น

ในการศึกษานี้สาหร่าย *D. salina* NUAC09 มีค่าแคโรทีนอยด์สูงสุด (42.67 ± 4.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ปริมาณความเค็ม 0.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ โดยเมื่อเข้าสู่วันที่ 14 ของการเลี้ยง พบว่าในชุดการทดลองที่มีปริมาณความเค็ม 0.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ สาหร่ายเริ่มมีการเปลี่ยนสีของเซลล์จากสีเขียวเป็นสีส้ม โดยสาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตลดลง ควบคู่ไปกับการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ ซึ่งบ่งชี้ถึงการเริ่มสะสมรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะอย่าง

ยั้งเบต้าแคโรทีน (Ben-Amotz et al., 1989) ทั้งนี้สาเหตุเนื่องจากสาหร่าย *Dunaliella* เป็นสาหร่ายที่ดำรงชีวิตในพื้นที่ที่มีความเค็มสูง ทำให้ต้องมีการปรับตัวต่อสภาวะความเค็มเปลี่ยนแปลง โดยสร้างรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ขึ้นมาช่วยในการปกป้องเซลล์ (Oren, 2014) นอกจากนี้อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์ สัดส่วนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เมื่อปริมาณความเค็มลดต่ำลง สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Gomez และคณะ (2003) ศึกษาผลของความเค็มต่อปริมาณของแคโรทีนอยด์ในสาหร่าย *D. salina* พบว่าอัตราส่วนของแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์ มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณความเค็มมีแนวโน้มลดลง โดยมีค่าแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์สูงสุดเท่ากับ 9 ต่อ 1 ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากผลการศึกษานี้มีแนวโน้มว่าปริมาณความเค็ม 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร มีความเหมาะสมต่อการสะสมแคโรทีนอยด์ของ *D. salina* NUAC09

5.1.5 ไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย

ไบคาร์บอเนต (bicarbonate) เป็นรูปแบบหนึ่งของธาตุคาร์บอนที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต กระตุ้นการผลิตรงควัตถุ รวมถึงช่วยปรับปรุงการเจริญเติบโตของสาหร่ายภายใต้สภาวะความเครียดจากการขาดสารอาหาร (Srinivasan et al., 2018) จากการศึกษาปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย สาหร่าย *D. salina* NUAC09 พบว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร Johnson ภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนต ปริมาณ 0.0 ถึง 0.086 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อจำนวนเซลล์ ปริมาณรงควัตถุ และอัตราการเจริญเติบโต โดยปริมาณไบคาร์บอเนตที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลทำให้สาหร่าย *D. salina* NUAC09 มีการเจริญเติบโตและรงควัตถุอยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Kim และคณะ (2017) ที่ศึกษาผลของไบคาร์บอเนต 0.0 – 30.0 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* ประเทศเกาหลีใต้ พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด เท่ากับ 0.34 – 0.70 ต่อวัน (2.06 เท่า) ที่ความเข้มข้นไบคาร์บอเนต 5.0 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร โดยปกติเมื่อสาหร่ายขนาดเล็กได้รับความเข้มข้นโซเดียมไอออนในปริมาณไม่เหมาะสมจะส่งผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ที่สำคัญบางชนิดซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโต (Sudhir and Murthy, 2004) เช่นเดียวกับ Srinivasan และคณะ (2015) ที่พบว่าการเสริมไบคาร์บอเนต 8.4 – 12.6 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร ทำให้สาหร่าย *D. salina* มีการเจริญเติบโต ผลผลิตชีวมวล แคโรทีนอยด์ และเบต้าแคโรทีนมีปริมาณสูงสุด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความ

เข้มข้นของไบคาร์บอเนตในการทดลองนี้มีปริมาณที่ค่อนข้างต่ำกว่า (0.00 – 0.087 กรัมของ โซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) ซึ่งไม่สัมพันธ์กับปริมาณไบคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ของ *Dunaliella* จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 มีแนวโน้ม ลดลงตามไปด้วย ขณะเดียวกัน Kim และคณะ (2017) กับ Srinivasan และคณะ (2015) กล่าวว่า หากในอาหารมีปริมาณไบคาร์บอเนตสูงหรือต่ำจนเกินไปจะส่งผลต่อการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ สาหร่ายตามมา ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาค้างนี้จึงมีแนวโน้มว่าปริมาณไบคาร์บอเนต 0.043 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *D. salina* NUAC09 แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสาหร่าย *Dunaliella* ที่ได้รับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหารมี แนวโน้มส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเพิ่มขึ้นมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไบคาร์บอเนต (Srinivasan et al., 2015; Jeon et al., 2016) รวมถึงควรมีการศึกษาปัจจัยไบคาร์บอเนตควบคู่กับ การเสริมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตให้สูงขึ้น

จากสมมุติฐานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสาหร่าย *Dunaliella* สามารถใช้ก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ในการเจริญเติบโตได้ (Jeon et al., 2016; Kim, 2017) จึงมีการศึกษาผลของ ไบคาร์บอเนตร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ซึ่งจากผลการศึกษาชี้ให้เห็นชัดเจนว่าการเสริมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ส่งผลต่อ การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ ปริมาณรงควัตถุ และอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย เมื่อเปรียบเทียบกับไบคาร์บอเนตเพียงอย่างเดียวในการศึกษาก่อนหน้านี้ เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็ก บางชนิดสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และคาร์บอนอนินทรีย์ (โซเดียมไบคาร์บอเนต) เพื่อการเจริญเติบโตได้ เช่นเดียวกับ Kumar และคณะ (2010) กับ Jeon และคณะ (2013) กล่าวว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 5 – 10 เปอร์เซ็นต์ในอาหารมีผลต่อ การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella* มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไบคาร์บอเนตเพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ ส่วน Mercado และคณะ (1999) กล่าวว่ากระบวนการในเซลล์ สาหร่ายจะทำการเปลี่ยนรูปก๊าซ (CO_2) ไปเป็นสารอนินทรีย์คาร์บอนก่อนเพื่อใช้ในกระบวนการ สังเคราะห์แสง ขณะเดียวกันการเจริญเติบโตของสาหร่ายจะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของก๊าซ CO_2 มากกว่า 12 เปอร์เซ็นต์และทำให้ค่าพีเอชในอาหารลดลงส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ สาหร่ายตามมา (Kim et al., 2012) นอกจากนี้การเสริมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 15 เปอร์เซ็นต์ใน สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* มีผลต่อการเจริญเติบโต ($0.17 \mu\text{ต่อวัน}$) คลอโรฟิลล์ เอ (25.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แคโรทีนอยด์ (6.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ผลชีวมวล (0.85 กรัมต่อลิตร)

โปรตีน (32.9 เปอร์เซ็นต์) คาร์โบไฮเดรต (26.2 เปอร์เซ็นต์) และไขมัน (25.8 เปอร์เซ็นต์) สูงสุด (Patil and Kaliwal, 2017) รวมถึงมีการรายงานว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในช่วง 0.1 – 20 เปอร์เซ็นต์ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่าย เช่น *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Botryococcus*, *Spirulina* และ *Nannochloropsis* เป็นต้น (Singh and Singh, 2014) ดังนั้น แสดงให้เห็นว่าไบคาร์บอเนต 0.043 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร ร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *D. salina* NUAC09 แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยคาร์บอนร่วมกับปัจจัยอื่นเพื่อปรับปรุงการเจริญเติบโตสาหร่ายให้สูงขึ้น

ขณะที่ปริมาณแคโรทีนอยด์มีค่าสูงสุด (5.36 ± 0.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ปริมาณโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.043 g/L ขณะที่ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 12 เท่า (65.03 ± 6.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อมีการเสริมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เช่นเดียวกับ Srinivasan และคณะ (2018) ที่พบว่าในสาหร่าย *D. salina* V-101 เมื่อขาดธาตุไนโตรเจนในอาหาร สาหร่ายจะมีปริมาณแคโรทีนอยด์ลดลง (7.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่การเสริมไบคาร์บอเนต 8.4 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร ร่วมกับการขาดธาตุไนโตรเจน จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 1.14 เท่า (8.25 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เนื่องจากภายใต้การจำกัดหรือขาดสารอาหารจะนำไปสู่การสูญเสียโปรตีนบางอย่างในปฏิกิริยาสังเคราะห์แสง (PSII) ซึ่งไบคาร์บอเนตที่เป็นธาตุอาหารรองจะไปช่วยปรับปรุงกระบวนการสังเคราะห์แสงและฟื้นฟูการทำงานของเซลล์ในสภาวะที่สาหร่ายขาดอาหารได้ (Lv et al., 2016) สอดคล้องกับการศึกษาในสาหร่ายชนิดอื่น ๆ Fawzy และคณะ (2016), Guiheneuf และ Stengel (2013), Mondal และคณะ (2017), Pancha และคณะ (2014), Pancha และคณะ (2015) และ Peng และคณะ (2017) ที่พบว่าการเสริมไบคาร์บอเนตในอาหารมีผลต่อการปรับปรุงและฟื้นฟูปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดไขมัน รวมถึงลดการเกิดสารอนุมูลอิสระ เมื่อเปรียบเทียบกับขาดสารอาหารเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ Srinivasan และคณะ (2018) กล่าวว่าไบคาร์บอเนตมีผลต่อการเจริญของสาหร่ายทะเลมากกว่าสาหร่ายน้ำจืด โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายใต้การขาดสารอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลเฟออร์) ขณะที่อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์มีค่าสูงสุด เท่ากับ 3.43 ± 0.01 เท่า ที่ปริมาณของไบคาร์บอเนต 0.086 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร สอดคล้องกับผลการศึกษา Srinivasan และคณะ (2015) ที่ศึกษาผลของไบคาร์บอเนตต่อปริมาณเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella* sp. พบว่าอัตราส่วนของแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์เท่ากับ 1.7 เท่า ที่ปริมาณไบคาร์บอเนต 12.6 กรัม

ของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร นอกจากนี้สาหร่ายสีเขียว *Botryococcus* ที่มีผลผลิตชีวมวลและแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นมากกว่าสองเท่าเมื่อได้รับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ในอาหารปกติ (Ranga et al., 2007) จากงานวิจัยที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าความเหมาะสมของปริมาณไบคาร์บอเนตต่อการเจริญเติบโตแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์สาหร่าย ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาครั้งนี้มีแนวโน้มว่าปริมาณไบคาร์บอเนต 0.043 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร ร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *D. salina* NUAC09 ขณะที่ควรศึกษาเพิ่มเติมปริมาณไบคาร์บอเนตร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ควบคู่กับปัจจัยอื่นเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและการผลิตตรงควัตถุให้สูงขึ้น ซึ่งผลที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางในการการเลี้ยงสาหร่ายเชิงพาณิชย์ต่อไป

5.1.6 องค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย

สเตอริโอไอโซเมอร์ของเบต้าแคโรทีน คือ รูปแบบของสารเบต้าแคโรทีนที่มีโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างกัน ซึ่งสาหร่ายจะผลิตเบต้าแคโรทีนผ่านกระบวนการสังเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenogenesis) ภายในเซลล์ โดยสเตอริโอไอโซเมอร์ของเบต้าแคโรทีนมีรูปแบบที่หลากหลาย เช่น *all-trans*, *9-cis*, *13-cis* และ *15-cis* β -carotenoid เป็นต้น โดยองค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนจะพบปริมาณสูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับสภาวะที่สาหร่ายเจริญเติบโตเป็นหลัก เช่น ความเข้มแสงสูง ระดับความเค็ม และการขาดธาตุอาหาร (Harvey and Ben-Amotz, 2020) ในการตรวจวัดองค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์ของสาหร่าย NUAC09 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนต ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่ามีพีคปรากฏขึ้นจำนวน 3 พีค (peak) ได้แก่ พีค *all-trans* β -carotene, พีค *9-cis* β -carotene และพีค *rest cis* β -carotene (*9'-cis*, *13-cis*, *15-cis*) ซึ่งมีลักษณะของพีคสารที่พบสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ผ่านมา (Weinrich et al., 2019, Xu et al., 2018; Lin et al., 2010; Fazeli et al., 2009; Hu et al., 2008; Bononi et al., 2002; Jian-Guo et al., 1996 และ Ben-Amotz et al., 1987) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ถูกลดปริมาณของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนตในอาหารจะทำให้มีการสะสมปริมาณไอโซเมอร์ และอัตราส่วนของซิสต่อทรานส์เบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Davidi และ Pick (2017) ที่กล่าวว่าปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) ของเบต้าแคโรทีนจะเกิดขึ้นในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงสารอาหาร เช่นเดียวกับรายงานของ Jian-Guo และคณะ (1996) จาก

ประเทศจีน ตรวจพบองค์ประกอบไอโซเมอร์หลัก 3 แบบในสาหร่าย *D. salina* ได้แก่ *all-trans*, *9-cis*, *15-cis* และ *total-cis* β -carotenoid โดยยังพบอีกว่าการลดปริมาณธาตุอาหารหลัก โดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัสส่งผลให้ปริมาณไอโซเมอร์ทั้งหมดของสาหร่ายเพิ่มขึ้น ซึ่งมีอัตราส่วน *total-cis* ต่อ *all-trans* β -carotenoid เท่ากับ 1.7 และ 1.8 เท่าภายใต้การขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซึ่งการจำกัดสารอาหารส่งผลให้สาหร่ายมีปริมาณไอโซเมอร์สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่าย *D. salina* ประเทศไต้หวันที่เลี้ยงในสภาวะปกติที่พบว่าปริมาณไอโซเมอร์ *all-trans* β -carotene และ *9-cis* β -carotene มีค่าเท่ากับ 138.25 และ 124.65 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้งต่อกรัม คิดเป็น 47.5 และ 42.7 เปอร์เซ็นต์ (Hu et al., 2008) ซึ่งเมื่อเทียบกับผลการศึกษาที่พบว่าการจำกัดปัจจัยไนโตรเจนและความเค็มทำให้ปริมาณ *9-cis* สูงกว่าการศึกษานี้ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gomez และคณะ (2003) ที่ศึกษาผลของความเค็มต่อปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *D. salina* และ *D. bardawil* ผลพบว่าเมื่อระดับความเค็มเพิ่มขึ้น (1.0 – 3.0 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์) ส่งผลให้อัตราส่วนของ *9-cis* ต่อ *all-trans* เพิ่มขึ้นถึง 4.3 ต่อ 1 เท่า แสดงให้เห็นว่าในสภาวะปกติไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนจะอยู่ทั้งในรูปแบบ *cis* และแบบ *trans* มีปริมาณที่แตกต่างกันในสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ โดยมีเอนไซม์ phytoene synthase (PSY) เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมกลไกและกำหนดรูปแบบการสังเคราะห์ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนในสาหร่าย (Xu and Harvey, 2019) ซึ่งกระบวนการจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อสาหร่ายเจริญอยู่ในสภาวะที่เป็นปฏิปักษ์ (extreme conditions) เช่น การขาดสารอาหาร ความเข้มแสงสูง และปัจจัยอื่นๆ จะส่งผลให้สาหร่ายเกิดสภาวะเครียดและตอบสนองเพื่อสร้างสารเบต้าแคโรทีนที่มีคุณสมบัติเพื่อปกป้องเซลล์ส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งยีน PSY จะสั่งการให้เซลล์เปลี่ยนมาสังเคราะห์ไอโซเมอร์ในรูปแบบ *9-cis*, *13-cis*, *15-cis* และ *rest-cis* เพิ่มมากขึ้นทำให้สัดส่วนของ *all-trans* β -carotene มีปริมาณที่ลดลง (Davidi et., 2015; Shaish et al., 2006; Xu and Harvey, 2019) จากที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าปัจจัยการเลี้ยงได้แก่ไนโตรเจน (0.0 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรตต่อลิตร) ฟอสฟอรัส (0.0 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร) ความเค็ม (0.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์) และไบคาร์บอเนตในอาหาร (0.0 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) ในอาหารมีผลต่อการสังเคราะห์ไอโซเมอร์ *cis* และ *trans* เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 สูงสุด อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาปัจจัยไนโตรเจนควบคู่กับปัจจัยอื่นๆ เพื่อเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ *cis*-isomer เบต้าแคโรทีนให้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์

กับการเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ในระบบที่ใหญ่ขึ้นเพื่อผลิตเบต้าแคโรทีนในระดับเชิงพาณิชย์ต่อไป

5.1.7 ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH activity) ของสารสกัดสาหร่าย

สารสกัดสาหร่าย *Dunaliella* มีฤทธิ์ชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยมีรายงานว่าสารสกัดหยาบของสาหร่ายมีฤทธิ์ด้านการเกิดโรคต่างๆ ได้ (Ludwig et al., 2021) จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH scavenging activity) ของสารสกัดสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม ไบคาร์บอเนต และไบคาร์บอเนตร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของธาตุอาหารแต่ละปัจจัยลดลงส่งผลทำให้ร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากภายในเซลล์สาหร่ายมีกลไกการป้องกันตัวจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายใต้การจำกัดธาตุอาหาร (Fan et al., 2014) โดยการสะสมสารรงควัตถุและเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Lv et al., 2016) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Singh และคณะ (2016) ประเทศอินเดียที่ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่าย *Dunaliella* พบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายที่ระดับความเค็ม 3.0 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ ร่วมกับการขาดธาตุไนโตรเจน (0.0 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรทต่อลิตร) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น 42 – 60 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการเลี้ยงปกติ ขณะที่การศึกษาของ Widowati และคณะ (2016) ประเทศอินโดนีเซีย พบว่าสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสาหร่าย *D. salina* สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ค่าร้อยละ เท่ากับ 58.5 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Nguyen และคณะ (2016) ประเทศสหรัฐฯ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella* จำนวน 12 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะเครียดจากแสงจะส่งผลทำให้สารสกัดจากสาหร่ายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH radical อยู่ระหว่าง 20 – 60 เปอร์เซ็นต์จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสาหร่าย *D. salina* NUAC09 มีสารซึ่งเป็นตัวให้ไฮโดรเจน แก่ DPPH radical (Srinivasan et al., 2018) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid (positive control) พบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่าย *D. salina* NUAC09 สูงกว่าอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดของสาหร่าย *Dunaliella* มีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสารประกอบกลุ่มแคโรทีนอยด์ (β -carotene, lutein, zeaxanthin) รวมถึงสารกลุ่มอื่น เช่น สารฟีนอลิก (Gentis acid, Catechin และ Epicatechin) ที่พบเฉพาะกลุ่มสาหร่ายสีเขียว และจัดว่าเป็นสารประกอบที่กล่าวมามีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันสูง (Lopez et al., 2015) จึงทำให้สารสกัดจากสาหร่าย *D. salina*

NUAC09 มีประสิทธิภาพในการจัดอนุมูลิสร DPPH ที่สูงกว่าสารมาตรฐาน นอกจากนี้พบว่าในสาหร่ายสกุลอื่นๆ เช่น *Chlorella*, *Spirulina*, *Nostoc* และ *Haematococcus* สามารถยับยั้งอนุมูลิสร (DPPH) ได้ร้อยละ 12 – 65 ที่ความเข้มข้นสารสกัด 10 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Assuncao et al., 2017; Gabr et al., 2020; Mtaki et al., 2020) ดังนั้นสรุปได้ว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ระดับไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนตที่เหมาะสมส่งผลให้ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลิสรมีค่าเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลิสรว่าเป็นผลมาจากสารสำคัญชนิดใด รวมถึงการศึกษาสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัด ซึ่งผลที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางในการนำสารสกัดสาหร่ายไปประยุกต์ใช้ในระดับเชิงพาณิชย์ต่อไป

5.2 สรุปผลการทดลอง

5.2.1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับลักษณะทางอนุชีววิทยาของพื้นที่ยีน 18S rDNA และ ITS บ่งชี้ว่าสาหร่าย *D. salina* NUAC09 เป็นสาหร่าย *Dunaliella salina* โดยผลสรุปจากการวิเคราะห์ลำดับเบสสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันทั้ง 2 พื้นที่ยีนที่ศึกษา แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาในยีนหลายตำแหน่งหรือหลายเทคนิคเพื่อให้ข้อมูลความหลากหลายมากขึ้น

5.2.2 เมื่อศึกษาการเจริญเติบโต และการสะสมรงควัตถุของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 สายพันธุ์ไทยที่เพาะเลี้ยงในปริมาณของไนโตรเจน (0.00 – 2.00 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรตต่อลิตร) ฟอสฟอรัส (0.000 – 0.070 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร) ความเค็ม (0.5 – 2.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์) และไบคาร์บอเนต (0.000 – 0.086 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร) ที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนตเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้จำนวนเซลล์ ค่าคลอโรฟิลล์เอ และผลผลิตชีวมวลเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ขณะที่แคโรทีนอยด์มีปริมาณลดลง ซึ่งปริมาณไนโตรเจน 2.00 กรัมของโพแทสเซียมไนเตรตต่อลิตร ฟอสฟอรัส 0.070 กรัมของโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตต่อลิตร ความเค็ม 2.5 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ และไบคาร์บอเนตร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.043 กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อลิตร มีความเหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

5.2.3 องค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์ของเบต้าแคโรทีนในสาหร่าย พบไอโซเมอร์ 2 ชนิดที่เด่นชัดที่สุด คือ *all-trans* β -carotene และ *9-cis* β -carotene ซึ่งการขาดไนโตรเจน ความเค็ม, ฟอสฟอรัส และไบคาร์บอเนตส่งผลต่อการผลิตไอโซเมอร์ *9-cis* ได้สูงสุด เท่ากับ 328.7,

156.5, 99.5 และ 43.2 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้งต่อกรัม และ 16.43, 7.82, 4.98, 2.16 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.2.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH scavenging activity) ของสารสกัดสาหร่าย พบว่าการขาดปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนตสามารถยับยั้งกิจกรรมอนุมูลอิสระ DPPH และมีค่า IC_{50} สูงที่สุด

5.2.5 การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนต มีผลต่อการเจริญเติบโต ปริมาณรงควัตถุ ปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน และฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์กับการเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ในระดับเชิงพาณิชย์ได้ แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย เช่น การเพาะเลี้ยงรูปแบบสองชั้นตอนยังมีความจำเป็น ซึ่งจะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของสาหร่ายและเหนี่ยวนำให้สาหร่ายเพิ่มปริมาณผลผลิตเบต้าแคโรทีนให้สูงขึ้นได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ในการจำแนกสาหร่ายด้วยลักษณะทางอนุชีววิทยาของสาหร่ายควรมีการศึกษาพื้นที่ ยืนที่หลากหลายเพื่อให้การจำแนกและระบุชนิดของสายพันธุ์สาหร่ายมีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

5.3.2 ควรมีการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยร่วม (interaction factors) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตควบคู่ไปกับการผลิตรงควัตถุของสาหร่าย *Dunaliella* ให้มากขึ้น

5.3.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมรงควัตถุของสาหร่ายครั้งต่อไป ควรมีการศึกษาในปริมาณเชิงพาณิชย์ โดยใช้ระบบการเลี้ยงขนาดใหญ่เพื่อเพิ่มกำลังการผลิตเบต้าแคโรทีนและปริมาณไอโซเมอร์ของสาหร่าย *D. salina* สายพันธุ์ NUAC09

5.3.4 ควรมีการศึกษาการกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งสารอนุมูลอิสระของสาหร่ายว่าเป็นผลมาจากสารสำคัญชนิดใด และศึกษาสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดสาหร่าย *D. salina* สายพันธุ์ NUAC09

5.3.5 สำหรับงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาองค์ความรู้ด้านปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การสะสมรงควัตถุ และประสิทธิภาพของสารสกัดเบต้าแคโรทีนของสาหร่ายดุนาลิเอลล่า ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ อาทิ ด้านเภสัชกรรม ด้านอุตสาหกรรม และด้านเกษตรกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยได้ ซึ่งจะสามารถช่วยลดต้นทุนการนำเข้าสารเบต้าแคโรทีนจากต่างประเทศ ลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย สามารถสร้างอาชีพให้กับ

เกษตรกร ตลอดจนการนำไปพัฒนานวัตกรรมสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืนต่อไป



บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- ยุวดี พิรพรพิศาล, จีรพร เพกเกาะ, ดวงกมล โพธิ์หวังประสิทธิ์, ธรพล ทนคำดี, อติณัฐ หงส์สิริชาติ และทัตพร คุณประดิษฐ์. (2550). การประเมินคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำนิ่งโดยใช้แฟล่งก์ตอนพืชชนิดเด่นด้วย AARL-PP Score. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง*. 1(1), 71-81.
- ยุวดี พิรพรพิศาล. (2553). การพัฒนาการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงจากสาหร่ายขนาดเล็กระยะที่ 1. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 60-62 น.
- สมฤทัย สิงหสุวรรณ. (2553). สภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตชีวมวลและไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้ในการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโตโทร. วิทยาสตรบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์. นครศรีธรรมราช.
- สรวิศ เผ่าทองสุข. (2536). การเลือกสายพันธุ์และการเพาะเลี้ยง *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) เพื่อผลิตเบต้าแคโรทีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สรวิศ เผ่าทองสุข. (2543). สาหร่าย: ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 356 หน้า.
- สุจิตา ฤทธิสร. (2551). การใช้ประโยชน์จากสาหร่ายเกลียวทองเพื่อการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมสุราแช่พื้นบ้าน. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.
- สุนิรัตน์ เรืองสมบูรณ์. (2552). ศักยภาพและความเป็นไปได้ในการใช้เซลล์สาหร่ายไซยาโนแบคทีเรียที่มีชีวิต ในการกำจัดตะกั่วจากน้ำเสีย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- Abubakar, A., Swamy, R., & Harvey, P. (2012). *Dunaliella* cultivation. University of Greenwich. 1–3.
- Ahmed, RA., He, M. Aftab, R.A., Zheng, S. Nagi, M. Bakri, R., & Wang, C. (2017). Bioenergy application of *Dunaliella salina* SA 134 grown at various salinity levels for lipid production. *Scientific Reports*, 7(1), 8118.
- Ak, I. (2008). Effects of light intensity, salinity and temperature on growth in CAMALT1 strain of *Dunaliella viridis* Teodoresco from Turkey. *Journal of Biological Sciences*, 8, 1356–1359.

- Alaluf, S., Heinrich, U., Stahl, W., Tronnier, H., & Wiseman, S. (2002). Dietary carotenoids contribute to normal human skin color and UV photosensitivity. *The Journal of nutrition*, 132(3), 399-403.
- Andersen, R.A. (2005). Algal culturing techniques. Academic Press, USA., ISBN, 9780120884261. Pages, 578.
- Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M.C., & Ahmed, Z. (2013). Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresource Technology*, 131, 246–249.
- Assunção, M.F.G., Amaral, R., Martins, C.B., Ferreira, J.D., Ressurreição, S., Santos, S.D., Varejão, J.M.T.B., & Santos, L.M.A. (2017). Screening microalgae as potential sources of antioxidants. *Journal of Applied Phycology*, 29, 865–877.
- Avron, M., & Ben-Amotz, A. (1992). *Dunaliella*, Physiology, Biochemistry and Biotechnology. CRC Press. Boca Raton, Florida, 240 p.
- Barra, L., Chandrasekaran, R., Corato, F., & Brunet, C. (2014). The challenge of ecophysiological biodiversity for biotechnological applications of marine microalgae. *Marine drugs*, 12(3), 1641-1675.
- Bauernfeind, J.C. (1981). Carotenoid as colorant and vitamin a precursor. *Academic Press*, New York. 938 p.
- Beardall, J., & Giordano, M. (2019). Acquisition and metabolism of inorganic nutrients by *Dunaliella*. In *The Alga Dunaliella* (pp. 173-188), CRC Press.
- Becker, E.W. (1994). Microalgae, biotechnology and microbiology. *Cambridge University Press*, New York. 293 p.
- Ben-Amotz, A., Shaish, A. (1992). β -carotene biosynthesis. In, *Dunaliella*, Physiology, biochemistry, and biotechnology. Avron, M., Ben-Amotz, A. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 205–216.
- Ben-Amotz, A., & Avorn, M. (1981). Glycerol and β -carotene metabolism in the halotolerant alga *Dunaliella*, A model system for biosolar energy conversion. *Trends in Biochemical Sciences*, 6, 297–299.
- Ben-Amotz, A., & Avorn, M. (1983). On the factors which dertermine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bradawil*. *Plant Physiology*, 72, 593–597.

- Ben-Amotz, A., Shaish, A., & Avorn, M. (1990). The Biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends Biotechnology*, 8, 121–126.
- Ben-Amotz, A. (1982). Accumulation of β -carotene in halotolerant algae, purification and characterization of β -carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 18, 529–537.
- Ben-Amotz, A. (1990). The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends Biotechnology*, 8(5), 121–126.
- Ben-Amotzb, A., Gressel, J., & Avron, M. (1987). Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition. *Journal of Phycology*, 23, 176–181.
- Bhumibhamon, O., Sittiphuprasert, U., Boontaveeyuwat, N., & Praiboon, J. (2003). The optimum use of salinity, nitrate and pond depth for β -carotene production of *Dunaliella salina*. *Agriculture and Natural Resources*, 37(1), 84–89.
- Bononi, M., Commissati, I., Lubian, E., Fossati, A., & Tateo, F. (2002). A simplified method for the HPLC resolution of alpha-carotene and beta-carotene (trans and cis) isomers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(2), 401–3.
- Boontaveeyuwat, N. (1999). Production, storage stability and safety test of β -carotene products from *Dunaliella salina* Teodoresco DS1197. Thesis of Doctoral Degree. Kasetsart University, Bangkok.
- Bornet, B., Antoine, E., Bardouil, M., & Marcaillou-Le Baut, C. (2004). ISSR as new markers for genetic characterization and evaluation of relationships among phytoplankton. *Journal of Applied Phycology*, 16(4), 285–290.
- Borowitzka, L.J., & Borowitzka, M.A. (1989). β -Carotene (provitamin A) production with algae. In, Vandamme E.J. (eds) *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*. Elsevier Applied Biotechnology Series. Springer, Dordrecht.
- Borowitzka, L.J., Borowitzka, M.A., & Moulton. (1984). The mass culture of *Dunaliella salina* for the fine chemicals, from laboratory to pilot plant. *Hydrobiologia*, (1), 166–177.
- Borowitzka, M.A., & Borowitzka, L.J. (1988). *Dunaliella* In Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (eds). *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press. pp. 27–58.

- Borowitzka, M.A., & Siva, C.J. (2007). The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, (19), 567–590.
- Borovkov, A.B., Gudvilovich, I.N., Memetshaeva, O.A., Avsiyan, A.L., Lelekov, A.S., & Novikova, T.M. (2019). Morphological and morphometrical features in *Dunaliella salina* (Chlamydomonadales, Dunaliellaceae) during the two-phase cultivation mode. *Ecologica Montenegrina*, 22, 157–165.
- Bramley, P.M., Bird, C. R., & Schuch, W. (1993). Carotenoid biosynthesis and manipulation. In *Biosynthesis and manipulation of plant products* (pp. 139–177). Springer, Dordrecht.
- Celekli, A., & Donmez, G. (2006). Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(2), 183–189.
- Chapman, V. J. (1970). Occurrence and distribution of seaweeds. In, *Seaweeds and their uses*, 2nd ed. London, Methuen & Co. Ltd. pp. 1–2.
- Charioui, I., Chikhaoui, M., El Filali, F., Abbassi, M., Banaoui, A., & Kaaya, A. (2017). Production in cell biomass and carotenoids under the effect of a saline stress in microalgae *Dunaliella* spp. isolated from moroccan saharian saline. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), 286–294.
- Chattopadhyay, K., & Chattopadhyay, B.D. (2010). Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation and antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein. *Journal of Research and Education in Indian Medicine*, 127, 571–576.
- Chen, H. and Jiang, J.G. (2009). Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *Journal of Cellular Physiology*, 219, 251–258.
- Cunningham Jr, F.X., & Gantt, E. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, 49(1), 557–583.
- Demirbas, A., & Demirbas, M.F. (2011). Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Convers Manage*, 52, 163–70.

- Davidi, L., Levin, Y., Ben-Dor, S., & Pick, U. (2015). Proteome analysis of cytoplasmatic and plastidic β -carotene lipid droplets in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 167(1), 60-79.
- Davidi, L., & Pick, U. (2017). Novel 9-*cis*/all-*trans* β -carotene isomerases from plastidic oil bodies in *Dunaliella bardawil* catalyze the conversion of all-*trans* to 9-*cis* β -carotene. *Plant Cell Reports*, (36), 807-814.
- Dhaka, P., & Gajendra, P.S. (2018). Effect of pH on growth and biopigment accumulation of green alga *Dunaliella salina*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(1), 271-76.
- Dhargalkar, V.K., & Verlekar, X.N. (2009). Southern Ocean seaweeds, A resource for exploration in food and drugs. *Aquaculture*, 287, 229-242.
- Dhawan, V. (2014). Reactive Oxygen and Nitrogen Species, General Considerations. In, Ganguly N, Jindal S, Biswal S, Barnes P, Pawankar R. (editors) *Studies on Respiratory Disorders. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*, 12th edition, New York, Humana Press.
- Fan, L., Vonshak, A., Gabbay, R., Hirshberg, J., Cohen, Z., & Boussiba, S. (1995). The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. *Plant and Cell Physiology*, 36, 1519-1524.
- Fan, J., Cui, Y., Wan, M., Wang, W., & Li, Y. (2014). Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 17.
- Fawzy, M. A., Abdel-Wahab, D.A., & Hifney, A.F. (2017). Physiological and biochemical responses of the green alga *Pachycladella chodatii* (SAG 2087) to sodicity stress. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, (4), 30-36.
- Fazeli, M.R., Tofighi, H., Samadi, N., Jamalifar, H., & Fazeli, A. (2006). Carotenoids accumulation by *Dunaliella tertiolecta* (Lake Urmia isolate) and *Dunaliella salina* (ccap 19/18 & wt) under stress conditions. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(3), 146-150.

- Fazeli, M.R., Tofighi, H., Madadkar-Sobhani, A., Shahverdi, A.R., Nejad-Sattari, T., Mirzaie, S., & Jamalifar, H. (2009). Nicotine inhibition of lycopene cyclase enhances accumulation of carotenoid intermediates by *Dunaliella salina* CCAP 19/18. *European Journal of Phycology*, 44(2), 215–220.
- Fleurence, J. (2012). What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture. *Trends in Food Science and Technology*, 27, 57–61.
- Fraser, P.D., Shimada, H. and Misawa, N. (1998). Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate in vitro assay. *European Journal of Biochemistry*, 252, 229–236.
- Gabr, G. A., El-Sayed, S. M., & Hikal, M. S. (2020). Antioxidant activities of phycocyanin, a bioactive compound from *Spirulina platensis*. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 32(2), 73–85.
- Gonzalez, M., Moreno, J., Manzano, J., Florencio, F., & Guerrero, M. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-*cis* β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 115(1), 81–90.
- Gibor, A. (1956). The culture of brine algae. *The Biological Bulletin*, 111, 223–229.
- Gomez, P.I., & González, M. A. (2005). The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biological Research*, 38(2–3), 151–162.
- Gomez, P.I., Barriga, A., Ifuentes, A.S., & Gonzalez, M.A. (2003). Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-0 0 7) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 3 0 8 6 1) Chlorophyta. *Biological Research*, 36, 185–192.
- Gomez-Pinchetti, J. L., Ramazanov, Z., Fontes, A., & Garcia-Reina, G. (1992). Photosynthetic characteristics of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Dunaliellales) in relation to β -carotene content. *Journal of applied phycology*, 4(1), 11–15.

- Grobbelaar, J.U., Nedbal, L., & Tichý, V. (1996). Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 8(4), 335–343.
- Gross, J. (1987). Pigments of Fruits. Ser., Food Science and Technology. *Academic Press*, Oxford, pp. 167–191.
- Guiheneuf, F., & Stengel, D. (2013). LC–PUFA–Enriched oil production by microalgae, Accumulation of lipid and triacylglycerols containing *n*–3 LC–PUFA is triggered by nitrogen limitation and inorganic carbon availability in the marine haptophyte *Pavlova lutheri*. *Marine Drugs*, 11, 4246–4266.
- Gupta, S., & Abu–Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science and Technology*, 22(3), 15–26.
- Halliwell, B. (2001). Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–7.
- Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 531–542.
- Hamed, I., Ak, B., Isik, O., Uslu, L., & Vursavus, K. (2017). The Effect of Temperature and salinity on the growth and carotenogenesis of three *Dunaliella* Species (*Dunaliella* sp. lake isolate, *D. salina* CCAP19/18, and *D. bardawil* LB 2538) cultivated under laboratory condition. World academy of science. Engineering and technology. Open science index 1 3 1. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 11(1), 806–811.
- Han, T., Lu, H., Zhao, Y., Xu, H., Zhang, Y., & Li, B. (2019). Two-step strategy for obtaining *Dunaliella* sp. biomass and β -carotene from anaerobically digested poultry litter wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 143, 104714.

- Harari, A., Harats, D., Marko, D., Cohen, H., Barshack, I., Kamari, Y., Gonen, A., Gerber, Y., Ben-Amotz, A., & Shaish, A. (2008). A 9-*cis* β -carotene enriched diet inhibits atherogenesis and fatty liver formation in LDL receptor knockout mice. *Journal of Nutrition*, 138, 1923–1930.
- Harvey, P.J., & Ben-Amotz, A. (2020). Towards a Sustainable *Dunaliella salina* Microalgal Biorefinery for 9-*cis* β -carotene Production. *Algal Research*, 50, 102002.
- Hejazi, M.A., Barzegari, A., Gharajeh, N.H., & Hejazi, M.S. (2010). Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga *Dunaliella*. *Saline systems*, 6, 4.
- Henley, W.J., Cobbs, M., Novoveská, L., & Buchheim, M.A. (2018). Phylogenetic analysis of *Dunaliella* (Chlorophyta) emphasizing new benthic and supralittoral isolates from Great Salt Lake. *Journal of phycology*, 54(4), 483–493.
- Hermawan, J., Masithah, E.D., Tjahjaningsih, W., & Abdillah, A.A. (2018). Increasing β -carotene content of phytoplankton *Dunaliella salina* using different salinity media. IOP Conference Series, *Earth and Environmental Science*. 137, 012034.
- Hill, R. (2014). *Chlorophyll*. In, Marcel F, Elmer HS (eds). *Comprehensive biochemistry*. Amsterdam, Elsevier, p. 73–97.
- Holdt, S.L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed, functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23, 543–597.
- Hsueh, H.T., Chu, H., & Yu, S.T. (2007). A batch study on the bio-fixation of carbon dioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot spring and marine algae. *Chemosphere*, 66, 878–886.
- Hu, CC., Lin, JT., Lu, FJ., Chou, FP., & Yang, DJ. (2008). Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*, 109, 439–446.
- Hu, C.J., Chen, S.M., Pan, C.H., & Huang, C.H. (2006). Effects of dietary vitamin A or β -carotene concentrations on growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* $\times$ *O. aureus*. *Aquaculture*, 253(1-4), 602–607.

- Huang, J., Zhong, Y., Sandmann, G., Liu, J., & Chen, F. (2012). Cloning and selection of carotenoid ketolase genes for the engineering of high-yield astaxanthin in plants. *Planta*, 236, 691–699.
- Interclinical Laboratories. (2010). *Dunaliella salina*-Marine Phytoplankton. Botanical Monograph. Interclinical Laboratories Pty Limited. Australia.
- Jacob, J., & Lawlor, D. (1993). In vivo photosynthetic electron transport does not limit photosynthetic capacity in phosphate deficient sunflower and maize leaves. *Plant, Cell and Environment*, 16, 785–95.
- Jeon, H., Lee, Y.J., Chang, K.S., Lee, C., & Jin, E. (2013). Enhanced production of biomass and lipids by supplying CO₂ in marine microalga *Dunaliella* sp. *Journal of Microbiology*, 51, 773–776.
- Jeon, H., Jeong, J., Baek, K., McKie-Krisberg, Z., Polle, J.E.W., & Jin, E. (2016). Identification of the carbonic anhydrases from the unicellular green alga *Dunaliella salina* strain CCAP 19/18. *Algal Research*, 19, 12–20.
- Jian-Guo, L., Chao-yuan, W., Niang-Hong, C., Yu-Jun, W., & Li-Dong, Y. (1996). Effect of nitrate and phosphate on accumulation of β -carotene isomers in *Dunaliella salina*. *Journal of Oceanology and Limnology*, 14, 165–169.
- Jimenez, C., & Pick, U. (1994). Differential stereoisomer compositions of β -carotene in thylakoids and in pigments globules in *Dunaliella*. *Journal of Plant Physiology*, 143, 257–263.
- Jimenez, C., & Pick, U. (1993). Differential reactivity of β -carotene isomers from *Dunaliella bardawil* toward oxygen radicals. *Plant Physiology*, 101, 385–390.
- Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z., & Aaronson, S. (1986). Algal nutrition. *Handbook of Microalgal Mass Culture*, 147–198.
- Kaur, S., Kaur, V.I., Holeyappa, S.A., & Khairnar, S.O. (2016). Effect of dietary supplementation of synthetic and natural β -carotene on survival, growth and pigmentation in freshwater Ornamental Koi (*Cyprinus carpio* L.) Carp. *Indian Journal of Animal Nutrition*, 33(4), 448–455.
- Khademi, H., Morowvat, M.H., & Ghasemi, Y. (2018). Effects of Nitrogen and Sulfur Deprivation on β -Carotene and Fatty Acid content of *Dunaliella salina*. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 187–196.

- Kharati-Koupaei, M., & Moradshahi, A. (2016). Effects of sodium nitrate and mixotrophic culture on biomass and lipid production in hypersaline microalgae *Dunaliella viridis* Teod. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59, 1–10.
- Khoo, H.E., Prasad, K.N., Kong, K.W., Jiang, Y., & Ismail, A. (2011). Carotenoids and their isomers, color pigments in fruits and vegetables. *Molecules*, 16(2), 1710–1738.
- Kim, G.Y., Heo, J., Kim, H.S., & Han, J.I. (2006). 9-*cis* β -carotene rich powder of the alga *Dunaliella bardawil* increases plasma HDL-cholesterol in fibrate-treated patients. *Bioresource Technology*, 237, 72–77.
- Kim, W., Park, J., Gim, G., Jeong, S.H., Kang, C., Kim, D.J., & Kim, S.W. (2012). Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, 19–27.
- Kim, G.Y., Heo, J., Kim, S.H., & Han, J.I. (2017). Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbon utilization efficiency. *Bioresource Technology*, 237, 72–77.
- Klut, M.E., Bisalpultra, T., & Antia, N.J. (1983). Agglutination of the chlorophycean flagellate *Dunaliella tertiolecta* by treatment with lectin or divalent cation at alkaline pH. *Journal of Phycology*, 19, 112–115.
- Kumar, A., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., Malcata, F.X., & Langenhove, H.V. (2010). Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae, recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, 28, 371–380.
- Lachmann, S. C., Mettler-Altmann, T., Wacker, A., & Spijkerman, E. (2019). Nitrate or ammonium, Influences of nitrogen source on the physiology of a green alga. *Ecology and evolution*, 9(3), 1070–1082.
- Lam, M.K., Lee, K.T., & Mohamed, A.R. (2012). Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 10, 456–469.
- Levin, G., & Mokady, S. (1994). Antioxidant activity of 9-*cis* compared to all-*trans* β -carotene in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(1), 77–82.

- Levy, Y., Zaltsberg, H., Ben-Amotz, A., Kanter, Y., & Aviram, M. (2000). Dietary supplementation of a natural isomer mixture of beta-carotene inhibits oxidation of LDL derived from patients with diabetes mellitus. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 44, 54–60.
- Lin, J.T., Lee, Y.C., Hu, C.C., Shen, Y.C., Lu, F.J., & Yang, D.J. (2010). Evaluation of carotenoid extract from *Dunaliella salina* against cadmium induced cytotoxicity and transforming growth factor b1 induced expression of smooth muscle α -actin with rat liver cell lines. *Journal of Food and Drug Analysis*, 18, 301–306.
- Lippemeier, S., Frampton, D.M.F., Blackburn, S.I., Geier, S.C., & Negri, A.P. (2003). Influence of phosphorus limitation on toxicity and photosynthesis of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) monitored by in-line detection of variable chlorophyll fluorescence. *Journal of Phycology*, 39, 320–331.
- Liu, J.G., & Wu, C.Y. (1991). Effect of salinity on accumulation of β -carotene isomers in *Dunaliella salina*. *Journal of Phycology*, 27(3), 189–196.
- Loeblich, L.A. (1982). Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella Salina* (Chlorophyta). *Journal of the Marine Biological Association UK*, 62(3), 493–508.
- Lopez, A., Rico, M., Santana-Casiano, J.M., Gonzalez, A., & Gonzalez-Davila, M. (2015). Phenolic profile of *Dunaliella tertiolecta* growing under high levels of copper and iron. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 14820–14828.
- Lotan, T., & Hirschberg, J. (1995). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -C-4 -oxygenase, that converts beta-carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS Letters*, 364, 125–128.
- Ludwig, K., Rihko-Struckmann, L., Brinitzer, G., Unkelbach, G., & Sundmacher, K. (2021). β -Carotene extraction from *Dunaliella salina* by supercritical CO₂. *Journal of Applied Phycology*, 33, 1435–1445.
- Lv, H., Cui, X., Wahid, F., Xia, F., Zhong, C., & Jia, S. (2016). Analysis of the physiological and molecular responses of *Dunaliella salina* to macronutrient deprivation. *PLOS ONE*, 11(3), 1–19.

- Madeira, M.S., Cardoso, C., Lopes, P.A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N.M., & Prates, J.A. (2017). Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livestock Science*, 205, 111-121.
- Mai, T., Nguyen, P., Vo, T., Huynh, H., Tran, S., Nim, T., Tran, D., Nguyen, H., & Bui, P. (2017). Accumulation of lipid in *Dunaliella salina* under nutrient starvation condition. *American Journal of Food and Nutrition*, 5(2), 58–61.
- Marinoa, T., Casellab, P., Sangiorgioc, P., Verardic, A., Ferrarod, A., Hristoforoud, E., Molino, A., & Musmarra, D. (2020). Natural beta-carotene, A microalgae derivate for nutraceutical applications. *Chemical Engineering*, 79.
- Machingura, M.C., & Moroney, J.V. (2018). Carbon Fixation, Closing the circle. *Elife*, 7, e42507.
- Martin, J. F., Gudina, E., & Barredo, J.L. (2008). Conversion of beta-carotene into astaxanthin, Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase–ketolase protein. *Microbial Cell Factories*, 7, 3.
- Masojidek, J., Torzillo, G., & Koblizek, M. (2013). Photosynthesis in microalgae. in, Handbook of Microalgal Culture, *Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition*, pp. 21–36.
- Mercado, J., Javier, F., Gordillo, L., Xavier- Niell, F., & Figueroa, F.L. (1999). Effects of different levels of CO₂ on photosynthesis and cell components of the red alga *Porphyra leucosticta*. *Journal of Applied Phycology*, 11, 455–461.
- Mofeed, J. (2015). Effects of Salinity and Light Intensity on Production of β –Carotene and Glycerol from The Halotolerant Alga *Dunaliella salina* (Chlorophyta) Isolated from Zaranik Nature Reserve, North Sinai, (Egypy). *The Egyptian Journal of Experimental Biology*, 11(1), 21–29.
- Mohamed, S. Hashim, S.N., & Rahman, H.A. (2012). Seaweeds, A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science and Technology*, 23, 83–96.
- Mondal, M., Ghosh, A., Oinam, G., Tiwari, O.N., Gayen, K., & Haldera, G.N. (2017). Biochemical responses to bicarbonate supplementation on biomass and lipid productivity of *Chlorella* sp. BTA9031 isolated from coalmine area. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 36, 1498–1506.

- Mtaki, K., Kyewalyanga, M.S., & Mtolera, M.S.P. (2020). Assessment of antioxidant contents and free radical-scavenging capacity of *Chlorella vulgaris* cultivated in low cost media. *Applied Sciences*, 10(23), 8611.
- Murthy, K.C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M. M., Sowmya, P.R., & Ravishankar, G.A. (2005). In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*—a green microalga. *Life sciences*, 76(12), 1381–1390.
- Mut-Salud, N., Alvarez, P.J., Garrido, J.M., Carrasco, E., Aranega, A., & Rodriguez-Serrano, F. (2015). Antioxidant intake and antitumor therapy, toward nutritional recommendations for optimal results. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 6719534.
- Nagata, C. (2010). Association of dietary fat, vegetables and antioxidant micronutrients with skin ageing in Japanese women. *British Journal of Nutrition*, 103(14), 93–98.
- Nezhad, F.S., & Mansouri, H. (2016). Identification of two species of the green algae *Dunaliella* and comparing their response to salinity. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21(1), 44–49.
- Ngo, D.H. (2011). Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry, An overview. *Food Research International*, 44, 523–29.
- Nguyen, A., Tran, D., Ho, M., Louime, C., Tran, H., & Tran, D. (2016). High light stress regimen on *Dunaliella salina* strains for carotenoids induction. *Integrative Food, Nutrition and Metabolism*, 3,347–350.
- Nezhad, F.S., & Mansouri, H. (2015). Identification of two species of the green algae *Dunaliella* and comparing their response to salinity. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21, 44–49.
- Nikookar, K., Moradshahi, A., & Kharati, M. (2004). Influence of salinity on the growth, pigmentation and ascorbate peroxidase activity of *Dunaliella salina* isolated from Maharlu lake salt in Shiraz. *Iranian Journal of Science and Technology (Sciences)*, 28(1), 117–25.
- Nishida, Y., Yamashita, E., & Miki, W. (2007). Quenching activities of common hydrophilic and lipophilic antioxidants against single oxygen using chemiluminescence detection system. *Carotenoid Science*, 11, 16–20.

- Oliviera, L., Bisalpultra, T., & Antia, N.J. (1980). Ultrastructure observation of the surface coat *Dunaliella tertiolecta* from staining with cationic dyes and enzyme treatments. *New Phytologist*, 85, 385–392.
- Oren, A. (2014). The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *Journal of Biological Research–Thessaloniki*, pp. 21–23.
- Orosa, M., Dranqueira, D., Cid, A., & Abalde, J. (2005). Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 96, 373–378.
- Orset, S.C., & Young, A.J. (2000). Exposure to low irradiances favors the synthesis of 9-*cis* β , β -Carotene in *Dunaliella salina* (Teod.). *Plant Physiology*, 122(2), 609–618.
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technol*, 156, 146–54.
- Pancha, I., Chokshi, K., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2015). Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 193, 315–323.
- Pangestuti, R., & Kim, S.K. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of functional foods*, 3(4), 255–266.
- Papageorgiou, G.C. (2007). Chlorophyll *a* fluorescence, a signature of photosynthesis. *Springer Science & Business Media*. New York. pp. 820.
- Patil, L., & Kaliwal, B. (2017). Effect of CO₂ concentration on growth and biochemical composition of newly isolated indigenous microalga *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 182, 335–348.
- Peng, L., Zhang, Z., Lan, C.Q., Basak, A., Bond, N., Ding, X., & Du, J. (2017). Alleviation of oxygen stress on *Neochloris oleo abundans*, effects of bicarbonate and pH. *Journal of Applied Phycology*, 29, 143–152.

- Peterfi, L.S., & Manton, I. (1968). Observations with the electron microscope on *Asteromonas gracilis* Artari emend. (*Stephanoptera gracilis* (Artari) Wisl.), with some comparative observations on *Dunaliella* sp. *Br. Psychological Bulletin Journal*, 3, 423–440.
- Pick, U., Karni, L., & Avron, M. (1986). Determination of ion content and ion fluxes in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*, 81, 92–96.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). Antioxidants in food, practical applications. New York, CRC Press. pp. 380.
- Pongpadung, P., Ponsa, S., Sanpapao, P., & Tawong, T. (2020). Genetic diversity and carotenoid accumulation of *Dunaliella* spp. isolated from salt fields in Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science*, 51,1(Suppl.), 437–442.
- Powtongsook, S., Kittakoop, P., Menasveta, P., & Wisessang, S. (1995). Isolation and characterization of *Dunaliella salina* from Thailand. *Journal of Applied Phycology*, 7, 75–90.
- Preetha, K., John, L., Subin, C.S., & Vijayan, K.K. (2012). Phenotypic and genetic Characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian salin as and their diversity. *Aquatic Biosystems*, 8(1), 27.
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4), 89-100.
- Rahman, T., Hosen, I., Towhidul-Islam, M.M., & Shekhar, H.U. (2012). Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 997–1019.
- Ramos, A.A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J.C., Jin, E.S., & Varela, J.C. (2011). The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance, genetic advances and future perspectives. *Algae*, 26(1), 3–20.
- Ranga, A.R., Sarada, R., & Ravishankar, G.A. (2007). Influence of CO₂ on growth and hydrocarbon production in *Botryococcus braunii*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17,414–419.
- Relevy, N.Z., Ruhl, R., Harari, A., Grosskopf, I., Barshack, I., Ben-Amotz, A., Nir, U., Gottlieb, H.E., Kamari, Y., Harats, D., & Shaish, A. (2015). 9-*cis* β -carotene inhibits atherosclerosis development in female LDLR^{-/-} Mice. *Functional Foods in Health and Disease*, 5(2), 67–79.

- Rhee, G-Y., & Gotham, I.J. (1980). Optimum N,P ratios and coexistence of planktonic algae. *Journal of Phycology*, 16(4), 486–489.
- Richmond, A. (1986). Cell response to environmental factors. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton, Florida. In Richmond, A. eds, pp. 69–99.
- Robert, R.A., Smith, R.A., Safe, S., & Szabo, C. (2010). Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology*, 276, 85–94.
- Rohacek, K., Soukupova, J., & Bartak, M. (2008). Chlorophyll fluorescence, a wonderful tool to study plant physiology and plant stress. *Plant Cell Compartments*, 41-104.
- Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escoria, A., & Saura-Calixto, J. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research*, 20, 941–953.
- Sarms, A.D., Mallick, A.R., & Ghosh, A.K. (2010). Free radicals and Their Role in Different Clinical Conditions, An Overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1(3), 185–192.
- Sathasivam, R., & Juntawong, N. (2013). Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. *International Journal of Current Science*, 5, 67–73.
- Sathasivam, R., Pongpadung, P., Praiboon, J., Chirapart, A., Trakulnaleamsai, S., Roytrakul, S., & Juntawong, N. (2018). Optimizing NaCl and KNO₃ concentrations for high β -carotene production in photobioreactor by *Dunaliella salina* KU11 isolated from saline soil sample. *Chiang Mai Journal of Science*, 45(1), 106–115.
- Shaish, A., Harari, A., Hananshvili, L., Cohen, H., Bitzur, R., Luvish, T., Ulman, E., Golan, M., Ben-Amotz, A., Gavish, D., Rotstein, Z., & Harats, D. (2006). 9-*cis* β -carotene-rich powder of the alga *Dunaliella bardawil* increases plasma HDL-cholesterol in fibrate-treated patients. *Atherosclerosis*, 189, 215–221.
- Shapoval, G.S., & Gromovaia, V.F. (2003). Mechanism of antioxidant protection of an organism from oxidative stress. *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal*, 75(2), 5-13.

- Sies, H., Stahl, W., & Sundquist, A. (1992). Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, β -carotene and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of sciences*, 368, 7–19.
- Singh, S.P., & Singh, P. (2014). Effect of CO₂ concentration on algal growth, A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 3, 172–179.
- Singh, P., Baranwal, M., & Reddy, S.M. (2016). Antioxidant and cytotoxic activity of carotenes produced by *Dunaliella salina* under stress. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2269–75.
- Smith, B.M., Morrissey, P.J., Guenther, J.E., Nemson, J.A., Harrison, M.A., Allen, M. A., & Melis, A. (1990). Response of the photosynthetic apparatus in *Dunaliella salina* (green algae) to irradiance stress. *Plant Physiology*, 93, 1433–1440.
- Solovchenko, A., Verschoor, A.M., Jablonowski, N.D., & Nedbal, L. (2015). Phosphorus from wastewater to crops, an alternative path involving microalgae, *Biotechnology Advances*, 34, 550–564.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Srinivasan, R., Mageswari, A., Subramanian, P., Suganthi, C., Chaitanyakumar, A., Aswini, V., & Gothandam, K.M. (2018). Bicarbonate supplementation enhances growth and biochemical composition of *Dunaliella salina* V-101 by reducing oxidative stress induced during macronutrient deficit conditions. *Scientific Reports*, 8(1), 6972.
- Srinivasan, R., Kumar, V.A., Kumar, D., Ramesh, N., Babu, S., & Gothandam, K.M. (2015). Effect of dissolved inorganic carbon on beta-carotene and fatty acid production in *Dunaliella* sp. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 175(6), 2895–2906.
- Sudhir, P., & Murthy, S.D.S. (2004). Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, 42, 481–486.
- Suganuma, K. (2010). Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of Matrix metalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, 58(2), 136–142.

- Supamattaya, K., Kiriratnikom, S., Boonyaratpalin, M., & Borowitzka, L. (2005). Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 248(1-4), 207–216.
- Suutari, M., Majaneva, M., Fewer, D. P., Voirin, B., Aiello, A., Friedl, T., Chiarello, A.G., & Blomster, J. (2010). Molecular evidence for a diverse green algal community growing in the hair of sloths and a specific association with *Trichophilus welckeri* (Chlorophyta, Ulvophyceae). *BMC evolutionary biology*, 10(1), 1–12.
- Susan, L.H., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed, functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23, 543–597.
- Tafreshi, A.H., & Shariati, M. (2009). *Dunaliella* biotechnology, methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 14–35.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5, Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739.
- Tawong, W., Pongpadung, P., Ponza, S., Na, Y., & Liu, J.G. (2017). Screening and phylogenetic analysis of carotenoid-rich *Dunaliella* spp. in Thailand. The 5th workshop on science and technology cooperation, Biodiversity, Global Awareness and Sustainability, Organized by TRF and CAS, November 6–8, Chiang Mai, Thailand.
- Telfer, A., Pascal, A., & Gall, A. (2008). Carotenoids in photosynthesis. In, Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander J (eds) Carotenoids. Natural functions. *Birkhauser*, pp 265–308.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson, T.J. (1995). CLUSTAL W, Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.

- Torres, P.B., Chow, F., Furlan, C.M., Mandelli, F., Mercadante, A., & Santos, D.Y.A.C.D. (2014). Standardization of a protocol to extract and analyze chlorophyll a and carotenoids in *Gracilaria tenuistipitata* Var. Liui. Zhang and Xia (Rhodophyta). *Brazilian journal of oceanography*, 62(1), 57–63.
- Vaupel, J.W. (2010). Biodemography of human ageing. *NATURE*. 464(25), 536–42.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113–4117.
- Van Loo-Bouwman, C.A., Naber, T.H., & Schaafsma, G. (2014). A review of vitamin A equivalency of β -carotene in various food matrices for human consumption. *British journal of nutrition*, 111(12), 2153–2166.
- Varela, J.C., Pereira, H., Vila, M., & León, R. (2015). Production of carotenoids by microalgae, achievements and challenges. *Photosynthesis research*, 125(3), 423–436.
- Vidhyavathi, R., Sarada, R., & Ravishankar, G.A. (2009). Expression of carotenogenic genes and carotenoid production in *Haematococcus pluvialis* under the influence of carotenoid and fatty acid synthesis inhibitors. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(2), 88–93.
- Vo, T., & Tran, D. (2014). Effects of salinity and light on growth of *Dunaliella* isolates. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 2(5), 208–211.
- Weinrich, T., Xu, Y., Wosu, C., Harvey, P.J., & Jeffery, G. (2019). Mitochondrial function, mobility and lifespan are improved in *Drosophila melanogaster* by extracts of 9-*cis* β -carotene from *Dunaliella salina*. *Marine Drugs*, 17(5), 279.
- Widowati, I., Zainuri, M., Kusumaningrum, H.P., Susilowati, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., Bourgougnon, N., & Mouget, J. (2017). Antioxidant activity of three microalgae *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* and *Isochrysis galbana* clone Tahiti. *IOP Conference Series, Earth and Environmental Science*, 55, 012067.
- Wongsnansilp, T., Juntawong, N., & Wu, Z. (2016). Effects of phosphorus on the growth and chlorophyll fluorescence of a *Dunaliella salina* strain isolated from saline soil under nitrate limitation. *Journal of Biological Research*, 89, 5866.

- Wongsnansilp, T., Yokthongwattana, K., Roytrakul, S., & Juntawong, N. (2019). β -carotene production of UV-C induced *Dunaliella salina* under salt stress. *Journal Pure Applied Microbiology*, 13(1), 193–200.
- Wu, Z., Duangmanee, P., Zhao, P., Juntawong, N., & Ma, C. (2016). The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three *Dunaliella salina* strains isolated from saline soil. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(1), e26732.
- Xu, Y., & P.J. Harvey. (2019). Red Light Control of β -Carotene Isomerisation to 9-*cis* β -Carotene and Carotenoid Accumulation in *Dunaliella salina*. *Antioxidants*, 8, 148.
- Xu, Y., Ibrahim, I.M., Wosu, C.I., Ben-Amotz, A., & Harvey, P.J. (2018). Potential of new Isolates of *Dunaliella salina* for natural β -carotene production. *Biology*, 7(1), 14.
- Yamashita, E. (2002). Cosmetic benefit of dietary supplements containing astaxanthin and tocotrienol on human skin. *Food Style*, 216(6), 112–17.
- Ye, Z.W., Jiang, J.G., & Wu, G.H. (2008). Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*, Progresses and prospects. *Biotechnology Advances*, 26(4), 352–360.
- Yuan, J.P., Peng, J., Yin, K., & Wang, J.H. (2011). Potential health-promoting effects of astaxanthin, a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular nutrition and food research*, 55(1), 150–165.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J.W. (1990). In PCR protocols, A guide to methods and applications. Eds. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White. Academic Press, Inc, 315–322.
- Zhang, J., Sun, Z., Sun, P., Chen, T., & Chen, F. (2014). Microalgal carotenoids, beneficial effects and potential in human health. *Food and function*, 5(3), 413–425.





Dunaliella salina strain NUAC09 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MF359998.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MF359998 703 bp DNA linear PLN 15-JUL-2018
 DEFINITION *Dunaliella salina* strain NUAC09 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION MF359998
 VERSION MF359998.1
 KEYWORDS .
 SOURCE *Dunaliella salina*
 ORGANISM [Dunaliella salina](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; core chlorophytes; Chlorophyceae; CS clade; Chlamydomonadales; Dunaliellaceae; Dunaliella.
 REFERENCE 1 (sites)
 AUTHORS Pongpadung,P., Tawong,W., Ponza,S. and Liu,J.
 TITLE Screening and phylogenetic analysis of carotenoid-rich *Dunaliella* spp. in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 703)
 AUTHORS Pongpadung,P., Tawong,W., Ponza,S. and Liu,J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (16-JUN-2017) Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, 99 Moo 9 Phitsanulok-Nakhonsawan Road, Muang, Phitsanulok 65000, Thailand
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..703
 /organism="Dunaliella salina"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="NUAC09"
 /db_xref="taxon:3046"
 misc_RNA <1..>703
 /note="contains small subunit ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large subunit ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ggaaagtaaa aaaacgtaac aaggtttccg taggtgaacc tgcggaagga tcattgaatc
 61 tatcaataac cacaccgtgc actgtttgt ctggcccatc attctctcg gagtttgggt
 121 cttccgggt agcattaagt tctgtctgg gttgggtctg gctatccat aactgggta
 181 gtcgggctgg tcctactaa ccaacaacac caataaaac cttaaagcaa agatattgtc
 241 tcggcctagc cgtcacatcc taactgagac aactctcaac aacggatatt ttggctctcg
 301 caacgatgaa gaacgcagcg aaatgcgata cgtagtgtga attgcagaat tccgtgaatc
 361 atcaaatctt tgaacgcaa ttgcgcccaa ggctcggct gagggcatgt ttgcctcagc
 421 gtcgggttaa tctcacttc ccttcccat attgaagtgt tgggcaagtg gatctggctg
 481 ttccagagct tgagtcttc attgctctca aaatgggctc tggatcagct gaagtaaaga
 541 ggctagctcg aggaccggtt aagggccgca actgggtagg cagctcaccg ctgtctattt



การเตรียมสารเคมีและอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

1. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร Johnson medium (Abubakar et al., 2012)

สำหรับปริมาตร 1 ลิตร (1 L)

สาร	ปริมาณ
NaCl	ตามความต้องการ
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.5 กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 กรัม
KCl	0.2 กรัม
CaCl ₂	0.2 กรัม
KNO ₃	1.0 กรัม
NaHCO ₃	0.043 กรัม
KH ₂ PO ₄	0.035 กรัม
Fe-solution	10 มิลลิลิตร
Na ₂ EDTA	1.89 กรัม
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2.44 กรัม
Trace-element solution	10 มิลลิลิตร
ZnCl ₂	4.1 มิลลิกรัม
H ₃ BO ₃	61.0 มิลลิกรัม
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5.1 มิลลิกรัม
CuCl ₂ ·2H ₂ O	4.1 มิลลิกรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4.1 มิลลิกรัม
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	38.0 มิลลิกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดแล้วปรับพีเอช (pH) ให้ได้ เท่ากับ 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) จากนั้นปรับปริมาตรน้ำให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) มรา อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทั้งให้เย็นที่ อุณหภูมิห้องจึงจะสามารถนำไปใช้ได้

2. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร D medium (Pick et al., 1986)

2.1 ส่วนประกอบ (recipe)

ปริมาณ 1 ลิตร

น้ำกลั่น (ddH ₂ O)	ปริมาณ 550 มิลลิลิตร
NaCl ความเข้มข้น 5 M NaCl	ปริมาณ 300 มิลลิลิตร
Concentrated Mix	ปริมาณ 100 มิลลิลิตร
D7 Micronutrient	ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

สำหรับอาหารแข็งให้เติม agar ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) มรอาอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติม โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO₃) ความเข้มข้น 0.5 M ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียม Concentrated Mix

ปริมาณ 1 ลิตร

น้ำกลั่น (ddH ₂ O)	ปริมาณ 550 มิลลิลิตร
Tris-HCl ความเข้มข้น 2 M pH 7.5	ปริมาณ 200 มิลลิลิตร
KNO ₃ ความเข้มข้น 1 M	ปริมาณ 50 มิลลิลิตร
MgSO ₄ ความเข้มข้น 1 M	ปริมาณ 50 มิลลิลิตร
CaCl ₂ ความเข้มข้น 60 mM	ปริมาณ 50 มิลลิลิตร
KH ₂ PO ₄ ความเข้มข้น 20 mM	ปริมาณ 50 มิลลิลิตร
ละลาย FeCl ₃ ความเข้มข้น 0.4 mM	
ใน EDTA-NaOH pH 7.5 ความเข้มข้น 4.0 mM	ปริมาณ 50 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียม D7 Micronutrient

ปริมาตร 1 ลิตร

H_3BO_3	ความเข้มข้น 150 mM (ใช้ความร้อนทำละลาย)
MnCl_2	ความเข้มข้น 10 mM
ZnCl_2	ความเข้มข้น 0.8 mM
CuCl_2	ความเข้มข้น 0.3 mM
Na_2MoO_4	ความเข้มข้น 2 mM
NaVO_3	ความเข้มข้น 2 mM (ใช้ความร้อนทำละลาย)
CoCl_2	ความเข้มข้น 0.2 mM





การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant content) ของสาหร่าย

การสกัดสารสกัดหยาบจากสาหร่าย

1. ชั่งสาหร่ายแห้ง จำนวน 5 มิลลิกรัม ลงในหลอด Eppendorf tube จากนั้นเติม สารละลายเมทานอล 95 % ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อ่างน้ำร้อน (water Bath) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ ความเข้มข้นสารสกัดเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ปิเปตส่วนใสของสารสกัดหยาบ ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้ครบ 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ได้แก่ 1,000, 100, 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับนำไปทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

การเตรียมสารมาตรฐาน ascorbic acid สำหรับเป็น positive control

1. ชั่งสารมาตรฐาน L – ascorbic acid (M.W. 176.12 g/mol) หนักประมาณ 0.1 กรัม ละลายใน absolute methanol ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid ที่ระดับความเข้มข้น 5, 25, 50, 100, 200, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ให้ครบ 1 มิลลิลิตร (ตาราง 1)

ตาราง 1 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้น L-ascorbic acid (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลาย L-ascorbic acid (ไมโครลิตร)	Absolute methanol (ไมโครลิตร)
5	0.005 ml หรือ 5 μ l	0.995 ml หรือ 995 μ l
25	0.025 ml หรือ 25 μ l	0.975 ml หรือ 975 μ l
50	0.05 ml หรือ 50 μ l	0.95 ml หรือ 950 μ l
100	0.1 ml หรือ 100 μ l	0.9 ml หรือ 900 μ l
200	0.2 ml หรือ 200 μ l	0.8 ml หรือ 800 μ l
250	0.25 ml หรือ 250 μ l	0.75 ml หรือ 750 μ l
500	0.5 ml หรือ 500 μ l	0.5 ml หรือ 500 μ l
1000	1 ml หรือ 1,000 μ l	0 ml หรือ 0 μ l

การเตรียมสารละลาย DPPH

ตามวิธีของ Li และคณะ (2014) เตรียม DPPH ให้มีความเข้มข้น 0.002 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 100 มิลลิลิตร โดยชั่งน้ำหนัก DPPH 2 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วย absolute methanol แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา (ควรเตรียมทันทีก่อนที่จะใช้) เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ได้ประมาณ 3 วัน

วิธี DPPH free radical scavenging activity

หลักการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยให้สารสกัดตัวอย่างสำหรับทำปฏิกิริยากับสาร DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) เป็นสารอนุมูลอิสระที่มีสีม่วง ซึ่งเมื่อสารอนุมูลอิสระ (DPPH) ทำปฏิกิริยาและได้รับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลอิสระไฮโดรเจนจะเกิดเป็นสารที่มีสีใสหรือสีเหลืองอ่อน

โดยทำการทดสอบตามวิธีการดัดแปลงของ Li และคณะ (2014) คือดูดสารสกัดมา 1.8 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH 0.002 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของสารสกัดสำหรับต่อสาร DPPH เท่ากับ 9 ต่อ 1) นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที และตั้งทิ้งไว้ในที่ปราศจากแสง เป็นระยะเวลา 25 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยมีกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็น positive control และใช้เมทานอลเป็นแบงก์ ใน microplate reader 96-well plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คิดหาเปอร์เซ็นต์การจับอนุมูลอิสระ DPPH (ตามวิธี kunaran และ karunaku 2006)

$$\text{Inhibition of DPPH free radical scavenging activity} = [A_0 - A_1] / A_0 \times 100$$

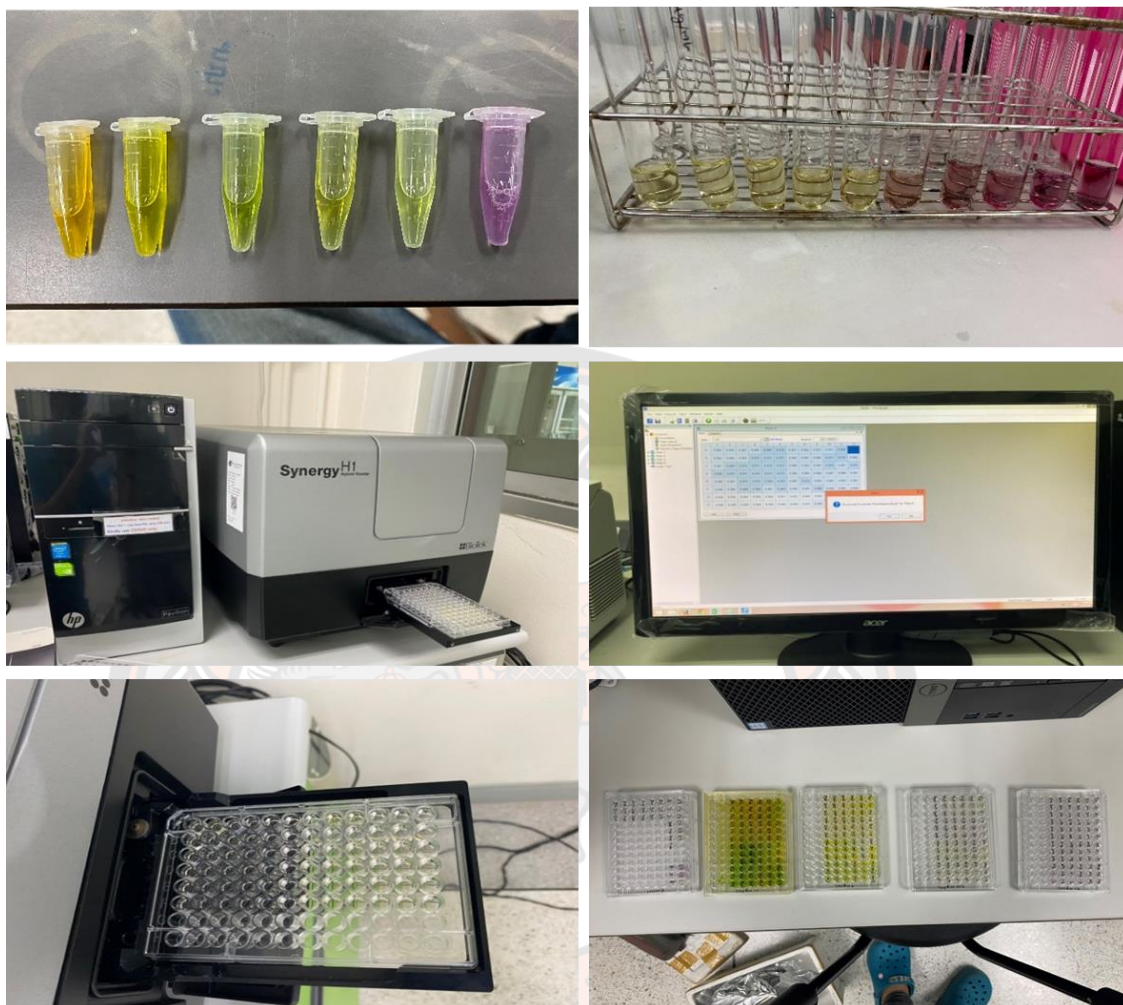
โดยที่ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของแบงก์ (เมทานอล+DPPH)

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (สารสกัดตัวอย่าง + DPPH)



ภาคผนวก ง

ภาพการวิเคราะห์ต่าง ๆ



ภาพ ผผนวก ง การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียว
Dunaliella salina NUAC09

อภิธานศัพท์

คำศัพท์

basic local alignment search tool

national center for biotechnology information

dry weight

gram

liter

microgram

milligram

millimeter

milliliter

nitrogen

phosphorus

polymerase chain reaction

pyruvate

second

ribosomal DNA

อักษรย่อ

BLAST

NCBI

DW

g

L

μ g

Mg

mm

mL

N

P

PCR

py

S

rDNA

