มวลชีวภาพและการสะสมแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก สายพันธุ์ PY202 ภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิก

Biomass and Carotenoid Accumulation by Green Microalga PY202 under Mixotrophic Condition

ณิมนาราห์ อยู่คงแก้ว, ปรียานุช เจริญสุข, ปีลดา เชิดชูเกียรติศักดิ์
และธัญนันท์ วรรณธง บรอคเคิลเฮอร์สท์*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์
ถนนราชมรรคาใน อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

Nimnara Yookongkaew, Preyanut Jaroensuk, Peelada Cherdchukeattisak,
and Thanyanan Wannathong Brocklehurst*

Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Sanam Chandra Palace Campus,
Rajamankha Nai Road, Muang, Nakhon Pathom 73000

บทคัดย่อ

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มีสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแคโรทีนอยด์กลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ ดังนั้นจึงมีการนำสารกลุ่มนี้ไปใช้ทั้งในด้านโภชนาการ เภสัชศาสตร์ และอุตสาหกรรมความงาม นับได้ว่าเป็นสารสีที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หากแต่พบได้ในสิ่งมีชีวิตเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก PY202 ซึ่งคัดแยกจากดินโป่งยุบ อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ซึ่งมีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ มีแคนธาแซนธินเป็นรงควัตถุเด่น โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *18S rRNA* ในสาหร่าย PY202 นี้ มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Hylodesmus singaporensis* (95 %) การศึกษารูปแบบการเจริญพบว่าสาหร่าย PY202 สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิก และเฮเทอโรโทรฟิก โดยภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิกซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นช่วยส่งเสริมให้สาหร่าย PY202 มีการผลิตมวลชีวภาพเพิ่มมากขึ้นจากชุดควบคุมถึงประมาณ 4 เท่า ($p<0.05$) อีกทั้งการเติมน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายนี้มีการสะสมแคนธาแซนธินสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 1,341.31 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมประมาณ 12 เท่า ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจและศักยภาพของวิถีสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ที่มีมูลค่าสูงภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิกของสาหร่าย PY202

คำสำคัญ : สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก; กลูโคส; คีโตแคโรทีนอยด์; แคนธาแซนธิน

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** wannathong_t@silpakorn.edu

doi: 10.14456/tstj.2017.50

Abstract

Carotenoids are pigments with a potent antioxidative activity especially, ketocarotenoids. Hence there are lots of applications of these pigments in nutritional supplements, pharmaceutical and cosmetic industries making them economically important. Only a few organisms, however, have been recorded biosynthesizing ketocarotenoids. This study focused on the green microalga PY202, isolated from Pongyub soil, Suanphung, Ratchaburi province that showed an ability to synthesize and accumulate canthaxanthin as a major pigment. A partial *18S rDNA* nucleotide sequence of PY202 was found to be 95 % identical to *Hylodesmus singaporensis*. The investigation of growth pattern discovered that PY202 was able to grow autotrophically, mixotrophically and heterotrophically. Under mixotrophic condition, supplying glucose as an exogenous carbon source with light, PY202 was significantly stimulated to produce approximately 4-times higher biomass than the control. In addition, a 20 g/l glucose supplementation accelerated canthaxanthin accumulation to its highest at 1,341.31 μg/g DW which is nearly 12-fold higher than the control. The findings from this study have highlighted the attractiveness and potential of high-value carotenoid biosynthesis under mixotrophic condition of PY202 alga.

Keywords: green microalgae; glucose; ketocarotenoid; canthaxanthin

1. บทนำ

ปัจจุบันนี้มนุษย์ต้องประสบกับปัญหาสุขภาพมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการเสื่อมของอวัยวะก่อนวัยอันควร การเกิดโรคหัวใจ โรคภูมิแพ้ หรือแม้แต่ความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง สิ่งกระตุ้นหลักที่ก่อให้เกิดปัญหาเหล่านี้มาจากการได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อม การบริโภคอาหารที่ไม่มีคุณค่าทางโภชนาการ รวมทั้งความเครียดจากปัญหาต่าง ๆ ในชีวิตประจำวัน สิ่งกระตุ้นดังกล่าวส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในร่างกาย การสะสมของอนุมูลอิสระที่มากเกินควรส่งผลให้ร่างกายเสียสมดุลและเป็นสาเหตุให้เกิดโรคในที่สุด ด้วยเหตุนี้ มนุษย์จึงพยายามเสาะหาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อนำมายับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในร่างกาย เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีอิเล็กตรอนอยู่ภายในโมเลกุลเป็นจำนวนมาก จึงสามารถให้อิเล็กตรอนกับโมเลกุลของอนุมูลอิสระและส่งผลให้เกิดความเสถียรขึ้นภายในโมเลกุล รวมถึงหยุดการก่อตัวขึ้นใหม่ของอนุมูลอิสระ [1]

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติมีหลายชนิด หนึ่งในนั้น คือ สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในพืชผักที่มีสีเหลืองส้ม ส้มแดง และแดง เช่น แครอท ฟักทอง มะเขือเทศ รวมไปถึงสาหร่าย แบคทีเรียและยีสต์บางชนิด ตลอดจนสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง และปลาแซลมอน มีรายงานการศึกษาและพบอนุพันธ์ของแคโรทีนอยด์ในธรรมชาติแล้วมากกว่า 750 ชนิด [2] ในพืช แคโรทีนอยด์จะเป็นรงควัตถุสำคัญในการสังเคราะห์แสง ช่วยดูดซับรับพลังงาน ในขณะเดียวกันก็ป้องกันอันตรายที่จะเกิดจากพลังงานส่วนเกินจากแสง อีกทั้งดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระหว่างการสังเคราะห์แสง [3] ในมนุษย์ แคโรทีนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ตลอดจนช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน [4]

โครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยแกนกลางเป็นคาร์บอน 40 อะตอม บางตำแหน่งของคาร์บอนเชื่อมกันด้วยพันธะคู่ และปลายโมเลกุลเป็นวงแหวนอะโรมาติก แคโรทีนอยด์บางชนิดพบอนุพันธ์ของไฮโดรคาร์บอนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ จากการศึกษาของ Naguib พบว่าแคโรทีนอยด์ในกลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง [5] สารกลุ่มนี้จึงมีความสำคัญทางเศรษฐกิจและได้รับการนำไปใช้ประโยชน์ในหลากหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นโภชนศาสตร์ เภสัชศาสตร์ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และโดยเฉพาะอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและสัตว์ปีก [6-8] ผลงานวิจัยจำนวนมากได้กล่าวถึงสมบัติของคีโตแคโรทีนอยด์ ได้แก่ แอสตาแซนธิน และแคนธาแซนธิน ในการป้องกันโรคและอาการป่วยที่เกิดขึ้นในมนุษย์จำนวนมาก อาทิ ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง [9] และโรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน [10] ป้องกันการอักเสบ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน [11] และยังสามารถชะลอความแก่ชราได้ [12] ยิ่งไปกว่านั้น ในอุตสาหกรรมฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและสัตว์ปีกเพื่อการบริโภค นอกจากสารดังกล่าวจะถูกใช้เป็นสารให้สีจากธรรมชาติ (natural colorant) เพื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงสัตว์เพื่อเร่งให้ผลผลิตจากสัตว์เหล่านั้นมีสีที่ผู้บริโภคพึงพอใจแล้ว ยังพบว่าคีโตแคโรทีนอยด์ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและลดอัตราการตาย และ/หรือ เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของสัตว์ที่ได้รับอีกด้วย [13-14]

ปัจจุบันสิ่งมีชีวิตที่ได้รับความนิยมนำมาเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมเพื่อผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Haematococcus pluvialis* เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้สามารถสะสมแอสตาแซนธินเป็นคีโตแคโรทีนอยด์ชนิดเด่นได้สูงสุดถึง 4 % ของมวลชีวภาพ (w/w) [5] อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ยังมีข้อจำกัดหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นการมีอัตราการเจริญที่ค่อนข้างต่ำ อีกทั้งสามารถพบคีโตแคโรทีนอยด์ได้เพียงช่วงระยะพักตัว ซึ่งในระยะนี้สาหร่ายจะไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นอีก นอกจากนี้การที่สาหร่าย *H. pluvialis* จะเข้าสู่ระยะพักตัวจำเป็นต้องได้รับการกระตุ้นเท่านั้น เช่น การกระตุ้นจากแสง การกระตุ้นจากความเค็ม หรือการกระตุ้นจากความเครียดจากสารอาหาร และต้องควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงให้อยู่ประมาณ 18-20 องศาเซลเซียส [15] ลักษณะทั้งหมดที่กล่าวนี้ล้วนเป็นอุปสรรคต่อการเพาะเลี้ยงและผลิตแอสตาแซนธินจากสาหร่าย *H. pluvialis* เป็นอย่างมาก ส่งผลให้ต้องมีต้นทุนที่สูงตามไปด้วย [16] ในงานวิจัยชิ้นนี้ คณะผู้วิจัยจึงมีความมุ่งหมายที่จะศึกษาสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิดอื่นในท้องถิ่นที่มีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมแคโรทีนอยด์ และศึกษาถึงผลของชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณการสะสมแคโรทีนอยด์ เพื่อเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและพัฒนาการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเก็บรักษาและจำแนกชนิดสาหร่าย PY202

สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ PY202 เป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่แยกได้จากดินโป่งยุบ อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ในสภาวะปกติสาหร่ายจะได้รับการเก็บรักษาบนอาหารแข็งสูตร HSM (high salt medium) [17] ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที การระบุชนิดของสาหร่ายใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่ตำแหน่งยีน *18S rRNA* (*18S rDNA*) การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform extraction

[18] และเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 18S-42F (5′-CT CAARGAYTAAGCCATGCA-3′) และ 18S-1498R (5′-CACCTACGGAAACCTTGTTA-3′) [19] จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำข้อมูลมาจัดเรียงเปรียบเทียบ (BLAST) กับฐานข้อมูล GenBank เพื่อระบุชนิดสาหร่าย

2.2 การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของสาหร่าย PY202

เพาะเลี้ยงเชื้อตั้งต้นของสาหร่าย PY202 ในอาหารเหลวสูตร HSM เพื่อเตรียมสารละลายสาหร่ายสำหรับนำไปศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตด้วยวิธี spot test ด้วยการหยดสารละลายสาหร่ายลงบนอาหารแข็งให้มีลักษณะเป็นวงกลม (spot) และนำไปเพาะเลี้ยงที่ 3 สภาวะ ได้แก่ (1) HSM + ให้แสง (2) HSM ที่เติมน้ำตาลกลูโคส (20, 50 และ 100 กรัมต่อลิตร) + ให้แสง และ (3) HSM ที่เติมน้ำตาลกลูโคส (20, 50 และ 100 กรัมต่อลิตร) + ไม่ให้แสง (ใช้อลูมิเนียมฟอยล์หุ้มจานเพาะเชื้อสำหรับสภาวะไม่ให้แสง) ทั้งหมดเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายภาพบันทึกผล

2.3 การศึกษาผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย PY202

ทดสอบผลของการเติมน้ำตาลด้วยเทคนิค spot test โดยหยดสารละลายสาหร่ายความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็งสูตร HSM ที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างกันได้แก่ 0, 20, 50 และ 100 กรัมต่อลิตร ให้มีลักษณะเป็นวงกลม (spot) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง (fluorescent) ตลอดเวลาที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ถ่ายภาพบันทึกผลพร้อมเก็บเซลล์สาหร่ายแต่ละวงกลมด้วยการขูดด้วยช้อนตักสาร (spatula) ทุก 7 วัน (แต่ละครั้งของการเก็บเซลล์ เก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ รวม 3 วงกลม) เป็นเวลา 35 วัน จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายไปทำให้แห้งด้วยเทคนิคทำแห้งแบบเยือกแข็ง แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อเปรียบเทียบมวลชีวภาพที่เกิดขึ้น รวมถึงวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายสะสมในแต่ละตัวอย่าง

2.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ในสาหร่าย PY202

นำเซลล์สาหร่ายจากการทดลอง 2.3 มาบดร่วมกับทรายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำให้เซลล์แตก จากนั้นสกัดสารสีโดยเติมน้ำกลั่นและเมทา-นอล อย่างละ 400 ไมโครลิตร เขย่าจนเข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 800 ไมโครลิตร เขย่าอีกครั้งแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที ดูดเอาสารละลายส่วนล่างที่มีรงควัตถุละลายอยู่ไปกำจัดตัวทำละลายโดยทิ้งไว้ให้แห้งภายในตู้ดูดควันในที่มืด นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมด้วยสเปกโตรโฟโต-มิเตอร์ตามวิธีของ Harmut โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470, 654.2 และ 666.6 นาโนเมตร และคำนวณตามสมการ

$$C_{total} = \frac{1000A_{470} - 4.39A_{666} - 6.44A_{654.2}}{174}$$

เมื่อ C_{total} = ปริมาณ total carotenoid, A_{470} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 nm, $A_{654.2}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 654.2 nm และ A_{666} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 666 nm [20] จากนั้นนำสารสกัดทั้งหมดไปศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์ด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) [21] แล้วขูดเอาแถบของสารตัวอย่างที่ตรงกับสารมาตรฐานเบต้าแคโรทีนและแคนธาแซนธินมาวิเคราะห์ปริมาณสารแบบแยกชนิด โดยชะเอาสาร

ตัวอย่างจากผงซิลิกาเจลที่ขูดมาข้างต้นด้วยคลอโรฟอร์ม 300 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 2 มิลลิลิตร ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สำหรับเบต้าแคโรทีน และที่ 466 นาโนเมตรสำหรับแคนธาแซนธิน นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณปริมาณรงควัตถุ โดยคำนวณจากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารแคโรทีนอยด์มาตรฐานเบต้าแคโรทีน (C4582-5MG, Sigma-Aldrich) y = 0.25x และแคนธาแซนธิน (32993-5MG, Sigma-Aldrich) y = 0.22x - 0.0002 โดยที่ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ และ x คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างซึ่งมีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามวิธีที่มีการอธิบายไว้ [22]

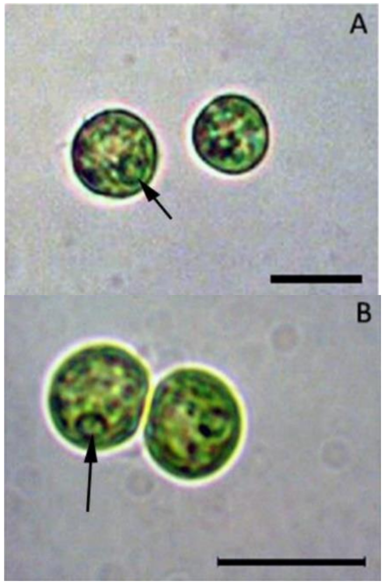
2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองทั้งหมดในงานวิจัยนี้มีจำนวนซ้ำอย่างน้อย 3 ซ้ำ และข้อมูลที่ได้ทั้งหมดถูกนำไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วย one-way ANOVA และ post hoc test ($P<0.05$) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างและจัดกลุ่ม

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกชนิดสาหร่าย PY202

การศึกษาเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสายพันธุ์ PY202 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าสาหร่าย PY202 มักอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ สีของเซลล์เป็นสีเขียวอ่อนคล้ายสีของหญ้า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-10 ไมครอน เซลล์มีรูปร่างกลม พบคลอโรพลาสต์อยู่ข้างผนังเซลล์ (parietal chloroplast) และภายในคลอโรพลาสต์มีไพรีนอยด์ 1 อัน (รูปที่ 1) ซึ่งจากลักษณะสัณฐานวิทยาที่ได้กล่าวมานี้ ทำให้สามารถระบุลำดับอนุกรมวิธานของสาหร่าย PY202 ได้เพียงว่าเป็นสมาชิกของดิวิชัน Chlorophyta ลำดับชั้น Chlorophyceae ดังนั้นจึงได้ศึกษาลักษณะทางอณูชีววิทยาเพื่อช่วยในการระบุชนิดของสาหร่าย PY202



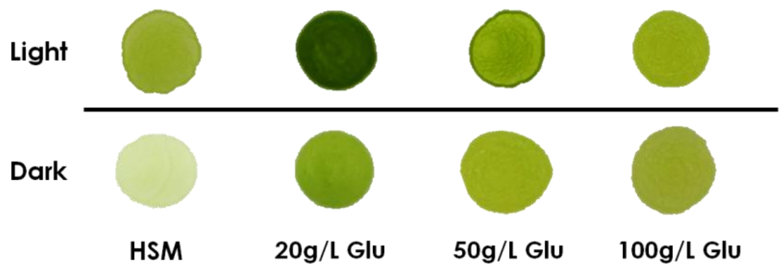
รูปที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสายพันธุ์ PY202 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เซลล์สาหร่าย PY202 ที่เจริญในอาหารสูตร HSM ในลักษณะเซลล์เดี่ยว (A) และเมื่อแบ่งเซลล์แล้วไม่หลุดออกจากกัน (B) ลูกศรสีดำแสดงตำแหน่งไพรีนอยด์ภายในเซลล์ (scale bar = 10 µm)

การศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *18S rRNA* ความยาว 1,100 คู่เบส ของสาหร่าย PY202 กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PY202 มีความเหมือนสูงสุดกับบางส่วนของยีน *18S rRNA* ของสาหร่าย *Hylodesmus singaporensis* strain E4-g (accession number FJ715936.1) โดยมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 95 ซึ่งถือว่ามีค่าร้อยละความเหมือนไม่สูงนัก เนื่องจากโดยทั่วไปนักอนุกรมวิธานมักระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์ โดยใช้ค่าความเหมือนที่ร้อยละ 97 ขึ้นไป [23]

การศึกษาเพิ่มเติมพบว่าสาหร่าย *H. singaporensis* และสาหร่าย PY202 นั้นเก็บมาจากพื้นที่ที่มีลักษณะทางนิเวศวิทยาต่างกัน กล่าวคือ สาหร่าย *H. singaporensis* เก็บมาจากไม้ผุพังที่อยู่ในบริเวณป่าไม้เขตร้อนของ Central Catchment Nature Reserve ในประเทศสิงคโปร์ [24] ซึ่งมีภูมิอากาศแบบร้อนชื้น และจัดเป็นสาหร่ายที่อาศัยอยู่แบบกึ่งบนบก (subaerial algae) ที่สามารถเจริญได้ในดินชื้นแฉะ ในขณะที่ PY202 เป็นสาหร่ายที่แยกมาจากตัวอย่างดินที่โป่งยุบ อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ในประเทศไทย ซึ่งมีภูมิอากาศร้อนและค่อนข้างแห้งแล้ง จากข้อมูลที่กล่าวมา เป็นไปได้ว่าสาหร่าย PY202 จะเป็นสาหร่ายคนละชนิดกับ *H. singaporensis* อย่างไรก็ตาม การระบุสายพันธุ์ที่แน่ชัดของ PY202 จึงยังมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป อาทิ ข้อมูลสัณฐานวิทยาของโครงสร้างในระดับเซลล์ ข้อมูลด้านสรีรวิทยา หรือจากด้านอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคอื่น ๆ หรือจากยีนตำแหน่งอื่น ๆ

3.2 รูปแบบการเจริญเติบโตของสาหร่าย PY202

ผลการทดสอบรูปแบบการเจริญด้วยวิธี spot test เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสาหร่าย PY202 สามารถเจริญเติบโตได้ทั้ง 3 สภาวะ ได้แก่ สภาวะออโตโทรฟิก (อาหารสูตร HSM + มีแสง) สภาวะมิกโซโทรฟิก (อาหารสูตร HSM + กลูโคส + มีแสง) และสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก (อาหารสูตร HSM + กลูโคส + ไม่มีแสง) ทั้งนี้พบการเจริญสูงสุดของสาหร่าย PY202 ในสภาวะเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิก สังเกตได้จากการที่สาหร่ายมีสีโคโลนีที่เขียวกว่าและหนาแน่นกว่าสภาวะอื่น ๆ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 รูปแบบการเจริญเติบโตของสาหร่าย PY202 ภายใต้สภาวะเลี้ยงที่แตกต่างกัน ทดสอบการเจริญของสาหร่ายด้วยเทคนิค spot test เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะไม่มีแสง (dark) มีแสง (autotroph) มีแสงร่วมกับเติมน้ำตาลกลูโคส (Glu) ความเข้มข้น 20, 50, 100 กรัมต่อลิตร (mixotroph) และไม่มีแสงร่วมกับเติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20, 50, 100 กรัมต่อลิตร (heterotroph)

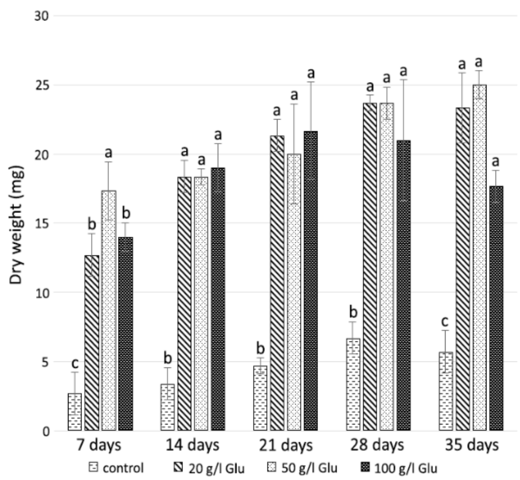
ผลการทดลองเป็นไปได้อย่างมากที่ PY202 มีความสามารถในการนำน้ำตาลกลูโคสจากภายนอกเข้าไปใช้ในเซลล์ได้โดยอาศัยกระบวนการ oxidative assimilation [25] ร่วมกับคาร์บอนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งลักษณะดังกล่าวยืนยันได้จากการเจริญเติบโตที่มากกว่าดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่ง

สอดคล้องกับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ในสาหร่าย *Chlorella* sp. และ *Nannochloropsis* sp. ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิกซึ่งสร้างมวลชีวภาพสูงกว่าสภาวะออโตโทรฟิก [26] การที่สาหร่าย PY202 มีการเจริญเติบโตในสภาวะนี้ได้ดี นับว่าเป็นข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่นที่เจริญได้ด้วยอาหารจากการสังเคราะห์ด้วยแสงเพียงอย่างเดียวเท่านั้น

3.3 มวลชีวภาพของสาหร่าย PY202 ในสภาวะเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิก

เนื่องจาก PY202 เจริญได้ดีในสภาวะมิกโซโทรฟิกที่มีกลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน ผู้วิจัยจึงทดลองเลี้ยงสาหร่าย PY202 ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 35 วัน พบว่าโดยภาพรวมสาหร่าย PY202 มีมวลชีวภาพเพิ่มมากขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป โดยทุกความเข้มข้นให้ค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน แล้วจึงลดลงเล็กน้อย ยกเว้นในอาหารที่มีน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร ที่ยังคงมีมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นและเพิ่มสูงสุดในวันที่ 35 ของการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม น้ำหนักแห้งที่ชั่งได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับมวลชีวภาพที่วัดได้ในวันที่ 21 ($p>0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบมวลชีวภาพที่ได้จากการทดลองกับชุดควบคุม จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า การเติมน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้มวลชีวภาพของเซลล์สาหร่าย PY202 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในทุกสัปดาห์ของการเก็บตัวอย่าง (รูปที่ 3)

สำหรับผลของน้ำตาลตามระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ณ วันที่ 7 การเติมกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์สาหร่ายสูงสุด ในขณะที่วันที่ 14, 21 และ 28 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลมวลชีวภาพที่เกิดขึ้นในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่าง พบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 20, 50 และ 100 กรัมต่อลิตร ส่งผลกับมวลชีวภาพของสาหร่ายไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) เมื่อพิจารณามวลชีวภาพจากน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์สาหร่าย PY202 ในวันที่ 35 ซึ่งเป็นการเก็บตัวอย่างครั้งสุดท้าย พบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสส่งผลให้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 3.1-4.4 เท่าของชุดควบคุม โดยน้ำตาลที่ความเข้มข้น 20 และ 50 กรัมต่อลิตรให้น้ำหนักแห้งสูงที่สุด อยู่ที่ 23.3±2.5 และ 25.0±1.0 มิลลิกรัม ตามลำดับ และการเติมกลูโคสความเข้มข้นสูง 100 กรัมต่อลิตรกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ในระดับเดียวกันกับความเข้มข้น 20 และ 50 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 3)

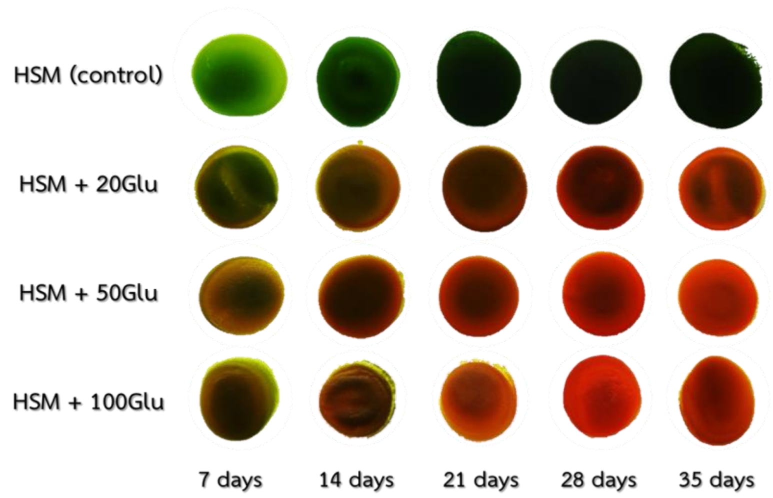


รูปที่ 3 ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อมวลชีวภาพของสาหร่าย PY202 เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะมีแสงในอาหารสูตร HSM (control) และอาหาร HSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20, 50 และ 100 กรัมต่อลิตร เก็บเซลล์ทุก 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน ตัวอักษร a, b, และ c แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนักแห้งสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารแต่ละชนิดในช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างเดียวกัน ($p<0.05$)

ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่มีต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย PY202 นี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Leesing และคณะ ซึ่งทดลองในสาหร่าย *Chlorella* sp. KKU-S2 โดยเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร Bristol ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะมิกโซ-โทรฟิก โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าน้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ให้มวลชีวภาพ (biomass yield) ของเซลล์สาหร่ายสูงสุดเท่ากับ 10.04 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตมวลชีวภาพ (biomass productivity) ของเซลล์สาหร่ายสูงสุดเท่ากับ 1.673 กรัมต่อลิตร [27] เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Ip และคณะ ซึ่งทดลองในสาหร่าย *Chlorella zofingiensis* ด้วยอาหารสูตร Bristol ร่วมกับการเติมน้ำตาลกลูโคส และพบว่าสาหร่าย *C. zofingiensis* มีการผลิตมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นในทุกชุดทดลองที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสเมื่อเทียบกับอาหารปกติ [28] จะเห็นได้ว่าน้ำตาลกลูโคสนั้นช่วยส่งเสริมให้สาหร่ายสามารถผลิตมวลชีวภาพได้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมก็มีความจำเพาะกับชนิดสาหร่าย

3.4 ชนิดของแคโรทีนอยด์ที่มีการสะสมในสาหร่าย PY202 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส

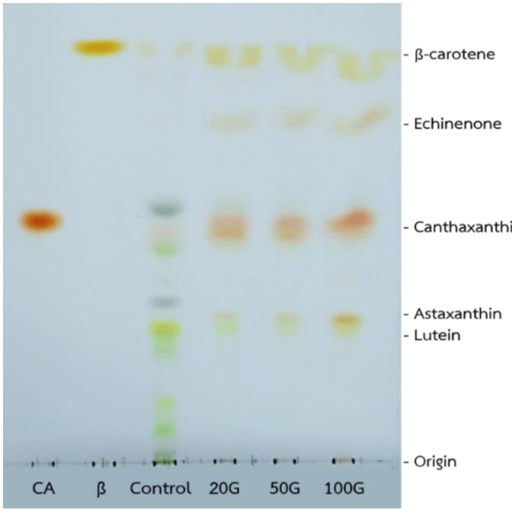
เมื่อศึกษาเปรียบเทียบการสะสมรงควัตถุของสาหร่าย PY202 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร HSM ในแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ในวันที่ 7, 14, 21, 28 และ 35 ของการทดลอง โดยพิจารณาสีของโคโลนี เป็นที่น่าสนใจว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสมีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวไปเป็นสีส้มแดงในทุกระดับความเข้มข้นของน้ำตาล โดยสีแดงจะเข้มมากขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่โคโลนีสาหร่ายยังคงเป็นสีเขียวเช่นเดิมในชุดควบคุม ถึงแม้ระดับความเข้มจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการเพาะเลี้ยงผ่านไป (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนีสาหร่าย PY202 เพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยเทคนิค spot test ในสภาวะมีแสง ในอาหารสูตร HSM (control) และอาหาร HSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20, 50 และ 100 กรัมต่อลิตร บันทึกภาพโคโลนีทุก 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

การวิเคราะห์ชนิดของรงควัตถุที่สาหร่ายผลิตขึ้นด้วยการสกัดสารสีแล้วแยกชนิดด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) ด้วยระบบที่รายงานในเอกสารของ Grung และคณะ [21] โดยมีสารมาตรฐานแคโรทีนอยด์ที่นำมาศึกษาร่วมเพียง 2 ชนิด ได้แก่ เบต้าแคโรทีน และแคนธาแซนธินบริสุทธิ์ แคโรทีนอยด์ชนิดอื่น ๆ จะเปรียบเทียบจากค่า Rf ที่รายงานไว้ในเอกสารข้างต้น พบว่าสาหร่ายในชุดควบคุมที่มีสีเขียวนั้น มีการสังเคราะห์และเก็บสะสมสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ชนิดเด่นเพียง 2 ชนิด ซึ่งคาดว่าคือ เบต้าแคโรทีน (β-carotene) และลูทีน (lutein) ดังแสดงในรูปที่ 5 ในขณะที่ผลจากการแยกสารสกัดหยาบของสาหร่าย PY202 ที่มีสีส้มแดง พบว่าสาหร่ายชนิดนี้สามารถสังเคราะห์และสะสมสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ได้หลายชนิดกว่าชุดควบคุม โดยคาดว่าสารที่ตรวจพบด้วยเทคนิค TLC เหล่านั้น ได้แก่ เบต้าแคโร-ทีน (β-carotene) ลูทีน (lutein) เอคินีโนน (echine-none) แคนธาแซนธิน (canthaxanthin) และแอสตาแซนธิน (astaxanthin) ซึ่งแคโรทีนอยด์สามชนิดหลังเป็นแคโรทีนอยด์ในกลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสามารถนำมาสรุปให้เห็นถึงภาพรวมของชนิดของแคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่าย PY202 ได้ดังตารางที่ 1

การศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่ามีงานวิจัยหลายชิ้นระบุถึงผลของการเติมแหล่งคาร์บอนภายนอกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อว่าสามารถกระตุ้นให้สาหร่ายสร้างและสะสมสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ได้ รวมไปถึงการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ที่มีส่วนช่วยในการเปลี่ยนสารเบต้าแคโรทีนไปเป็นแอสตาแซนธินถูกกระตุ้นระดับการทำงานให้มากขึ้น โดยเอนไซม์เหล่านี้จะมีตำแหน่งของการทำปฏิกิริยาทางชีวเคมีอยู่ที่เม็ดสี (plastid) ซึ่งเป็นแหล่งเก็บสะสมสารเบต้าแคโรทีน และยังพบอีกว่าในสาหร่ายขนาดเล็กร้อยละ 70 ของสารเบต้าแคโรทีนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารกลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ได้ [29,30]



รูปที่ 5 โครมาโตกราฟี (TLC) ของรงควัตถุที่สกัดได้จากสาหร่าย PY202 ซ้ายไปขวา สารมาตรฐานแคนธาแซนธิน (CA) สารมาตรฐานเบต้าแคโรทีน (β) สารสกัดจากสาหร่าย PY202 อายุ 35 วัน ที่เลี้ยงในอาหาร HSM (control) และอาหาร HSM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20, 50 และ 100 กรัมต่อลิตร (20G, 50G, 100G)

ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้าซึ่งเกือบทั้งหมดมีวัตถุประสงค์ที่จะกระตุ้นสาหร่ายสีเขียวให้ผลิตและสะสมสารกลุ่มแคโร-ทีนอยด์ที่มีมูลค่าสูง เช่น งานวิจัยของ Ma และ Chen ที่ศึกษาในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิก พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนภายนอก สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายชนิดนี้เกิดการสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์ชนิดแอสตาแซนธินได้ [31] และเมื่อ Yuan และคณะ ศึกษาในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กอีกชนิดหนึ่งในสกุลเดียวกันก็

พบว่ากลูโคสสามารถกระตุ้นให้สาหร่ายชนิดนี้สร้างและสะสมแคโรทีนอยด์ โดยชนิดของแคโรทีนอยด์ที่ตรวจพบ ได้แก่ เบต้าแคโรทีน (ß-carotene) ลูทีน (lutein) รวมถึงคีโตแคโรทีนอยด์ที่มีมูลค่าสูง เช่น แอสตาแซนธิน (astaxanthin) อะโดนิแซนธิน (adonixanthin) และแคนธาแซนธิน (canthaxanthin) [32]

ตารางที่ 1 แคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่าย PY202 ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างกัน

Medium	Carotenoid					
	Lutein	ß-carotene	Echinenone	Canthaxanthin	Adonixanthin	Astaxanthin
HSM	+	+	-	-	-	-
HSM 20 g/l glucose	+	+	+	+	+	+
HSM 50 g/l glucose	+	+	+	+	+	+
HSM 100 g/l glucose	+	+	+	+	+	+

เครื่องหมาย + คือ พบแคโรทีนอยด์ชนิดดังกล่าว และเครื่องหมาย - คือ ไม่พบชนิดดังกล่าว

ทำนองเดียวกันกับงานของ Sun และคณะ ที่ศึกษาในสาหร่าย *Chlorella zofingiensis* โดยใช้น้ำตาลกลูโคส แมนโนส ฟรุกโตส ซูโครส กาแลกโตส และแลกโตส เป็นแหล่งคาร์บอนภายนอก พบว่าน้ำตาลทั้ง 6 ชนิด สามารถกระตุ้นการสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์ โดยน้ำตาลกลูโคสสามารถกระตุ้นให้สาหร่าย *C. zofingiensis* เกิดการสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์ชนิดแอสตาแซนธินได้ดีที่สุด [33] นอกจากนี้ การเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนภายนอกด้วยการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ก็สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายทั้งสองชนิดนี้เกิดการสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์ชนิดแอสตาแซนธินได้เช่นกัน [34]

3.5 ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์ในสาหร่าย PY202

ผลการศึกษาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (total carotenoid content) ที่สาหร่าย PY202 ผลิตได้ พบว่าในสภาวะเลี้ยงที่มีน้ำตาลกลูโคส สามารถตรวจพบสารสีกลุ่มดังกล่าวเพิ่มขึ้น 1.2-1.6 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งตรวจพบปริมาณแคโรทีนอยด์รวมเท่ากับ 1,629.56±24.78 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 2) และพบว่า สาหร่าย PY202 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร HSM ที่มีการเติมน้ำตาลที่ความเข้มข้น 20 และ 100 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เท่ากับ 2,498.41±227.43 และ 2,547.55± 142.59 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีน (ß-carotene content) พบว่าสาหร่ายที่ได้รับน้ำตาลตรวจพบเบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้น 1.1-2.4 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ตรวจพบปริมาณเบต้าแคโรทีนเท่ากับ 362.05±55.16 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 2) โดยความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเบต้าแคโรทีนสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เท่ากับ 875.86±60.14 ไมโครกรัมต่อกรัม ในขณะที่ปริมาณเบต้าแคโรทีนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร HSM ที่มีการเติมน้ำตาลที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม

ส่วนคีโตแคโรทีนอยด์ชนิดเด่นที่สาหร่ายผลิตได้ คือ แคนธาแซนธิน พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้น 6.0-11.6 เท่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (116.08±27.97

ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณแคนธาแซนธิน (canthaxanthin content) สูงสุด เท่ากับ 1,341.31±67.52 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 50 และ 100 กรัมต่อลิตร ไม่ได้ส่งผลให้สาหร่ายผลิตแคนธาแซนธินได้ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณการผลิตสารสีแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสายพันธุ์ PY202 ผลการวิเคราะห์สารสกัดหยาบของสาหร่าย PY202 อายุ 35 วัน ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร HSM ที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 35 วัน

Medium	Content (µg/g DW)			Production (µg/รอบการเพาะเลี้ยง)		
	Total carotenoid	ß-carotene	Canthaxanthin	Total carotenoid	ß-carotene	Canthaxanthin
HSM	1629.56±24.77^{c}	362.05±55.15^{c}	116.08±27.97^{c}	9.21±2.36^{c}	2.01±0.38^{d}	0.64±0.15^{c}
HSM 20 g/l Glucose	2498.41±227.42^{a}	875.86±60.14^{a}	1341.31±67.51^{a}	57.97±3.16^{a}	20.49±3.067^{a}	31.23±2.80^{a}
HSM 50 g/l Glucose	1883.78±317.04^{b}	566.85±124.89^{b}	691.83±159.56^{b}	47.27±9.71^{b}	14.23±3.49^{b}	17.38±4.62^{b}
HSM 100 g/l Glucose	2547.55±142.58^{a}	388.66±32.56^{c}	835.93±126.46^{b}	45.11±5.41^{b}	6.85±0.32^{c}	14.68±1.49^{b}

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

หากพิจารณาถึงศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวม (total carotenoid production) การผลิตเบต้าแคโรทีน (ß-carotene production) และการผลิตแคนธาแซนธิน (canthaxanthin production) ในวันที่ 35 (สัปดาห์ที่ 5) พบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสส่งผลให้ศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวม เบต้าแคโรทีนและแคนธาแซนธินของสาหร่าย PY202 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($p<0.05$) โดยศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวมเพิ่มมากขึ้น 4.9-6.3 เท่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์รวมเท่ากับ 9.21±2.36 ไมโครกรัม และสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM ที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวมสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เท่ากับ 57.97±3.16 ไมโครกรัม สำหรับศักยภาพในการผลิตเบต้าแคโรทีน พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้น 3.4-10.2 เท่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการผลิตเบต้าแคโรทีนเท่ากับ 2.01±0.39 ไมโครกรัม โดยสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร มีศักยภาพในการผลิตเบต้าแคโรทีนสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เท่ากับ 20.49±3.07 ไมโครกรัม

ส่วนศักยภาพในการผลิตแคนธาแซนธินซึ่งเป็นคีโตแคโรทีนอยด์ที่มีมูลค่าสูง พบว่า มีค่าเพิ่มขึ้นโดยประมาณ 22-48 เท่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการผลิตแคนธาแซนธินเท่ากับ 0.64±0.15 ไมโครกรัม สาหร่ายที่เจริญในสภาวะเลี้ยงที่มีน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร มีศักยภาพในการผลิตแคนธาแซนธินสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เท่ากับ 31.23±2.80 ไมโครกรัม และยังพบอีกว่าศักยภาพในการผลิตแคนธาแซนธินของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร HSM ที่มีการเติมน้ำตาลที่ความเข้มข้น 50 และ 100 กรัมต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลการทดลองครั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yuan และคณะ ที่พบว่าน้ำตาลกลูโคสมีผลต่อการสร้างและสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ และพบว่า

ปริมาณแคนธาแซนธินและเบต้าแคโรทีนจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมน้ำตาลกลูโคสลงในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง [32] น้ำตาลกลูโคสถือเป็นแหล่งคาร์บอนภายนอกที่มีความสำคัญ และมีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยอัตราส่วนที่สูงจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ในเซลล์สาหร่ายได้ดี ขณะที่ค่าอัตราส่วน C:N ที่ต่ำจะให้ผลในทางตรงกันข้าม [33] อีกทั้งกลูโคสยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญสำหรับวิถีการสร้างและสะสมสารกลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ [28]

เมื่อเปรียบเทียบผลจากงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของ Abe และคณะ ก็พบว่ากลูโคสสามารถส่งเสริมการผลิตแคนธาแซนธินและเบต้าแคโรทีนได้เช่นกัน Abe และคณะ รายงานว่าสาหร่าย *Coelastrella striolata* var. *multistriata* มีประสิทธิภาพในการให้ปริมาณแคนธาแซนธินได้สูงถึง 47.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และให้ปริมาณเบต้าแคโรทีนได้ถึง 7.0 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง [35] ในขณะที่สาหร่าย PY202 นั้นสามารถให้ปริมาณแคนธาแซนธินได้เพียง 1.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และให้ปริมาณเบต้าแคโรทีนได้เพียง 0.9 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งนับว่าน้อยกว่าสาหร่าย *C. striolata* var. *multistriata* อยู่มาก อย่างไรก็ตาม เทคนิคที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ในงานวิจัยนี้นับว่าเป็นเทคนิคพื้นฐานที่มีความละเอียดและความไวค่อนข้างต่ำ ประกอบกับการสูญเสียตัวอย่างบางส่วนไปในระหว่างการทดลองโดยเฉพาะในขั้นตอนการระเหยตัวทำละลาย ซึ่งอาจทำให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่วัดได้มีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง เพื่อให้ผลการทดลองมีความแม่นยำมากขึ้น ในอนาคตควรมีการใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำสูงในการวิเคราะห์ เช่น high performance liquid chromatography โดยรวมผู้วิจัยมีความเห็นว่าผลการทดลองนี้สามารถแสดงแนวโน้มในการศึกษาต่อถึงผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณการสะสมแคนธาแซนธินในสาหร่าย PY202 อีกทั้งยังแสดงถึงศักยภาพของสาหร่ายดังกล่าวในการนำมาผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติต่อไป

4. สรุป

ผลการทดลองทั้งหมดอาจกล่าวได้ว่าสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสายพันธุ์ PY202 ที่เบื้องต้นคาดการณ์ว่าเป็นสาหร่ายในจีนัส *Hylodesmus* นั้นสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิก และเฮเทอโรโทรฟิก แต่เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในสภาวะมิกโซโทรฟิก การเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตและสะสมแคโรทีนอยด์รวม ตลอดจนสะสมเบต้าแคโรทีนและแคนธาแซนธินสูงสุด นอกจากนี้พบว่าน้ำตาลมีผลกระตุ้นให้สาหร่ายมีการสะสมคีโตแคโรทีนอยด์โดยมีแคนธาแซนธินเป็นชนิดหลัก

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากกองทุนวิจัยและสร้างสรรค์คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ SRF-PRG-2556-04

6. รายการอ้างอิง

[1] Sies, H., 1997, Oxidative stress: Oxidants and antioxidants, Exp. physiol. 82: 291-295.

[2] Sakagami, Y., Sumiya, Y. and Komemushi, S., 2010, Research on search of the carotenoid-producing microorganisms in marine area and the improvement of

production ratio, YAKUGAKU ZASSHI 130: 1445-1451.

[3] Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley P.M. and Rice-Evans, C.A., 1996, Antioxidant activities of carotenoids and xanthophylls, FEBS Lett. 384: 240-242.

[4] Rao, A.V. and Rao, L.G., 2007, Carotenoids and human health, Pharmacol. Res. 55: 207-216.

[5] Naguib, Y.M., 2000, Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids, J. Agric. Food Chem. 48: 1150-1154.

[6] Lorenz, R.T. and Cysewski, G.R., 2000, Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin, Trends Biotechnol. 18: 160-167.

[7] Guerin, M., Huntley, M.E. and Olaizola, M., 2003, *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition, Trends Biotechnol. 21: 210-216.

[8] Eonseon, J., Lee, C.G. and Polle, J.E.W., 2006, Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): biosynthesis, regulation and biotechnology, J. Microbiol. Biotechnol. 16: 821-831.

[9] Nishino, H., Murakosh, M., Ii, T., Takemura, M., Kuchide, M., Kanazawa, M., Mou, X.Y., Wada, S., Masuda, M., Ohsaka, Y., Yogosawa, S., Satomi, Y. and Jinno, K., 2002, Carotenoids in cancer chemoprevention, Canc. Metastasis Rev. 21: 257-264.

[10] Fassett, R.G. and Coombes, J.S., 2012, Astaxanthin in cardiovascular health and disease, Molecules 17: 2030-2048.

[11] Park, J.S., Chyun, J.H., Kim, Y.K., Line, L.L. and Chew, B.P., 2010, Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans, Nutr. Metab. (Lond) 7: 18.

[12] Kidd, P., 2011, Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential, Altern. Med. Rev. 16: 355-364.

[13] Baker, R. and Gunther, C., 2004, The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption, Trends Food Sci. Technol. 15: 484-488.

[14] Zhang, J., Liu, Y.J., Tian, L.X., Yang, H.J., Liang, G.Y., Yue, Y.R. and Xu, D.H., 2013, Effects of dietary astaxanthin on growth, antioxidant capacity and gene expression in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Aquacult. Nutr. 19: 917-927.

[15] Danxiang, H., Yantao, L., and Qiang, H., 2013, Astaxanthin in microalgae: Pathways, functions and biotechnological implications, Algae 28: 131-147.

[16] Margalith, P.Z., 1999, Production of ketocarotenoids by microalgae, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 431-438.

[17] Sueoka, N., 1960, Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardti*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 46: 83-91.

[18] Sambrook, K. and Russell, D.W., 2001, Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

[19] López-García, P., Philippe, H., Gail, F. and Moreira, D., 2003, Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 697-702.

[20] Hartmut, L., 1987, Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes, Methods Enzymol. 148: 350-382.

[21] Grung, M., D'Souza, F.M., Borowitzka, M. and Liaaen-Jensen, S., 1992, Algal carotenoids 51, Secondary carotenoids 2, *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3′S)-astaxanthin esters, J. Appl. Phycol. 4: 165-171.

[22] Biehler, E., Mayer, F., Hoffmann, L., Krause, E. and Bohn, T., 2010, Comparison of 3 spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables, J. food Sci. 75: c55-61.

[23] Stackebrandt, E. and Goebel, B.M., 1994, Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and *16S rRNA* sequence analysis in the present species definition in bacteriology, Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 846-849.

[24] Eliás, M., Nemcová, Y., Skaloud, P., Neustupa, J., Kaufnerová, V. and Sejnohová, L., 2009, *Hylodesmus singaporensis* gen. et sp. nov., a novel autosporic subaerial green alga (Scenedesmaceae, Chlorophyta) from Singapore, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 1224-1235.

[25] Perez-Garcia, O., Escalante, F.M., de-Bashan, L.E. and Bashan, Y., 2011, Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products, Water Res. 45: 11-36.

[26] Cheirsilp, B. And Torpee, S., 2012, Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation, Bioresour. Technol. 110: 510-516.

[27] Leesing, R., Papone, T. and Puangbut, M., 2014, Effect of nitrogen and carbon sources on growth and lipid production from mixotrophic growth of Chlorella sp. KKU-S2, Int. Schol. Scient. Res. Innov. 8: 365-368.

[28] Ip, P.F., Wong, K., and Chen, F., 2004, Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture, Proc. Biochem. 39: 1761-1766.

[29] Jayaraj, J., Devlin, R. and Punja, Z., 2008, Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants, Transgen. Res. 17: 489-501.

[30] Mulders, K.J., Lamers, P.P., Martens, D.E.

and Wijffels, R.H., 2014, Phototrophic pigment production with microalgae: Biological constraints and opportunities, J. Phycol. 50: 229-242.

[31] Ma, R.Y.N. and Chen, F., 2001, Induction of astaxanthin formation by reactive oxygen species in mixotrophic culture of *Chlorococcum* sp., Biotechnol. Lett. 23: 519-523.

[32] Yuan, J.P., Chen, F., Liu, X. and Li, X.Z., 2002, Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*, Food Chem. 76: 319-325.

[33] Sun, N., Wang, Y., Li, Y.T., Huang, J.C. and Chen, F., 2008, Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta), Proc. biochem. 43: 1288-1292.

[34] Raman, R. and Mohamad, S.E., 2012, Astaxanthin production by freshwater microalgae *Chlorella sorokiniana* and marine microalgae *tetraselmis* sp., Pak. J. Biol. Sci. 15: 1182-1186.

[35] Abe, K., Hattori, H. and Hirano, M., 2007, Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*, Food chem. 100: 656-661.