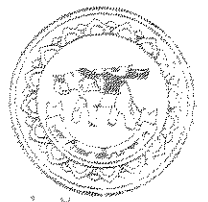


ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ



สำนักหอสมุด



รายงานการวิจัย

การพัฒนาเพิ่มผลผลิตของสารกลูโคซิลกลีเซอรอลในสาหร่ายอาร์throspira (Spirulina) platensis ในภาวะความเป็นเกลือ

Optimisation of Glucosylglycerol Production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* under Salt Stress



หัวหน้าโครงการ ดร.สรารุช สัตยากรวิ
ผู้ร่วมวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา
สังกัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
วันลงทะเบียน 30 ก.ค. 2564
เลขทะเบียน 1040886
เลขเรียกหนังสือ 2

QR
๑๑
๗
๐๔๒
๙๖๕๕
๒๕๖๐

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายได้มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560


กันยายน 2562

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณาจากมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ดำเนินการจัดสรรทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการจากงบประมาณรายได้มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี รวมถึงคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เอื้อเฟื้อพื้นที่ในการดำเนินการวิจัย และสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆ ซึ่งรวมถึง สาธารณูปโภค เครื่องมือวิทยาศาสตร์ วัสดุและอุปกรณ์ ทำให้การดำเนินงานวิจัยเป็นไปอย่างราบรื่นและเรียบร้อย




.....

ดร.สรราช สัตยาควี
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

กลูโคซิลกลีเซอรอล (GG) คือ คาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก สามารถสะสมในเซลล์จุลินทรีย์สำหรับ และพืช เมื่อเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งสารชนิดนี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นหลายประการ เช่น เป็นสารทดแทนความหวานที่ร่างกายดูดซึมไม่ได้ อิ่มน้ำได้ดีและเป็นสารให้ความชุ่มชื้น อีกทั้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จึงมีการทดลองศึกษาการเพิ่มปริมาณของ GG ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิส เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตสารชนิดนี้ในระดับอุตสาหกรรมผ่านการเพาะเลี้ยงสาหร่าย เมื่อทำการศึกษาค้นคว้าที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณ GG โดยมีปัจจัยคือ ความเข้มข้นของเกลือ ปริมาณโซเดียมไบคาร์บอเนต และแสงสีแดง พบว่า สาหร่ายสามารถสะสม GG ได้ดีที่สุดในสภาวะ 0.5M NaCl, 8.4 g/l NaHCO_3 และแสงสีแดง ซึ่งในสภาวะนี้สาหร่ายสะสม GG เท่ากับ 129.80 ± 9.70 g/l เพิ่มขึ้น 1,603.99% เมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม โดยมีน้ำหนักแห้งและปริมาณไกลโคเจนเท่ากับ 2.06 ± 0.09 g/l และ 280.01 ± 26.31 mg/l ตามลำดับ และการสะสมคาร์โบไฮเดรตทั้ง GG และไกลโคเจนเท่ากับ 6.30% และ 13.59% ต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากผลการทดลองสรุปได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่จะเพิ่มปริมาณ GG ในสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิส ซึ่งเป็นสาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมเนื่องจากเป็นสาหร่ายที่เจริญเติบโตง่ายและสามารถเก็บเกี่ยวได้ผ่านการกรอง จะช่วยให้ลดต้นทุนในการผลิต GG สร้างโอกาสในการผลิตและนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

คำสำคัญ

กลูโคซิลกลีเซอรอล, อาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิส, ความเครียดเกลือ, สารออสโมไลต์

Abstract

Glucosylglycerol (GG) is a low molecular weight carbohydrate which can be accumulated in microorganisms, algae and plants under stressed conditions. This compound can be applied in food, pharmaceutical and cosmetic industry as it possesses several properties. For example, it can be used as sweetener with low body absorptivity. It also possesses a good water-holding property and acts as a moisturizing agent. Furthermore, it has an anti-proliferation effect against cancer cells. This leads to a study of an increased GG productivity in cyanobacterium *Arthrospira platensis* to explore the feasibility of producing the compound at large scale through the algal cultivation. The study was conducted to identify the most suitable conditions to cultivate algae regarding salinities, concentrations of sodium bicarbonate and red light. The result showed that the alga could best produce GG when they were cultivated under 0.5M NaCl, 8.4 g/l NaHCO₃ and red-light condition. In this condition, 129.80 ± 9.70 g/l of GG was found in cyanobacterial cells, 1603.99% higher when compared to the control condition. The cell dry weight and the concentration of glycogen were equal to 2.06 ± 0.09 g/l and 280.01 ± 26.31 mg/l, respectively. The carbohydrate accumulation of GG and glycogen were 6.30% และ 13.59% per cell dry weight, respectively. It can be concluded that it is promising to enhance GG production in *Arthrospira platensis* at industrial scale since it can be cultivated easily and only required simple harvesting method of filtration which can help reduce the cost of GG production in order to improving the price competitiveness and seeking opportunity for further application.

Keywords glucosylglycerol, *Arthrospira platensis*, salt stress, osmolytes

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ฉ
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	3
ผลการวิจัย	5
อภิปรายและวิจารณ์ผล	10
สรุปผลการวิจัย	13
ข้อชี้แจงและข้อเสนอแนะ	13
บรรณานุกรม	14



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1: น้ำหนักแห้ง, ปริมาณ glycogen และปริมาณ glucosylglycerol ในสาหร่าย <i>A. platensis</i> ในสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน	10

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1: โครงสร้างของกลูโคซิลกลีเซอรอลที่พบในธรรมชาติ	2
รูปที่ 2: กระบวนการสังเคราะห์กลูโคซิลกลีเซอรอลด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด	2
รูปที่ 3: ลักษณะของสาหร่าย <i>Arthrospira platensis</i> ผ่านกล้องจุลทรรศน์	3
รูปที่ 4: ผลของความเข้มข้นเกลือที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Arthrospira platensis</i> , ปริมาณ glycogen และปริมาณ glucosylglycerol ในระยะเวลา 18 วัน	6
รูปที่ 5: ผลของปริมาณ NaHCO_3 ในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Arthrospira platensis</i> , ปริมาณ glycogen และปริมาณ glucosylglycerol ในระยะเวลา 18 วัน	8
รูปที่ 6: ผลของแสงสีแดงต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Arthrospira platensis</i> , ปริมาณ glycogen และปริมาณ glucosylglycerol ที่เลี้ยงในอาหาร Zarrouk ดัดแปลง ที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.5M NaCl และ 8.4 g/l NaHCO_3 ในระยะเวลา 18 วัน	9

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

A. platensis

GG

GGPS

GGPP

M

nm

PS I

PS II

Arthrospira platensis

glucosylglycerol

glucosylglycerol-phosphate synthase

glucosylglycerol-phosphate phosphatase

molar

nanometer

photosystem I

photosystem II



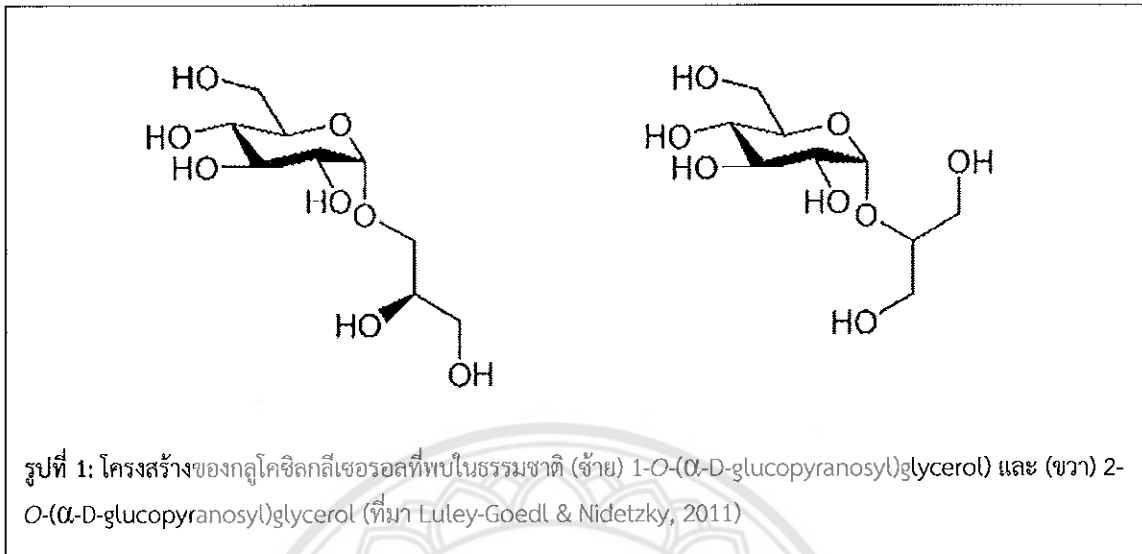
บทนำ

กลูโคซิลกลีเซอรอล คือ คาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง สารชนิดนี้สะสมอยู่ในพืช สำหรับขนาดเล็ก และจุลินทรีย์ ทำหน้าที่ในการควบคุมความดันออสโมติก (osmotic pressure) ซึ่งเป็นผลมาจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการดำรงชีวิต และช่วยให้เซลล์สามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมได้ หนึ่งในสิ่งมีชีวิตที่สามารถสะสมกลูโคซิลกลีเซอรอลได้ก็คือ อาร์โธรสไปรา พลาเทินซิส สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่อาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม ซึ่งรายงานเบื้องต้นระบุว่า สาหร่ายชนิดนี้จะสะสมกลูโคซิลกลีเซอรอลในสภาวะเครียดเกลือ (salt stress) แต่กลไกในการสังเคราะห์และสะสมกลูโคซิลกลีเซอรอลยังมีอยู่จำกัด โดยอาร์โธรสไปรา พลาเทินซิสถือเป็นโมเดลสิ่งมีชีวิตที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาการสะสมกลูโคซิลกลีเซอรอลเนื่องจากเป็นสาหร่ายที่เจริญเติบโตได้รวดเร็ว สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูงจึงลดปัญหาการปนเปื้อนจากสาหร่ายชนิดอื่น และทนความเค็มได้ในระดับปานกลาง พร้อมกันนี้การเก็บเกี่ยวยังทำได้เพียงใช้การกรอง ซึ่งการเก็บเกี่ยวสาหร่ายถือเป็นต้นทุนที่มากที่สุดในการสกัดสารสำคัญจากสาหร่าย ทั้งหมดที่กล่าวมานี้จึงทำให้อาร์โธรสไปรา พลาเทินซิสเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมสำหรับศึกษาการผลิตกลูโคซิลกลีเซอรอล โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อสังเคราะห์กลูโคซิลกลีเซอรอลให้ได้ปริมาณสูงในระดับเซลล์สำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

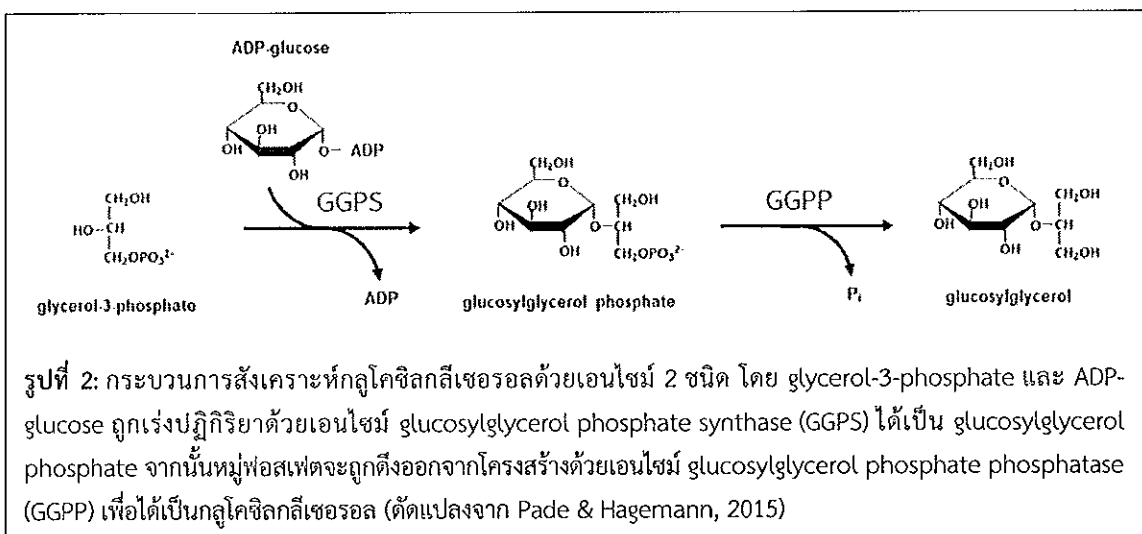
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

กลูโคซิลกลีเซอรอล (Glucosylglycerol, GG) คือ คาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ประกอบด้วย glucose และ glycerol เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) โดยในธรรมชาติสามารถพบได้ 2 รูปแบบ คือ 1-O-(α -D-glucopyranosyl)glycerol และ 2-O-(α -D-glucopyranosyl)glycerol (รูปที่ 1) ซึ่งสารชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มสารไกลโคไซด์ (glycoside) และมีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น กลีเซอรอลกลูโคไซด์ (glycerol glucoside) กลูโคกลีเซอรอล (gluco-glycerol) หรือ กลีเซอริลกลูโคส (glycerylglucose) มีรายงานระบุว่า GG เป็นสารช่วยปกป้องเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิด จากความดันออสโมติกในสภาวะความเครียดเกลือ ซึ่งรวมถึง *Synechocystis* PCC 6803 (Reed & Stewart, 1985) และ *Synechococcus* PCC 7002 (Engelbrecht et al., 1999) อีกทั้งยังพบการสะสมของ GG ในแบคทีเรีย *Pseudomonads* และ *Stenotrophomonas* ภายใต้สภาวะเครียดเกลือ (Mikkat et al., 2000; Roder et al., 2005) และในพืชชั้นสูง *Myrothamnus flabellifolia* และ *Lilium japonicum* เมื่อตกอยู่ในสภาวะขาดน้ำ (Bianchi et al., 1993; Kaneda et al., 1984) GG ได้รับความสนใจในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาจากคุณสมบัติเด่นหลายประการ โดยมีความหวานน้อยกว่าซูโครสเพียงครึ่งหนึ่งแต่แคลอรีต่ำ ซึ่งร่างกายย่อยได้ต่ำ และดูดซึมน้ำได้น้อย (Takenaka & Uchiyama, 2000) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่สามารถพัฒนาเป็นอาหารสุขภาพได้ (Sawangwan, 2015) GG สามารถอุ้มน้ำได้ดีและยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ aquaporin ระบบนำส่งน้ำเข้าออกของเซลล์ในร่างกาย จึงเป็นตัวเลือกที่นิยมนำมาใช้เป็นมอยเจอร์เซอร์และสารให้ความชุ่มชื้น (Schrader et al., 2012) มีผลการวิจัยระบุว่า GG สามารถเพิ่มความยืดหยุ่นของผิวหนังผ่านการสังเคราะห์ IGF-I ในอาสาสมัครเพศหญิง (Harada et al., 2010) นอกจากนี้ GG ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้ง

การทำงานของเซลล์มะเร็ง (Colombo et al., 1999) จึงทำให้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และยา

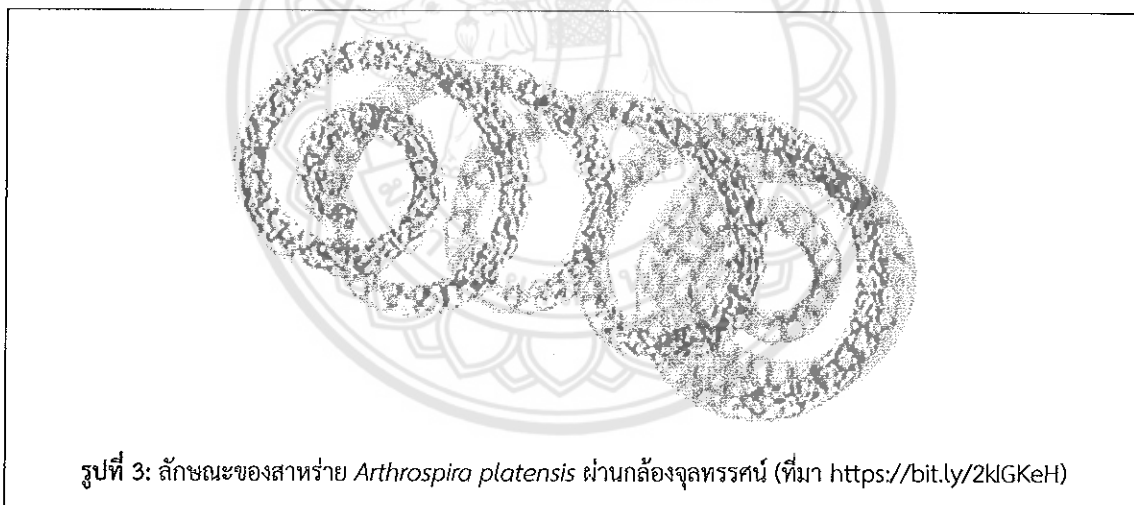


กระบวนการสังเคราะห์ GG ภายในเซลล์เป็นกระบวนการที่มีการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด (รูปที่ 2) โดยสารตั้งต้น ADP-glucose และ glycerol-3-phosphate จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ glucosylglycerol-phosphate synthase (GGPS) และ glucosylglycerol-phosphate phosphatase (GGPP) (Hagemann et al., 2001) การทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดเป็นการทำงานแบบต่อเนื่องเพื่อป้องกันไม่ให้สารตัวกลาง (intermediate) glucosylglycerol-phosphate สะสมในเซลล์เนื่องจากสารตัวกลางชนิดนี้ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ การสังเคราะห์ GG เป็นกระบวนการที่แข่งขันกับการสังเคราะห์ glycogen ซึ่ง Xu และคณะรายงานว่าความผิดปกติของการสังเคราะห์ glycogen ใน *Synechococcus* PCC 7002 ส่งผลให้การสังเคราะห์ GG เพิ่มขึ้น 2 เท่า (Xu et al., 2013) นอกจากนี้แล้ว ยังสามารถสังเคราะห์ GG ผ่านกระบวนการหมักด้วยเอนไซม์ sucrose phosphorylase โดยใช้สารตั้งต้นคือ sucrose และ glycerol โดยเอนไซม์จะทำการย้ายน้ำตาล glucose จากโมเลกุลของ sucrose เพื่อเชื่อมต่อกับ glycerol แต่กรรมวิธีการ



สังเคราะห์นี้จะได้ผลลัพธ์เป็น GG และผลพลอยได้ จึงทำให้ได้ GG ไม่บริสุทธิ์ อีกทั้งประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ยังอยู่ในระดับ (Aerts et al., 2011; Luley-Goedl et al., 2010)

อาร์โธรสไปรา พลาเท็นซิส (*Arthrospira platensis*, *A. platensis*) คือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีการเจริญเติบโตด้วยการสังเคราะห์แสง (รูปที่ 2) และเป็นแหล่งที่มีปริมาณโปรตีนสูงสุดเมื่อเทียบกับน้ำหนักรวม (Aaronson & Dubinsky, 1982) อีกทั้งยังอุดมด้วยสารมูลค่าสูงต่างๆ เช่น เบต้า-แคโรทีน (Wang et al., 2007) ไฟโคไซยานิน (Valderrama et al., 2003) และ แกมมา-ไลโนเลนิก (GLA) (Sajilata et al., 2008) สาหร่ายชนิดนี้สามารถอาศัยอยู่ในค่าความเป็นด่างสูงถึง pH 11 และค่าความเค็มถึง 1.0M NaCl จึงทำให้ประสบปัญหาการปนเปื้อนต่ำในการเลี้ยง อีกทั้งสามารถเก็บเกี่ยวผ่านวิธีการกรองเนื่องจากเป็นสาหร่ายที่มีขนาดเล็กเกินไป ซึ่งเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ ขณะที่มีการรายงานว่า *A. platensis* สามารถสะสม GG เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเค็มสูงขึ้นแม้จะเป็นสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตในน้ำจืด (Warr et al., 1985) แต่รายงานถึงกระบวนการสังเคราะห์ GG ในสาหร่ายชนิดนี้ยังมีอยู่จำกัดเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดอื่น ณ ปัจจุบัน ข้อมูลจีโนมของ *A. platensis* ได้รับการจัดทำจนเสร็จสมบูรณ์แล้ว (Fujisawa et al., 2010) ซึ่งจะช่วยให้การศึกษากระบวนการสังเคราะห์ GG ระดับจีโนมและระดับโปรตีนมีความเป็นไปได้มากยิ่งขึ้น โดยภาวะเครียดเกลือมีความเป็นไปได้ที่จะส่งผลต่อวิถีเมแทบอลิซึมที่มีความเชื่อมโยงกันมากถึง 31 วิถี (Wang et al., 2013) การศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมจะทำให้เข้าใจถึงกระบวนการสังเคราะห์ GG และการควบคุมปริมาณของสารชนิดนี้ในสาหร่าย *A. platensis* เพื่อใช้เป็นโรงงานระดับเซลล์ในการผลิต GG ได้



รูปที่ 3: ลักษณะของสาหร่าย *Arthrospira platensis* ผ่านกล้องจุลทรรศน์ (ที่มา <https://bit.ly/2kIGKeH>)

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่าย *A. platensis*

ทำการเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย *A. platensis* strain TISTR 8217 โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk สูตรดัดแปลง [ต่อ 1,000 ml: 16.80 g NaHCO₃, 2.50 g NaNO₃, 0.50 g K₂HPO₄, 1.00 g K₂SO₄, 0.20 g MgSO₄·7H₂O, 1.00 g NaCl, 0.04 g CaCl₂, 0.01 g FeSO₄·7H₂O, 0.08 g Na₂EDTA·2H₂O, 1 ml A5 และ 1 ml B6; A5 ต่อ 1,000 ml, 2.86 g H₃BO₃, 1.80 g MnCl₂·4H₂O, 0.22 g ZnSO₄·7H₂O, 0.08 g CuSO₄·5H₂O และ 0.018 g MoO₃; B6 ต่อ 1,000 ml, 0.023 g NH₄VO₃, 0.048 g NiSO₄·7H₂O, 0.018 g Na₂WO₄·2H₂O,

0.044 g Co(NO₃)₂·6H₂O) ภายใต้ แสงขาว 12 ชั่วโมง และไร้แสง 12 ชั่วโมง ความเข้มข้นของแสงเท่ากับ 5,000 ลักซ์ (lux) ณ อุณหภูมิห้อง และให้อากาศตลอด 24 ชั่วโมง จนกระทั่งการเจริญเติบโตถึงจุด stationary phase โดยมีการเตรียมหัวเชื้อใหม่เพื่อใช้ในการทดลองอย่างต่อเนื่อง

2. ผลของความเครียดเกลือต่อการสะสม GG ในเซลล์สาหร่าย *A. platensis*

นำหัวเชื้อสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk ที่มีความเข้มข้นเกลือแตกต่างกัน คือ 0.017M (ตัวแปรควบคุม), 0.5M และ 0.75M NaCl ภายใต้ แสงขาว 12 ชั่วโมง และไร้แสง 12 ชั่วโมง ความเข้มข้นของแสงเท่ากับ 5,000 ลักซ์ (lux) ณ อุณหภูมิห้อง โดยให้อากาศตลอด 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายทุก 3 วัน จนกระทั่งการเจริญเติบโตถึงจุด stationary phase โดยแบ่งตัวอย่างเพื่อดำเนินการหาการเจริญเติบโต ปริมาณ GG และปริมาณ glycogen ที่สะสมในเซลล์สาหร่าย

3. ผลของปริมาณ NaHCO₃ ต่อการสะสม GG ในเซลล์สาหร่าย *A. platensis*

นำหัวเชื้อสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk ความเข้มข้นเกลือเท่ากับ 0.5M NaCl ที่มีปริมาณของโบคาร์บอนเนตแตกต่างกัน คือ 16.8 g/l (ตัวแปรควบคุม), 8.4 g/l และ 4.2 g/l NaHCO₃ ภายใต้ แสงขาว 12 ชั่วโมง และไร้แสง 12 ชั่วโมง ความเข้มข้นของแสงเท่ากับ 5,000 ลักซ์ (lux) ณ อุณหภูมิห้อง โดยให้อากาศตลอด 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายทุก 3 วัน จนกระทั่งการเจริญเติบโตถึงจุด stationary phase โดยแบ่งตัวอย่างเพื่อดำเนินการหาการเจริญเติบโต ปริมาณ GG และปริมาณ glycogen ที่สะสมในเซลล์สาหร่าย

4. ผลของแสงสีแดงต่อการสะสม GG ในเซลล์สาหร่าย *A. platensis*

นำหัวเชื้อสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk ความเข้มข้นเกลือเท่ากับ 0.5M NaCl และ 8.4 g/l NaHCO₃ ภายใต้แสงสีต่างกัน คือ แสงขาวความเข้มข้นของแสงเท่ากับ 5,000 ลักซ์ (lux) และแสงสีแดงความยาวคลื่น 630-660 nm ในสภาวะให้แสง 12 ชั่วโมง และไร้แสง 12 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง โดยให้อากาศตลอด 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายทุก 3 วัน จนกระทั่งการเจริญเติบโตถึงจุด stationary phase โดยแบ่งตัวอย่างเพื่อดำเนินการหาการเจริญเติบโต ปริมาณ GG และปริมาณ glycogen ที่สะสมในเซลล์สาหร่าย

5. การวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของสาหร่าย *A. platensis*

เก็บตัวอย่างสาหร่าย *A. platensis* ปริมาตร 5 ml ทุก 3 วัน ทำการล้างเซลล์สาหร่าย โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที กำจัดส่วนสารละลายออกแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 ml พร้อมกับละลายตะกอนเซลล์สาหร่ายแล้วจึงนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อีกครั้ง กำจัดส่วนสารละลายออกแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 ml กำจัดส่วนสารละลายออกแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 ml พร้อมกับละลายตะกอนเซลล์สาหร่ายแล้วจึงนำมากรองผ่านกระดาษกรองด้วยสุญญากาศ เพื่อให้ตะกอนสาหร่ายติดบนกระดาษกรอง จากนั้นจึงนำกระดาษกรองมาอบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการชั่งน้ำหนักกระดาษกรองก่อน-หลังการกรองและคำนวณน้ำหนักของตะกอนสาหร่ายที่ได้

6. การสกัด GG จากเซลล์สาหร่าย *A. platensis*

วิธีการสกัด GG ดัดแปลงมาจาก Nagata และคณะ (1996) นำตัวอย่างสาหร่าย 5 ml มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนสาหร่ายมาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นเติม 80% (v/v) เอทานอล ปริมาตร 2 ml ลงไปในตะกอน นำไปปั่นไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่

อุณหภูมิ 65°C แล้วทำการตกตะกอนสาหร่ายด้วยวิธีปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนสารละลาย ทำการสกัด GG ซ้ำอีกครั้งหนึ่งด้วย 80% (v/v) เอทานอล หลังจากเสร็จสิ้นนำสารละลายทั้ง 2 ส่วนมารวมกัน แล้วจึงระเหยเอทานอลออกจนแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน เติมน้ำบริสุทธิ์ (ultrapure water) ปริมาตร 250 μ l ลงในตะกอนที่เหลืออยู่ จากนั้นนำมากรองผ่านตัวกรอง 0.22 μ m เก็บสารสกัดไว้ ณ อุณหภูมิ -20°C

7. การวิเคราะห์ปริมาณ GG ในสารสกัดสาหร่าย *A. platensis*

วิธีการวิเคราะห์ GG ดัดแปลงมาจาก Takenaka และคณะ (2000) ผสมสารสกัด GG ปริมาตร 50 μ l ใน 20 μ l ของ 100mM acetate buffer pH 5.0 ที่มีเอนไซม์ α -glucosidase 1 unit ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 95°C เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณ glycerol ด้วย glycerol assay kit (Megazyme) โดยดำเนินการตามคู่มือการใช้ที่แนบมาของบริษัท จากนั้นทำการคำนวณปริมาณ GG ด้วยการเทียบ 1 mole glycerol เท่ากับ 1 mole glucosylglycerol

8. การวิเคราะห์ปริมาณ glycogen ในเซลล์สาหร่าย *A. platensis*

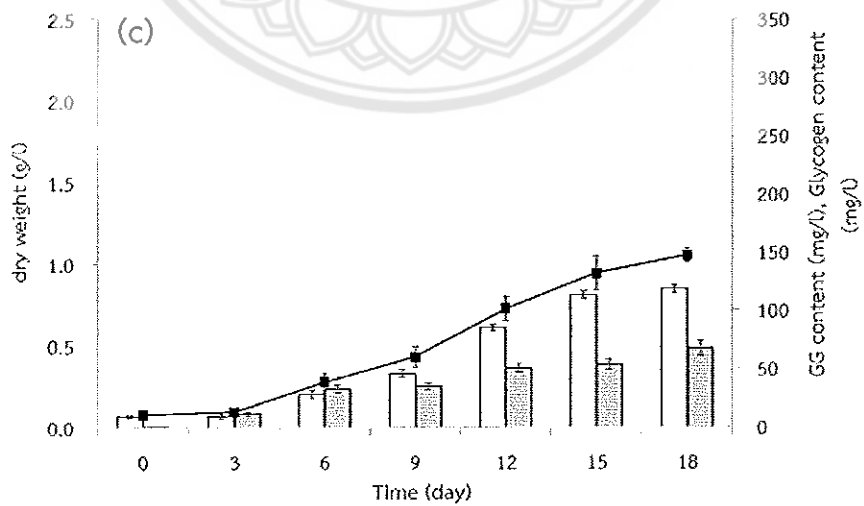
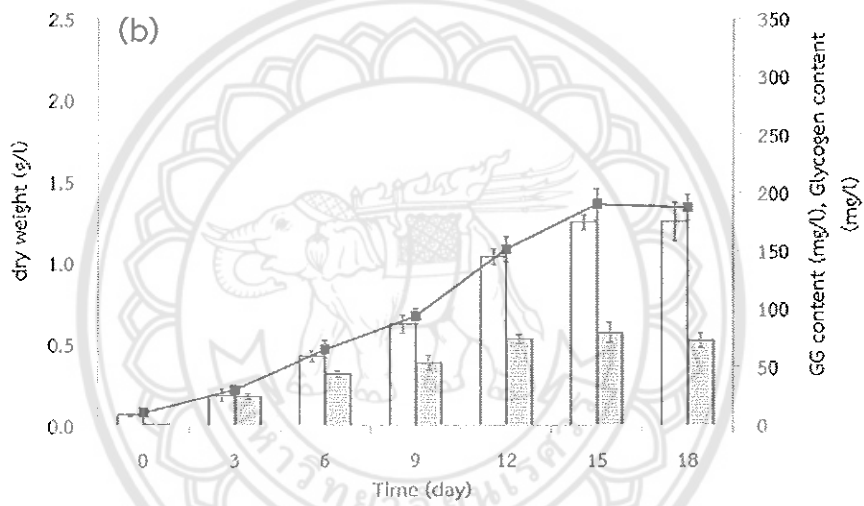
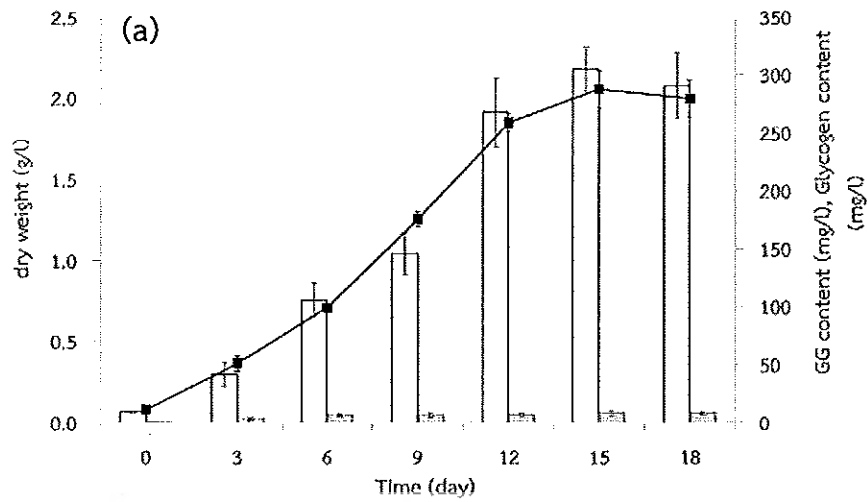
การวิเคราะห์ glycogen ดัดแปลงมาจาก Suzuki และ คณะ (2010) นำตัวอย่างสาหร่าย 5 ml มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนสาหร่ายมาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นจึงละลายตะกอนด้วย absolute methanol ปริมาตร 2 ml นำสารละลายมาบ่มไว้ ณ อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที กำจัดส่วนสารละลาย และระเหยสารละลายที่เหลือด้วยก๊าซไนโตรเจนจนตะกอนแห้ง นำตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 500 μ l และทำการวิเคราะห์ glycogen ด้วย glycogen assay kit (Sigma-Aldrich) โดยดำเนินการตามคู่มือการใช้ที่แนบมาของบริษัท

ผลการวิจัย

ผลของ NaCl ต่อการเจริญเติบโต, ปริมาณ glycogen และปริมาณ GG ของสาหร่าย *A. platensis*

การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *A. platensis* ในอาหารเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของ NaCl แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 18 วัน (รูปที่ 3) พบว่า สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 0.017M NaCl และการเจริญเติบโตมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นเป็น 0.5M NaCl และ 0.75M NaCl โดยการเจริญเติบโตของสาหร่ายเท่ากับ 1.99 ± 0.11 g/l ในอาหารเลี้ยงที่มีความเข้มข้น 0.017M NaCl ขณะที่การเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารที่มีความเข้มข้น 0.5M NaCl และ 0.75M NaCl เท่ากับ 1.34 ± 0.08 g/l และ 1.051 ± 0.04 g/l ตามลำดับ โดยแต่ละสภาวะ (0.017M, 0.5M, 0.75M NaCl) มีค่า doubling time เท่ากับ 3.84 วัน, 4.38 วัน และ 4.78 วัน ตามลำดับ

การสะสมคาร์โบไฮเดรต glycogen ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำรองของสาหร่าย *A. platensis* ลดลงเมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น โดยปริมาณ glycogen ของสาหร่ายใน 0.017M NaCl เท่ากับ 290.28 ± 28.50 mg/l ซึ่งมีอัตราส่วนเป็น 14.57% ต่อน้ำหนักแห้ง ขณะที่ปริมาณ glycogen ของสาหร่ายที่ความเข้มข้นเกลือ 0.5M NaCl และ 0.75M NaCl เท่ากับ 175.01 ± 16.44 mg/l และ $118.10 \pm$



รูปที่ 4: ผลของความเข้มข้นเกลือที่ต่างกันต่อ (—■) การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Arthrospira platensis*, (□) ปริมาณ glycogen และ (▨) ปริมาณ glucosylglycerol ในระยะเวลา 18 วัน ที่เลี้ยงในอาหาร Zarrouk ดัดแปลง ความเข้มข้น (a) 0.017M NaCl, (b) 0.5M NaCl และ (c) 0.75M NaCl ข้อมูลที่ได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

3.60 mg/l ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบเป็นอัตราส่วนต่อน้ำหนักแห้งพบว่า glycogen มีการสะสมในเซลล์ลดลง โดยมีอัตราส่วนเท่ากับ 13.06% และ 11.25% ในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.5M NaCl และ 0.75M NaCl ตามลำดับ

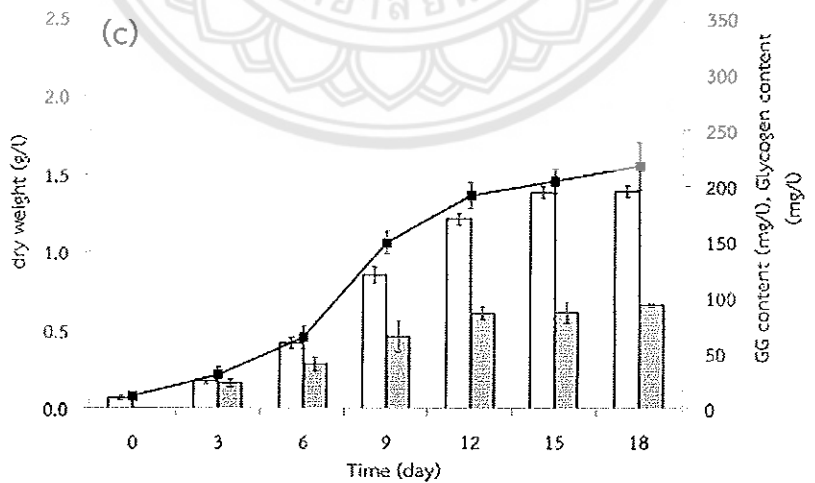
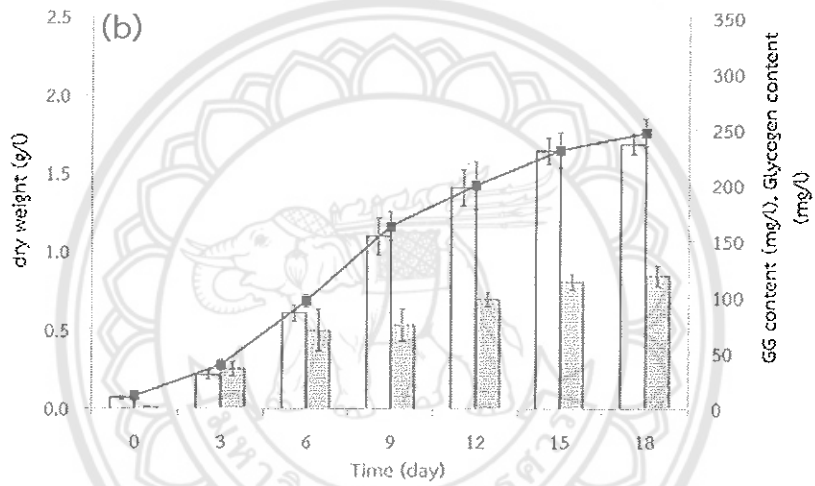
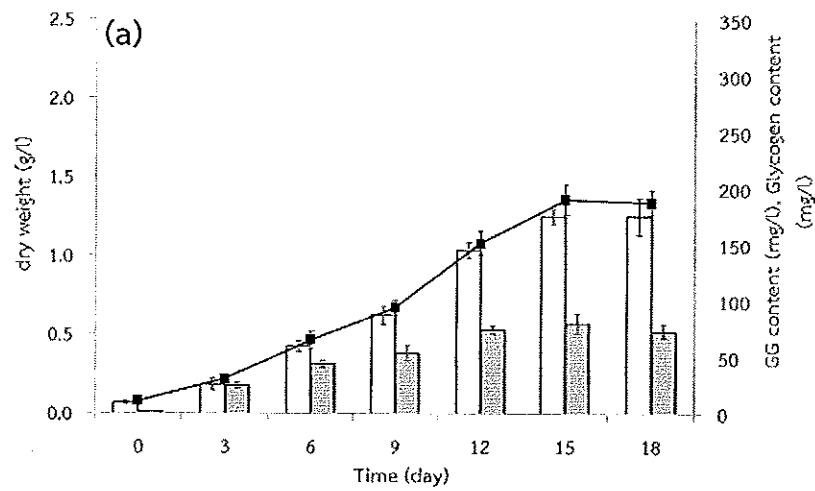
การสะสม GG ในเซลล์สาหร่าย *A. platensis* เป็นไปในทิศทางตรงกันข้ามกับการสะสม glycogen โดยในสถานะที่ไม่มีความเครียดเกลือ (0.017M NaCl) สาหร่ายสะสม GG ในปริมาณเพียง 8.03 ± 1.13 mg/l หรือเทียบเท่ากับ 0.40% ต่อน้ำหนักแห้ง แต่เมื่ออยู่ในสถานะเครียดเกลือจากปริมาณความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นพบว่าสาหร่ายสะสม GG เท่ากับ 72.84 ± 5.68 mg/l ใน 0.5M NaCl และ 67.20 ± 6.43 mg/l ใน 0.75M NaCl หรือเทียบเท่ากับอัตราส่วน 5.44% และ 6.40% ต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

ผลของ NaHCO_3 ต่อการเจริญเติบโต, ปริมาณ glycogen และปริมาณ GG ของสาหร่าย *A. platensis*

หลังจากการศึกษาผลของความเค็มในอาหารเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการสะสมคาร์โบไฮเดรต glycogen และ GG จึงสามารถระบุว่า ความเข้มข้น 0.5M NaCl สาหร่าย *A. platensis* สามารถสะสม GG ได้สูงกว่าระดับความเค็มที่ 0.017M NaCl และ 0.75M NaCl จึงดำเนินการวิจัยต่อไปถึงผลกระทบของ NaHCO_3 ซึ่งเป็นหนึ่งในธาตุอาหารหลักของสาหร่ายชนิดนี้ต่อการสะสมคาร์โบไฮเดรต โดยให้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ 0.5M NaCl และ 16.8 g/l NaHCO_3 เป็นชุดควบคุม ซึ่งคงสภาวะความเค็มที่ 0.5M NaCl และทำการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ NaHCO_3 จากผลการทดลองระบุว่า การลดปริมาณของ NaHCO_3 ในอาหารสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ (รูปที่ 4) ที่ความเข้มข้น 8.4 g/l NaHCO_3 สาหร่ายมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.76 ± 0.09 g/l ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นถึง 31.34% เทียบกับน้ำหนักแห้งของชุดควบคุม (1.34 ± 0.08 g/l) แต่การลดปริมาณของ NaHCO_3 ในอาหารเลี้ยงมาที่ 4.2 g/l แม้จะมีการเจริญเติบโตสูงกว่าชุดควบคุม แต่ต่ำกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงใน 8.4 g/l NaHCO_3 โดยในสภาวะนี้สาหร่ายมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.56 ± 0.15 g/l หรือเป็นอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น 16.42% เทียบกับชุดควบคุม โดยแต่ละสภาวะ (16.8 g/l, 8.4 g/l, 4.2 g/l NaHCO_3) มีค่า doubling time เท่ากับ 4.38 วัน, 3.99 วัน, และ 4.16 วัน ตามลำดับ

การสะสม glycogen สอดคล้องกับผลของการเจริญเติบโต กล่าวคือ ที่ความเข้มข้น 8.4 g/l NaHCO_3 สาหร่ายสะสม glycogen อยู่ที่ $236.46.10 \pm 9.02$ mg/l แต่ที่ความเข้มข้น 4.2 g/l NaHCO_3 สาหร่ายสะสม glycogen ในเซลล์ได้ต่ำกว่า อยู่ที่ระดับ 195.21 ± 5.01 mg/l หรือเป็นอัตราการเพิ่มขึ้นเท่ากับ 35.11% และ 11.54% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า อัตราการสะสม glycogen ต่อน้ำหนักแห้งเปลี่ยนแปลงไปเมื่อลดปริมาณของ NaHCO_3 ในอาหารเลี้ยง ปริมาณ glycogen ในเซลล์สาหร่ายที่ 8.4 g/l NaHCO_3 และ 4.2 g/l NaHCO_3 เท่ากับ 13.44% และ 12.51% ต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปริมาณ glycogen เท่ากับ 13.06% ต่อน้ำหนักแห้ง ในชุดควบคุม

เช่นเดียวกัน ปริมาณ GG มีการเพิ่มขึ้นเมื่อลด NaHCO_3 ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายลง สาหร่ายที่เลี้ยงใน 8.4 g/l NaHCO_3 มีการสะสม GG ในเซลล์สูงถึง 118.49 ± 8.84 mg/l ขณะที่สาหร่ายในอาหารที่มีความเข้มข้น 4.2 g/l NaHCO_3 สะสม GG ในเซลล์เท่ากับ 93.19 ± 1.58 mg/l โดยเป็นปริมาณที่สูงกว่าชุดควบคุม (72.84 ± 5.68 mg/l) ถึง 62.67% และ 27.94% ตามลำดับ อีกทั้งอัตราส่วน GG ต่อน้ำหนักแห้งก็เพิ่มขึ้น ทั้ง 2 สภาวะเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในอาหารเลี้ยง 8.4 g/l NaHCO_3 และ 4.2 g/l NaHCO_3 มีอัตราส่วนของ GG เท่ากับ 6.73% และ 5.97% ต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สูงกว่าชุดควบคุมซึ่งมีอัตราส่วนของ GG ต่อน้ำหนักแห้ง เท่ากับ 5.44%

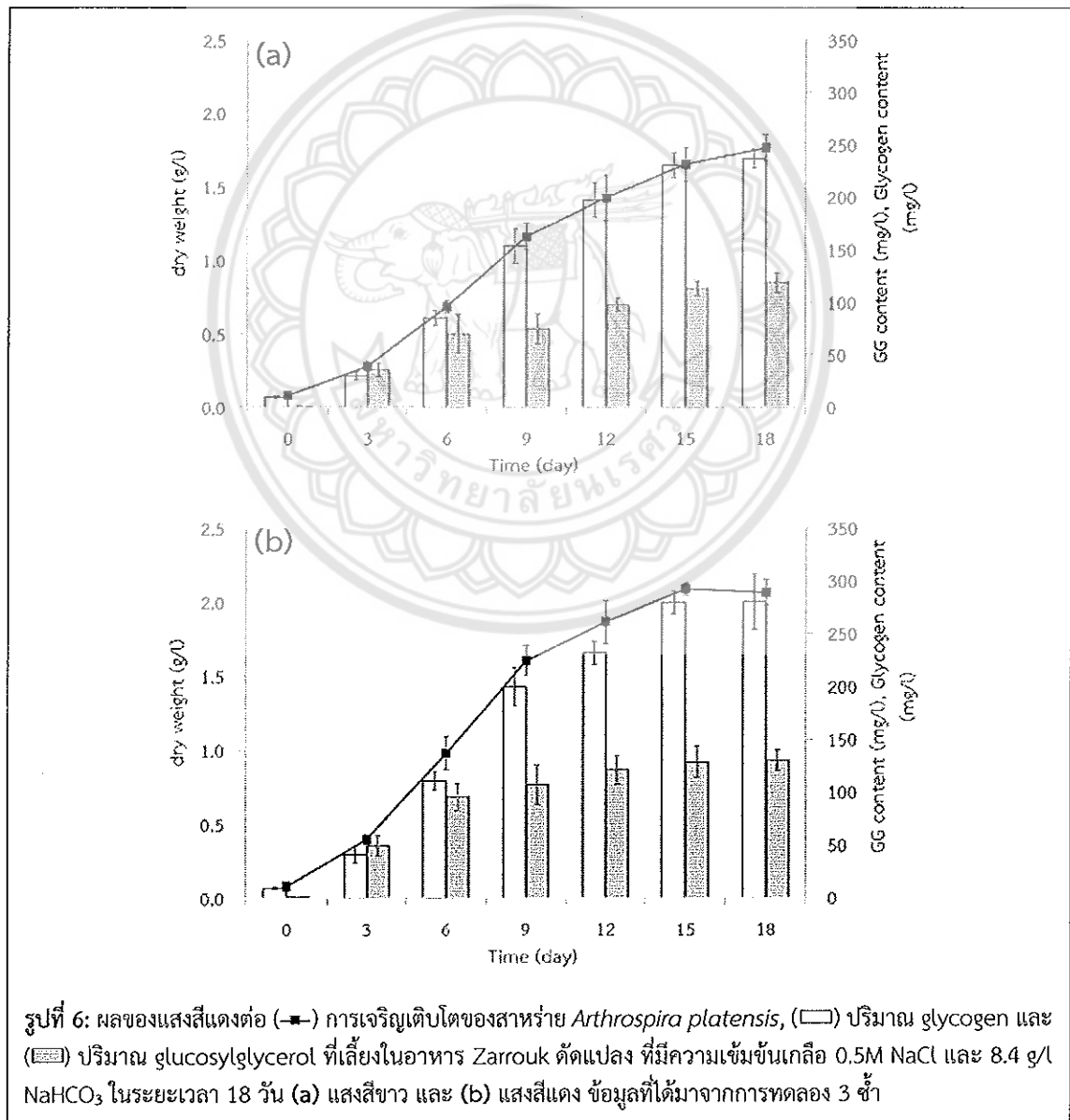


รูปที่ 5: ผลของปริมาณ NaHCO_3 ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.5M NaCl ต่อ (—■—) การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Arthrospira platensis*, (□) ปริมาณ glycogen และ (▤) ปริมาณ glucosylglycerol ในระยะเวลา 18 วัน ที่เลี้ยงในอาหาร Zarrouk ดัดแปลงความเข้มข้น (a) 16.8 g/l NaHCO_3 , (b) 8.4 g/l NaHCO_3 และ (c) 4.2 g/l NaHCO_3 ข้อมูลที่ได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลของแสงสีแดงต่อการเจริญเติบโต, ปริมาณ glycogen และปริมาณ GG ของสาหร่าย *A. platensis*

การศึกษาผลของแสงสีแดงต่อการสะสม GG ในสาหร่าย *A. platensis* เริ่มต้นโดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.5M NaCl และ 8.4 g/l NaHCO₃ และเปรียบเทียบระหว่างแสงสีขาว (ตัวควบคุม) และแสงสีแดง เป็นระยะเวลา 18 วัน (รูปที่ 5) ซึ่งพบว่า สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีแดง มีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นจาก 1.76 ± 0.09 g/l เป็น 2.06 ± 0.09 g/l หรือเพิ่มขึ้น 17.05% เทียบกับสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้แสงสีขาว และมีค่า doubling time เท่ากับ 3.80 วัน เทียบกับ 3.99 วัน

เช่นเดียวกัน ปริมาณของ glycogen ในเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้นตามอัตราการเจริญเติบโตที่สูงขึ้น โดย glycogen ในสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้แสงสีแดงเท่ากับ 280.01 ± 26.31 mg/l เทียบกับ glycogen 236.46 ± 9.02 mg/l ในสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้แสงขาว ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นของ glycogen เท่ากับ 18.42% ขณะที่อัตราส่วน





glycogen ต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายภายใต้แสงสีแดงเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับสาหร่ายภายใต้แสงสีขาวจาก 13.44% เป็น 13.59%

ในทางตรงกันข้าม เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ GG ในเซลล์สาหร่าย พบว่าอัตราส่วนของ GG ต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายภายใต้แสงสีแดงลดลงเมื่อเทียบกับสาหร่ายภายใต้แสงสีขาวจาก 6.40% เป็น 6.30% แต่เมื่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายเพิ่มขึ้นภายใต้แสงสีแดง จึงทำให้ปริมาณ GG ในสาหร่ายภายใต้แสงสีแดงยังคงสูงกว่าในสาหร่ายภายใต้แสงสีขาว ปริมาณ GG ในสาหร่ายภายใต้แสงสีขาวและภายใต้แสงสีแดงเท่ากับ 118.49 ± 8.84 mg/l และ 129.80 ± 9.70 mg/l ตามลำดับ ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นของ GG เท่ากับ 9.54%

ตารางที่ 1: น้ำหนักแห้ง, ปริมาณ glycogen และปริมาณ glucosylglycerol ในสาหร่าย *A. platensis* ในสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน

Condition	Dry weight (g/l)	Glycogen		Glucosylglycerol	
		mass (mg/l)	content (%dw)	mass (mg/l)	content (%dw)
0.017M NaCl, 16.8g NaHCO ₃ , white	1.99 ± 0.11	290.28 ± 28.50	14.57 ± 0.63	8.03 ± 1.13	0.40 ± 0.03
0.5M NaCl, 16.8g NaHCO ₃ , white	1.34 ± 0.08	175.01 ± 16.44	13.06 ± 0.45	72.84 ± 5.68	5.44 ± 0.10
0.75M NaCl, 16.8g NaHCO ₃ , white	1.05 ± 0.04	118.10 ± 3.60	11.25 ± 0.08	67.20 ± 6.43	6.40 ± 0.37
0.5M NaCl, 8.4g NaHCO ₃ , white	1.76 ± 0.09	236.46 ± 9.02	13.44 ± 0.17	118.49 ± 8.84	6.73 ± 0.16
0.5M NaCl, 4.2g NaHCO ₃ , white	1.56 ± 0.15	195.21 ± 5.01	12.51 ± 0.89	93.19 ± 1.58	5.97 ± 0.48
0.5M NaCl, 8.4g NaHCO ₃ , red	2.06 ± 0.09	280.01 ± 26.31	13.59 ± 0.68	129.80 ± 9.70	6.30 ± 0.20

อภิปรายและวิจารณ์ผล

เมื่อนำสาหร่าย *A. platensis* มาเลี้ยงในความเข้มข้นเกลือที่เพิ่มขึ้น จาก 0.017M NaCl เป็น 0.5M NaCl และ 0.75 M NaCl ทำให้สาหร่ายเกิดความเครียดเกลือ (salt stress) และหยุดการเจริญเติบโตในระยะแรกของการเลี้ยง แต่เมื่อปรับตัวได้สาหร่ายก็สามารถเจริญเติบโตในอาหารดังกล่าว อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำหนักแห้งจะน้อยกว่าชุดควบคุม (0.017M NaCl) เนื่องจากมีอัตราการเติบโต (growth rate) ที่ต่ำกว่า แต่หากสาหร่ายเจริญเติบโตไม่ได้จะมีสีที่เปลี่ยนไปและน้ำหนักแห้งของสาหร่ายจะลดลง (จากผลการทดลองเบื้องต้นในอาหารเลี้ยงที่มีความเข้มข้นเกลือ 1M NaCl ซึ่งมีการชี้แจงไว้ในหัวข้อ “สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ”) การลดลงของอัตราการเติบโตของสาหร่ายเมื่อเลี้ยงในความเข้มข้นเกลือที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Vonshak และคณะ (1988), Zeng และ Vonshak (1998) และ Shalaby และ Shanab (2010) ในสาหร่าย *A. platensis* สายพันธุ์อื่น ขณะที่ผลของเกลือต่อการเจริญเติบโตก็เป็นไปในทิศทางเดียวกันเมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่น ไม่ว่าจะเป็น *Anacystis nidulans* (Vonshak & Richmond, 1981), *Nostoc muscorum* (Blumwald & Tel-Or, 1982), *Scenedesmus opoliensis* (Fodorpataki & Bartha,

2004) หรือ *Chlorella vulgaris* (Abdel-Rahman et al., 2005) ซึ่งการลดลงของอัตราการเจริญเติบโตในสาหร่ายมีสาเหตุมาจากการลดลงของกิจกรรมการสังเคราะห์แสง ภายใต้สภาวะเครียดเกลือเมแทบอลิซึมของสาหร่ายจะจำกัดการใช้พลังงานในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ โดยสังเกตจากการลดลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงผ่านการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE electrophoresis ทำให้ปริมาณของคลอโรฟิลล์ลดลง ขณะที่รงควัตถุอื่นที่สนับสนุนการสังเคราะห์แสง เช่น phycoyanin และ phycoerythrin มีปริมาณสูงขึ้น (Shalaby & Shanab, 2010) ถึงแม้ว่าสาหร่ายจะสามารถปรับสภาพให้อยู่รอดในความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นได้หลังจากนั้น แต่อัตราการสังเคราะห์แสงจะต่ำกว่าในสภาวะที่ไม่มีความเครียดเกลือ (Sudhir et al., 2005; Vonshak & Richmond, 1981) นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายจะมีอัตราการหายใจ (respiration) สูงในสภาวะเครียดเกลือ เนื่องจากการปรับตัวให้อยู่รอดจำเป็นต้องใช้พลังงานสูงขึ้นเพื่อเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ส่งผลให้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสำรอง (glycogen) ในระดับต่ำกว่าสภาวะที่ไม่มีความเครียดเกลือ (Fry et al., 1986; Jeanjean et al., 1993; Zeng & Vonshak, 1998)

การเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในสภาวะเครียดเกลือเพื่อความอยู่รอด เริ่มต้นจากการที่สาหร่ายเพิ่มการดูดซึม CO_2 และสลายแหล่งคาร์โบไฮเดรตสำรอง เพื่อเปลี่ยนเป็นสาร osmolytes (หรือ compatible solutes) ผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งสารกลุ่มนี้เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดเล็กทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากความดันออสโมติก ยกตัวอย่างเช่น ในกรณีของ *Dunaliella* สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่เปลี่ยน starch เป็น glycerol เพื่อปกป้องเซลล์จากการเพิ่มขึ้นของเกลือในสิ่งแวดล้อมรอบข้าง (Liska et al., 2004) ขณะที่กลุ่มของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน glycogen ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนสำรองและถูกใช้สำหรับการสังเคราะห์สาร osmolytes ชนิดต่างๆ (Erdmann et al., 1989; Kerby et al., 1990; Warr et al., 1985) ใน *A. platensis* จะมีการสังเคราะห์สาร osmolyte อย่างเช่น GG จาก glycogen เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียดเกลือ (Tel-Or et al., 1986) แต่จากการที่อัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายลดลงในเมื่ออยู่ในความเข้มข้นเกลือที่เพิ่มขึ้น จึงทำให้การสังเคราะห์ glycogen ลดลง ส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์สาร osmolytes ลดลง จนท้ายที่สุดการเจริญเติบโตของสาหร่ายจึงต่ำลง เหตุการณ์นี้สามารถยืนยันได้จากงานวิจัยของ Suzuki และคณะ (2010) ที่เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechococcus elongatus* PCC 7942 ประเภท wild type และ mutant ที่ขาดเอนไซม์ในการสังเคราะห์ glycogen ในสภาวะเครียดเกลือ โดยพบว่า mutant มีการเจริญเติบโตต่ำ และมีการสะสม sucrose ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตในกลุ่ม osmolytes ของสาหร่ายชนิดนี้ต่ำกว่าใน wild type จากการขาด glycogen นอกจากนี้ยังพบว่า รงควัตถุที่ช่วยในการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น เนื่องจากจำเป็นต้องทำการสังเคราะห์ sucrose โดยตรงจาก CO_2 ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนแทน glycogen ด้วยเหตุนี้การได้รับ CO_2 ในรูปแบบละลายน้ำสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์สาร osmolytes ได้ โดย CO_2 เมื่อละลายน้ำจะอยู่ในรูปของ HCO_3^- ดังนั้นการเติม NaHCO_3 จึงสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของสาหร่ายในสภาวะเครียดเกลือ จากรายงานของ Liu และคณะ (2019) ระบุว่าสาหร่าย microalga SAE1 มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นในสภาวะเครียดเกลือเมื่อปริมาณ NaHCO_3 เพิ่มขึ้น และมีการสะสม starch แหล่งคาร์โบไฮเดรตสำรองในเซลล์เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้าม *A. platensis* ในงานวิจัยนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นเมื่อลดปริมาณ NaHCO_3 ลง เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเพราะสาหร่ายสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองสามารถทนต่อปริมาณ NaHCO_3 อยู่ในระดับต่ำเช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานในสาหร่ายสายพันธุ์อื่น (Li et al., 2018; Ogbonda et al., 2007) ขณะที่การสะสมคาร์โบไฮเดรตสำรอง (glycogen ในกรณีของ *A. platensis*) เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับสาหร่าย microalga SAE1 การลดปริมาณ NaHCO_3 ในสูตรอาหาร Zarrouk จาก 16.8 g/L เป็น 8.4 g/L ส่งผลให้สาหร่าย *A. platensis* มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น แต่การลดลงของ NaHCO_3 จาก 8.4 g/L เป็น 4.2 g/L กลับทำให้อัตราการเจริญเติบโตต่ำลง ซึ่งรวมถึง

ปริมาณ glycogen และ GG ก็ต่ำลงเช่นกัน อัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นของสาหร่าย *A. platensis* จากการลดลงของ NaHCO_3 น่าจะมาจากที่ปริมาณของ NaHCO_3 ในอาหาร Zarrouk อยู่ในจุดอิ่มตัว และเกินความจำเป็นที่สาหร่ายต้องการ แต่การลดลงของ NaHCO_3 ไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่จะทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น การลดปริมาณ NaNO_3 ในอาหารเลี้ยงก็ยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเช่นกัน (Castro et al., 2015) ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในครั้งต่อไป

แม้การลดลงของปริมาณ glycogen ต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่าย จะมาควบคู่กับการเพิ่มขึ้นของ GG ภายในเซลล์สาหร่ายในสภาวะเครียดเกลือ แต่สัดส่วนของ glycogen ที่ลดลงกลับไม่สอดคล้องกับ GG ที่เพิ่มขึ้น จากผลการทดลอง (ตารางที่ 1) พบว่า ที่สภาวะการเลี้ยง 0.017M NaCl, 16.8 g/l NaHCO_3 และแสงสีขาว อัตราส่วนของ glycogen ภายในเซลล์เท่ากับ 14.57% ต่อน้ำหนักแห้ง ขณะที่ปริมาณ GG เท่ากับ 0.40% ต่อน้ำหนักแห้ง แต่เมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ 0.5M NaCl, 16.8 g/l NaHCO_3 และแสงสีขาว glycogen ลดลงมาอยู่ที่ 13.06% ต่อน้ำหนักแห้ง แต่ GG กลับเพิ่มขึ้นมาเท่ากับ 5.44% ต่อน้ำหนักแห้ง ดังนั้น glycogen อาจจะไม่ใช่แหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์ GG เพียงอย่างเดียว HCO_3^- ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงสามารถเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับการสังเคราะห์ GG เช่นกัน นอกจากนี้สารอาหารที่ได้จากการตายลงของเซลล์สาหร่ายยังมีส่วนช่วยให้สาหร่ายลดการสลาย glycogen ได้อีกทางหนึ่ง (Martinez-Garcia & van der Maarel, 2016) ขณะที่การให้แสงสีแดงในการเพาะเลี้ยงช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่ายรวมถึงการสะสมคาร์โบไฮเดรต ไม่ว่าจะเป็น glycogen หรือ GG ภายในเซลล์ โดยทั่วไปคลอโรฟิลล์ประกอบด้วย photosystem I (PSI) และ photosystem II (PSII) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสง ซึ่ง PSI สามารถดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรดได้ดี ขณะที่ PSII สามารถดูดกลืนแสงในช่วงแสงสีแดง ซึ่งอัตราส่วนแสงสีแดงต่อแสงอินฟราเรด (R:IR) เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายและพืช ขณะที่อัตราส่วนของแสงสีแดงต่อแสงอินฟราเรด (R:IR) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของพืชอย่างมีนัยสำคัญ อัตราส่วนนี้จะต่ำ (0.6-0.8) ในช่วงเช้าตรู่และพลบค่ำ และสูงสุด (1.0-1.3) ในช่วงเที่ยงของวัน (Hertel et al., 2011; Holmes & Smith, 1977) ดังนั้นการทำงานของ PSI และ PSII จึงผันแปรตามปริมาณแสงระหว่างวัน ซึ่งปกติแล้ว PSII สามารถดูดกลืนแสงในช่วง 655-665 nm และคายพลังงานแสงออกในช่วงความยาวคลื่น 725-735 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ PSI ดูดกลืนได้ ในสภาวะที่สาหร่ายมีความเครียดต่ำการสังเคราะห์แสงเกิดขึ้นระหว่าง 580-680 nm แต่เมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นได้ดีในช่วงความยาวคลื่น 680-720 nm (Canaani, 1990) ซึ่งน่าจะมีสาเหตุความเสียหายของ PSII จากรายงานของ Lu และ Vonshak (2002) ก็ได้ระบุไว้ว่า PSII สูญเสียคุณสมบัติในการถ่ายโอนอิเล็กตรอน และกระตุ้นการทำงานของ PSI เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ได้ให้ข้อมูลเพิ่มเติมว่า การทำให้สาหร่ายเกิดความเครียดจะส่งผลให้ปริมาณของ phycocyanin ลดลง แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์คงที่ ซึ่งตรงกันข้ามกับงานวิจัยของ Shalaby และ Shanab (2010) ที่รายงานว่า ความเครียดเกลือส่งผลให้ปริมาณของคลอโรฟิลล์ลดลง แต่ phycocyanin และ phycoerythrin มีปริมาณสูงขึ้น โดย phycocyanin เป็นรงควัตถุที่ช่วยในการดูดกลืนแสงให้กับคลอโรฟิลล์ภายในเซลล์สาหร่าย อีกทั้งปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเพิ่มสูงขึ้นในสภาวะเครียดเกลือนี้ Rakhimberdieva และคณะ (2001) ได้มีการรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่าง PSI, PSII และ phycocyanin ว่ามีเพียง 20% ของรงควัตถุทั้งหมดมีหน้าที่ดูดกลืนแสงให้กับ PSII แต่ 80% ที่เหลือทำหน้าที่สนับสนุนการสังเคราะห์แสงผ่าน PSI และมีนำผลการทดลองของโครงการวิจัยนี้มาพิจารณาประกอบ จึงมีความเป็นไปได้คือ เมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะเครียดเกลือ PSI จะทำงานได้ดีกว่า PSII และสามารถดูดกลืนแสงผ่านการช่วยเหลือของรงควัตถุ phycocyanin ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อตกอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการ

เจริญเติบโตเช่นนี้ เมื่อ phycoerythrin ส่วนใหญ่ (80%) สามารถทำงานได้ก็สามารถส่งเสริมให้ PSI ทำงานได้ในสภาวะเครียดเกลือภายใต้แสงสีแดง และกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่ายในท้ายที่สุด

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *A. platensis* ต่อการผลิต GG ภายในเซลล์ พบว่า เมื่อนำสาหร่ายมาเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.5M NaCl เกลือไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) 8.4 g/L ภายใต้แสงสีแดงความยาวคลื่น 630-660 nm สาหร่ายสามารถผลิต GG ได้ในปริมาณ 129.80 ± 9.70 mg/L เป็นอัตราส่วน 6.30 ± 0.20 % ต่อน้ำหนักแห้ง ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้น 1,063.99% เมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม ที่มีปริมาณ GG เท่ากับ 8.03 ± 1.13 mg/L ในอาหารเลี้ยงที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.017M NaCl (1 g/L NaCl ในอาหาร Zarrouk) เกลือไบคาร์บอเนต 16.8 g/L ภายใต้แสงขาว

ข้อชี้แจงและเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้มีการปรับเปลี่ยนวิธีดำเนินการวิจัยในหลายขั้นตอนเนื่องจากข้อจำกัดของงบประมาณในการวิจัยและกระบวนการบางอย่างที่ไม่สอดคล้องกับสมมติฐาน โดยมีข้อปรับเปลี่ยนดังนี้

1. มีการปรับเปลี่ยนการเลี้ยงสาหร่ายจากเดิมที่ 0M, 0.5M และ 1.0M NaCl เป็น 0.017M, 0.5M และ 0.75M NaCl เนื่องจากสูตรอาหารเริ่มต้นมีปริมาณ 1 g/L NaCl อยู่แล้ว จึงเทียบเท่ากับ 0.017M NaCl และหลังจากดำเนินการพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน 1M NaCl เช่นที่เคยมีรายงานไว้ในสาหร่ายสายพันธุ์อื่น จึงทำการลดปริมาณความเข้มข้นเกลือลงอยู่ที่ระดับ 0.75M NaCl เพื่อทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงให้ครบ 3 ความเข้มข้นเกลือ

2. มีการปรับเปลี่ยนการเลี้ยงสาหร่ายในปริมาณ NaHCO_3 ที่แตกต่างกันในแต่ละความเข้มข้นเกลือที่ 0M, 0.5M และ 1.0M NaCl แต่จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าเกลือที่ 0M NaCl (0.017M NaCl หลังปรับแก้) ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณ GG ในเซลล์สาหร่าย และสาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่มีความเข้มข้น 1.0M NaCl ดังนั้นจึงมีการดำเนินการศึกษาผลของ NaHCO_3 ต่อการสะสม GG ในเซลล์ เพียงความเข้มข้นเกลือที่ 0.5M NaCl เท่านั้น

3. มีการปรับเปลี่ยนการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้แสงสีแดงเทียบกับแสงขาวในแต่ละความเข้มข้นเกลือที่ 0M, 0.5M และ 1.0M NaCl ซึ่งเหตุผลเช่นเดียวกับข้อ 2.

4. ไม่มีการดำเนินการศึกษาผลของอากาศต่อการสะสม GG ภายในเซลล์สาหร่าย เนื่องจากวิธีดำเนินการวิจัยที่เสนอไปไม่สอดคล้องกับสมมติฐาน

5. เปลี่ยนแปลงการวิเคราะห์ GG จากการใช้เทคนิค HPLC เป็นวิธี colorimetric assay เนื่องจากไม่มีคอลัมน์เจาะจงในการแยก GG

6. ไม่มีการดำเนินการศึกษาด้าน proteomics และ real time PCR เนื่องจากงบประมาณไม่เพียงพอ

นอกจากนี้มีการเปลี่ยนแปลงตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการวิจัย จากการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มีค่า Impact Factor เป็นการขอยื่นจดอนุสิทธิบัตร ซึ่งได้ดำเนินการยื่นขอจดอนุสิทธิบัตรผ่านงานส่งเสริมทรัพย์สินทางปัญญา กองส่งเสริมการบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยนเรศวร ภายใต้ชื่อสิ่งประดิษฐ์ “กรรมวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายอาร์โธรสไปรา (*Arthrospira* sp.) ที่มีสารกลูโคซิลกลีเซอรอลในปริมาณสูง” และอยู่ในระหว่างการดำเนินงาน

บรรณานุกรม

- Aaronson, S., & Dubinsky, Z. (1982). Mass production of algae. *Experientia*, 38, 36-40.
- Abdel-Rahman, M. H. M., Ali, R. M., & Said, H. A. (2005). Alleviation of NaCl induced effects on *Chlorella vulgaris* and *Chlorococcum hummicola* by riboflavin application. *Int J Agri Biol*, 7(1): 58-62.
- Aerts, D., Verhaeghe, T. F., Roman, B. I., Stevens, C. V., Desmet, T., & Soetaert, W. (2011). Transglucosylation potential of six sucrose phosphorylases toward different classes of acceptors. *Carbohydr Res*, 346, 1860-1867.
- Bianchi, G., Gamba, A., Limioli, R., Pozzi, N., Elster, R., Salamini, F., & Bartels, D. (1993). The usual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Physiol Plant*, 87, 223-226.
- Blumwald, E., & Tel-Or, E. (1982). Osmoregulation and cell composition in salt adaptation of *Nostoc muscorum*. *Arch Microbiol*, 132, 168-172.
- Canaani, O. (1990). The role of cyclic electron flow around photosystem I and excitation energy distribution between the photosystems upon acclimation to high ionic stress in *Dunaliella salina*. *Phytochem Photobiol*, 52(3), 591-599.
- Castro, G. F. P. da S. de, Rizzo, R. F., Passos, T. S., Santos, B. N. C. dos, Dias, D. da S., Domingues, J. R., & Araújo, K. G. de L. (2015). Biomass production by *Arthrospira platensis* under different culture conditions. *Food Sci Technol*, 35(1), 18-24.
- Colombo, D., Compostella, F., Ronchetti, F., Scala, A., Toma, L., Tokuda, H., & Nishino, H. (1999). Chemoenzymatic synthesis and antitumor promoting activity of 6'- and 3-esters of 2-O-beta-D-glucosylglycerol. *Bioorg Med Chem*, 7, 1867-1871.
- Engelbrecht, F., Marin, K., & Hagemann, M. (1999). Expression of the *ggpS* gene, involved in osmolyte synthesis in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002, revealed regulatory differences between this strain and the freshwater strain *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl Environ Microbiol*, 65, 4822-4829.

- Liu, C., Liu, J., Hu, S., Wang, X., Wang, X., & Guan, Q. (2019). Isolation and identification of a halophilic and alkaliphilic microalgal strain. *PeerJ*, 7, e7189. doi:10.7717/peerj.7189
- Lu, C., & Vonshak, A. (2002). Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiol Plant*, 114, 405-413.
- Luley-Goedl, C., Sawangwan, T., Mueller, M., Schwarz, A., & Nidetzky, B. (2010). Biocatalytic process for production of α -glucosylglycerol using sucrose phosphorylase. *Food Technol Biotechnol*, 43, 276-283.
- Luley-Goedl, C., & Nidetzky, B. (2011). Glycosides as compatible solutes: Biosynthesis and applications. *Nat Pro Rep*, 28(5), 875.
- Martinez-Garcia, M., & van der Maarel, M. J. E. C. (2016). Floridoside production by the red microalga *Galdieria sulphuraria* under different conditions of growth and osmotic stress. *AMB Express*, 6(1), 71. doi:10.1186/s13568-016-0244-6
- Mikkat, S., Galinski, E. A., Berg, G., Minkwitz, A., & Schoor, A. (2000). Salt adaptation in Pseudomonads: Characterization of glucosylglycerol-synthesizing isolates from brackish coastal waters and the rhizosphere. *System Appl Microbiol*, 23, 31-40.
- Nagata, S., Adachi, K., & Sano, H. (1996). NMR analyses of compatible solutes in a halotolerant *Brevibacterium* sp. *Microbiol*, 142, 3355-3362.
- Ogbonda, K. H., Aminigo, R. E., & Abu, G. O. (2007). Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresour Technol*, 98, 2207-2211.
- Pade, N., & Hagemann, M. (2015). Salt acclimation of cyanobacteria and their application in biotechnology. *Life*, 5, 25-49. doi:10.3390/life5010025
- Rakhimberdieva, M. G., Boichenko, V. A., Karapetyan, N. V., & Stadnichuk, I. N. (2001). Interaction of phycobilisomes with photosystem II dimers and photosystem I monomers and trimers in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biochemistry*, 40(51), 15780-15788. doi:10.1021/bi010009t
- Reed, R. H., & Stewart, W. D. P. (1985). Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Mar Biol*, 88, 1-9.
- Roder, A., Hoffmann, E., Hagemann, M., & Berg, G. (2005). Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. *FEMS Microbiol Lett*, 243, 219-226.
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kamat, M. Y. (2008) Fractionation of lipids and purification of γ -linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis*. *Food Chem*, 109, 580-586.

- Sawangwan, T. (2015). Glucosylglycerol on performance of prebiotic potential. *Funct Food Health Dis*, 5, 427-436.
- Schrader, A., Siefken, W., Kueper, T., Breitenbach, U., Gatermann, C., Sperling, G., Biernoth, T., Scherner, C., Stäb, F., Wenck, H., Wittern, K.-P., & Blatt, T. (2012). Effect of glyceryl glucoside on AQP3 expression, barrier function and hydration of human skin. *Skin Pharmacol Physiol*, 25, 192-199.
- Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. M. (2010). Salt stress enhancement of antioxidant and antiviral efficiency of *Spirulina platensis*. *J Am Sci*, 6(10), 38-51.
- Sudhir, P.-R., Pogoryelov, D., Kovačs, L., Garab, G., & Murtly S. D. S. (2005). The effects of salt stress on photosynthetic electron transport and thylakoid membrane proteins in the cyanobacterium *Spirulina Platensis*. *J Biochem Mol Biol*, 38(4), 481-485.
- Suzuki, E., Ohkawa, H., Moriya, K., Matsubara, T., Nagaike, Y., Iwasaki, I., ... Nakamura, Y. (2010). Carbohydrate metabolism in mutants of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 defective in glycogen synthesis. *Appl Environ Microbiol*, 76, 3153-3159.
- Takenaka, F., & Uchiyama, H. (2000). Synthesis of α -D-glucosylglycerol by α -glucosidase and some of its characteristics. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64, 1821-1826.
- Takenaka, F., Uchiyama, H., & Imamura, T. (2000). Identification of α -D-glucosylglycerol in sake. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64, 378-385.
- Tel-Or, E., Spath, S., Packer, L., & Mehlhorn, R. J. (1986). Carbon-13 NMR studies of salt-induced carbohydrate turnover in the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *Plant Physiol*, 82, 646-652.
- Valderrama, J. O., Perrut, M., & Majewski, W. (2003) Extraction of astaxanthine and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide. *J Chem Eng Data*, 48, 827-830.
- Vonshak, A., & Richmond, A. (1981). Photosynthetic and respiratory activity in *Anacystis nidulans* adapted to osmotic stress. *Plant Physiol*, 68, 504-505.
- Vonshak, A., Guy, R., & Guy, M. (1988). The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. *Arch Microbiol*, 150(5), 417-420.
- Wang, H., Yang, Y., Chen, W., Ding, L., Li, P., Zhao, X., Wang, X., Li, A., & Bao, Q. (2013). Identification of differentially expressed proteins of *Arthrospira (Spirulina) platensis*-YZ under salt-stress conditions by proteomics and qRT-PCR analysis. *Proteome Sci*, 11, 6.
- Wang, L., Pan, B., Sheng, J., Xu, J. and Hu, Q. (2007) Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chemistry*, 105, 36-41

- Warr, S. R., Reed, R. H., Chudek, J. A., Foster, R., & Stewart, W. D. (1985). Osmotic adjustment in *Spirulina platensis*. *Planta*, 163(3), 424-429.
- Xu, Y., Guerra, L. T., Li, Z., Ludwig, M., Dismukes, G. C., & Bryant, D. A. (2013). Altered carbohydrate metabolism in glycogen synthase mutants of *Synechococcus* sp. strain PCC 7002: Cell factories for soluble sugars. *Metab Eng*, 16, 56-67.
- Zeng, M.-T., & Vonshak, A. (1998). Adaptation of *Spirulina platensis* to salinity-stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 120(1), 113-118.

