



การจัดจำแนกและการประเมินศักยภาพของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorosarcinopsis* spp.  
ที่คัดแยกจากดินเพื่อการผลิตลิโตแคโรทีนอยด์



โดย  
นางสาวปัลลดา เชิดชูเกียรติศักดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การจัดจำแนกและการประเมินศักยภาพของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorosarcinopsis* spp.  
ที่คัดแยกจากดินเพื่อการผลิตลิโตแคโรทีนอยด์



โดย  
นางสาวปีลดา เชิดชูเกียรติศักดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**CLASSIFICATION AND EVALUATION OF THE SOIL GREEN MICROALGAE  
*CHLOROSARCINOPSIS* SPP. FOR KETOCAROTENOID PRODUCTION**



**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree**

**Master of Science Program in Biology**

**Department of Biology**

**Graduate School, Silpakorn University**

**Academic Year 2015**

**Copyright of Graduate School, Silpakorn University**

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การจัดจำแนกและการประเมินศักยภาพของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorosarcinopsis* spp. ที่คัดแยกจากดินเพื่อการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์” เสนอโดย นางสาวปิลดา เชิดชูเกียรติศักดิ์ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศน์วงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร.ธัญนันท์ วรรณจง

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลนาถ ออบสุวรรณ)

...../...../.....

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ หยกทองวัฒนา)

...../...../.....

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธิ์า)

...../...../.....

..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ธัญนันท์ วรรณจง)

...../...../.....



56303205 : สาขาชีววิทยา

คำสำคัญ : คีโตแคโรทีนอยด์ / แคนธาแซนธิน / *Chlorosarcinopsis* / สภาวะขาดแคลนไนโตรเจน

ปิลดา เขิดชูเกียรติศักดิ์ : การจัดจำแนกและการประเมินศักยภาพของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorosarcinopsis* spp. ที่คัดแยกจากดินเพื่อการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อ.ดร. ธัญนันท์ วรรณธง. 123 หน้า.

คีโตแคโรทีนอยด์เป็นสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากได้รับการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านโภชนศาสตร์ เกษศาสตร์ รวมถึงอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและสัตว์ปีก งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ที่มีความสามารถในการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์อย่างโดดเด่นภายในท้องถิ่น ผลจากการคัดแยกสาหร่ายจากตัวอย่างดินที่เก็บจากโป่งยุบ อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี สามารถคัดแยกสาหร่ายให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ 5 ไอโซเลท (ให้ชื่อ PY01-PY05) สาหร่ายทั้งหมดสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งแบบ autotroph mixotroph และ heterotroph โดยภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ mixotroph (เติมอะซิเตท) โคโลนีของสาหร่ายเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีแดงอย่างเห็นได้ชัดภายในระยะเวลาหนึ่งเดือน เมื่อนำตัวอย่างสาหร่ายในระยะที่มีสีแดงไปวิเคราะห์สารสีแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง ultrahigh performance liquid chromatography (UPLC) พบว่า สาหร่ายทั้ง 5 ไอโซเลทมีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ อันได้แก่ adonixanthin echinenone 3-OH-echinenone และมี canthaxanthin เป็นรงควัตถุชนิดเด่น และจากการวิเคราะห์ปริมาณ canthaxanthin content ในสาหร่ายแต่ละไอโซเลท พบว่า ไอโซเลทที่ให้ปริมาณของค่าดังกล่าวสูงที่สุดคือ PY02 รองลงมาได้แก่ PY05 PY03 PY01 และ PY04 ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับลักษณะทางอนุชีววิทยาของยีน *tufA* และ 18S rDNA บ่งชี้ว่าสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลทเป็นสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* และแม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของสาหร่ายทั้ง 5 นั้นจะมีความคล้ายคลึงกันมาก หากแต่ ข้อมูลของลักษณะทางสรีรวิทยา (ชนิดของแหล่งคาร์บอนจากภายนอกที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ ระดับความสามารถในการทนเค็ม และสีของโคโลนีบนอาหารสูตร Bold's basal medium) และลักษณะทางอนุชีววิทยา (RAPD และ 18S rDNA) สามารถจัดจำแนกสาหร่ายเหล่านี้ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยสาหร่ายไอโซเลท PY01 PY02 PY03 และ PY04 ในขณะที่กลุ่มที่ 2 มีไอโซเลท PY05 เพียงชนิดเดียว

จากคุณสมบัติที่มีปริมาณ canthaxanthin content สูงสุดของสาหร่ายไอโซเลท PY02 สาหร่ายดังกล่าวจึงถูกเลือกมาศึกษาต่อถึงผลของสภาวะขาดแคลนไนโตรเจน และปริมาณอาหารที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ ผลจากการศึกษาพบว่า สาหร่าย PY02 มีการสร้างมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นถึง 16% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีไนโตรเจนลดลง 50% นอกจากนี้แล้วปริมาณ canthaxanthin content ยังเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจาก 520 ไปเป็น 1504 และ 1427  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  ( $P<0.05$ ) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีไนโตรเจนลดลงเหลือ 50% และ 10% ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายดังกล่าวในอาหารเหลวที่มีปริมาณแตกต่างกัน ได้แก่ 15 30 และ 60 มิลลิลิตร พบว่า ปริมาณอาหารที่น้อยลงส่งผลให้สาหร่ายมีศักยภาพในการผลิตมวลชีวภาพและ canthaxanthin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ )

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา .....

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ .....

56303205: MAJOR: BIOLOGY

KEY WORD: KETOCAROTENOID / CANTHAXANTHIN / *CHLOROSARCINOPSIS* / NITROGEN DEPRIVATION

PEELADA CHERDCHUKEATTISAK: CLASSIFICATION AND EVALUATION OF THE SOIL GREEN MICROALGAE *CHLOROSARCINOPSIS* SPP. FOR KETOCAROTENOID PRODUCTION. THESIS ADVISOR: THANYANAN WANNATHONG, Ph.D. 123 pp.

Ketocarotenoids are commercially important carotenoid pigments that have applications in the nutraceutical, pharmaceutical, aquaculture and poultry industries. This study aimed to isolate indigenous ketocarotenoid-producing algae with a distinctive capability from soil samples collected from Pongyup, Suanpueng, Ratchaburi province. Five isolates of axenic algal cultures were obtained (assigned PY01-PY05) and they were able to grow autotrophically, mixotrophically and heterotrophically. Remarkably, colony colour of the algae changed from green to deep red within one month under mixotrophic condition (adding acetate). Carotenoid pigment analysis of the red algal cells using ultrahigh performance liquid chromatography (UPLC) found that all 5 isolates can synthesize and accumulate the ketocarotenoids including adonixanthin, echinenone and 3-OH-echinenone, with canthaxanthin as a dominant pigment. Quantification of canthaxanthin in the algae disclosed that PY02 had the highest canthaxanthin content followed by PY05 PY03 PY01 and PY04, respectively.

Morphological investigation along with *tufA* gene and 18S rDNA information revealed that all 5 Pongyup algae are members of the genus *Chlorosarcinopsis*. Although their morphological characters under light microscope were very similar, the biochemical characters (an ability to utilize the different exogenous carbon sources, salinity tolerance capacity and colony colour on the Bold's basal medium) and molecular features (RAPD and 18S rDNA) classify the algae into two groups; the first group is PY01 PY02 PY03 and PY04 whereas the second group is only PY05.

From the highest canthaxanthin content, the alga PY02 was selected to further study the effects of nitrogen deprivation and different media volume on its growth and canthaxanthin production. Interestingly, an increase of 16% in biomass production of PY02 was obtained from a 50% nitrogen reduction agar culture. Significant enhancements of canthaxanthin content from 520 to 1504 and 1427  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  were detected ( $P<0.05$ ) under 50% and 10% nitrogen culture condition, respectively. Notably, in liquid media volumes of 15, 30 and 60 ml, the lower volume offered a significantly higher biomass and canthaxanthin production ( $P<0.05$ ).

---

Department of Biology

Graduate School, Silpakorn University

Student's signature .....

Academic Year 2015

Thesis Advisor's signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์นี้ของข้าพเจ้าคงไม่สามารถสำเร็จได้อย่างสมบูรณ์ หากขาดความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่านที่มีส่วนร่วมในส่วนสำคัญของงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ธัญนันท์ วรรณธง ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์นี้ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและสอนเทคนิคมากมายที่ใช้ในการทดลอง รวมไปถึงการให้คำปรึกษาแนะนำทั้งในเรื่องการเรียนและการดำเนินชีวิต สั่งสอนให้ข้าพเจ้าสามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการทดลองได้ด้วยตนเองอย่างมีเหตุผล และเป็นบุคคลสำคัญที่ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบพระคุณ Professor Paul D Fraser ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมี อีกทั้งยังให้คำแนะนำในการตรวจวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ ขอขอบพระคุณ Dr. Marilise Nogueira และ Mr. Chris Gerrish ที่ให้ความ मदูแลข้าพเจ้า และสอนเทคนิคมากมายที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ ในระหว่างที่ข้าพเจ้าทำการทดลองอยู่ ณ ประเทศอังกฤษ ขอขอบพระคุณ Professor Saul Purton ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางด้านอนุชีววิทยา ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ยศเวท สิริจามร ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำวิธีการใช้โปรแกรมในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คมศร ลมไธสง และคุณจิราภรณ์ พิมพ์ภูมิ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคพิศิษฐ์ เทพลีธา ที่ให้ความอนุเคราะห์ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค RAPD ทั้งยังที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์นี้ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลนาถ ออบสุวรรณ ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ หยกทองวัฒนา ที่ให้ความกรุณาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคุณณรงค์ สามงามนึ่ง ที่กรุณาช่วยจัดหาอุปกรณ์ที่ขาดแคลนในห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี ขอขอบคุณนางสาวเข็มสรารัตน์ไพบูลย์กิจ ที่คอยเป็นเพื่อนที่ปรึกษา ให้คำแนะนำและคอยช่วยเหลือซึ่งกันและกันตลอดมา ขอขอบคุณน้องๆ ห้องปฏิบัติการสาหร่ายทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือบางประการและทำให้ห้องปฏิบัติการมีสีสัน และขอขอบคุณนายพันต์ อุตุมพร ที่คอยให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่ชาย ของข้าพเจ้า ที่คอยสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกด้าน ทั้งการเรียน การดำรงชีวิต และยังคงคอยให้ความรักและกำลังใจแก่ข้าพเจ้า บุคคลทั้งสามเป็นส่วนหนึ่งในความสำเร็จทุกก้าวของข้าพเจ้าเสมอมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
ประโยชน์ที่ได้รับ.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
การใช้อักษรย่อ.....	4
2 ทบทวนเอกสาร.....	5
แคโรทีนอยด์.....	5
คีโตแคโรทีนอยด์.....	8
ประโยชน์ของแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก.....	10
แคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก.....	12
สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่สามารถสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์.....	14
ปัจจัยที่กระตุ้นการสะสมแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิในสาหร่าย.....	15
ชีววิทยาและการจัดจำแนกสาหร่ายสกุล <i>Chlorosarcinopsis</i> .....	18
3 วิธีการศึกษา.....	24
วัสดุและอุปกรณ์.....	24
สารเคมี.....	25
วิธีการทดลอง.....	28
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล.....	40
การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีความสามารถในการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์.....	40
ลักษณะทางสรีรวิทยาของสาหร่ายโป่งยุบ.....	42
ชนิดของแคโรทีนอยด์ที่ตรวจพบในสาหร่ายโป่งยุบ.....	49
การจัดจำแนกสาหร่ายโป่งยุบ.....	55
ปริมาณไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ในสาหร่าย <i>Chlorosarcinopsis</i> PY02.....	76



ปริมาณอาหารต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคนธาสแซนธินในสาหร่าย <i>Chlorosarcinopsis</i> PY02.....	84
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....	88
รายการอ้างอิง.....	89
ภาคผนวก.....	108
ประวัติผู้วิจัย.....	123



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1	คีโตแคโรทีนอยด์ชนิดเด่นในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่ได้รับการรายงาน..... 14
2-2	ปัจจัยที่กระตุ้นให้สาหร่ายมีการสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ ..... 17
3-1	โอลิโกนิวคลีโอไทด์สำหรับยีน <i>tufA</i> และ 18S rDNA ..... 26
3-2	โอลิโกนิวคลีโอไทด์สำหรับเทคนิค RAPD ..... 26
3-3	โปรแกรมในการวิเคราะห์สารแคโรทีนอยด์ตัวอย่างด้วยเครื่อง UPLC ..... 32
3-4	Retention time และ spectrum ของสารแคโรทีนอยด์มาตรฐาน..... 32
3-5	ข้อมูลลักษณะทางสรีรวิทยาวิเคราะห์ในระบบตัวเลขของสาหร่ายโป่งยุบ ..... 34
4-1	แคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่ายโป่งยุบ ..... 49
4-2	ดัชนีความคล้ายคลึงจากลักษณะทางสรีรวิทยา 37 ลักษณะของสาหร่ายโป่งยุบ ..... 60
4-3	ดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของสาหร่ายโป่งยุบ ..... 63
4-4	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>tufA</i> กับฐานข้อมูล NCBI GenBank..... 66
4-5	ร้อยละความคล้ายคลึงจากลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน <i>tufA</i> ของสาหร่ายโป่งยุบ ..... 68
4-6	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA กับฐานข้อมูล NCBI GenBank ..... 70
4-7	ร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 18S rDNA ของสาหร่ายโป่งยุบ..... 71
4-8	สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่ใช้ร่วมในการสร้างแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ .... 73
4-9	ผลของไนโตรเจนต่อการผลิตมวลชีวภาพและอัตราการเจริญเติบโตสัมพันธ์ของ <i>Chlorosarcinopsis</i> PY02..... 79
4-10	ผลของไนโตรเจนต่อปริมาณและศักยภาพในการผลิตแคนธแซนธินของ <i>Chlorosarcinopsis</i> PY02..... 83
4-11	ผลของปริมาณอาหารต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคนธแซนธินของสาหร่าย <i>Chlorosarcinopsis</i> PY02..... 86
4-12	ข้อมูลเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตแคนธแซนธิน ..... 87

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2-1	โครงสร้างของแคโรทีนอยด์บางชนิดในกลุ่มแคโรทีนและกลุ่มแซนโทฟิลล์ ..... 6
2-2	แผนภาพจำลองแสดงการแทรกตัวของโมเลกุลแอสตาแซนธินบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ..... 8
2-3	สัณฐานวิทยาใต้กล้องจุลทรรศน์ของสาหร่ายที่ใช้เป็นแหล่งแคโรทีนอยด์ระดับอุตสาหกรรม.. 11
2-4	วิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ปฐมภูมิและทุติยภูมิในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก..... 13
2-5	สัญญาณจากสภาวะแวดล้อมในธรรมชาติที่กระตุ้นให้สาหร่ายสะสมแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ ..... 16
2-6	ภาพวาดลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์สาหร่าย <i>Chlorosarcinopsis</i> spp..... 20
3-1	แผนภาพแสดงวิธีการแปลผล RAPD DNA fingerprint ให้อยู่ในระบบตัวเลข..... 37
4-1	การเปลี่ยนสีโคลีนีจากสีเขียวไปเป็นสีแดงของสาหร่ายโป่งยุบ..... 41
4-2	ชนิดอาหาร อุณหภูมิที่เหมาะสมและรูปแบบการเจริญของสาหร่ายโป่งยุบ ..... 43
4-3	การเจริญเติบโตบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันของสาหร่ายโป่งยุบ ..... 45
4-4	ผลแหล่งไนโตรเจน การเติมเกลือ และอาหารสูตร BBM ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายโป่งยุบ ..... 48
4-5	โครมาโตแกรมและสเปกตรัมของแคโรทีนอยด์จากสารสกัดของสาหร่ายโป่งยุบ..... 50
4-6	วิธีการสังเคราะห์แอสตาแซนธินโดยมีเบตาแคโรทีนเป็นสารตั้งต้น..... 51
4-7	ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายไอโซเลท PY02..... 53
4-8	ปริมาณแคโรทีนในสาหร่ายโป่งยุบ ..... 54
4-9	ลักษณะโคลีนีของสาหร่าย PY02 บนอาหารแข็งจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ..... 55
4-10	สัณฐานวิทยาของเซลล์สาหร่ายโป่งยุบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ..... 57
4-11	ลักษณะของซูเปอร์และถุงไขมันใต้กล้องจุลทรรศน์ในสาหร่ายโป่งยุบ..... 58
4-12	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์จากลักษณะทางสรีรวิทยาของสาหร่ายโป่งยุบ..... 60
4-13	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RAPD ของสาหร่ายโป่งยุบจากไพรเมอร์ 12 ชนิด..... 62
4-14	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากข้อมูล RAPD ของสาหร่ายโป่งยุบ..... 64
4-15	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน <i>tufA</i> จากสาหร่ายโป่งยุบ..... 66
4-16	แผนภูมิสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่ายโป่งยุบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>tufA</i> . 68
4-17	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน 18S rDNA จากสาหร่ายโป่งยุบ ..... 69
4-18	แผนภูมิสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่ายโป่งยุบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA..... 72
4-19	การจัดกลุ่มสาหร่ายโป่งยุบด้วยข้อมูลลักษณะต่างๆ ..... 75
4-20	ผลของปริมาณไนโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงสีของ <i>Chlorosarcinopsis</i> PY02..... 77
4-21	การเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorosarcinopsis</i> PY02 ..... 78
4-22	ผลของไนโตรเจนต่อ carotenoid profile ของสาหร่าย <i>Chlorosarcinopsis</i> PY02 ..... 81
4-23	ผลของปริมาณอาหารต่อการเปลี่ยนสีของสาหร่าย <i>Chlorosarcinopsis</i> PY02..... 87

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ที่มาและความสำคัญ

คีโตแคโรทีนอยด์ หมายถึง รังควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันคีโตน (ketone functional group, C=O) อยู่ในโมเลกุล อาทิ แอสตาแซนธิน (astaxanthin) และแคนธาแซนธิน (canthaxanthin) สารกลุ่มนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพราะได้รับการนำไปใช้ประโยชน์ในหลากหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นโภชนศาสตร์ เภสัชศาสตร์ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และโดยเฉพาะอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและสัตว์ปีก (Eonseon et al., 2006, Guerin et al., 2003, Lorenz and Cysewski, 2000) เนื่องจากคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง (Naguib, 2000) จึงมีผลงานวิจัยจำนวนมากที่สนใจศึกษาและได้กล่าวถึงคุณสมบัติของคีโตแคโรทีนอยด์ในการป้องกันโรคและอาการป่วยที่เกิดขึ้นในมนุษย์จำนวนมาก อาทิ ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคเมเร็งชนิดต่างๆ (Nishino et al., 2002) และโรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน (Fassett and Coombes, 2012) ป้องกันการอักเสบ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Park et al., 2010) และยังสามารถชะลอความแก่ชราได้ (Kidd, 2011) ยิ่งไปกว่านั้น ในอุตสาหกรรมฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและสัตว์ปีกเพื่อการอุปโภค นอกจากสารดังกล่าวจะถูกใช้เป็นสารให้สีจากธรรมชาติ (natural colourant) เพื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงสัตว์เพื่อเร่งให้ผลผลิตจากสัตว์เหล่านั้นมีสีที่ผู้บริโภคพึงพอใจแล้ว ยังพบว่า คีโตแคโรทีนอยด์ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและลดอัตราการตาย และ/หรือ เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของสัตว์ที่ได้รับอีกด้วย (Baker and Gunther, 2004, Zhang et al., 2013) ดังเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น จึงไม่น่าแปลกใจที่ความต้องการของคีโตแคโรทีนอยด์ในตลาดโลกนั้นค่อนข้างสูง โดยมูลค่าทางการตลาดนั้นมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นตลอดเวลา โดยได้มีการประมาณมูลค่าการตลาดไว้ถึงประมาณ 1 พันล้านดอลลาร์สหรัฐในปี 2020 (Healthcare and Pharma, 2015) แต่อย่างไรก็ตาม ในธรรมชาติกลับมีสิ่งมีชีวิตเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่มีความสามารถในการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ และมีศักยภาพเพียงพอในการเป็นแหล่งผลิตของสารสีกลุ่มนี้ในระดับอุตสาหกรรม (Yokoyama et al., 1994, Rodríguez-Sáiz et al., 2010)

สาหร่ายขนาดเล็กจัดเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตสังเคราะห์แสงที่ให้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ต่อหน่วยพื้นที่สูง (Leite et al., 2013) และมีงานวิจัยจำนวนมากที่กล่าวถึงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กบางชนิดว่า มีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ไว้ในเซลล์ได้อย่างโดดเด่น ขณะที่ต้องการเพียงธาตุอาหารไม่กี่ชนิดร่วมกับพลังงานจากแสงอาทิตย์และคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ (Hata et al., 2001, Del Campo et al., 2004) ด้วยเหตุนี้เอง แม้การผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ด้วยการสังเคราะห์ทางเคมีจะเป็นทางเลือกที่มีต้นทุนการผลิตต่ำกว่า แต่ในขณะนี้ สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก

*Haematococcus pluvialis* ซึ่งเป็นแหล่งผลิตคีโตแคโรทีนอยด์จากธรรมชาติเพียงแหล่งเดียวที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมกลับได้รับความนิยมมากกว่า เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้สามารถสะสม astaxanthin ภายในเซลล์ได้สูงสุดถึง 4% ของมวลชีวภาพ (w/w) แคโรทีนอยด์ชนิดนี้จาก *H. pluvialis* ได้รับการยืนยันจากงานวิจัยจำนวนมากว่ามีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารชนิดเดียวกันที่สังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี หรือ synthetic carotenoid (Kobayashi and Sakamoto, 1999) ผลจากงานวิจัยกล่าวเพิ่มเติมไปในทิศทางเดียวกันว่า การสร้างและสะสมคีโตแคโรทีนอยด์รวมถึง astaxanthin เป็นกลไกของสาหร่ายเพื่อที่จะตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม อาทิ ความเข้มแสงสูง ความเค็มสูง และการขาดแคลนสารอาหาร (Kobayashi et al., 1992a, Kobayashi et al., 1997b, Fabregas et al., 1998)

อย่างไรก็ตาม ด้วยข้อจำกัดหลายประการในการเพาะเลี้ยง *H. pluvialis* ไม่ว่าจะเป็นอัตราการเจริญที่ค่อนข้างต่ำ ปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ต้องการอุณหภูมิต่ำในการเจริญเติบโต และความจำเป็นที่ต้องกระตุ้นให้เข้าสู่ระยะซิสต์ (cyst cells) เซลล์จึงจะสร้างคีโตแคโรทีนอยด์ที่ต้องการ (Margalith, 1999, Han et al., 2013) สิ่งทีกล่าวมานี้ล้วนเป็นอุปสรรคต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ในระดับอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศเขตร้อน จึงทำให้ยังคงมีงานวิจัยจำนวนมากที่มุ่งเสาะหาสาหร่ายขนาดเล็กชนิดอื่นที่อาจมีศักยภาพมาทดแทน *H. pluvialis* อย่างต่อเนื่อง (Aburai et al., 2015, Grama et al., 2014) หากสามารถค้นหาสาหร่ายที่ผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ได้ปริมาณสูงจากภายในท้องถิ่นที่สามารถเจริญเติบโตและปรับตัวได้ดีในสภาพแวดล้อมแบบเขตร้อนของประเทศไทย ผลจากการศึกษาวิจัยสาหร่ายที่ค้นพบและแยกเพาะเลี้ยงได้ย่อมสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปสู่การศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ในระดับอุตสาหกรรมภายในท้องถิ่นต่อไปในอนาคต

งานวิจัยชิ้นนี้มีความมุ่งหมายหลักเพื่อเสาะหาสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสายพันธุ์ไทยภายในท้องถิ่นภาคตะวันตก ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมสารกลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ได้อย่างโดดเด่น โดยทำการคัดแยกสาหร่ายจากตัวอย่างดินโป่งยุบ อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี พร้อมทั้งมุ่งที่จะศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายสะสม จัดจำแนกและระบุชนิดสาหร่ายเหล่านั้น รวมไปถึงศึกษาปัจจัยกระตุ้นที่ส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์มากขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลในการประเมินศักยภาพการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายที่คัดแยกได้ ด้วยความคาดหวังว่าผลจากการศึกษานี้จะนำเสนอทางเลือกและข้อมูลใหม่ของสาหร่ายที่เป็นแหล่งผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ภายใต้สภาพภูมิอากาศเขตร้อนของประเทศไทย

## วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อคัดแยกสาหร่ายที่มีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ในท้องถิ่น
2. เพื่อจัดจำแนกสาหร่ายที่มีความสามารถในการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ที่คัดแยกได้
3. เพื่อศึกษาผลของสภาวะขาดแคลนไนโตรเจนและปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายที่คัดแยกได้

## ประโยชน์ที่ได้รับ

1. พบสาหร่ายที่มีความสามารถในการสังเคราะห์สารกลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ภายในท้องถิ่นภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
2. สามารถจัดจำแนกและระบุได้ว่าสาหร่ายที่มีความสามารถในการสังเคราะห์สารกลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ที่คัดแยกได้นั้นเป็นสาหร่ายกลุ่มใด
3. ทราบผลของสภาวะขาดแคลนไนโตรเจนและปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายที่คัดแยกได้

## ขอบเขตของงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้จะทำการคัดแยกสาหร่ายจากดินที่เก็บจาก โป่งยุบ อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยจะเลือกเฉพาะสาหร่ายไอโซเลทที่สามารถสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ได้เท่านั้นมาทำการศึกษา ต่อ ทำการจัดจำแนกและระบุชนิดสาหร่ายจนถึงระดับอนุกรมวิธานที่มีข้อมูลที่น่าเชื่อถือเพียงพอ รวมถึงศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการ จากนั้นจึงจัดจำแนกความแตกต่างระหว่างสาหร่ายแต่ละไอโซเลท แล้วคัดเลือกสาหร่าย 1 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ที่มีมูลค่าสูง เพื่อนำไปศึกษาต่อถึงผลของสภาวะขาดแคลนไนโตรเจน และปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์

## การใช้ตัวย่อ

คำศัพท์	ตัวย่อ
acetate	Ac
basic local alignment search tool	BLAST
blue green 11 medium	BG11
Bold's basal medium	BBM
canthaxanthin	CA
dry weight	DW
fresh weight	FW
fructose	Fr
gram	g
high salt medium	HSM
liter	L
microgram	$\mu$ g
micrometer	$\mu$ m
milligram	mg
millimeter	mm
milliliter	ml
national center for biotechnology information	NCBI
nitrogen	N
polymerase chain reaction	PCR
Pong-yup	PY
pyruvate	Py
random amplification of polymorphic DNA	RAPD
second	s
ribosomal DNA	rDNA
translation elongation factor	<i>tufA</i>
ultrahigh performance liquid chromatography	UPLC
unweighted pair group method with arithmetic mean	UPGMA
xylose	Xy

## บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร

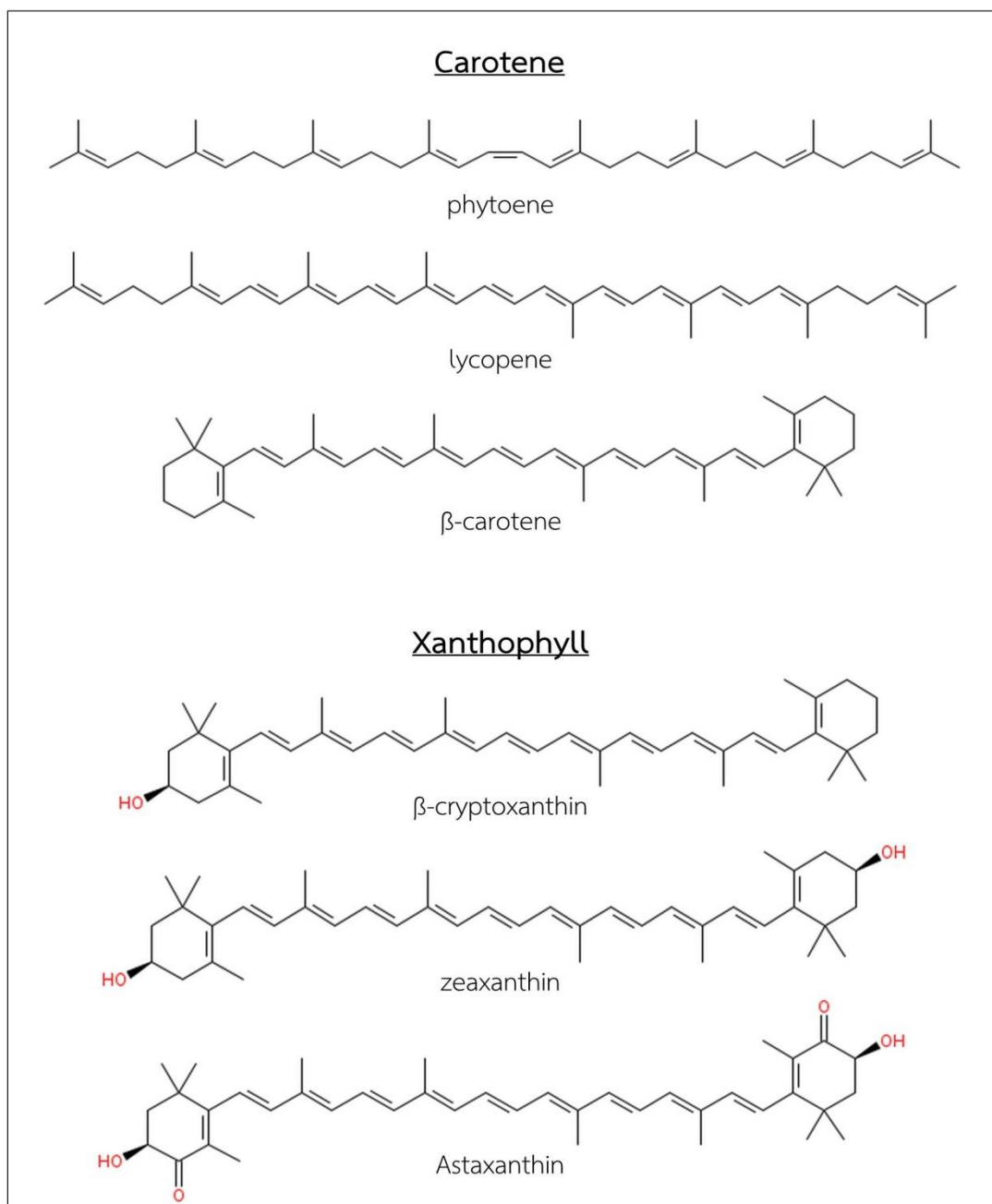
### 1. แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นรงควัตถุอินทรีย์ (organic pigments) โดยพบว่า นอกจากแคโรทีนอยด์ชนิดแรกในวิธีการสังเคราะห์ที่เป็นสารไม่มีสีแล้ว แคโรทีนอยด์ชนิดอื่นพบว่ามีสีอยู่ในช่วงตั้งแต่สีเหลืองจนถึงสีแดง รงควัตถุกลุ่มนี้นับได้ว่ามีอนุพันธ์หลากหลายที่สุดในบรรดารงควัตถุต่างๆที่ปรากฏอยู่ในธรรมชาติ โดยปัจจุบันพบโครงสร้างที่มีรายงานแล้วกว่า 750 รูปแบบ (Takaichi, 2011) สารกลุ่มนี้พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่สามารถสังเคราะห์แสง รวมไปถึงเชื้อรา ยีสต์ (Ojima et al., 2006) และแบคทีเรียบางชนิด (Misawa et al., 1995) และยังพบอีกว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดอาจสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์ที่ต่างชนิดและปริมาณกันออกไป ทั้งนี้เนื่องมาจากแต่ละสิ่งมีชีวิตมีวิถีในการสังเคราะห์ (biosynthesis pathway) ที่แตกต่างและหลากหลาย อย่างไรก็ตาม หน้าที่หลักที่สำคัญของแคโรทีนอยด์ในสิ่งมีชีวิตสังเคราะห์แสง (photosynthetic organism) เช่น พืช สาหร่าย และไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) นั้นไม่แตกต่างกัน โดยแคโรทีนอยด์มีหน้าที่เป็นรงควัตถุเสริมที่ช่วยดักเก็บพลังงานจากแสงในช่วงความยาวคลื่นที่รงควัตถุหลัก เช่น คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll a) และคลอโรฟิลล์บี (chlorophyll b) ไม่สามารถดูดกลืนได้ รวมไปถึงปกป้องส่วนประกอบต่างๆที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthetic apparatus) จากความเสียหายและอันตรายจากแสง (Bartley and Scolnik, 1995) อีกทั้งยังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ตามธรรมชาติภายในเซลล์อีกด้วย (Krinsky, 1989)

แคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นเอกลักษณ์เฉพาะกลุ่ม โดยโมเลกุลของแคโรทีนอยด์ทุกชนิดจะมีโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยคาร์บอน (carbon) 40 อะตอม และภายในโมเลกุลจะมีพันธะคู่ (double bond) อยู่มาก โดยรูปแบบของการเชื่อมต่อกันระหว่างอะตอมของคาร์บอนด้วยพันธะคู่ภายในสายโครงสร้างโพลีอินแบคโบน (polyene backbone) ของแคโรทีนอยด์นี้เอง ที่เป็นตัวกำหนดความสามารถของแคโรทีนอยด์ในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆในกระบวนการสังเคราะห์แสงของแคโรทีนอยด์แต่ละชนิด (Britton, 1995) อีกทั้งยังเป็นบริเวณที่ส่งเสริมให้เกิดกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของแคโรทีนอยด์ (Stahl and Sies, 2003)

นอกจากนี้แล้วในแคโรทีนอยด์หลายชนิดจะสามารถพบโครงสร้างที่เป็นวงแหวนบริเวณส่วนปลายของโมเลกุล ซึ่งบริเวณนี้จะเป็นตำแหน่งที่สามารถเติมหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่มีออกซิเจนได้ ด้วยส่วนประกอบของธาตุต่างๆในโมเลกุลจากการถูกเติมหมู่ฟังก์ชันนี้ สามารถจัดกลุ่มของแคโรทีนอยด์ได้เป็นสองกลุ่ม (Goodwin, 2012) ได้แก่ แคโรทีน (carotene) หมายถึงกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีเพียงคาร์บอนและไฮโดรเจนอยู่ในโมเลกุลเท่านั้น และกลุ่มที่สองคือ แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) หมายถึงกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีทั้ง คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล โดยตัวอย่างโครงสร้างของโมเลกุลแคโรทีนอยด์ในแต่ละกลุ่มแสดงในรูปที่ 2-1





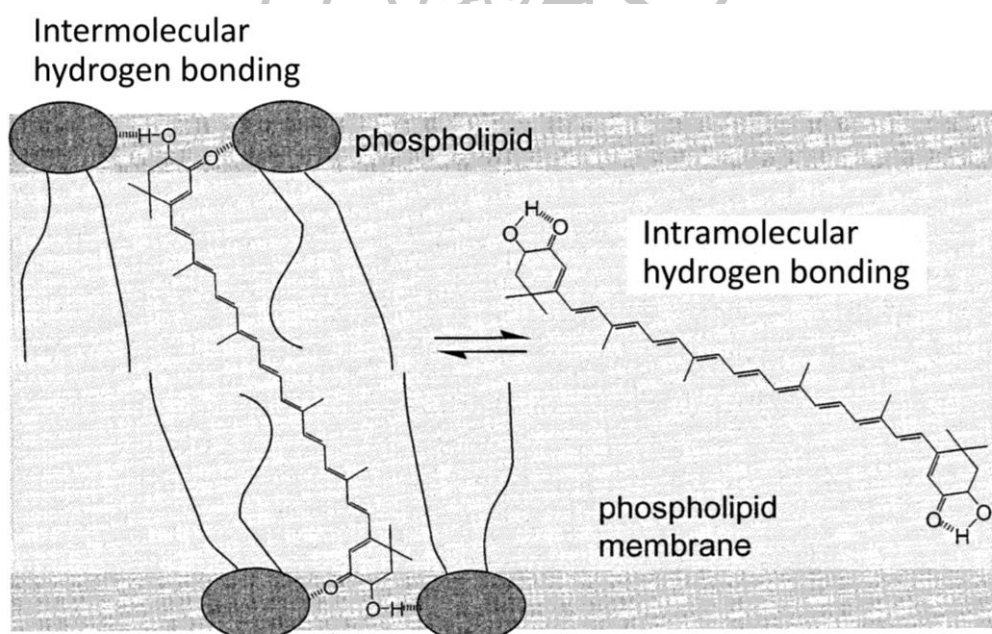
รูปที่ 2-1 โครงสร้างของแคโรทีนอยต์ในกลุ่มแคโรทีนและกลุ่มแซนโทฟิลล์บางชนิด  
ที่มา: ดัดแปลงจาก Guaratini และคณะ (2009) และ Schaub และคณะ (2012)

มนุษย์รู้จักสารกลุ่มแคโรทีนอยด์จากประโยชน์ที่เกิดจากการบริโภค เนื่องด้วยคุณสมบัติของแคโรทีนอยด์ที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์หรือละลายในไขมันได้ดี (lipid soluble) จึงทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ได้ง่าย โดยในสัตว์ (Olson, 1989) นั้นแคโรทีนอยด์จะถูกนำไปเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์วิตามินเอ (provitamin a) ซึ่งส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อคิวติเคิล (cuticle) เช่น ฟัน เล็บ เส้นผม รวมไปถึงบำรุงสายตาและการมองเห็น นอกจากนี้ แคโรทีนอยด์ก็ยังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ หรือที่รู้จักกันในชื่อ antioxidative agent (Krisinsky, 1989) ซึ่งประโยชน์อย่างหลังนี้เองที่เพิ่มระดับความสำคัญของแคโรทีนอยด์ให้เป็นที่รู้จักอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสภาพแวดล้อมและการดำรงชีวิตของมนุษย์ในปัจจุบันทำให้มีโอกาสที่จะได้รับสิ่งกระตุ้นที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ได้ตลอดเวลา ไม่ว่าจะเป็นการบริโภคอาหารที่ไม่มีประโยชน์หรือคุณภาพต่ำ ความเครียดจากปัญหาต่างๆในชีวิตประจำวัน มลภาวะในอากาศ หรือรังสีเหนือม่วง (ultraviolet ray : UV) ที่เพิ่มมากขึ้นจากการถูกทำลายของชั้นโอโซนในบรรยากาศที่เป็นผลมาจากภาวะโลกร้อน (global warming) สาเหตุเหล่านี้ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นและรวดเร็วขึ้น ทำให้กระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระตามธรรมชาติของร่างกายเกิดความไม่สมดุล และเป็นที่มาของปัญหาสุขภาพมากมาย เช่น การเสื่อมสภาพของอวัยวะหรือเกิดริ้วรอยก่อนวัย โรคหัวใจ โอกาสของการเกิดโรคมะเร็งที่เพิ่มมากขึ้น เป็นต้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันก็มีผลงานวิจัยที่ยืนยันว่า ความเสี่ยงของปัญหาเหล่านี้สามารถลดลงได้ด้วยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับเพิ่มจากภายนอกร่างกาย (Johnson, 2002, Chen et al., 2013)

ธรรมชาติของมนุษย์และสัตว์ชนิดอื่นๆ ไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้เอง (Barker and Pilbeam, 2015) จำเป็นต้องได้รับจากการบริโภคอาหารเท่านั้น โดยแคโรทีนอยด์พบได้ในผักและผลไม้เกือบทุกชนิดในปริมาณที่มากน้อยแตกต่างกันไป มักพบแคโรทีนอยด์ปริมาณสูงในพืชที่มีสีเหลือง ส้ม หรือแดงสด อันเป็นสีของแคโรทีนอยด์นั่นเอง แคโรทีนอยด์ชนิดที่มีความสำคัญและมีผลงานวิจัยอย่างต่อเนื่อง เช่น ไลโคปีน (lycopene) ที่พบมากใน มะเขือเทศ (Agarwal and Rao, 2000) ฟักข้าว (Aoki et al., 2002) และมะละกอ (Wilberg and Rodriguez-Amaya, 1995) เบตาแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) ที่พบมากในแครอท (Chen et al., 1995) และแอสตาแซนธิน (astaxanthin) หรือแคนธาแซนธิน (canthaxanthin) ซึ่งจัดเป็นสารกลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ (ketocarotenoid) ซึ่งแคโรทีนอยด์ชนิดหลังนี้เป็นชนิดที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก (Guerin et al., 2003) แต่ไม่สามารถพบได้ในพืชทางการเกษตรที่มนุษย์บริโภคในชีวิตประจำวัน มนุษย์สามารถได้รับจากการบริโภคเนื้อสัตว์บางชนิด เช่น ปลาแซลมอน (salmon) ปลาเทรา (trout) ครัสเตเชีย (crustaceans) บางชนิด (Tolasa et al., 2005, López et al., 2004) อย่างไรก็ตามสัตว์เหล่านี้ไม่สามารถสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ได้เอง แต่เกิดจากการสะสมเมื่อได้รับจากภายนอกเช่นเดียวกัน (Maoka, 2011)

## 2. คีโตแคโรทีนอยด์

คีโตแคโรทีนอยด์ (ketocarotenoid) หมายถึง แคโรทีนอยด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันคีโตน (ketone functional group; C=O) อยู่ในโมเลกุล สารกลุ่มนี้มีลักษณะเด่น คือ เป็นรงควัตถุที่มีสีส้มแดงจนถึงสีแดงเข้ม (Higuera-Ciapara et al., 2006) คีโตแคโรทีนอยด์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้แก่ astaxanthin และ canthaxanthin (Baker and Gunther, 2004) จากการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลที่หลากหลายของแคโรทีนอยด์ในธรรมชาติทำให้พบว่า สารกลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง astaxanthin เมื่อมนุษย์ได้รับเข้าสู่ร่างกายแล้ว สารดังกล่าวจะมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ (Naguib, 2000) จากโครงสร้างของ astaxanthin ที่แสดงในรูปที่ 2-1 จะเห็นว่า ที่ส่วนปลายของวงแหวนทั้งสองข้างโมเลกุลจะมีหมู่ฟังก์ชันคีโตนและหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ (Hydroxyl functional group) ซึ่งที่บริเวณของหมู่ฟังก์ชันทั้งสองนั้นเองที่ช่วยให้โมเลกุลของ astaxanthin สามารถแทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) ซึ่งเป็นฟอสโฟลิปิดสองชั้น (phospholipid bilayer) โดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับชั้น phospholipid (รูปที่ 2-2) ทำให้สามารถเกิดกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งที่บริเวณผิวของชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ภายนอก ภายใน และในระหว่างชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ (Goto et al., 2001)



รูปที่ 2-2 แผนภาพจำลองแสดงการแทรกตัวของโมเลกุลแอสตาแซนธินบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์  
ที่มา: Goto และคณะ (2001)

เนื่องจากคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง คีโตแคโรทีนอยด์จึงได้รับการศึกษาเกี่ยวกับประโยชน์ต่อมนุษย์เป็นจำนวนมาก โดยผลการทดลองเปรียบเทียบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (scavenging capacity) ของ  $\beta$ -carotene และ astaxanthin ในการลดปริมาณอนุมูลอิสระในตับหนูให้ผลสอดคล้องกับค่า scavenging capacity ของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ กล่าวคือ แคโรทีนอยด์ที่ยับยั้งอนุมูลอิสระในตับหนูได้ดีที่สุด คือ astaxanthin (Palozza and Krinsky, 1992) ในขณะเดียวกันก็แสดงค่า scavenging capacity สูงสุดอีกด้วย (Chen et al., 2013) นอกจากนี้ ยังมีรายงานผลการวิจัยที่แสดงถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของคีโตแคโรทีนอยด์ในด้านอื่นๆ อีก เช่น ช่วยชะลอความแก่ชรา (Kidd, 2011) ลดการอักเสบและกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Salguero et al., 2003, Park et al., 2010) ลดการเสื่อมสภาพและปกป้องดวงตา (Johnson, 2002, Nakajima et al., 2008) อีกทั้งยังป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน (Fassett and Coombes, 2011, Fassett and Coombes, 2012) และขณะนี้คุณสมบัติของ astaxanthin ที่ได้รับความสนใจสูงสุด ได้แก่ คุณสมบัติในการลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง (Nagendraprabhu and Sudhandiran, 2011, Nakao et al., 2010, Chew et al., 1998) ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องจากการที่ astaxanthin ช่วยยับยั้งและลดความเสียหายของ DNA damage ซึ่งหมายถึงการลดความเสี่ยงของเซลล์ในการพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง ในขณะที่เดียวกันก็สามารถส่งเสริมกระบวนการตายตามธรรมชาติของระบบเซลล์ (cell apoptosis) และการสื่อสารของเซลล์เมื่อเจริญเติบโตมาชิดกัน (gap junction communication) ทำให้วัฏจักรของการแบ่งตัวของเซลล์สามารถเป็นไปอย่างปกติ (Chen et al., 2013)

ในด้านคุณสมบัติการเป็นสารให้สีจากธรรมชาติ (natural colourant) ที่ปลอดภัยต่อการบริโภค astaxanthin และ canthaxanthin จึงถูกนำไปใช้เป็นสารให้สีแดงในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์หลายชนิด โดยการเติมสารสีดังกล่าวลงในอาหารที่ให้กับสัตว์ในลักษณะของการเป็น feed additive เพื่อให้สีของผลผลิตจากสัตว์เหล่านั้นมีสีส้มแดงตามความต้องการของผู้บริโภค และทำให้ผลผลิตมีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้นไปด้วย เช่น ปลาแซลมอน ปลาเทราต์ (Amaya and Nickell, 2015) และสัตว์ปีกจำพวกไก่ไข่ (Cho et al., 2013, Rodriguez-Amaya, 2016) โดยมีการรายงานว่า canthaxanthin สามารถช่วยส่งเสริมสีให้ไข่แดงของแม่ไก่เนื่องจากสามารถย่อยและดูดซึมไปสะสมในไข่แดงได้ (Baker and Gunther, 2004) ในขณะเดียวกันก็ยังพบอีกว่า คีโตแคโรทีนอยด์ที่เติมในอาหารสัตว์นั้นช่วยส่งเสริมสุขภาพและผลผลิตจากสัตว์ได้อีกด้วย เช่น ผลงานวิจัยที่พบว่า canthaxanthin และ astaxanthin ช่วยส่งเสริมอัตราการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของปลาแซลมอนและปลาเทราต์ (Li et al., 2014, Torrissen, 1984, Zhang et al., 2013) ส่งเสริมอัตราการความสำเร็จในการปฏิสนธิของไข่ (Deufel, 1965) ส่งเสริมระบบต้านอนุมูลอิสระในสัตว์น้ำ (Sheikhzadeh et al., 2012) และยังช่วยป้องกันการเกิดโรคบางชนิดในสัตว์น้ำที่สำคัญทางการเกษตรอีกด้วย (Pettersson and Lignell, 1999)

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากคีโตแคโรทีนอยด์ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ในพืชทางการเกษตร อีกทั้งมีสิ่งมีชีวิตเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถสังเคราะห์สารดังกล่าวได้ อาทิ *Adonis aestivalis* (Mawson, 1995) ซึ่งเป็นพืชดอก *Xanthophyllomyces dendrorhous* ซึ่งเป็นยีสต์ (Ducrey Sanpietro and Kula, 1998) และสิ่งมีชีวิตกลุ่มที่สามารถสังเคราะห์สารชนิดนี้ได้โดยตรง ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กบางชนิด (Yuan et al., 2011) โดยสาหร่ายชนิดที่ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งของ astaxanthin ในระดับอุตสาหกรรมแล้วในปัจจุบันได้แก่ *Haematococcus pluvialis* ซึ่งนับเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหลักชนิดเดียวในขณะนี้ (Guerin et al., 2003)

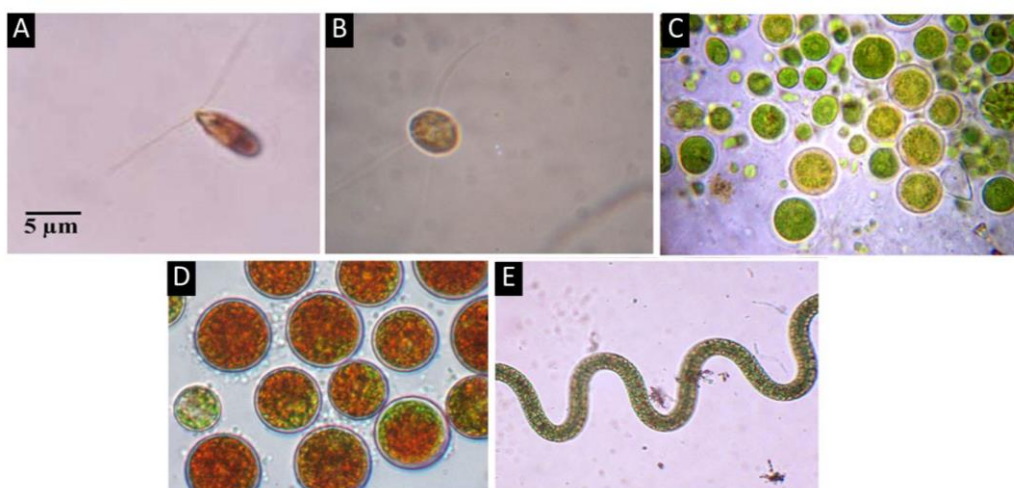
### 3. ประโยชน์ของแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้คล้ายพืช สิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้พบได้ทั่วไปทั้งในแหล่งน้ำ ดินที่มีความชื้น บริเวณที่แห้งแล้ง หรือ ในสภาวะแวดล้อมที่มีความรุนแรง อาทิ หิมะ หรือน้ำพุร้อน (Wehr et al., 2015) สาหร่ายมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสภาพแวดล้อมของโลกเนื่องจากบทบาทของการเป็นผู้ผลิตปฐมภูมิ (primary producer) ในห่วงโซ่อาหาร (Friedmann and Ocampo, 1976) ช่วยรักษาสมดุลทางธรรมชาติ โดยสาหร่ายจะดูดซับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดสภาวะเรือนกระจกเข้าไป แล้วปลดปล่อยแก๊สออกซิเจนออกมาสู่สิ่งแวดล้อมผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงภายในเซลล์ (Hamilton et al., 1992, Meeren, 1991) และเนื่องจากสาหร่ายหลายชนิดเป็นแหล่งของโปรตีนคล้ายเนื้อสัตว์ ทั้งยังมีรายงานการพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญอีกหลายชนิด เช่น โอเมกา 3 (omega 3) ไฟโคไซยานิน ซี (c-phyococyanin) และรงควัตถุกลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ (McCarty, 2007, Milledge, 2011, Adarme-Vega et al., 2014) ในปัจจุบันสาหร่ายจึงถูกนำมาบริโภคและใช้เป็นแหล่งของสารชีวเคมีที่มีมูลค่าจำนวนมาก ซึ่งจะเห็นได้จากอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อการค้าที่มีมูลค่าการในตลาดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Spolaore et al., 2006)

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยพื้นที่สูง (Leite et al., 2013) บางชนิดมีรายงานว่าสามารถผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ในปริมาณมาก โดยใช้เพียงธาตุอาหารหลักบางชนิดร่วมกับพลังงานแสงและคาร์บอนไดออกไซด์ (Hata et al., 2001, Del Campo et al., 2004) อีกทั้งยังคงสามารถพัฒนาศักยภาพด้วยการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงได้อย่างต่อเนื่อง (Varela et al., 2015) สาหร่ายจึงเป็นแหล่งผลิตคีโตแคโรทีนอยด์สำคัญที่มีการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านโภชนาการ (Guerin et al., 2003) เภสัชศาสตร์ และอุตสาหกรรมความงาม (Eonseon et al., 2006) โดยถูกเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมและเป็นสารสีธรรมชาติในเครื่องสำอาง (Spolaore et al., 2006) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายที่ใช้ในผลิตภัณฑ์สำหรับมนุษย์ในหลายๆ ด้านจะเป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย แต่อุตสาหกรรมที่ใช้ประโยชน์จากแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายแหล่งใหญ่ที่สุดกลับเป็นอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Hemaiswarya et al., 2011)

ในปี 2000 อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นส่วนการผลิตสัตว์น้ำสู่ตลาดผู้บริโภคคิดเป็นสัดส่วนถึง 40% ของสัตว์น้ำทั้งหมด และได้ถูกประเมินว่าจะมีการขยายตัวมากขึ้นจนมากกว่า สัตว์น้ำที่จับจากธรรมชาติ ในปี 2020 ถึงปี 2025 (Tacon, 2003) ซึ่งในขณะเดียวกันความต้องการ ผลผลิตของสาหร่ายเพื่อเติมลงในอาหารสัตว์ อันมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อเร่งสีในสัตว์น้ำก็มากขึ้นไป ด้วย โดยพบว่า ในทุกๆ ปีทั่วโลกมีความต้องการผลผลิตเซลล์สาหร่ายประมาณ 5 ล้านกิโลกรัมต่อปี ด้วยมูลค่าทางการตลาดประมาณ 330 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม หรือประมาณ 12,000 บาทไทยต่อกิโลกรัม (Muller-Feuga et al., 2003) ซึ่งจากการสำรวจในปี 1999 พบว่า ในปริมาณการผลิตมวลชีวภาพของสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำ 1,000 ตันนั้น 62% ใช้ในการเพาะเลี้ยงหอยมอลลัสกา (mollusca) 21% ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง และ 16% ใช้ในการเพาะเลี้ยงปลา (Spolaore et al., 2006)

ดังที่ได้กล่าวไปแล้วว่า *Haematococcus pluvialis* เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหลักที่เป็นแหล่งผลิต astaxanthin เนื่องจากพบว่าสามารถสะสม astaxanthin ได้มากถึง 4% ของมวลชีวภาพ (Boussiba, 2000) ซึ่ง astaxanthin และ canthaxanthin ก็เป็นคีโตแคโรทีนอยด์ชนิดที่นิยมใช้เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากที่สุด แต่ด้วยวงจรชีวิตของสาหร่าย *H. pluvialis* ประกอบกับอัตราการเจริญที่ต่ำและเกิดการปนเปื้อนจากจุลชีพอื่นได้ง่าย ทำให้มีการศึกษาวิจัยเพื่อหาสาหร่ายชนิดอื่นที่มีศักยภาพมาทดแทนอยู่เสมอ (Han et al., 2013) โดยสาหร่ายขนาดเล็กชนิดอื่นๆ ที่ปัจจุบันมีการศึกษาและใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อเป็นแหล่งของแคโรทีนอยด์แล้ว ได้แก่ *Dunaliella* sp. *Chlorella* sp. *Chaetoceros* sp. และ *Spirulina* sp. ดังแสดงในรูปที่ 2-3 โดยนอกจากประโยชน์ในการให้สารสีจากธรรมชาติของแคโรทีนอยด์แล้ว ในสาหร่ายดังกล่าวบางชนิดยังมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ เช่น โปรตีน วิตามิน รวมไปถึงกรดไขมันที่มีประโยชน์บางชนิด (Guedes et al., 2010)



รูปที่ 2-3 สัมภาษณ์วิทยากรได้กล้องจุลทรรศน์ของสาหร่ายที่ใช้เป็นแหล่งแคโรทีนอยด์ระดับอุตสาหกรรม ที่มา: Hemaiswarya และคณะ (2011)

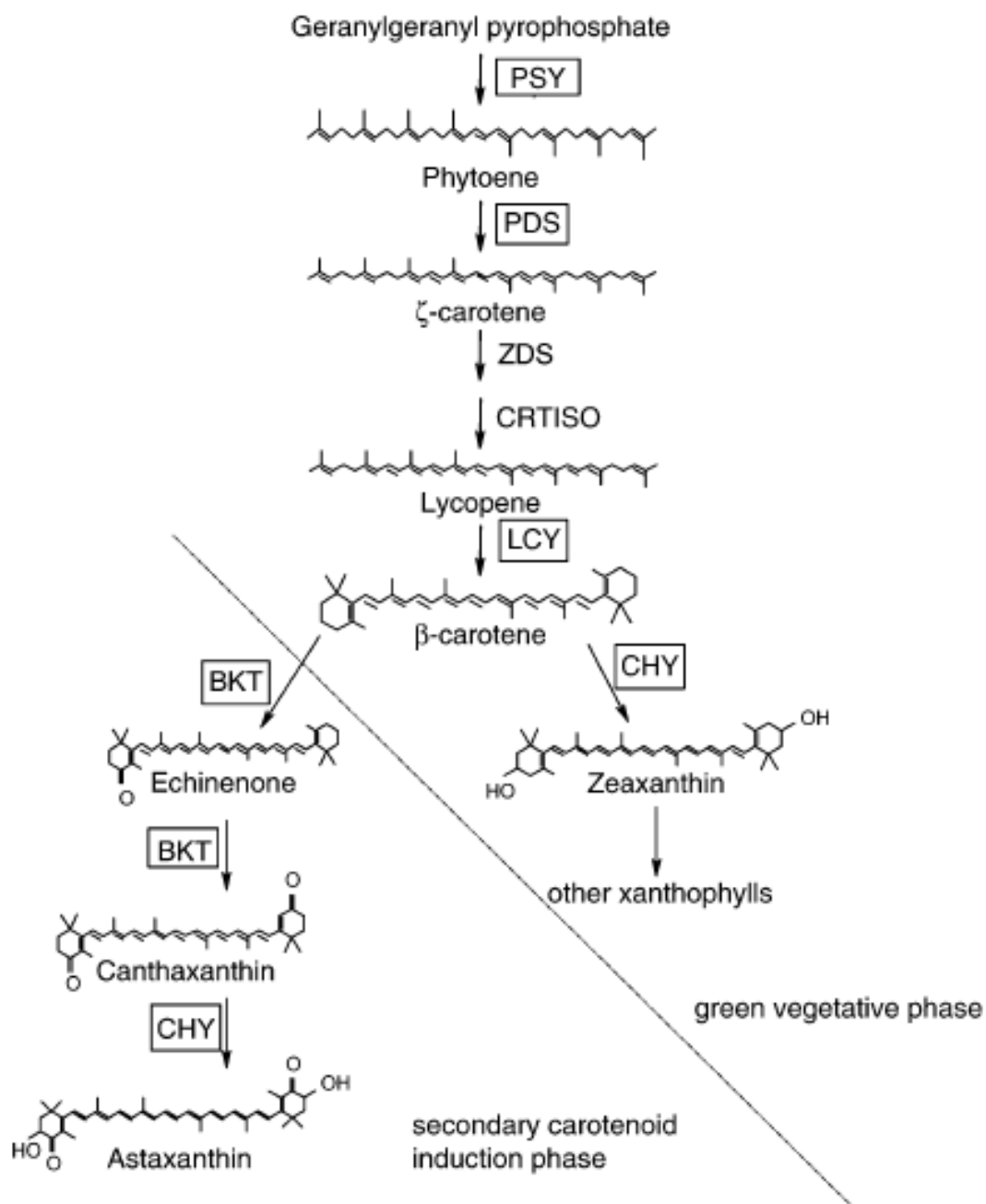
- |                           |                                    |
|---------------------------|------------------------------------|
| (A) <i>Dunaliella</i> sp. | (B) <i>Chaetoceros</i> sp.         |
| (C) <i>Chlorella</i> sp.  | (D) <i>Haematococcus pluvialis</i> |
| (E) <i>Spirulina</i> sp.  |                                    |

#### 4. แคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก

สาหร่ายสีเขียว (green algae) เป็นสาหร่ายที่จัดอยู่ในดิวิชัน Chlorophyta ซึ่งสาหร่ายกลุ่มนี้มีรงควัตถุชนิดหลัก คือ คลอโรฟิลล์ บี (chlorophyll b) คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) และแคโรทีนอยด์ (Rowan, 1989) โดยสามารถแบ่งแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวตามลักษณะหน้าที่ได้เป็นสองประเภท ได้แก่ ประเภทที่หนึ่ง คือ แคโรทีนอยด์ปฐมภูมิ (primary carotenoids) เป็นแคโรทีนอยด์ที่มีการสังเคราะห์ตลอดเวลาและสะสมอยู่ภายในคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่คล้ายกับแคโรทีนอยด์ทั่วไปในพืชชั้นสูง (Takaichi, 2011) ประเภทที่สอง คือ แคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ (secondary carotenoids) ที่จะมีการสังเคราะห์ขึ้นเมื่อสาหร่ายอยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสมหรือได้รับการกระตุ้นจากความเครียดต่างๆ เท่านั้น แคโรทีนอยด์ประเภทนี้ไม่ได้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แสง แต่ทำหน้าที่ปกป้องอันตรายจากแสงและอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเป็นหลัก โดยจะถูกสังเคราะห์และเก็บอยู่ในถุงไขมัน (lipid vesicle หรือ lipid droplet) ที่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) แต่จะไม่พบการเก็บสะสมไว้ในคลอโรพลาสต์ (Grunewald et al., 2001)

ในกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ทางชีวภาพของสาหร่ายสีเขียวที่มีการศึกษาจำนวนมาก พบว่า จุดเริ่มต้นแรกในการสังเคราะห์คือการรวมโมเลกุลของ geranylgeranyl diphosphate (GGPP) สองโมเลกุลเข้าด้วยกันเพื่อสร้างสารที่มีชื่อว่าไฟโตอีน (phytoene) ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์โมเลกุลแรกที่มีคาร์บอนในโมเลกุล 40 อะตอม ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นโดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีชื่อว่า phytoene synthase (PSY) ดังแสดงในรูปที่ 2 ขั้นตอนการสังเคราะห์ phytoene นี้มีการศึกษาพบว่าเป็นขั้นตอนสำคัญที่จะกำหนดปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด หรือที่เรียกว่า rate limiting step ปฏิกิริยาถัดไปที่ทำให้ได้สารที่มีสีขึ้นเป็นโมเลกุลแรก เกิดขึ้นโดยการทำงานของเอนไซม์ phytoene desaturase (PDS) ทำให้ได้สารชื่อ lycopene ที่มีสีชมพูเป็นผลิตภัณฑ์ และเอนไซม์ lycopene  $\beta$ -cyclase (LCY) จะทำงานเป็นลำดับถัดไป โดยการสร้างโครงสร้างวงแหวนขึ้นที่ปลายทั้งสองข้างของโมเลกุล lycopene ทำให้ได้สารชื่อ  $\beta$ -carotene (Cunningham and Gantt, 1998) การสังเคราะห์  $\beta$ -carotene นี้เอง ที่เป็นสารตั้งต้นหลักของการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ต่อไปในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ (Lotan and Hirschberg, 1995, Martin et al., 2008) ดังแสดงในรูปที่ 2-4

จากวิถีการสังเคราะห์ที่แสดงในรูปที่ 2-4 จะพบว่า คีโตแคโรทีนอยด์จะสังเคราะห์ขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นเท่านั้น โดยจะมีการเติมหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่งของวงแหวนส่วนปลายทั้งสองข้างของโมเลกุล  $\beta$ -carotene (Huang et al., 2006) โดยจากข้อเท็จจริงที่เกิดจากการศึกษาวิจัยในสาหร่ายหลายชนิด พบว่า เมื่อสาหร่ายได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการดำรงชีวิต จะเกิดการกระตุ้นให้เอนไซม์ที่มีชื่อว่า  $\beta$ -carotene ketolase (BKT) ซึ่งทำหน้าที่เติมหมู่คีโตนให้กับโมเลกุลของ  $\beta$ -carotene ทำงาน โดยเอนไซม์ชนิดนี้มักมีกิจกรรมร่วมกับเอนไซม์  $\beta$ -carotene hydroxylase (CHY) ที่ทำหน้าที่ในการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl functional group; -OH) ให้กับโมเลกุลของ  $\beta$ -carotene ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ในที่สุด นั่นคือ astaxanthin (Fan et al., 1995, Lotan and Hirschberg, 1995, Fraser et al., 1998)



รูปที่ 2-4 วิธี การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ปฐมภูมิและทุติยภูมิในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก  
ที่มา: Vidhyavathi และคณะ (2008)

(PSY) phytoene synthase

(PDS) phytoene desaturase

(LCY) lycopene β-cyclase

(CHY) β-carotene hydroxylase

(BKT) β-carotene ketolase



## 5. สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่สามารถสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์

สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบว่ามีความสามารถในการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ โดยนอกจากสาหร่ายชนิด *Haematococcus pluvialis* แล้ว จากการรายงานของ Lemoine และ Schoefs ที่รวบรวมขึ้นในปี 2010 และผลงานวิจัยของ Abe และคณะ (2007) และ Aburai และคณะ (2013) ยังคงพบว่าสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กอีกหลายชนิดมีความสามารถในการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ อันได้แก่ *Ankistrodesmus* sp. *Botryococcus braunii* *Chlamydocapsa* spp. *Chlamydomonas* spp. *Chlorella zofingiensis* *Chlorococcum* sp., *Chloromonas nivalis* *Coelastrella striola* *Neochloris wimmeri* *Scenedesmus* spp. *Protosiphon botryoides* *Scotiellopsis oocystiformis* *Tetracystis intermedium* และชนิดที่มีรายงานล่าสุดได้แก่ *Dactylococcus* sp. (Grama et al., 2014) โดยลักษณะเด่นที่พบในสาหร่ายที่สามารถสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณมาก นั่นคือ เซลล์ของสาหร่ายจะมีระยะที่เปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีในช่วงสั้นจนถึงสีแดงเข้ม โดยคีโตแคโรทีนอยด์ชนิดเด่นของสาหร่ายจะแตกต่างกันออกไป (ตารางที่ 2-1) ซึ่งลักษณะของสีโคโลนีที่แตกต่างกันที่ปรากฏอาจสามารถบ่งบอกถึงชนิด (Cunningham and Gantt, 2011) และปริมาณของรงควัตถุที่แตกต่างกันได้

ตารางที่ 2-1 คีโตแคโรทีนอยด์ชนิดเด่นในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่ได้รับการรายงาน

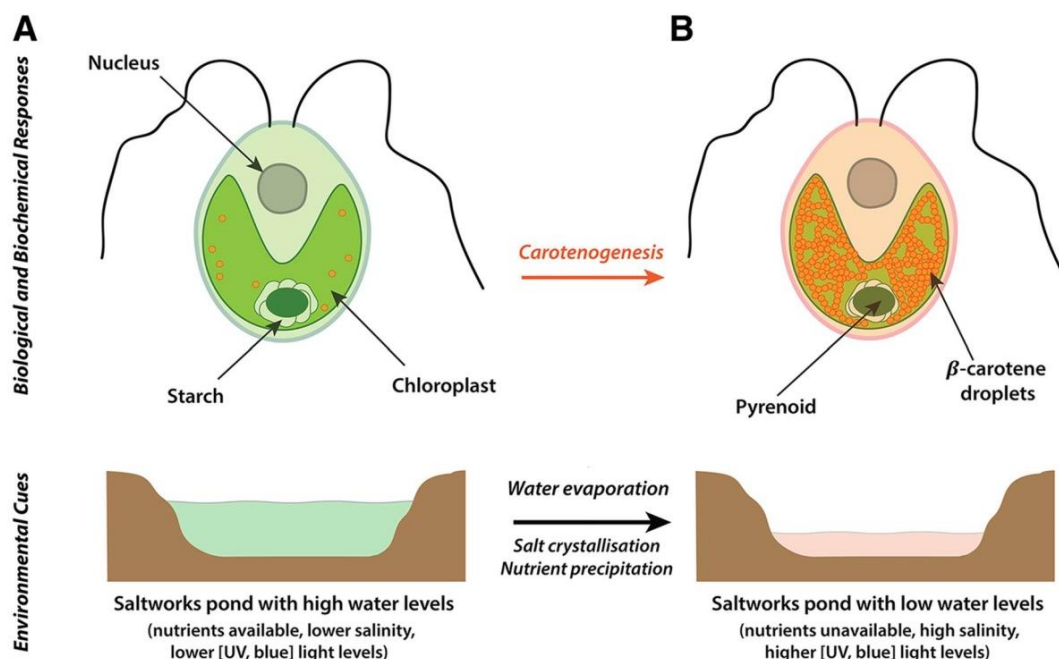
ชนิดของสาหร่าย	คีโตแคโรทีนอยด์ชนิดเด่น	เอกสารอ้างอิง
<i>Chlamydomonas antarctica</i>	astaxanthin	Bidigare และคณะ (1993)
<i>Chlorella nivalis</i>	astaxanthin	Remias และคณะ (2005)
<i>Chlorella emersonii</i>	canthaxanthin	Malis และคณะ (1993)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	astaxanthin canthaxanthin	Rise และคณะ (1994)
<i>Chlorococcum</i> sp.	astaxanthin canthaxanthin	Zhang และ Lee (2001)
<i>Chlamydomonas nivalis</i>	astaxanthin	Remias และคณะ (2005)
<i>Coelastrella striolata</i>	canthaxanthin	Abe และคณะ (2007)
<i>Dactylococcus</i> sp.	canthaxanthin	Grama และคณะ (2014)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	astaxanthin	Boussiba และคณะ (1991)
<i>Scenedesmus</i> spp.	astaxanthin canthaxanthin	Aburai และคณะ (2013)

สาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* เป็นกลุ่มสาหร่ายที่มีลักษณะเด่นของสาหร่ายที่มีความสามารถในการสะสมแคโรทีนอยด์ในปริมาณสูง โดยพบรายงานการเปลี่ยนแปลงสีของเซลล์จากสีเขียวไปเป็นสีส้ม น้ำตาล หรือแดง เมื่อทำการทดสอบทางสรีรวิทยาบางประการ นอกจากนี้ งานวิจัยจำนวนหนึ่งยังได้กล่าวถึงการสะสมแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิในสาหร่ายสกุลนี้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน (Watanabe et al., 2000, Groover and Bold, 1969, Flechtner et al., 2013) อย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจสอบเอกสารทางวิชาการที่ผ่านมา พบว่าไม่เคยมีรายงานถึงความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ได้มาก่อนในสาหร่ายสกุลนี้ อีกทั้งยังไม่เคยมีงานวิจัยที่มีจุดประสงค์ที่จะตรวจวิเคราะห์ชนิดของแคโรทีนอยด์ใดๆ ในสาหร่ายสกุลนี้เลย พบงานวิจัยชิ้นเดียวที่มีรายงานเกี่ยวกับแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสกุลนี้ คือการตรวจวัดปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและ  $\beta$ -carotene เท่านั้น (Tansakul, 2007)

## 6. ปัจจัยที่กระตุ้นการสะสมแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิในสาหร่าย

จากผลงานตีพิมพ์ที่รวบรวมเอกสารทางวิชาการของ Varela และคณะ (2015) ได้อธิบายถึงสัญญาณ (signal) จากสภาวะแวดล้อมในธรรมชาติที่กระตุ้นให้สาหร่ายสะสมแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ โดยมีสาหร่ายต้นแบบในการศึกษา คือ สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Dunaliella salina* ที่สามารถสะสมแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิชนิด  $\beta$ -carotene ได้มากถึง 14% ของน้ำหนักแห้ง (Ramos et al., 2011) โดยแคโรทีนอยด์ชนิดดังกล่าวสะสมขึ้นเพื่อปกป้องคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายจากแสงความเข้มสูงที่เป็นอันตราย ดังแสดงในรูปที่ 2-5 ในสภาวะปกติที่มีระดับน้ำสูง (รูปที่ 2-5 A) จะมีสารอาหารละลายในน้ำซึ่งสาหร่ายสามารถนำไปใช้ได้ รวมถึงมีระดับความเค็มและระดับความเข้มแสงต่ำ จึงพบว่าในสภาวะข้างต้นเซลล์สาหร่ายจะมีสีเขียวหรืออยู่ในระยะเซลล์ปกติ (vegetative cell) แต่เมื่อน้ำในแหล่งน้ำเกิดการระเหย (รูปที่ 2-5 B) สาหร่ายดังกล่าวจะมีการสังเคราะห์และสะสมแคโรทีนอยด์ขึ้นในเซลล์ในปริมาณมากจนปรากฏเป็นระยะเซลล์สีแดง เพื่อตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากเมื่อระดับน้ำในแหล่งน้ำลดลงจากการระเหย จะส่งผลให้เกิดการตกผลึกของเกลือ (salt crystallization) พร้อมทั้งเกิดการตกตะกอนของสารอาหาร (nutrient precipitation) ทำให้สาหร่ายเกิดสภาวะเครียดจากความเค็มสูงและขาดแคลนสารอาหารเนื่องจากไม่สามารถนำมาใช้ได้ (Oren, 2009) นอกจากนี้ระดับน้ำที่ต่ำประกออบกับผลึกของเกลือที่เกิดขึ้นก็ยิ่งไปเพิ่มอัตราการระเหยของแสงสู่สาหร่ายทำให้เกิดความเครียดจากความเข้มแสงที่สูงเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Kirk, 1988, Fujimaki et al., 2003, Oroud, 2001)

จากการศึกษาที่ผ่านมาใน *Haematococcus pluvialis* และ *Chlorella zofingiensis* ก็พบว่าเกิดปรากฏการณ์ดังที่ได้กล่าวไปข้างต้นเช่นกัน (Davies et al., 1970) โดยเมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะเครียดสาหร่ายจะตอบสนองต่อความเครียดด้วยการลดขนาดของเยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์ (chloroplast membrane) เพื่อลดการผลิตแป้ง ในขณะที่เดียวกันจะเริ่มมีการสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์ซึ่งอยู่ในรูปของถุงไขมัน (lipid vesicle) ภายในเซลล์มากขึ้นแทน (Dipak and Lele, 2005)



รูปที่ 2-5 สัญญาณจากสภาวะแวดล้อมในธรรมชาติที่กระตุ้นให้สาหร่ายสะสมแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ  
ที่มา: Varela และคณะ (Varela et al., 2015)

(A) สภาวะที่มีระดับน้ำปกติ (B) สภาวะที่ระดับน้ำลดต่ำลงเนื่องจากการระเหยของน้ำ

เนื่องจากคีโตแคโรทีนอยด์จัดเป็นแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิในสาหร่าย ซึ่งจะถูกสังเคราะห์และสะสมขึ้นเมื่อสาหร่ายถูกกระตุ้นเท่านั้น จากข้อเท็จจริงนี้จึงได้มีนักวิจัยจำนวนมากศึกษาถึงปัจจัยหรือความเครียดที่กระตุ้นการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตสารชนิดดังกล่าวของสาหร่าย โดยปัจจัยที่กระตุ้นหรือสภาวะเครียด (stress condition) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความเข้มแสง และอุณหภูมิ และปัจจัยทางเคมี เช่น การขาดแคลนธาตุอาหารบางชนิด หรือจากสภาวะที่มีสารเคมีที่เป็นพิษ เป็นต้น โดยจากผลการศึกษาต่างๆ ที่ผ่านมามีพบว่า การขาดแคลนธาตุอาหารที่จำเป็นโดยเฉพาะอย่างยิ่งไนโตรเจนนั้น เป็นปัจจัยกระตุ้นพื้นฐานที่สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ทุติยภูมิได้ในสาหร่ายเกือบทุกชนิด (Boussiba et al., 1992, Grunewald et al., 2000) นอกจากนี้ปัจจัยที่ได้ยกตัวอย่างมาข้างต้นก็ยังสามารถศึกษาถึงปัจจัยอื่นๆ อีกเป็นจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 2-2 ซึ่งปัจจัยกระตุ้นเหล่านี้แท้จริงแล้วล้วนเกิดขึ้นกับสาหร่ายได้ในธรรมชาติ

ตารางที่ 2-2 ปัจจัยที่กระตุ้นให้สาหร่ายมีการสะสมคีโตแคโรทีนอยด์

ปัจจัยที่ศึกษา	ชนิดของสาหร่าย	เอกสารอ้างอิง
<b>ปัจจัยทางกายภาพ</b>		
แสง (ความเข้มสูง)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Kobayashi และคณะ (1992a)
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Qin และคณะ (2008)
อุณหภูมิ (เพิ่ม/ลด)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Tjahjono และคณะ (1994)
อุณหภูมิและแสง (สูง)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Fan และคณะ (1994)
<b>ปัจจัยทางเคมี</b>		
ขาดแคลนไนโตรเจน	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Orosa และคณะ (2001)
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Kakizono และคณะ (1992)
	<i>Scenedesmus</i> sp.	Pirastru และคณะ(2012)
ไนโตรเจนและแมกนีเซียม (ต่ำ)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Fabregas และคณะ (1998)
เติมอะซิเตท (acetate)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Kobayashi และคณะ (1993)
เติมน้ำตาลชนิดต่างๆ	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Sun และคณะ (2008)
เติมเกลือ (NaCl)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Kobayashi และคณะ (1997b)
เติมกรดซาลิไซลิก (salicylic acid)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Gao และคณะ (2012)
เติมกรดแอบไซสิค (abscisic acid)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Kobayashi และคณะ (1997a)
ขาดแคลนไนโตรเจนและเติมน้ำตาล	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Ip และคณะ (2004)
<b>ปัจจัยทางกายภาพร่วมกับเคมี</b>		
แสงสูงและไนโตรเจนต่ำ	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Scibilia และคณะ (2015)
	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Bar และคณะ (1995)
แสงสูงและเติมเกลือ (NaCl)	<i>Scenedesmus</i> sp.	Aburai และคณะ (2015)
แสงสูง ไนโตรเจนต่ำ เติมเกลือ (NaCl)	<i>Dactylococcus</i> sp.	Grama และคณะ (2014)
ไม่ให้แสง และเติมน้ำตาล	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Ip และ Chen (2005)

จากปัจจัยที่แสดงในตารางที่ 2-2 จะพบว่า ไม่ปรากฏการศึกษาปัจจัยความเครียดจากการขาดแคลนน้ำ หรือความแห้งแล้ง (drought stress) โดยตรง เนื่องจากการกำหนดปริมาณน้ำที่แน่นอนในสิ่งแวดล้อมจำลองนั้นทำได้ยาก การศึกษาถึงสถานะเครียดจากความแห้งแล้งจึงมักทำโดยอ้อม โดยการทดลองที่รายงานโดย Kobayashi และคณะ (1997a) ใน *H. pluvialis* ซึ่งทำการเติมกรดแอบไซสิค (abscisic acid) ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย จากผลการทดลองครั้งนั้น ผู้วิจัยได้กล่าวว่าการเติมกรดชนิดดังกล่าวลงในอาหารแห้งที่ใช้เพาะเลี้ยง *H. pluvialis* เป็นสถานะที่ก่อให้เกิดความเครียดจากความแห้งแล้ง และความเครียดนั้นมีผลกระทบทำให้สาหร่ายสะสม astaxanthin เพิ่มขึ้นอีกด้วย

## 7. ชีววิทยาและการจัดจำแนกสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis*

สาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* ได้รับการรายงานครั้งแรกในปี 1958 โดย Herndon (1958) เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กในดิวิชัน Chlorophyta และด้วยลักษณะเฉพาะของกลุ่มของสาหร่ายสกุลนี้ คือ การเรียงติดกันของเซลล์ในลักษณะลูกบาศก์ 3 มิติ ทำให้สาหร่ายสกุลนี้ถูกจัดอยู่ในพวกสาหร่ายซาสิโนยด์ (sarcinoid algae) โดยมักพบว่า sarcinoid algae มักมีการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นแบบโคโคไลซึ่งเป็นผลมาจากการแบ่งเซลล์แล้วไม่หลุดออกจากกัน ลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* คือ แต่ละเซลล์จะมี 1 คลอโรพลาสต์ซึ่งเป็นแบบที่แผ่ติดไปกับผนังเซลล์ เรียกว่า parietal chloroplast มี 1 ไพเรินอยด์ (pyrenoid) โดยจะพบในระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตดี (active) และลักษณะเด่นที่แบ่งสาหร่ายสกุลนี้ออกจากสกุลอื่นที่มีความใกล้เคียงคือ การสร้างซุโอสปอร์ (zoospore) ที่ไม่มีผนังเซลล์ หรือ naked zoospore โดย zoospore มีแฟลกเจลลา (flagella) 2 เส้นที่มีความยาวเท่ากัน (Herndon, 1958) โดยสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* มีลำดับอนุกรมวิธานดังต่อไปนี้ (Bold and Wynne, 1978)

ดิวิชัน (Division) Chlorophyta

ชั้น (Class) Chlorophyceae

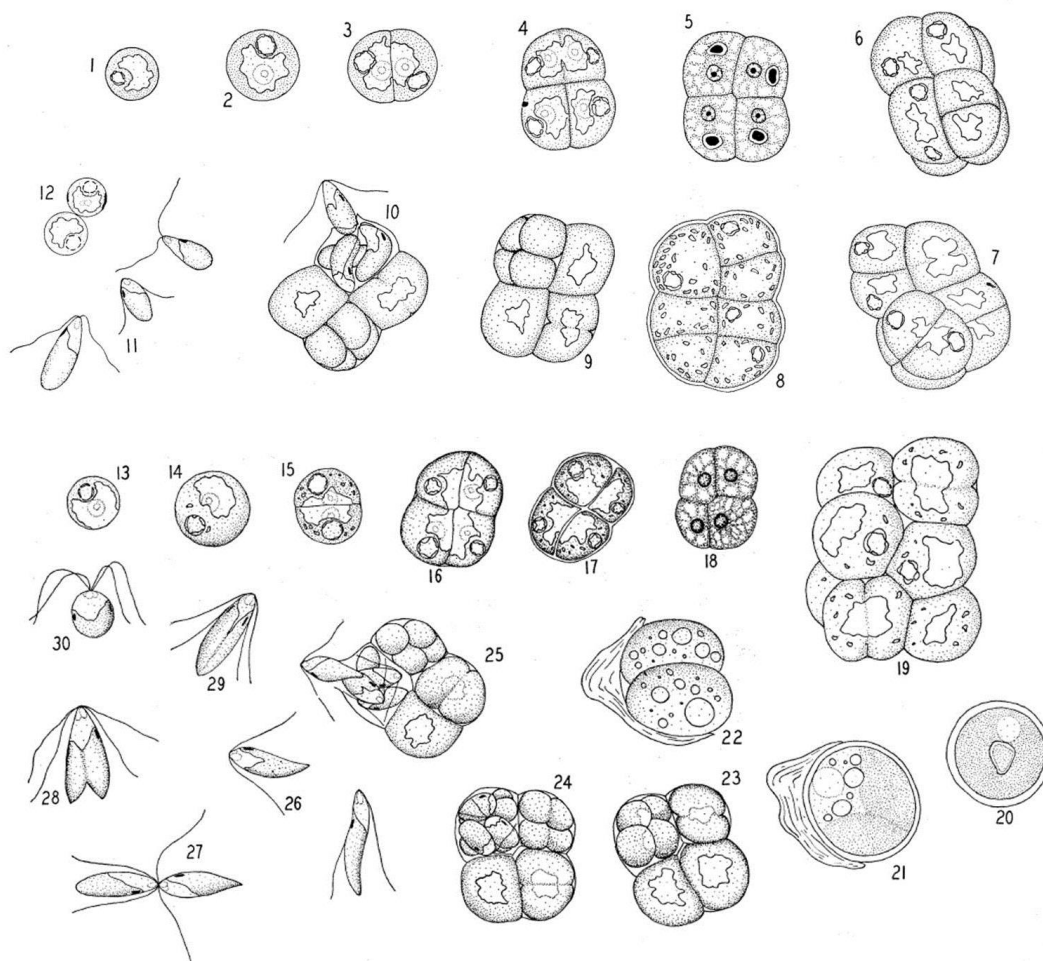
อันดับ (Order) Chlorosarcinales

วงศ์ (Family) Chlorosarcinaceae

สกุล (Genus) *Chlorosarcinopsis*

ชีววิทยาของสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* พบว่า เป็นสาหร่ายที่สามารถพบได้เกือบทุกสภาพแวดล้อมไม่ว่าจะเป็น บนพื้นดิน น้ำจืด และพบในน้ำเค็มได้บ้าง โดยการเจริญเติบโตในระยะปกติเซลล์มักอยู่เป็นกลุ่มตั้งแต่ 4 เซลล์ขึ้นไป อันเนื่องมาจากการแบ่งตัวของเซลล์และไม่หลุดออกจากกัน โดยจะถูกห่อหุ้มไว้ด้วยถุงเจลลาติน (gelatinous sheath) ส่วนในด้านการสืบพันธุ์พบว่า สาหร่ายในสกุลนี้มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นเกิดโดยการสร้าง zoospore และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้น พบว่า สาหร่ายจะสร้างเซลล์ที่มีรูปร่างลักษณะคล้ายกับ zoospore โดยแต่ละเซลล์จะมีขนาดเท่ากัน เรียกเซลล์สืบพันธุ์นี้ว่า ไอโซแกมีต (Isogamete) ซึ่ง isogamete แต่ละเซลล์จะสามารถจับคู่และเกิดการรวมกันของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) โดยการติดตามและบันทึกสภาพความเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในวัฏจักรชีวิตของสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* (Herndon, 1958) แสดงในรูปที่ 2-6 ซึ่งสาหร่าย *Chlorosarcinopsis minor* เป็นชนิดที่แสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในกระบวนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และสาหร่าย *Chlorosarcinopsis dissociate* แสดงการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (รูปที่ 2-6)

ในด้านการจัดจำแนกสาหร่ายภายในสกุล *Chlorosarcinopsis* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้น พบว่า ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic features) ของ vegetative cell สามารถจำแนกความแตกต่างได้ไม่มากนัก เนื่องจากสาหร่ายในสกุลนี้มีรูปแบบการจับกลุ่มเซลล์และขนาดของเซลล์ค่อนข้างหลากหลาย (รูปที่ 2-6) อีกทั้งลักษณะดังกล่าวยังผันแปรตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงรวมถึงสภาวะในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นในการจัดจำแนกสาหร่ายในสกุลนี้จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเซลล์ในระดับที่เล็กลงไปอีก ซึ่งเรียกว่า ultrastructural features (Watanabe et al., 2006) โดยลักษณะ ultrastructure ที่เป็นเอกลักษณ์ของสาหร่ายสกุลนี้ คือ การมี zoospore แบบ Protosiphon type (Starr, 1955) และมี pyrenoid อยู่ใน chloroplast ซึ่งด้วยลักษณะนี้เองทำให้สาหร่ายสกุล *Chlorosarcina* แยกออกไปจากสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* เนื่องจากไม่มี pyrenoid อยู่ใน chloroplast (Deason, 1959, Deason and Floyd, 1987) และถึงแม้ว่าเอกสารการวินิจฉัยสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* จนถึงระดับชนิด (key to species) จะมีอยู่อย่างจำกัด แต่ก็มีการศึกษาที่รายงานว่า ลักษณะ ultrastructure ได้แก่ ลักษณะและปริมาณของไทลาคอยด์ (Thylakoids) ภายใน pyrenoid (Watanabe, 1983) และลักษณะของ zoospore ได้แก่ การมีหรือไม่มีผนังเซลล์ ตำแหน่งของ flagella (Melkonian, 1978) และตำแหน่งของ stigma เป็นลักษณะที่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของสาหร่ายแต่ละชนิดในสกุล *Chlorosarcinopsis* ออกจากกันได้ (Watanabe et al., 2006)



รูปที่ 2-6 ภาพวาดลักษณะพื้นฐานวิทยาของเซลล์สาหร่าย *Chlorosarcinopsis* spp.

ที่มา: Herndon (1958)

(1-12) *Chlorosarcinopsis minor*

(13-30) *Chlorosarcinopsis dissociata*

(1, 2) median optical sections of solitary vegetative cells

(3, 4) successive stages of vegetative cell division

(5) group of cells showing uniuclate condition

(6, 7) packets of cells resulting cell division

(8) group of cells from inactive culture

(9, 10) stages in bipartition in the zoospore formation

(11) zoospore

(12) young vegetative cells originated from zoospore

(13, 14) optical sections of solitary vegetative cells

(15, 16) successive stages in vegetative cell division

(17) small group of cells from inactive culture

(18) group of cells showing uniuclate condition

(19) irregularly shaped of cells from actively growing culture

(20) median optical section akinete

(21) germinating akinete showing shedding of outer wall

(22) akinete germinating by vegetative division

(23-25) Successive stages in zoosporogenesis by bipartitio

(26) zoospore

(27-29) Successive stages in union of isogametes, producing motile zygotes

(30) quiescent gamete

เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาใต้กล้องจุลทรรศน์ของสาหร่ายกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันมาก จึงมีนักวิจัยทำการศึกษถึงความแตกต่างของลักษณะทางสรีรวิทยาในสาหร่ายสกุลนี้ โดยนำสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* ที่ Herndon (1958) ได้ทำการบันทึกไว้ทั้งหมด 14 species มาทดลองเพาะเลี้ยงในสภาวะแตกต่างกัน จากนั้นติดตามลักษณะของโคโลนีและเซลล์สาหร่ายที่เจริญเติบโตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมไปถึงสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนีสาหร่าย เมื่อทำการทดสอบทางสรีรวิทยาที่ Groover และ Bold (1969) บางประการ เช่น ความแตกต่างของสีโคโลนีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Bold's basal medium (BBM) แหล่งพลังงานคาร์บอนจากภายนอกที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ การเจริญเติบโตในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน และการเจริญเติบโตบนอาหารที่มีไนโตรเจนเข้มข้นต่างกัน จากผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วนั้น พบว่า ในการจัดจำแนกสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* ของ Groover และ Bold (1969) ค่อนข้างให้น้ำหนักกับการเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนี โดยได้จัดจำแนกสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* ออกเป็น 4 กลุ่ม จากสีของโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อสาหร่ายมีการสะสมแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิตามคำอธิบายต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 “Green to yellow-green” ได้แก่

*Chlorosarcinopsis sempervirens*

*Chlorosarcinopsis auxotrophica*

*Chlorosarcinopsis minuta*

*Chlorosarcinopsis deficiens*

กลุ่มที่ 2 “A portion of the plant mass remaining green; the remainder green on yellow-orange to green on orange” ได้แก่

*Chlorosarcinopsis variabilis*

*Chlorosarcinopsis pseudominor*

กลุ่มที่ 3 “Plant mass a light brownish-orange to a dark brownish-orange” ได้แก่

*Chlorosarcinopsis dissociata*

*Chlorosarcinopsis aggregate*

*Chlorosarcinopsis negevensis*

*Chlorosarcinopsis bastropiensis*

กลุ่มที่ 4 “Plant mass orange to reddish-orange” ได้แก่

*Chlorosarcinopsis minor*

*Chlorosarcinopsis eremi*

*Chlorosarcinopsis gelatinosa*

*Chlorosarcinopsis arenicola*

*Chlorosarcinopsis communis*



จากผลการศึกษาทั้งหมดของ Groover และ Bold ในครั้งนั้น ลักษณะทางสรีรวิทยาที่ถูกบันทึกไว้ ไม่ว่าจะเป็นความเปลี่ยนแปลงของทั้งสีโคโลนีสำหรับราย การตอบสนองต่อสารชนิดต่างๆ การสร้างถุงหุ้มกลุ่มเซลล์ การจัดเรียงตัวกันของเซลล์สำหรับรายเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะทดลองต่างๆ ได้รับการวิเคราะห์และคัดเลือกลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์เพื่อนำไปสร้างเป็นเอกสารวินิจฉัยชนิด (key to species) ของสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* โดย Groover และ Bold ได้สร้างจากลักษณะที่มีการบันทึกไว้โดย Herndon (1958) ร่วมกับการค้นพบของพวกเขา ซึ่งจะเห็นได้ว่าลักษณะเด่นประการแรกที่ใช้จำแนกสาหร่ายแต่ละกลุ่มออกจากกันคือสีของโคโลนีสาหร่ายนั่นเอง

การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก นอกจากจะศึกษาจากลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาแล้ว ในปัจจุบันยังมีวิธีการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตโดยใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาซึ่งมีความแม่นยำมากกว่า เนื่องจากลักษณะทางกายภาพของสิ่งมีชีวิตสามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยมีปัจจัยชักนำจากสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ หรือ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สิ่งมีชีวิตเหล่านั้นอยู่อาศัยหรือถูกเพาะเลี้ยงในขณะนั้น (Pancha et al., 2014, Lind et al., 2016, Ito et al., 2013, Li et al., 2013) ในขณะที่ลักษณะทางพันธุกรรมยังคงเดิม ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำเทคนิคทางอนุชีววิทยาเข้ามาประยุกต์ใช้เพื่อแก้ไขปัญหาการจัดจำแนกสาหร่าย โดยที่นิยมเป็นวิธีศึกษาที่ต้องใช้ร่วมกับเทคนิคลูกโซ่โพลีเมอร์เลส (polymerase chain reaction; PCR) อาทิ ความเหมือนหรือความต่าง (similarity) ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่ตำแหน่งยีนใดๆ เช่น restriction fragment length polymorphism (RFLP) random amplified polymorphic DNA (RAPD) amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ short and long tandem repeat repetitive sequences (STR) เป็นต้น

ในการบ่งชี้ชนิดของสาหร่าย ลักษณะที่นิยมนำมาศึกษามักเป็นความคล้ายคลึง หรือความเหมือน (similarity) ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่ตำแหน่งยีนใดๆ โดยคุณสมบัติที่ดีของยีนตำแหน่งดังกล่าว คือ ควรเป็นบริเวณที่สามารถแสดงความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ (polymorphic gene) นั่นหมายความว่าบริเวณดังกล่าวควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแปรผันสูง และแสดงลักษณะเฉพาะของสาหร่ายแต่ละ species (Hebert et al., 2003) จากผลการศึกษา ยีนที่เหมาะสมแก่การนำมาบ่งชี้ชนิดของสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* โดย Hall และคณะ (2010) พบว่า ยีนที่มีความหลากหลายสูงในสาหร่ายสกุลนี้ ได้แก่ยีน *rbcl* รองลงมาคือ *tufA* และ 18S rDNA ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม ในด้านการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) ของสิ่งมีชีวิต พบว่า การเลือกตำแหน่งยีนที่จะนำมาศึกษาควรมุ่งเน้นไปที่ตำแหน่งยีนที่มีทั้งบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และมีความแปรผัน (variation) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Soltis and Soltis, 1998) ซึ่งการศึกษาในสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* พบว่า มีรายงานการศึกษาโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA โดย Watanabe และคณะ (2006) ซึ่งในงานวิจัยขึ้นดังกล่าวนี้ได้นำลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทั้ง microscopic feature และ ultrastructural feature รวมไปถึงลักษณะทางสรีรวิทยาที่มีรายงานไว้โดย Groover และ Bold (1969) มาทำการวิเคราะห์ร่วมด้วย ผลการศึกษาพบว่า การจัดจำแนกตามสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน 18S

rDNA ให้ผลสอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้ Watanabe และคณะ (2006) ยังได้สรุปถึงการทดสอบทางสรีรวิทยาซึ่งแสดงถึงความแตกต่าง ทั้งยังสอดคล้องกับผลการจัดจำแนกของยีน 18S rDNA ว่าได้แก่

- 1) การเปลี่ยนแปลงสีของโคลีนีสาหร่ายบนอาหารสูตร BBM
- 2) ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิด succinamide uric และ uracil
- 3) ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ และ
- 4) ผลของวิตามินบี 12 ต่อการเจริญเติบโต

ซึ่งภายหลังจากการศึกษาของ Watanabe และคณะ (2006) จึงมีการนำยีน 18S rDNA ไปใช้จัดจำแนกและศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* ที่คัดแยกจากดิน จากอุทยานแห่งชาติในประเทศสหรัฐอเมริกา (Flechtner et al., 2013) ซึ่งผลการศึกษาก็พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่นกัน

นอกจากการศึกษาข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีนใดๆ ยังพบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ก็เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) อีกรูปแบบหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เช่น RAPD RFLP AFLP และ STRR เป็นต้น โดยแม้ว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้จะไม่สามารถใช้ในการบ่งชี้ชนิดของสาหร่ายได้ แต่พบว่าเป็นวิธีที่สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) ของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางอนุกรมวิธานสูงได้ค่อนข้างดี (Valatka et al., 2000, Oppen et al., 1994) เนื่องจากเทคนิคเหล่านี้เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แบบสุ่ม หรือการตรวจหาตำแหน่งที่มีความแตกต่างแบบสุ่มทั้งจีโนม (genome) ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการศึกษาจึงเกิดขึ้นมากกว่า 1 ตำแหน่งยีนทำให้มีโอกาสสูงที่จะพบบริเวณที่บอกความแตกต่างได้ (Lynch and Milligan, 1994, Weising et al., 1994)

ในขณะนี้ยังไม่พบงานวิจัยที่นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ในการจัดจำแนก รวมถึงการศึกษาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* (30 มิถุนายน 2559) แต่เมื่อสืบค้นในสาหร่ายสกุลที่มีความใกล้ชิด พบว่ามีงานนำเทคนิค RAPD ไปใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวก็ประสบความสำเร็จในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม (Gomez and Gonzalez, 2001) โดยผู้เขียนได้รายงานว่าพบความแตกต่างทางสรีรวิทยาบางประการในไอโซเลท *Dunaliella* ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิต  $\beta$ -carotene โดยบางไอโซเลทมีการเจริญเติบโตและปริมาณการสะสม  $\beta$ -carotene ที่น้อยกว่าปกติ และเมื่อทำการศึกษาด้วยเทคนิค RAPD ก็พบแถบดีเอ็นเอที่บอกความแตกต่างได้ (polymorphic band) นอกจากนี้ด้วยเทคนิคเดียวกันนี้ก็ยังมีงานนำไปใช้ศึกษาความความใกล้ชิดทางพันธุกรรมร่วมกับการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS1 และ ITS2 ของตัวอย่างสาหร่าย *Dunaliella* ที่ได้มาจากต่างท้องถิ่น (Gómez and González, 2004) ซึ่งก็พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสาหร่ายที่มาจากต่างประเทศได้ จากการทดลองที่ยกตัวอย่างมาจึงแสดงให้เห็นว่าเทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ดีแม้สาหร่ายมีความใกล้ชิดกันมาก

### บทที่ 3 วิธีการศึกษา

#### วัสดุและอุปกรณ์

##### 1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการ

Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 และ 2.0 ml  
Centrifuge tube ขนาด 25 และ 50 ml  
Plastic petri dish 90×15 mm (P0006, KIMA)  
ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 10 200 และ 1,000 µl (Sartorius, US)  
ปิเปตทิป (pipette tips) ขนาด 10 200 และ 1000 µl (Extragene)  
กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์  
ขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 250 ml (Duran laboratory glass bottle)  
กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Nikon SMZ-10)  
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus CH30)  
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Hiclave HVE-50, Hirayama, Japan)  
เครื่องชั่งน้ำหนัก (PB303-S, Mettler Toledo)  
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Biofuge pico, Sorvall®, UK)  
ชั้นวางสำหรับเพาะเลี้ยงพร้อมชุดหลอดฟลูออเรสเซนซ์สำหรับให้แสงสว่าง

##### 2. อุปกรณ์สำหรับการศึกษาด้านอณูชีววิทยา

เครื่องเทอร์โมไซเคลอร์ (FlexCycler, Analytikjena, Germany)  
เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ (MiniRun GE – 100, Hangzhou Bioer Technology, China)  
เครื่องส่องเจลดด้วยรังสียูวี (InGenius 3, UK)

##### 3. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์รงควัตถุ

###### 3.1 อุปกรณ์สำหรับสกัดรงควัตถุ

Polypropylene micro pestle (3411D68, Thomas scientific)  
Evaporator and concentrator (GeneVac, รุ่น EZ-2, Suffolk, UK)

###### 3.2 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์รงควัตถุ

Ultrahigh performance liquid chromatography; UPLC (Acquity™ Waters, UK)  
UPLC Photodiode array (PDA) detector (Acquity™ Waters, UK)  
UPLC BEH C18 column 2.1×100 mm, 1.7 µm (Acquity™ Waters, UK)  
BEH C18 VanGuard precolumn 2.1 x 50 mm, 1.7 µm (Acquity™ Waters, UK)

## สารเคมี

### 1. สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและเพาะเลี้ยงสาหร่าย (ภาคผนวก)

อาหารสูตร HSM (Sueoka, 1967)  
 อาหารสูตร TAP (Gorman, 1965)  
 อาหารสูตร BBM (Stein, 1979)  
 อาหารสูตร BG11 (Stanier et al., 1971)

### 2. สารเคมีสำหรับการทดสอบทางสรีรวิทยา

Sodium acetate (679-25KG, Univar)  
 Sodium pyruvate (P2256, Sigma-Aldrich)  
 Fructose (775-500G, Univar)  
 Xylose (07411, Sigma-Aldrich)  
 Sodium chloride (465-500G, Univar)  
 Sodium nitrate (465-500G, Univar)  
 Sodium nitrite (492-500G, Univar)

### 3. สารเคมีสำหรับการศึกษาทางอณูชีววิทยา

#### 3.1 สารเคมีสำหรับสกัดสารพันธุกรรม

TEN buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 150 mM NaCl)  
 SDS-EB buffer (2% SDS; 400 mM NaCl; 40 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0)  
 Phenol (P1037, Sigma-Aldrich)  
 Chloroform: Isoamyl alcohol 24:1 (C0549-1PT, Sigma-Aldrich)  
 Ethanol absolute -analytical grade (20821.321, VWR chemicals)

#### 3.2 สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย

Taq DNA polymerase (Geneaid, Korea)  
 10X PCR buffer (Geneaid, Korea)  
 dNTP set (NP2406, Vivantis)  
 PCR primer (Eurofins Genomics, Germany) แสดงในตารางที่ 3-1 และ 3-2

#### 3.3 สารเคมีสำหรับแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

Agarose (PC0701, Vivantis)  
 DNA dye (Ultrapower™ Nucleic acid stain, SK)  
 Loading dye (ภาคผนวก ก)  
 TAE buffer (ภาคผนวก ก)

ตารางที่ 3-1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์สำหรับยีน *tufA* และ 18S rDNA

โอลิโกนิวคลีโอไทด์	ตำแหน่งยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-->3')	เอกสารอ้างอิง
tufAF	<i>tufA</i>	TGAAACAGAAMAWCGTCATTATGC	Fama และคณะ (2002)
tufAR	<i>tufA</i>	CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC	Fama และคณะ (2002)
107F	18S rDNA	CGAATGGCTCATTAAT	Suutari และคณะ (2010)
ChloroR	18S rDNA	GAATCAACCTGACAAGGCAAC	Moro และคณะ (2009)
18S-42F	18S rDNA	CTCAARGAYTAAGCCATGCA	Lopez-Garcia และคณะ (2003)
18S-1498R	18S rDNA	CACCTACGGAAACCTTGTTA	Lopez-Garcia และคณะ (2003)

ตารางที่ 3-2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์สำหรับเทคนิค RAPD

โอลิโกนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-->3')
OPD-20	GTTGCGATCC
OPM-5	GGGAACGTGT
OPM-4	GGCGGTTGTC
OPR-3	ACACAGAGGG
OPR-7	ACTGGCCTGA
OPR-9	TGAGCACGAG
OPR-12	ACAGGTGCGT
OPR-13	GGACGACAAG
OPZ-4	AGGCTGTGCT
OPZ-6	GTGCCGTTCA
OPZ-11	CTCAGTCGCA
OPZ-13	GACTAAGCCC

#### 4. สารเคมีสำหรับสกัดและวิเคราะห์รงควัตถุ

Sea sand (Nr.41 845, Ferak laborat)

Water HPLC grade (W5SK-4, Fisher)

Methanol HPLC grade (A452SK, Fisher)

Chloroform HPLC grade (C607-4, Fisher)

Acetonitrile HPLC grade (A998SK-4, Fisher)

Ethyl acetate HPLC grade (E195SK-4, Fisher)

Petroleum ether HPLC grade (E139SK-4, Fisher)

$\beta$ -carotene standard type II (C4582-5MG, Sigma-Aldrich)

Canthaxanthin standard (32993-5MG, Flukar)

Astaxanthin standard\*

Adonixanthin standard\*

Antheraxanthin standard\*

Zeaxanthin standard\*

Lutein standard\*

Phenicoxanthin standard\*

3-OH-echinenone standard\*

Echinenone standard\*

หมายเหตุ: \* ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Paul D. Fraser แห่ง Royal Holloway University, UK วิธีการโดยละเอียดอธิบายไว้ใน Nogueira และ คณะ (Nogueira et al., 2013)



## วิธีการทดลอง

### 1. การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีความสามารถในการสะสมแคโรทีนอยด์อย่างโดดเด่น

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากโป่งยุบ อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยใช้ขวดเก็บตัวอย่าง โป่งใสที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำกลับมาบ่มร่วมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง  $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ( $^{\circ}\text{C}$ ) ในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลาประมาณ 1 เดือน เมื่อเริ่มสังเกตพบการเจริญเติบโตของสาหร่ายจึงทำการแยกสาหร่ายให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยการเจือจางสารละลายสาหร่ายที่เจริญขึ้นในน้ำกลั่นด้วยวิธี 10-fold dilution จากนั้นทำการสเปรดเพลท (spread plate) บนอาหารที่ใช้สำหรับคัดเลือกสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (อาหารสูตร HSM) บ่มจนเพาะเชื้อดังกล่าวต่อเป็นระยะเวลาประมาณหนึ่งเดือน เมื่อเริ่มมีการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยสังเกตจากโคโลนีสีเขียว ทำการแกะเชื้อจากโคโลนีเดียวไปทำการลากเชื้อซ้ำ (re-streak) จนกว่าจะได้เชื้อสาหร่ายที่ปราศจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่น (axenic culture) เมื่อได้เชื้อสาหร่ายที่บริสุทธิ์แล้วจึงนำเชื้อสาหร่ายดังกล่าวไปทดสอบเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร HSM TAP BBM และ BG11 จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีโคโลนีของสาหร่าย และคัดเลือกไอโซเลทที่มีการเปลี่ยนแปลงสีโคโลนีจากเขียวไปเป็นสีส้มแดงเพื่อนำไปทำการศึกษาต่อ

### 2. การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของสาหร่ายที่สะสมแคโรทีนอยด์อย่างโดดเด่น

#### 2.1 การเตรียมสารละลายสาหร่ายเพื่อใช้ในเทคนิค spot test

เนื่องจากสาหร่ายทุกไอโซเลทที่คัดเลือกมาทำการศึกษามีลักษณะเป็นก้อนไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกับสารละลาย จึงต้องปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายสาหร่ายของแต่ละไอโซเลทให้เท่ากันด้วยการชั่งน้ำหนักเซลล์สด (FW) โดยการชูดเก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งด้วยปิเปตทิปขนาด  $1000 \mu\text{l}$  ประมาณเมล็ดถั่วเขียวลงสู่หลอด microcentrifuge tube ขนาด  $1.5 \text{ ml}$  ชั่งน้ำหนักเซลล์สดพร้อมบັນทิกและคำนวณหาปริมาณอาหารเหลวที่ต้องเติมเพื่อให้สารละลายสาหร่ายมีความเข้มข้น  $20 \text{ mgFW/ml}$  จากนั้นเติมอาหารเหลวตามปริมาตรที่คำนวณได้ และบดเซลล์สาหร่ายเบาๆ ด้วย micro pestle จนกระทั่งเซลล์สาหร่ายละลายเป็นเนื้อเดียวกับอาหารเหลว เพื่อให้สามารถปิเปตผ่านปลายทิปขนาด  $200 \mu\text{l}$  ได้ สารละลายสาหร่ายนี้จะใช้ในการทดลองการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาทั้งหมด

#### 2.2 การศึกษาอาหาร อุณหภูมิที่เหมาะสม และรูปแบบการเจริญเติบโต

หยดสารละลายสาหร่ายทุกไอโซเลทปริมาตร  $6 \mu\text{l}$  ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดแข็ง 5 สภาวะ ได้แก่ HSM TAP BBM BG11 และอาหารสูตร TAP ที่ไม่ให้แสง (หุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียม) แต่ละชุดทดลองมีอย่างน้อย 3 ซ้ำ และแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ  $25^{\circ}\text{C}$  และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ  $35^{\circ}\text{C}$  ที่ความเข้มแสง  $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  จากนั้นบันทึกผลการเจริญเติบโตด้วยกล้องดิจิทัลเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน อย่างไรก็ตามทุกการทดลองหลังจากนี้จะทำการศึกษาที่ความเข้มแสง  $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  และอุณหภูมิ  $25^{\circ}\text{C}$  ทั้งสิ้น

### 2.3 การศึกษาความสามารถในการใช้คาร์บอนชนิดต่างๆ เป็นแหล่งพลังงานจากภายนอก

หอยดสารละลายสาหร่ายทุกไอโซเลทปริมาตร 50  $\mu$ l ลงบนอาหารแข็งสูตร TAP ที่ลดไนโตรเจนลงเหลือ 50% (TAP 50%N) จากอาหาร TAP สูตรปกติ ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ sodium acetate (ชุดควบคุม) sodium pyruvate fructose และ xylose โดยแหล่งคาร์บอนทุกชนิดจะมีปริมาณคาร์บอนเข้มข้นเท่ากับ 1% glucose (w/v) แต่ละชุดทดลองมีอย่างน้อย 3 ซ้ำ และแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ให้แสงอย่างต่อเนื่องและกลุ่มที่ไม่ให้แสง (หุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียม) เพื่อศึกษาว่าสาหร่ายสามารถใช้แหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเป็นพลังงานจากภายนอกแทนการสังเคราะห์แสงได้หรือไม่ จากนั้นสังเกตและถ่ายภาพบันทึกผลการเจริญเติบโตด้วยกล้องดิจิทัลทุก 7 วัน

### 2.4 การศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

หอยดสารละลายสาหร่ายทุกไอโซเลทปริมาตร 50  $\mu$ l ลงบนอาหารแข็ง 3 ชนิด ได้แก่ 1) อาหารสูตร TAP 50%N ซึ่งมีชนิดของแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย ( $\text{NH}_4$ ) หรือชุดควบคุม 2) อาหารสูตร TAP 50%N ที่เปลี่ยนชนิดของแหล่งไนโตรเจนไปเป็นไนเตรท ( $\text{NO}_3$ ) และ 3) อาหารสูตร TAP 50%N ที่เปลี่ยนชนิดของแหล่งไนโตรเจนไปเป็นไนไตรท์ ( $\text{NO}_2$ ) โดยทำการปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนในชุดทดลองที่ทำการเปลี่ยนชนิดของแหล่งไนโตรเจนให้เท่ากับชุดควบคุม นั่นคือ 50% จากสูตรปกติ หรือเท่ากับ 3.74 มิลลิโมลาร์ (mM) แต่ละชุดทดลองมีการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยให้แสงอย่างต่อเนื่องและถ่ายภาพบันทึกผลการเจริญเติบโตด้วยกล้องดิจิทัลทุก 7 วัน

### 2.5 การศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์

หอยดสารละลายสาหร่ายทุกไอโซเลทปริมาตร 50  $\mu$ l ลงบนอาหารแข็งสูตร TAP 50%N ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร (g/l) และมีอาหารสูตร TAP 50%N ไม่เติมเกลือเป็นชุดควบคุม โดยแต่ละชุดทดลองมีอย่างน้อย 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยให้แสงอย่างต่อเนื่องและถ่ายภาพบันทึกผลการเจริญเติบโตด้วยกล้องดิจิทัลทุก 7 วัน

### 2.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนีบนอาหารสูตร Bold's basal medium

สืบเนื่องจากการทดสอบทางสรีรวิทยาในสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* โดย Groover และ Bold (1969) ค่อนข้างให้ความสำคัญกับลักษณะการเจริญของโคโลนีและการเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนีบนอาหารสูตร BBM ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายทุกไอโซเลทด้วยวิธี spot test อีกครั้ง เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงสีโคโลนีของสาหร่ายที่คัดแยกได้ โดยหอยดสารละลายสาหร่ายทุกไอโซเลทปริมาตร 50  $\mu$ l ลงบนอาหารแข็งสูตร BBM จำนวน 3 ซ้ำ และนำไปเพาะเลี้ยงโดยให้แสงอย่างต่อเนื่องและถ่ายภาพบันทึกผลการเจริญเติบโตด้วยกล้องดิจิทัลทุก 7 วัน



### 3. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายโพงยุบที่ได้รับคัดเลือก

#### 3.1 การสร้างกราฟของสารแคโรทีนอยด์มาตรฐาน (calibration curve)

การเตรียมทำได้โดยแต่ละสารมาตรฐานปริมาณเล็กน้อยด้วยปลายปิเปตทิปขนาด 200  $\mu\text{l}$  (ขนาดประมาณ 1 ใน 8 ของหัวไม้ขีดไฟ) จุ่มลงในขวดแก้วสีชาที่ได้ทำการเติม chloroform ปริมาตร 1 ml ไว้แล้วเพื่อให้สารมาตรฐานสามารถละลายได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นเขย่า (vortex) และปรับปริมาตรให้เป็น 5 ml ด้วย petroleum ether เพื่อใช้เป็นสารละลายเริ่มต้น (stock solution) ในการเจือจางต่อไป วัดความเข้มข้นของ stock solution ข้างต้นด้วยสมการของ Beer-Lambert หรือ Beer-Lambert's law (Calloway, 1997) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer จากนั้นแทนค่าลงในสมการดังต่อไปนี้

$$A = \epsilon^{1\%} c l$$

เมื่อ

A = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ ณ ความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารมาตรฐานชนิดนั้น ( $\lambda_{\text{max}}$ ) ใน petroleum ether ดังที่รายงานไว้โดย Davies (1965)

$\epsilon^{1\%}$  = extinction coefficient ของสารมาตรฐานใน petroleum ether (Davies, 1965)

c = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ต้องการทราบ มีหน่วยเป็น  $\mu\text{g/ml}$

l = ระยะทางที่แสงส่องผ่าน หรือ ความหนาของ cuvette ที่ใช้วัดซึ่งเท่ากับ 1 cm

นำ stock solution ของสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว มาเจือจางครั้งละ  $\frac{1}{2}$  เท่า จำนวน 6 ครั้งด้วย chloroform และแบ่งสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นที่เขย่าให้เข้ากันเป็นอย่างดี แล้วออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นตามสมการข้างต้น และส่วนที่สองนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC และบันทึกค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่คำนวณได้จากสมการ Beer-Lambert มาสร้างกราฟมาตรฐานร่วมกับค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จาก UPLC โดยให้แกน x เป็นความเข้มข้นของสาร ซึ่งมีหน่วยเป็น  $\mu\text{g/ml}$  และแกน y เป็นค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานเพื่อให้ได้สมการการถดถอยเชิงเส้นสำหรับใช้วิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวอย่างต่อไป

### 3.2 การเตรียมสารสกัดสาหร่าย

การสกัดรงควัตถุของสาหร่ายทำได้โดยนำตัวอย่างเซลล์สาหร่ายในระยะที่ต้องการศึกษาไปผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) จากนั้นชั่งเซลล์ปริมาณ 10 mg มาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งขนาดเล็ก ทั้งนี้จะทำการเติม sea sand เพื่อช่วยในการทำให้เซลล์แตกได้ดียิ่งขึ้น จากนั้นเทเซลล์สาหร่ายที่บดแล้วลงสู่ microcentrifuge tube ขนาด 2 ml เติมน้ำกลั่น (water HPLC grade) 400  $\mu$ l และ methanol 400  $\mu$ l ผสมตัวอย่างให้เข้ากันอย่างแรงเพื่อให้สารละลายและเซลล์สาหร่ายรวมเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มสารสกัดไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 800  $\mu$ l และผสมสารสกัดอย่างแรงอีกครั้งจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเปิดสารละลายส่วนล่างซึ่งจะมีรงควัตถุที่มีขั้วต่ำหรือไม่มีขั้ว (nonpolar phase) ละลายอยู่ย้ายลงสู่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ นำสารสกัดข้างต้นไปกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่อง evaporator and concentrator หรือในกรณีที่ไม่มีเครื่องมือข้างต้นจะกำจัดตัวทำละลายโดยตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควันและปลอดภัย เมื่อสารสกัดแห้งสนิทเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและปลอดภัย

### 3.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง ultrahigh performance liquid chromatography

ในการตรวจวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง UPLC ด้วยวิธีการที่เขียนอธิบายไว้ในเอกสารของ Nogueira และคณะ (2013) โดยนำสารสกัดสาหร่ายที่แห้งสนิทแล้วจากข้อ 3.2 มาละลายด้วย ethyl acetate ปริมาตร 50  $\mu$ l เขย่าจนสารสกัดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงสุด (13,000 รอบต่อนาที) เพื่อกำจัดตะกอนที่ไม่ต้องการให้ตกลงสู่ก้นหลอด จากนั้นจึงนำสารสกัดไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC โดยใช้คอลัมน์ BEH C18 column (2.1 x 100 mm, 1.7  $\mu$ m) ร่วมกับตัวป้องกันคอลัมน์ BEH C18 VanGuard pre-column (2.1 x 50 mm, 1.7  $\mu$ m) และใช้ตัวตรวจจับเป็นแบบ photodiode array (PDA) detector โดยมีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ได้แก่ สารชนิด A คือ methanol:water (50:50 v/v) สารชนิด B คือ acetonitrile:ethyl acetate (75:25 v/v) และรันวิเคราะห์ตัวอย่างตามรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 3-3 จากนั้นวินิจฉัยชนิดของแคโรทีนอยด์โดยเปรียบเทียบกับ retention time และ spectrum ของสารมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 3-4 และคำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์ในตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟกับกราฟของสารมาตรฐานตามวิธีของ Fraser และคณะ (2000)

ตารางที่ 3-3 โปรแกรมในการวิเคราะห์สารแคโรทีนอยด์ตัวอย่างด้วยเครื่อง UPLC

ลำดับที่	% สารละลายชนิด A	% สารละลายชนิด B	ระยะเวลาที่รัน (นาที)
1	50	50	0.5*
2	30	70	4.5
3	0	100	2.0
4	30	70	1.0
5	50	50	2.0

หมายเหตุ: \*0.5 นาทีเท่ากับ 30 วินาที

ตารางที่ 3-4 Retention time และ spectrum ของสารแคโรทีนอยด์มาตรฐาน

ชนิดแคโรทีนอยด์	Retention time (นาที)	Spectra
Astaxanthin	3.152	479.6
Adonixanthin	3.682	466.2
Antheraxanthin	4.081	x, 429.8, 455.3
Zeaxanthin	4.187	x, 454.1, 480.8
Lutein	4.372	x, 448.0, 476.0
Phenicoxanthin	4.573	479.6
Canthaxanthin	5.863	477.2
3-OH-echinenone	6.177	465
echinenone	6.967	460.2
$\beta$ -carotene	8.07	x, 454.1, 479.6

หมายเหตุ: Retention time และ spectrum ของสารแคโรทีนอยด์มาตรฐานเกิดจากการตรวจวิเคราะห์ตามโปรแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 3-3 และ X หมายถึงที่ค่าความยาวคลื่นที่ไม่แน่นอน

#### 4. การจัดจำแนกสาหร่ายที่คัดแยกจากโปงยุบและมีความสามารถในการผลิตคีโตแซโรทีนอยด์

##### 4.1 การจัดจำแนกสาหร่ายด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เนื่องจากสาหร่ายทุกไอโซเลทที่แยกได้มีลักษณะเป็นก้อน ในการศึกษาลักษณะของเซลล์ระยะปกติ (vegetative cell) ทำได้โดยนำตัวอย่างเซลล์สาหร่ายแต่ละไอโซเลทมาเตรียมสไลด์สด (wet mount) ตามปกติ แต่จำเป็นต้องใช้ micro pestle บดเบาๆ (ระวังอย่างมากเพื่อป้องกันเซลล์แตก) เพื่อช่วยให้สาหร่ายหลุดออกจากกันและง่ายต่อการศึกษามากขึ้น ส่วนในการศึกษาลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์ หรือ ซูโอสปอร์ (zoospore) ทำได้โดยเขี่ยเซลล์สดของสาหร่ายแต่ละไอโซเลทจากจานเพาะเชื้อวางลงบนกระจกสไลด์โดยไม่เติมน้ำ จากนั้นใช้ micro pestle บดวนตามเข็มนาฬิกาอย่างแรงบนกระจกสไลด์ จากนั้นจึงหยดน้ำกลั่นและปิดกระจกสไลด์ก่อนนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเลนส์ประกอบ และใช้เอกสารทางวิชาการประกอบการจัดจำแนกชนิดของสาหร่าย (Wehr et al., 2015, Herndon, 1958, Groover and Bold, 1969)

##### 4.2 การจัดจำแนกสาหร่ายด้วยลักษณะทางสรีรวิทยา

สืบเนื่องจากการทดสอบทางสรีรวิทยาของสาหร่ายแต่ละไอโซเลทในวิธีการทดลองที่ 2 ผู้วิจัยได้นำผลจากการทดสอบเหล่านั้น มาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความแตกต่างเพื่อการจัดจำแนกสาหร่าย โดยเพื่อหลีกเลี่ยงความลำเอียงที่เกิดจากตัวผู้วิจัย ในวิธีการทดลองนี้จึงได้วัดความแตกต่างให้อยู่ในระบบตัวเลขและข้อมูลเชิงปริมาณ โดยใช้ตัววัด (parameter) 3 ลักษณะใหญ่ และในแต่ละลักษณะใหญ่จะแบ่งเป็นลักษณะย่อย (character) 17 ลักษณะ ดังแสดงในตารางที่ 3-5 ซึ่งตารางดังกล่าวเป็นผลจากการเก็บข้อมูลและแปลผลด้วยตัววัดแต่ละลักษณะ ดังต่อไปนี้

1) ความสามารถในการเจริญเติบโตของสาหร่ายบนอาหารชนิดต่างๆ โดยลักษณะนี้จะมีโอกาสเป็นได้ 2 ทางเท่านั้น คือ พบการเจริญเติบโตของสาหร่ายบนอาหารชนิดนั้นๆ และไม่พบการเจริญเติบโตหรือสาหร่ายไม่เพิ่มจำนวนเลยบนอาหารชนิดนั้นๆ โดยจะแทนแต่ละลักษณะด้วยตัวเลขได้แก่ 1 และ 0 ตามลำดับ

2) มวลชีวภาพสาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารชนิดต่างๆ ซึ่งลักษณะนี้จะมีโอกาสเป็นได้ตั้งแต่ 1 จนถึง 5 โดยตัวเลขที่ได้เกิดจากการเก็บเซลล์ของสาหร่ายที่ทำการทดสอบทางสรีรวิทยาแต่ละชุดทดลอง (ซึ่งมีอย่างน้อย 3 ซ้ำ) จากนั้นนำน้ำหนักเซลล์แห้งที่ซั่งได้มาทำการจัดกลุ่มทางสถิติโดยใช้ post hoc Duncan's test (one-way ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสาหร่ายแต่ละไอโซเลท จากนั้นแทนแต่ละลักษณะย่อยด้วยตัวเลขตามผลการจัดกลุ่มทางสถิติ (ตารางที่ 3-5)

3) สีโคโลนีสาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารชนิดต่างๆ ซึ่งลักษณะนี้จะมีโอกาสเป็นได้ตั้งแต่ 1 จนถึง 5 โดยตัวเลขที่ได้เกิดจากการวัดสีของโคโลนีสาหร่ายด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS3 ใช้คำสั่งหาค่า RGB เพื่อวัดค่า R (ตัวแทนของสีแดง) ทำการวัดซ้ำ 3 โคโลนีๆ ละ 5 จุด จากนั้นนำค่า R ที่ได้ในสาหร่ายแต่ละไอโซเลทมาจัดกลุ่มทางสถิติโดยใช้ post hoc Duncan's test (one-way ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสาหร่ายแต่ละไอโซเลท จากนั้นแทนแต่ละลักษณะย่อยด้วยตัวเลขตามผลการจัดกลุ่มทางสถิติ (ตารางที่ 3-5)

เพื่อสามารถนำลักษณะทางสรีรวิทยา มาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ระหว่างสาหร่ายแต่ละไอโซเลท ผลการวิเคราะห์ในแต่ละลักษณะย่อยรวมทั้งหมด 37 ลักษณะ ที่ได้เปลี่ยนให้อยู่ในระบบตัวเลขแล้ว (ตารางที่ 3-5) จะถูกนำมาจัดเรียงเปรียบเทียบ (alignment) ด้วยโปรแกรม Bioedit V.7.0.9 (Hall, 1999) จากนั้นคำนวณค่าดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index) ด้วยวิธี simple matching ของ Sneath และ Sokal (1973) และสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ด้วยคำสั่ง unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) cluster analysis ด้วยโปรแกรม PAUP 4.0 b10 (Swofford, 2003)

ตารางที่ 3-5 ข้อมูลลักษณะทางสรีรวิทยาวิเคราะห์ในระบบตัวเลขของสาหร่ายโป่งยุบ

TAXA	Ctrl (NH <sub>4</sub> )	<sup>1</sup> Carbon source								<sup>1</sup> Nitrogen source		NaCl concentration				<sup>1</sup> BBM <sub>14</sub>	<sup>1</sup> BBM <sub>28</sub>
		light				dark				NO <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	5g/l	10g/l	15g/l	20g/l		
		Ac	Py	Fr	Xy	Ac	Py	Fr	Xy								
<sup>2</sup> ความสามารถในการเจริญเติบโตของสาหร่ายบนอาหารชนิดต่างๆ																	
PY01	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	NA
PY02	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	NA
PY03	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	NA
PY04	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	NA
PY05	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	NA
<sup>3</sup> มวลชีวภาพของสาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารชนิดต่างๆ																	
PY01	1	2	2	2	3	NA	NA	NA	NA	1	NA	1	2	2	1	NA	NA
PY02	1	2	3	2	4	NA	NA	NA	NA	1	NA	1	2	3	1	NA	NA
PY03	1	1	1	1	2	NA	NA	NA	NA	1	NA	1	1	1	1	NA	NA
PY04	1	1	3	1	2	NA	NA	NA	NA	1	NA	1	2	1	1	NA	NA
PY05	1	1	3	3	1	NA	NA	NA	NA	1	NA	1	2	2	2	NA	NA
<sup>4</sup> สีของโคโลนีสาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารชนิดต่างๆ																	
PY01	1	1	1	2	1	NA	NA	NA	NA	1	NA	1	1	1	NA	1	2
PY02	1	1	1	2	1	NA	NA	NA	NA	1	NA	1	1	1	NA	1	2
PY03	1	1	3	2	1	NA	NA	NA	NA	1	NA	1	1	1	NA	1	2
PY04	1	1	2	2	1	NA	NA	NA	NA	1	NA	1	1	1	NA	1	3
PY05	2	2	1	1	1	NA	NA	NA	NA	1	NA	2	2	1	NA	1	1

หมายเหตุ:

<sup>1</sup>Ac=acetate Py=pyruvate Fr=fructose Xy=xylose NO<sub>3</sub>=nitrate NO<sub>2</sub>=nitrite BBM =Bold's Basal medium

<sup>2</sup>ตัวเลขแสดงความสามารถในการเจริญบนอาหารของสาหร่ายแต่ละไอโซเลท 0=ไม่มีการเจริญ 1=มีการเจริญ

<sup>3</sup>ตัวเลขแสดงกลุ่มน้ำหนักแห้งของสาหร่ายที่จัดด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้ post hoc Duncan's test (ANOVA) n=3 P<0.05 ด้วย SPSS

<sup>4</sup>ตัวเลขแสดงกลุ่มสีโคโลนีของสาหร่ายที่วัดจากรูปภาพด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS3 จากการอ่านค่า R จาก RGB โดยจัดกลุ่มโดย post hoc Duncan's test (ANOVA) n=15 P<0.05 ด้วย SPSS

NA = ไม่มีข้อมูลเนื่องจากไม่มีการเจริญของสาหร่ายบนอาหารดังกล่าว หรือข้อมูลที่มีไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้

### 4.3 การจัดจำแนกสายห่วยด้วยลักษณะทางอณูชีววิทยา

#### 4.3.1 การสกัดสารพันธุกรรม

สกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธี phenol:chloroform extraction ตามวิธีการของ Sambrook และคณะ (2001) โดยใช้ปิเปตทิปขนาด 1000  $\mu\text{l}$  ชูดตัวอย่างเซลล์สายห่วยจากจานเพาะเชื้อขนาดประมาณเมล็ดถั่วเขียวลงสู่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย TEN buffer ปริมาตร 500  $\mu\text{l}$  แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายทั้งหมดทิ้งไป แล้วจึงนำมาเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 150  $\mu\text{l}$  พร้อมกับเติม SDS-EB buffer ปริมาตร 300  $\mu\text{l}$  และ phenol:chloroform:isoamyl-alcohol ปริมาตร 350  $\mu\text{l}$  เขย่าอย่างแรงเพื่อให้เซลล์แตก โดยในขั้นตอนนี้อาจใช้ micro pestle ร่วมด้วย จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จะพบว่าสารละลายแยกชั้น นำสารละลายส่วนใสชั้นบนซึ่งมีสารพันธุกรรมละลายอยู่ถ่ายลงสู่ microcentrifuge tube หลอดใหม่และเติม 95% ethanol ที่แช่เย็นปริมาตร 2 เท่าของสารละลายข้างต้น ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา และบ่มที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  อย่างน้อย 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA) จากนั้นเทสารละลายทั้งหมดทิ้งแล้วเติม 70% ethanol ปริมาตร 800  $\mu\text{l}$  เพื่อล้างตะกอน DNA อีกครั้งและปั่นเหวี่ยงเช่นเดิม เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงเทสารละลายทั้งหมดออกและทิ้งให้ ethanol ระเหยไปจนหมดประมาณ 15-20 นาที เมื่อตกตะกอน DNA แห้งแล้วละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

#### 4.3.2 ปฏิกริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR)

##### 4.3.2.1 ปฏิกริยาพีซีอาร์สำหรับเทคนิค RAPD

การทำปฏิกริยาพีซีอาร์ในเทคนิค RAPD จะเริ่มต้นโดยการปรับความเข้มข้นของ genomic DNA (gDNA) ของสายห่วยทุกไอโซเลทให้เท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) ก่อน จากนั้นจึงนำ gDNA ที่เจือจางแล้วไปเตรียมส่วนผสมในปฏิกริยาพีซีอาร์ ซึ่งมีปริมาตรรวม 25  $\mu\text{l}$  อันประกอบไปด้วย gDNA ( $40 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) ปริมาตร 0.5  $\mu\text{l}$  random primer ( $10 \mu\text{M}$ ) ปริมาตร 1.7  $\mu\text{l}$  dNTPs ( $10 \text{ mM}$ ) ปริมาตร 0.5  $\mu\text{l}$  Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.125  $\mu\text{l}$  PCR buffer (10X) ปริมาตร 2.5  $\mu\text{l}$  และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 19.7  $\mu\text{l}$  โดยสายห่วยทุกไอโซเลทจะได้รับการทำปฏิกริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 12 ชนิด (ตารางที่ 3-2) ทำซ้ำทั้งหมด 3 รอบ และแต่ละรอบเป็นอิสระต่อกัน โดยโปรแกรมที่ใช้ในปฏิกริยาพีซีอาร์ในเทคนิค RAPD ด้วยเครื่อง thermocycler มีดังต่อไปนี้

- 1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ  $94^{\circ}\text{C}$  นาน 6 นาที
- 2) denaturation ที่อุณหภูมิ  $94^{\circ}\text{C}$  นาน 1 นาที
- 3) annealing ที่อุณหภูมิ  $45^{\circ}\text{C}$  นาน 2 นาที
- 4) extension ที่อุณหภูมิ  $72^{\circ}\text{C}$  นาน 2 นาที
- 5) terminal extension ที่อุณหภูมิ  $72^{\circ}\text{C}$  นาน 6 นาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 ทั้งหมด 35 รอบ แล้วจึงเริ่มปฏิกิริยาในขั้นตอนที่ 5 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้ไปทำการแยกขนาดชิ้นส่วน DNA ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) 1.5% agarose gel (1.5% agarose ใน 1XTAE buffer) ร่วมกับ 1XTAE buffer จากนั้นนำไปส่องและเก็บภาพภายใต้เครื่องส่องเจลด้วยรังสียูวี หรือเครื่อง gel documentation และบันทึกภาพเพื่อนำไปทำการแปลผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นต่อไป

#### 4.3.2.2 ปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของตำแหน่งยีน

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ที่ตำแหน่งยีน *tufA* และ 18S rDNA นั้น จะทำการเตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งมีปริมาตรรวม 50  $\mu$ l อันประกอบไปด้วย gDNA (40 ng/ $\mu$ l) ปริมาตร 1  $\mu$ l primer forward และ reward (20  $\mu$ M) ชนิดละ 1  $\mu$ l dNTPs (10 mM) ปริมาตร 1  $\mu$ l *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.25  $\mu$ l PCR buffer (10X) ปริมาตร 5  $\mu$ l และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 40.75  $\mu$ l โดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 3-1 และโปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเครื่อง thermocycler มีดังต่อไปนี้

- 1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที
- 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที
- 3) annealing ที่อุณหภูมิ 55°C (*tufA*) 45°C (18S rDNA) นาน 30 วินาที
- 4) extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที 30 วินาที
- 5) terminal extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 6 นาที

โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 ทั้งหมด 30 รอบ แล้วจึงเริ่มปฏิกิริยาในขั้นตอนที่ 5 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไปทำการตรวจสอบและส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (1st BASE, SG) เพื่อนำข้อมูลมาทำการจัดเรียงเปรียบเทียบ (BLAST search) กับฐานข้อมูล NCBI GenBank เพื่อบ่งชี้ชนิดสายสำหรับ และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปใช้ในการจำแนกและการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ต่อไป

#### 4.3.3 การศึกษาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

นำผลภาพถ่ายลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายแต่ละไอโซเลทที่ได้จากการทดลองที่ 4.3.2.1 มาทำการแปลผลให้อยู่ในระบบตัวเลข โดยตำแหน่งที่ไม่พบแถบ (band) DNA แทนด้วย 0 และตำแหน่งที่พบแถบแทนด้วย 1 ดังตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 3-1 เมื่อได้ข้อมูลของสายแต่ละไอโซเลทที่อยู่ในระบบตัวเลขแล้ว นำไปจัดเรียงเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม Bioedit V.7.0.9 (Hall, 1999) จากนั้นคำนวณค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมตามวิธีของ Nei และ Li (1979) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายด้วยคำสั่ง UPGMA cluster analysis โดยใช้โปรแกรม PAUP 4.0 b10 (Swofford, 2003)

RAPD DNA fingerprint				ผลในระบบตัวเลข			
S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
—	—	—	—	→ 1	1	1	1
	—	—	—	→ 0	1	1	1
—	—	—		→ 1	1	1	0
	—	—		→ 0	1	1	0
—	—			→ 1	1	0	0
—	—	—	—	→ 1	1	1	1
—				→ 1	0	0	0
—	—	—	—	→ 1	1	1	1
—	—	—	—	→ 1	1	1	1

รูปที่ 3-1 แผนภาพแสดงวิธีการแปลผล RAPD DNA fingerprint ให้อยู่ในระบบตัวเลข

#### 4.3.4 การจำแนกและการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *tufA* และ 18S rDNA

ในการจัดจำแนกและการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tufA* และ 18S rDNA นั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีนจากสาหร่ายนอกกลุ่ม สาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* ที่ได้รับการตรวจวิเคราะห์และตีพิมพ์งานวิจัยก่อนหน้านี้ และสาหร่ายในสกุลใกล้เคียงที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI ได้ถูกนำมาจัดเรียงร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายที่คัดแยกได้ โดยใช้โปรแกรม Bioedit v. 7.0.9 (Hall, 1999) ด้วยคำสั่งอัตโนมัติ CLUSTALW multiple alignment ทำการปรับแต่งและแก้ไขหลังการจัดเรียงโดยการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีความชัดเจนบริเวณส่วนหัวและส่วนท้ายของลำดับ จากนั้นจึงนำชุดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tufA* และ 18S rDNA มาคำนวณร้อยละความคล้ายคลึง (% similarity) และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (cladogram) ด้วยโปรแกรม PAUP version 4.0 b10 (Swofford, 2003) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum parsimony และใช้คำสั่ง Heuristic search ในการค้นหา Most parsimonious tree ด้วยจำนวนซ้ำเท่ากับ 1,000 ครั้ง และใช้คำสั่งคำนวณค่า bootstrap support ด้วยจำนวนซ้ำเท่ากับ 1,000 ครั้ง



## 5. การศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ในสาหร่าย *Chlorosarcinopsis* PY02

### 5.1 การศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ในสาหร่าย

เตรียมสารละลายสาหร่ายไอโซเลท PY02 ตามวิธีการทดลองที่ 2.1 จากนั้นทำการหดยุติสารละลายสาหร่ายดังกล่าวปริมาตร 10  $\mu$ l ลงบนอาหารสูตร TAP ที่มีการเพิ่มและลดความเข้มข้นของไนโตรเจน ซึ่งได้แก่ อาหารสูตร TAP ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 2 เท่า (2XN) และ 3 เท่า (3XN) และอาหารสูตร TAP ที่ลดความเข้มข้นของไนโตรเจนลงเหลือ 50% (50%N) และเหลือ 10% (10%N) โดยมีอาหารสูตร TAP ปกติเป็นชุดควบคุม ซึ่งแต่ละชุดทดลองมี 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยให้แสงอย่างต่อเนื่องและถ่ายภาพบันทึกผลการเจริญเติบโตด้วยกล้องดิจิทัลทุกๆ 7 วัน เพื่อติดตามการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนี

### 5.2 การศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในสาหร่าย

จากผลการทดลองที่ 5.1 ผู้วิจัยจึงได้เลือกเฉพาะความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ลดลงมาทำการศึกษาต่อ โดยเตรียมสารละลายสาหร่ายไอโซเลท PY02 ตามวิธีการทดลองที่ 2.1 จากนั้นหดยุติสารละลายสาหร่ายข้างต้นปริมาตร 50  $\mu$ l บนอาหารแข็ง 3 สภาวะ ได้แก่ อาหารสูตร TAP ปกติเป็นชุดควบคุม อาหารสูตร TAP 50%N และอาหารสูตร TAP 10%N โดยแต่ละชุดทดลองจะมีอย่างน้อย 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยให้แสงอย่างต่อเนื่อง และเก็บเซลล์สาหร่ายทุก 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง (28 วัน) เซลล์สาหร่ายที่เก็บทั้งหมดจะถูกนำไปผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง (DW) เพื่อนำไปคำนวณอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (relative growth rate; RGR) ซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมต่อวัน ( $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) ดังสมการต่อไปนี้ (Hoffmann and Poorter, 2002) จากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ข้างต้นไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง UPLC ตามวิธีการทดลองที่ 3

$$\text{RGR} = \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{(t_2 - t_1)}$$

เมื่อ

$W_1$  = น้ำหนักเซลล์สาหร่ายแห้งเริ่มต้น (mg)

$W_2$  = น้ำหนักเซลล์สาหร่ายวันสุดท้าย (mg)

$t_1$  = วันเริ่มต้นของการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย ในที่นี้เท่ากับ 0 (d)

$t_2$  = วันวันสิ้นสุดของการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย (d)

## 6. การศึกษาปริมาณที่แตกต่างกันของอาหารเพาะเลี้ยงชนิดเหลวต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคนธินในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorosarcinopsis* PY02

จากผลการทดลองที่ 5 อาหารสูตร TAP 50%N จึงได้รับเลือกมาทำการศึกษาต่อ โดยทำการเตรียมสารละลายสาหร่ายไอโซเลท PY02 ตามวิธีการทดลองที่ 2.1 จากนั้นหยดสารละลายสาหร่ายข้างต้นปริมาตร 50  $\mu$ l ลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร TAP ที่มีปริมาณอาหารแตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 15 30 และ 60 ml ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 ml (Duran laboratory glass bottle) โดยแต่ละชุดทดลองจะมีอย่างน้อย 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยให้แสงอย่างต่อเนื่องและทำการเขย่าวันละ 1 ครั้ง เก็บเซลล์ทุกๆ 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง (28 วัน) เซลล์สาหร่ายที่เก็บทั้งหมดจะถูกนำไปผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง (DW) เพื่อนำไปคำนวณหาค่า RGR ( $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) ดังที่ได้แสดงไปแล้วในการทดลองที่ 5.2 (Hoffmann and Poorter, 2002) จากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ข้างต้นไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง UPLC ตามวิธีการทดลองที่ 3

## 7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการทดลองที่มีการเก็บข้อมูลเชิงปริมาณและมีชุดทดลองละอย่างน้อย 3 ซ้ำขึ้นไป ข้อมูลดังกล่าวจะถูกนำไปคำนวณค่าเฉลี่ยพร้อมกับแสดงค่าความคลาดเคลื่อน ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ) นอกจากนี้ข้อมูลดิบทั้งหมดจะถูกนำไปวิเคราะห์ผลกระทบของปัจจัยต่อตัวแปรดังกล่าวด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิธี one way analysis of variant (ANOVA) จากนั้นทำการจัดกลุ่มด้วยสถิติ post hoc Duncan's test และแสดงการจัดกลุ่มเป็นตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก

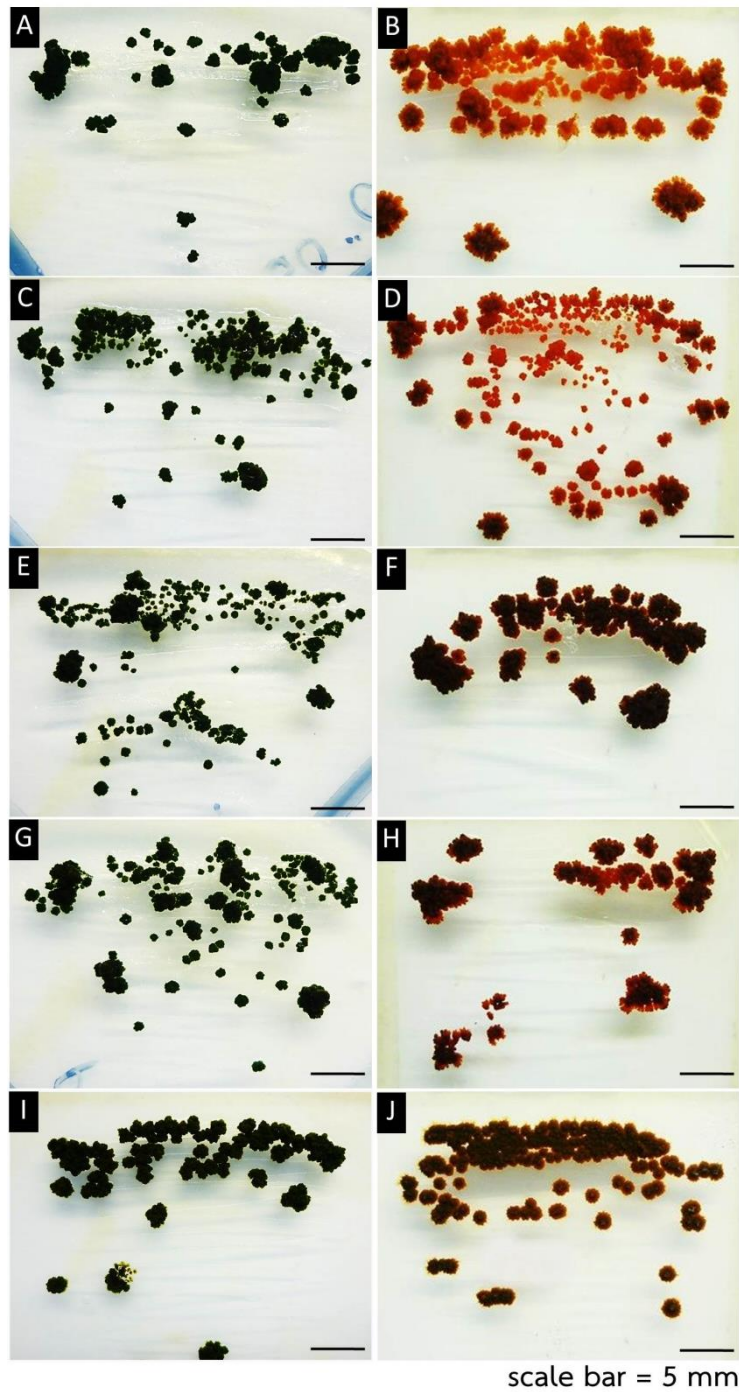


#### บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

##### 1. การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมคลอโรทินอยด์

จากการเก็บตัวอย่างดินจาก โป่งยุบ อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี เพื่อนำมาทำการคัดแยกหาสาหร่ายที่มีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมคลอโรทินอยด์อย่างโดดเด่น ด้วยคุณลักษณะการเปลี่ยนสีของโคลนีสากร่ายจากสีเขียวไปเป็นสีส้มจนถึงแดง พบว่า ตัวอย่างดินที่นำมาบ่ม (incubate) ในน้ำกลั่นภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการและให้แสงอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เริ่มพบการเจริญเติบโตของสาหร่ายเมื่อบ่มเป็นระยะเวลาประมาณ 1 เดือน โดยจะสังเกตเห็นว่าดินและน้ำกลั่นที่ใช้บ่มเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อน เมื่อสังเกตพบการเจริญของสาหร่ายแล้วจึงนำสาหร่ายไปคัดแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (axenic culture) ด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็งสูตร high-salt medium (HSM) และทำการลากลอกเชื้อซ้ำหลายครั้ง จากนั้นจึงนำสาหร่ายที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์อื่นแล้วไปทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง 4 ชนิด ได้แก่ HSM-TAP BBM และ BG11

ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารข้างต้นทำให้พบสาหร่ายที่มีการเปลี่ยนสีโคลนีสากร่ายจากสีเขียวไปเป็นสีส้มจนถึงแดงเข้มอย่างชัดเจนจำนวน 5 ไอโซเลท (ซึ่งตรวจพบในภายหลังว่าสามารถสังเคราะห์และสะสมคลอโรทินอยด์ได้) บนอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร TAP เป็นระยะเวลาประมาณ 1 เดือน (รูปที่ 4-1) ผู้วิจัยจึงตั้งชื่อสาหร่ายดังกล่าวว่า สาหร่ายโป่งยุบ (Pong-Yup; PY) โดยให้ชื่อแต่ละไอโซเลทเป็น PY01 PY02 PY03 PY04 และ PY05 สาหร่ายทั้ง 5 ล้วนมีความสามารถในการเจริญเติบโตในสภาวะห้องปฏิบัติการ อีกทั้งยังสามารถเพิ่มมวลชีวภาพจากโคลนเดี่ยวได้ ซึ่งทำให้สะดวกต่อการแยกเพาะเลี้ยงจนได้เชื้อสาหร่ายที่บริสุทธิ์เพื่อนำมาศึกษาต่อถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการศึกษาอื่นๆต่อไป



รูปที่ 4-1 การเปลี่ยนสีโคโลนีจากสีเขียวไปเป็นสีแดงของสาหร่ายโป่งยวบ  
 เพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็งสูตร TAP เมื่อ re-streak สาหร่ายสามารถสร้างโคโลนีเดี่ยวได้

(A-B) PY01

(C-D) PY02

(E-F) PY03

(G-H) PY04

(I) PY05

## 2. ลักษณะทางสรีรวิทยาของสาหร่ายโป่งยุบ

### 2.1 อาหาร อุณหภูมิที่เหมาะสม และรูปแบบการเจริญเติบโต

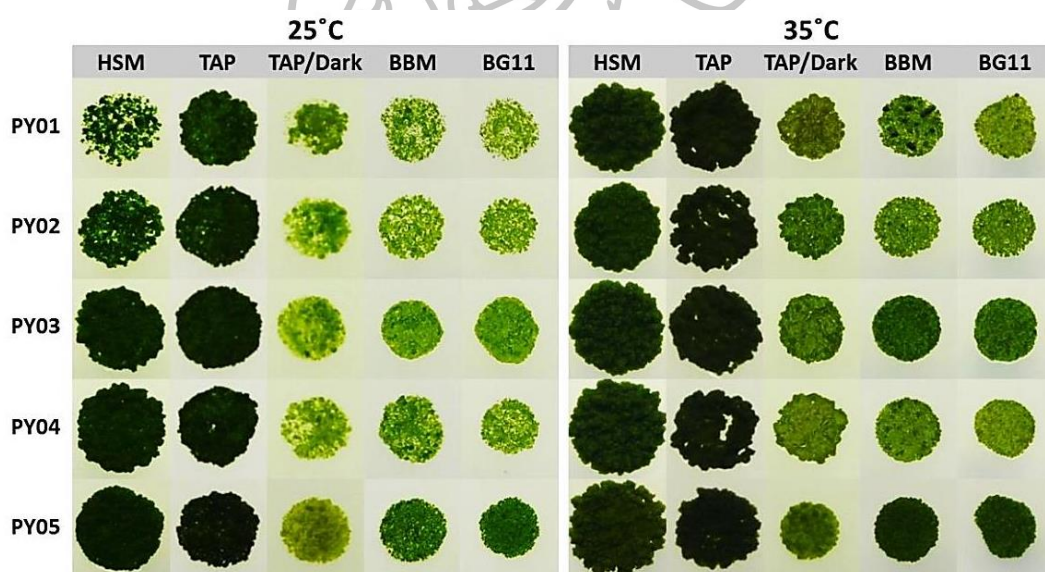
ผลการศึกษารูปแบบการเจริญรวมไปถึงชนิดของอาหารที่เหมาะสมเบื้องต้น ด้วยวิธีการหยดสาหร่ายบนอาหารทดลอง (spot test) ของสาหร่ายทั้ง 5 ไอโซเลท ที่ระดับอุณหภูมิ 25°C และ 35°C (รูปที่ 4-2) พบว่าสาหร่ายทุกไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตบนอาหารสูตร HSM ซึ่งเป็นสูตรอาหารสำหรับแยกเพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิต autotroph ที่มีแร่ธาตุที่จำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตอย่างจำกัด (minimal media) และอาหารสูตร TAP ได้ดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่อุณหภูมิ 35°C จะสังเกตเห็นได้ว่าในระยะเวลาที่เท่ากัน (7 วัน) โคโลนีมีขนาดใหญ่กว่าที่อุณหภูมิ 25°C อย่างเห็นได้ชัด ส่วนบนอาหารสูตร BBM และ BG11 นั้น แม้มีการเจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่ากับอาหารสูตร HSM และ TAP แต่สาหร่ายยังคงสามารถเจริญเติบโตได้ และยังพบว่า โคโลนีของสาหร่ายบนอาหารดังกล่าวที่อุณหภูมิ 35°C มีสีเขียวเข้มกว่าที่อุณหภูมิ 25°C เช่นเดียวกัน (รูปที่ 4-2) จากผลการทดลองเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 35°C อาจเป็นสภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญของสาหร่ายทั้ง 5 ไอโซเลท หรือกล่าวได้ว่าสาหร่ายเหล่านี้เป็นสาหร่ายทนร้อน (thermotolerant algae) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากตู้เพาะเลี้ยงสาหร่าย (growth chamber) เกิดการชำรุดในเวลาต่อมา ผู้วิจัยจึงไม่สามารถตั้งค่าระบบการทดลองที่อุณหภูมิ 35°C ได้ ประกอบกับระบบที่ระดับอุณหภูมิ 25°C ภายในห้องปฏิบัติการสามารถควบคุมเสถียรภาพได้เป็นอย่างดี จึงได้เลือกทำการทดลองต่อไปที่อุณหภูมิ 25°C ตลอดทั้งหมด

ในการศึกษาครั้งนี้มีการนำอาหารสูตร TAP ซึ่งเป็นอาหารที่มีส่วนผสมของอะซิเตท (acetate) มาใช้เพื่อทดสอบว่าสาหร่ายที่แยกได้ทั้ง 5 ไอโซเลทสามารถใช้ acetate เป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนจากภายนอกได้หรือไม่ โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้งในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง พบว่าสาหร่ายทุกไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งสองสภาวะ แต่จะเจริญได้ดีกว่าอย่างเห็นได้ชัดในสภาวะที่มีแสง (รูปที่ 4-2) ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า สาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลท มีความสามารถเจริญเติบโตทั้งแบบ ออโตโทรฟ (autotroph) มิกโซโทรฟ (mixotroph) และเฮเทโรโทรฟ (heterotroph)

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลาประมาณ 1 เดือน พบว่า โคโลนีของสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลท ในชุดทดลองบนอาหารสูตร HSM จะเริ่มซีดและตายโดยไม่มีการเปลี่ยนไปเป็นสีแดง ในขณะที่โคโลนีของสาหร่ายในชุดทดลองบนอาหารสูตร TAP มีการเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีแดง ซึ่งบ่งบอกถึงการสะสมแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ (secondary carotenoid) ขึ้นในเซลล์เป็นจำนวนมากจนสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า ผลดังกล่าวอาจเป็นผลมาจาก acetate ที่มีอยู่ในอาหารสูตร TAP ที่กระตุ้นให้สาหร่ายสังเคราะห์และสะสม secondary carotenoid เช่นเดียวกับที่มีรายงานในสาหร่ายชนิด *Haematococcus pluvialis* (Kobayashi et al., 1993, Jeon et al., 2006) ที่พบว่า acetate ช่วยกระตุ้นการสะสมแอสตาแซนธิน (astaxanthin) ในสาหร่ายดังกล่าว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก acetate เป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่ดีสำหรับกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ดังที่ได้มีรายงานในงานวิจัยของ Kobayashi และคณะ (1991)

ความสามารถในการเจริญแบบ mixotroph และ heterotroph ของสาหร่าย ในปัจจุบันยัง กลายมาเป็นข้อได้เปรียบทางเศรษฐกิจมากกว่าการเจริญแบบ autotroph เพียงอย่างเดียว (Perez-Garcia et al., 2010) เนื่องจากทำให้สามารถนำสาหร่ายไปศึกษาได้ง่ายยิ่งขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นรูปแบบ การเจริญที่หลากหลายดังกล่าวยังเอื้อต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะแวดล้อมที่มีแสงน้อย หรือไม่ จำเป็นต้องมีแสง เช่น การเพาะเลี้ยงในถังเลี้ยงขนาดใหญ่ (fermenter) ซึ่งนับว่ามีเทคโนโลยีการผลิต ที่ก้าวหน้าไปมากกว่าถังเร่งปฏิกิริยาชีวภาพแบบใช้แสง (photobioreactor) เป็นอย่างมาก ที่ผ่านมา จึงมีนักวิจัยจำนวนมากพยายามค้นหาสาหร่ายที่มีรูปแบบการเจริญที่ไม่ต้องอาศัยแสงแต่เพียงอย่าง เดียวเพื่อลดปัญหาเรื่องแสงไม่เพียงพอ เช่น การศึกษาการกระตุ้นในสาหร่าย *Chlorella zofingiensis* สะสม astaxanthin ภายใต้สภาวะ heterotroph ด้วยการเติมน้ำตาลกลูโคส (Sun et al., 2008) และทั้งภายใต้สภาวะ mixotroph และ heterotroph ในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* (Kobayashi et al., 1992b)

เนื่องด้วยสาหร่ายโง่ยุบทั้งหมดแสดงลักษณะที่บ่งชี้ถึงการสะสมแคโรทีนอยด์อย่างโดดเด่น โดยการเปลี่ยนสีโคลนไปเป็นสีแดงเข้ม เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร TAP อีกทั้งยังเจริญเติบโตได้ ใกล้เคียงกับอาหารสูตร HSM (ซึ่งโคลนนี้สาหร่ายจะไม่เปลี่ยนสี) ผู้วิจัยจึงเลือกอาหารสูตร TAP เพื่อใช้ ศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของสาหร่ายต่อไปในทุกการทดลองหลังจากนี้



รูปที่ 4-2 ชนิดอาหาร อุณหภูมิที่เหมาะสมและรูปแบบการเจริญของสาหร่ายโง่ยุบ

รูปถ่าย ณ วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค spot test

(25°C) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (35°C) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

(HSM) เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร HSM (TAP) เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร TAP

(TAP/dark) เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร TAP ไม่ให้แสง (BBM) เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร BBM

(BG-11) เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร BG11

## 2.2 ความสามารถในการใช้คาร์บอนชนิดต่างๆ เป็นแหล่งพลังงานจากภายนอก

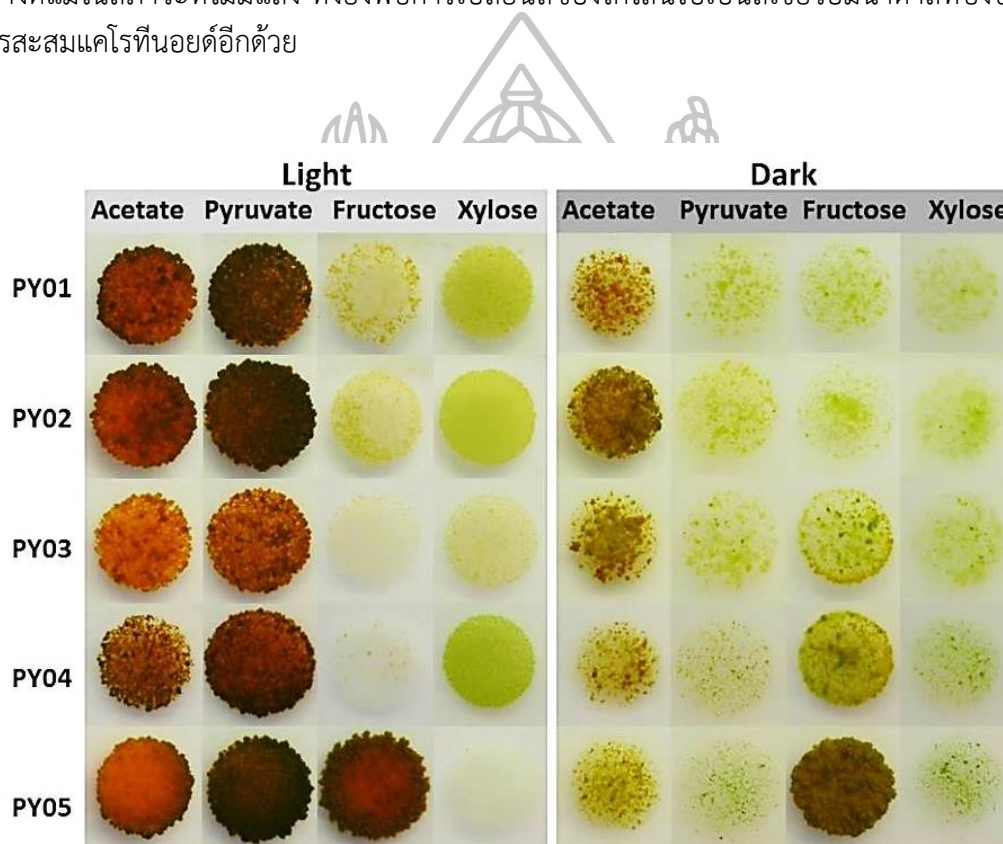
จากผลการทดลองที่ 2.1 แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายโพงยุบทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตแบบ heterotroph ได้ (เจริญได้บนอาหารชนิด TAP/dark) โดยมี acetate เป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนจากภายนอกแทนการสังเคราะห์ด้วยแสง อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนจากภายนอกของสาหร่ายแต่ละชนิดนั้นค่อนข้างจำเพาะกับชนิดของสาหร่าย (Neilson and Lewin, 1974, Francisco et al., 2014) ในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการใช้คาร์บอนชนิดต่างๆ โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารสูตร TAP ที่ลดไนโตรเจนลงเหลือ 50% จากอาหารสูตร TAP ปกติ และมีส่วนประกอบของแหล่งพลังงานคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ ชุดควบคุม (acetate) ไพรูเวท (pyruvate) ฟรุคโตส (fructose) และไซโลส (xylose) ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง โดยการลดไนโตรเจนลงนั้น เพื่อต้องการกระตุ้นให้สาหร่ายสะสมรงควัตถุได้มากและเร็วขึ้น ซึ่งจะทำให้สามารถศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดต่อการเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนีสาหร่ายไปพร้อมกับความสามารถในการนำไปใช้ได้อย่างชัดเจน

ณ วันที่ 14 ของการทดลอง พบว่า ภายใต้สภาวะที่มีแสงสาหร่ายโพงยุบทุกไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่มี acetate และ pyruvate ได้ดีไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4-3 ทั้งยังพบการเปลี่ยนสีของโคโลนีจากสีเขียวไปเป็นสีแดงเช่นเดียวกันอีกด้วย แต่ในสภาวะที่ไม่มีแสงกลับพบว่าสาหร่ายไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้บนอาหารที่มี pyruvate ได้เลย ซึ่งหมายความว่าสาหร่ายโพงยุบทั้งหมดไม่สามารถใช้ pyruvate เป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนจากภายนอกทดแทนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้

ในชุดทดลองบนอาหารที่มี fructose ภายใต้สภาวะที่มีแสง มีเพียงสาหร่ายไอโซเลท PY05 เท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีไปพร้อมกับการเปลี่ยนสีของโคโลนีเป็นสีแดง ในขณะที่ในไอโซเลท PY01 กับ PY02 และ PY03 กับ PY04 เจริญได้เพียงเล็กน้อยและซีดตายเมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 4-3) และเมื่อพิจารณาถึงชุดทดลองบนอาหารที่มี fructose ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง ก็พบผลการทดลองที่คล้ายคลึงกันว่าสาหร่ายไอโซเลท PY05 สามารถเจริญเติบโตได้ดีเกือบใกล้เคียงกับสภาวะที่มีแสง ในขณะที่ในไอโซเลท PY03 กับ PY04 สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้เพียงเล็กน้อย และไม่พบการเจริญได้เลยในไอโซเลท PY01 กับ PY02 จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่าน้ำตาล fructose เป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนภายนอกที่สาหร่ายไอโซเลท PY05 นำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้กระทั่งในสภาวะไม่มีแสง PY05 ก็แสดงให้เห็นว่า สามารถนำน้ำตาล fructose ไปใช้เป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนทดแทนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้เป็นอย่างดี

ส่วนในชุดทดลองบนอาหารที่มี xylose พบว่า ภายใต้สภาวะที่มีแสงสาหร่ายไอโซเลท PY01 PY02 PY03 และ PY04 สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร TAP ปกติจะสังเกตเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน และไม่พบการเจริญเลยในไอโซเลท PY05 นอกจากนี้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงก็พบว่าสาหร่ายทั้งหมดไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้เลย ซึ่งหมายความว่าสาหร่ายโพงยุบทุกไอโซเลทไม่สามารถใช้น้ำตาล xylose เป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนจากภายนอกได้

จากผลทั้งหมดในการทดลองนี้บ่งบอกว่าสาหร่ายโพงยุบทั้ง 5 ไอโซเลท มีลักษณะทางสรีรวิทยาในด้านความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนคล้ายคลึงกับสาหร่ายขนาดเล็กโดยทั่วไป (Droop, 1974) ซึ่งพบว่า acetate เป็นแหล่งคาร์บอนชนิดที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ข้อสังเกตที่พบคือ สาหร่ายไอโซเลท PY05 มีลักษณะทางสรีรวิทยาที่แตกต่างจากไอโซเลทอื่นอย่างเห็นได้ชัดจนบนอาหารที่มี fructose เป็นแหล่งคาร์บอน ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะที่น่าสนใจเป็นอย่างมากต่อการนำไปศึกษาต่อการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ heterotroph ในอนาคต เนื่องจากพบว่า เมื่อมี fructose เป็นแหล่งพลังงาน PY05 สามารถเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดีแม้ในสภาวะที่ไม่มีแสง ทั้งยังพบการเปลี่ยนสีของโคโลนีไปเป็นสีเขียวอมน้ำตาลที่บ่งบอกถึงการสะสมแคโรทีนอยด์อีกด้วย



รูปที่ 4-1 การเจริญเติบโตบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันของสาหร่ายโพงยุบ  
รูปถ่าย ณ วันที่ 14 ของการทดลอง

(Light) เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง

(Dark) เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีแสง

(Acetate) อาหารที่มีอะซิเตท

(Pyruvate) อาหารที่มีไพรูเวท

(Fructose) อาหารที่มีฟรุคโตส

(Xylose) อาหารที่มีไซโลส



### 2.3 ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

ผลการศึกษานิตของแหล่งไนโตรเจนที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ได้ ได้แก่ แอมโมเนีย ( $\text{NH}_4$ ) หรือชุดควบคุม (เนื่องจากเป็นชนิดแหล่งไนโตรเจนในอาหารสูตร TAP ปกติ) ไนเตรท ( $\text{NO}_3$ ) และ ไนไตรท์ ( $\text{NO}_2$ ) โดยเปลี่ยนชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารสูตร TAP และปรับความเข้มข้นของ ไนโตรเจนให้เท่ากับ 50% ของอาหารปกติ จากนั้นบันทึกผล ณ วันที่ 14 ของการทดลอง โดยผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4-4 จะสังเกตพบว่า สาหร่ายทุกไอโซเลทชิตตายและไม่พบการเจริญใดๆ เลยบนอาหารที่มีไนไตรท์ ในขณะที่บนอาหารที่มีแอมโมเนียและไนเตรทสามารถเจริญได้ดีและมีขนาดโคโลนีใกล้เคียงกัน ซึ่งหมายความว่า สาหร่ายโง่ยู่ทั้ง 5 ไอโซเลทไม่สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนชนิด ไนไตรท์ได้ แต่สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดแอมโมเนียและไนเตรทได้ดีทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกัน เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายโง่ยู่ทั้ง 5 ไอโซเลท มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่สามารถนำไปใช้ได้เหมือนกัน ซึ่งผลดังกล่าวก็ยังคงคล้ายคลึงกับสาหร่ายโดยทั่วไปที่พบว่า ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียและไนเตรทเป็นชนิดที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ได้ดีที่สุด (Li et al., 2008, Xu et al., 2001) ส่วนไนไตรท์นั้น เหตุที่สาหร่ายชิตตายทั้งหมดอาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของสารดังกล่าวที่พบว่ามีผลในทางลบต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Oke, 1966, Lewis Jr and Morris, 1986) ซึ่งไนไตรท์พบได้ปกติเนื่องจากเป็นผลผลิตสุดท้ายในปฏิกิริยาแอมโมเนียมออกซิเดชัน (ammonium oxidation) อันเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง (Cua and Stein, 2011) สาหร่ายที่สามารถนำไนไตรท์ไปใช้ประโยชน์ได้จึงมีจำนวนไม่กี่ชนิดเท่านั้น (Admiraal, 1977, Yang et al., 2004) จากผลข้างต้นอาจเป็นไปได้ว่า ณ ความเข้มข้นนี้ ไนไตรท์ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาหร่ายโง่ยู่ทั้ง 5 ไอโซเลท

### 2.4 ความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ )

การทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารสูตร TAP ที่ลดไนโตรเจนลงเหลือ 50% และเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเค็มต่างๆ ได้แก่ 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร (g/L) จากนั้นบันทึกผล ณ วันที่ 14 ของการทดลอง พบว่า สาหร่ายทั้ง 5 ไอโซเลทมีการเจริญเติบโตลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มสูงขึ้น ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 4-4 ที่ระดับความเค็ม 5 g/L สาหร่ายมีขนาดโคโลนีที่ใหญ่และหนาแน่นที่สุด จากนั้นขนาดและความหนาแน่นของโคโลนีสาหร่ายที่เจริญเติบโตจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อความเข้มข้นเกลือเพิ่มสูงขึ้น และในอาหารที่เติมเกลือระดับ 20 g/L จะพบว่าสาหร่ายไอโซเลท PY01-PY04 ไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้เลย แต่ในไอโซเลท PY05 ยังคงพบการเพิ่มจำนวนเล็กน้อย

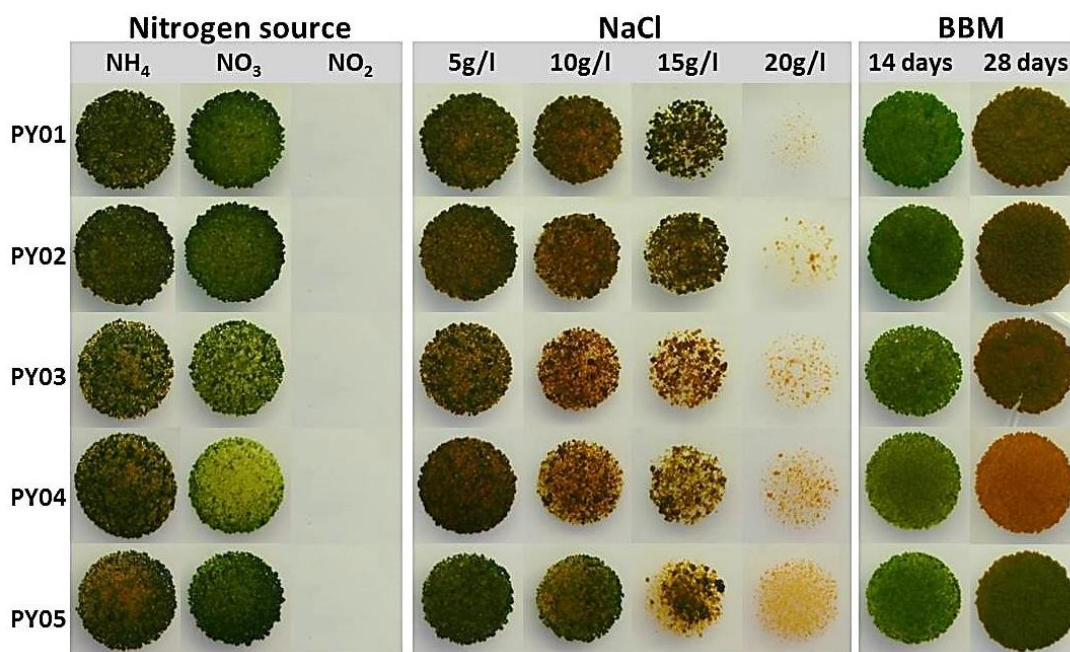
จากระดับความเค็มที่สาหร่ายทั้งหมดทนได้นั้น ทำให้สามารถจัดสาหร่ายทั้ง 5 อยู่ในกลุ่มสาหร่ายไม่ชอบเค็ม (non-halophilic algae) เนื่องจากสาหร่ายโง่ยู่ทั้ง 5 ไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับความเค็มน้อยกว่า 15 g/L หรือ น้อยกว่า 1.5% w/v ซึ่งใกล้เคียงกับระดับความเค็มที่สิ่งมีชีวิตกลุ่ม non-halophiles และสิ่งมีชีวิตน้ำจืดสามารถเจริญเติบโตได้ดีตามปกติ คือ ประมาณ 1% w/v (Antón, 2011) ในขณะที่หากเป็นสาหร่ายทนเค็มหรือ Halotolerant algae จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งที่ระดับความเค็มปกติ (1% w/v) และทนได้จนถึง 6% w/v (Borowitzka and Siva, 2007)

นอกจากในด้านการเจริญเติบโตแล้วยังพบว่า การเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเพาะเลี้ยงกระตุ้นให้สาหร่ายมีการเปลี่ยนสีของโคโลนีได้เร็วขึ้น โดยเริ่มสังเกตพบการเปลี่ยนแปลงสีตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และสังเกตพบว่า ณ วันเดียวกันของการเพาะเลี้ยงสีโคโลนีของสาหร่ายไปยูปในชุดที่มีการเติมเกลือจะมีสีน้ำตาลแดงมากกว่าชุดควบคุม (ชุดทดลอง  $\text{NH}_4$  ในคอลัมน์ nitrogen source) การเปลี่ยนแปลงสีโคโลนีของสาหร่ายแสดงให้เห็นว่าการเติมเกลือเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการสะสมแคโรทีนอยด์มากขึ้นในสาหร่ายไปยูปทั้ง 5 ไอโซเลท ซึ่งข้อสันนิษฐานดังกล่าวได้รับการยืนยันแล้วว่า การเติมเกลือในอาหารเพาะเลี้ยงกระตุ้นให้มีปริมาณการสะสม canthaxanthin เพิ่มมากขึ้นจากสภาวะที่ไม่มีการเติมเกลือในไอโซเลท PY02 โดยเป็นการศึกษาของ นิภาวรรณ พิษสิงห์ นักศึกษาระดับปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (unpublished) นอกจากนี้ จากการทบทวนเอกสารในสาหร่ายที่มีความสามารถในการสะสม secondary carotenoid เช่น *Haematococcus pluvialis* (Gao et al., 2015) หรือ *Chlorella zofingiensis* (Petah et al., 2004) ก็พบว่าความเค็มมีผลกระทบให้สาหร่ายสะสมแคโรทีนอยด์มากขึ้นเช่นเดียวกัน

## 2.5 การเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนีบนอาหารสูตร Bold's basal medium

สืบเนื่องจากผลการทดลองเบื้องต้นถึงอาหารที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของสาหร่ายไปยูปทั้ง 5 ไอโซเลท (ผลการทดลองที่ 2.1) แม้พบว่าสาหร่ายทั้งหมดเจริญเติบโตบนอาหารสูตร BBM ได้ไม่ดีเท่ากับอาหารสูตร TAP แต่ก็พบการเปลี่ยนแปลงสีโคโลนีจากสีเขียวไปเป็นสีแดงเมื่อเวลาผ่านไปเช่นเดียวกัน ประกอบกับงานวิจัยของ Groover และ Bold (1969) ที่ได้รายงานถึงผลทดสอบทางสรีรวิทยาของสาหร่ายกลุ่มที่มีลักษณะการเปลี่ยนสีของโคโลนีตั้งแต่ สีน้ำตาล เหลือง ส้ม ไปจนถึงสีแดง ว่าอาหารสูตร BBM ส่งผลให้สาหร่ายแต่ละชนิดมีสีโคโลนีที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นในการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 5 บนอาหารสูตรดังกล่าวเพื่อติดตามสีโคโลนีที่เปลี่ยนไปของสาหร่าย

ผลการเปรียบเทียบสีโคโลนีของสาหร่าย ณ วันที่ 14 และ 28 ของการทดลอง (รูปที่ 4-4) พบว่า อาหารสูตร BBM ส่งผลให้สาหร่ายไปยูปแต่ละไอโซเลทมีสีของโคโลนีแตกต่างกันออกไป โดยโคโลนีของไอโซเลท PY01 PY02 และ PY03 มีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวไปเป็นสีน้ำตาลแดง ไอโซเลท PY04 เปลี่ยนไปเป็นสีส้ม และไอโซเลท PY05 เปลี่ยนไปเป็นสีเขียวอมน้ำตาล ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นเป็นหลักฐานที่สนับสนุนว่าสาหร่ายทั้ง 5 อาจไม่ใช่สาหร่ายชนิดเดียวกัน เนื่องจากสีโคโลนีที่แตกต่างกันอาจบ่งบอกถึงชนิด และ/หรือ ปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายสามารถสังเคราะห์ได้แตกต่างกัน (Ha et al., 2007, Davies et al., 1970) อย่างไรก็ตาม ปัจจัยที่อยู่ในอาหารสูตร BBM อันส่งผลให้สาหร่ายมีสีของโคโลนีที่ต่างกันยังคงต้องการผลการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันต่อไป



รูปที่ 4-2 ผลของแหล่งไนโตรเจน การเติมเกลือ และอาหารสูตร BBM ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายโพงยุบ

รูปถ่าย ณ วันที่ 14 ของการทดลอง

(Nitrogen source) ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

(NaCl) การเจริญเติบโตบนอาหารที่เติมเกลือที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

(BBM) การเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนีสาหร่ายเมื่อผ่านไป 28 วัน บนอาหารสูตร BBM



### 3. ชนิดของแคโรทีนอยด์ที่ตรวจพบในสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลท

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้เลือกตัวอย่างสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร TAP เป็นเวลา 35 วันมาศึกษา เนื่องจากเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าสาหร่ายทั้งหมดได้มีการเปลี่ยนแปลงสีโคลนไปเป็นสีแดงเข้มอย่างสมบูรณ์แล้ว โดยตัวอย่างเซลล์สาหร่ายทั้ง 5 ไอโซเลทที่เก็บมานั้น เป็นตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงในงานเพาะเชื้อเดียวกันและเก็บเซลล์พร้อมกันทุกตัวอย่าง จากนั้นนำไปทำการสกัดสารสีแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ชนิดของแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultrahigh performance liquid chromatography; UPLC)

จากผลการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ในสารสกัดสาหร่าย (carotenoid profile) พบว่า สาหร่ายทุกไอโซเลทมีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ (ketocarotenoid) หลายชนิดภายในเซลล์ (ตารางที่ 4-1) อันได้แก่ อโดนิแซนธิน (adonixanthin) เอคินีโนน (echinenone) 3-ไฮดรอกซีเอคินีโนน (3-OH-echinenone) และพบแคนธาแซนธิน (canthaxanthin) เป็นคีโตแคโรทีนอยด์ชนิดเด่นในสาหร่ายทุกตัวอย่าง (80% โดยประมาณ) ผลการตรวจสอบองค์ประกอบของชนิดคีโตแคโรทีนอยด์ที่นอกเหนือจากแคนธาแซนธินแล้ว พบว่ามีความแตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลท ดังแสดงในรูปที่ 4-5 ซึ่งเป็นโครมาโตแกรม (chromatogram) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดสาหร่ายด้วยเครื่อง UPLC จะเห็นได้ว่า โครมาโตแกรมของสาหร่ายทุกไอโซเลทมีพีคที่ 3 (peak 3) ซึ่งเป็นพีคของ canthaxanthin สูงที่สุด ในขณะที่สามารถตรวจพบคีโตแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นๆ ได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนความสูงของแต่ละพีคในโครมาโตแกรม (รูปที่ 4-5)

นอกจาก canthaxanthin แล้ว ยังตรวจพบลูทีน (lutein) เป็นแคโรทีนอยด์อีกหนึ่งชนิดที่สาหร่ายทั้ง 5 สะสมภายในเซลล์ ซึ่ง lutein นั้นจัดอยู่ในกลุ่มแคโรทีนอยด์ปฐมภูมิ (Takaichi, 2011) จึงพบว่าการสังเคราะห์ในสาหร่ายทุกไอโซเลท อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วย UPLC ในการทดลองนี้กลับตรวจไม่พบเบตาแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) ซึ่งเป็นชนิดที่มีรายงานว่าเป็นแคโรทีนอยด์ปฐมภูมิที่จะพบได้ทั่วไปในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว (Takaichi, 2011) ผลดังกล่าวอาจเนื่องมาจาก  $\beta$ -carotene ส่วนใหญ่ถูกใช้ไปเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์แล้ว (Cunningham and Gantt, 2005, Martin et al., 2008) ทำให้มีปริมาณคงเหลือภายในเซลล์น้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยระบบที่ใช้ในการทดลองนี้ ซึ่งเมื่อสังเกตในรูปที่ 4-6 ที่แสดงวิถีการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์โดยมีแอสตาแซนธิน (astaxanthin) เป็นผลผลิตสุดท้าย (end product) ก็จะได้เห็นว่า  $\beta$ -carotene เป็นสารตั้งต้นของกระบวนการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

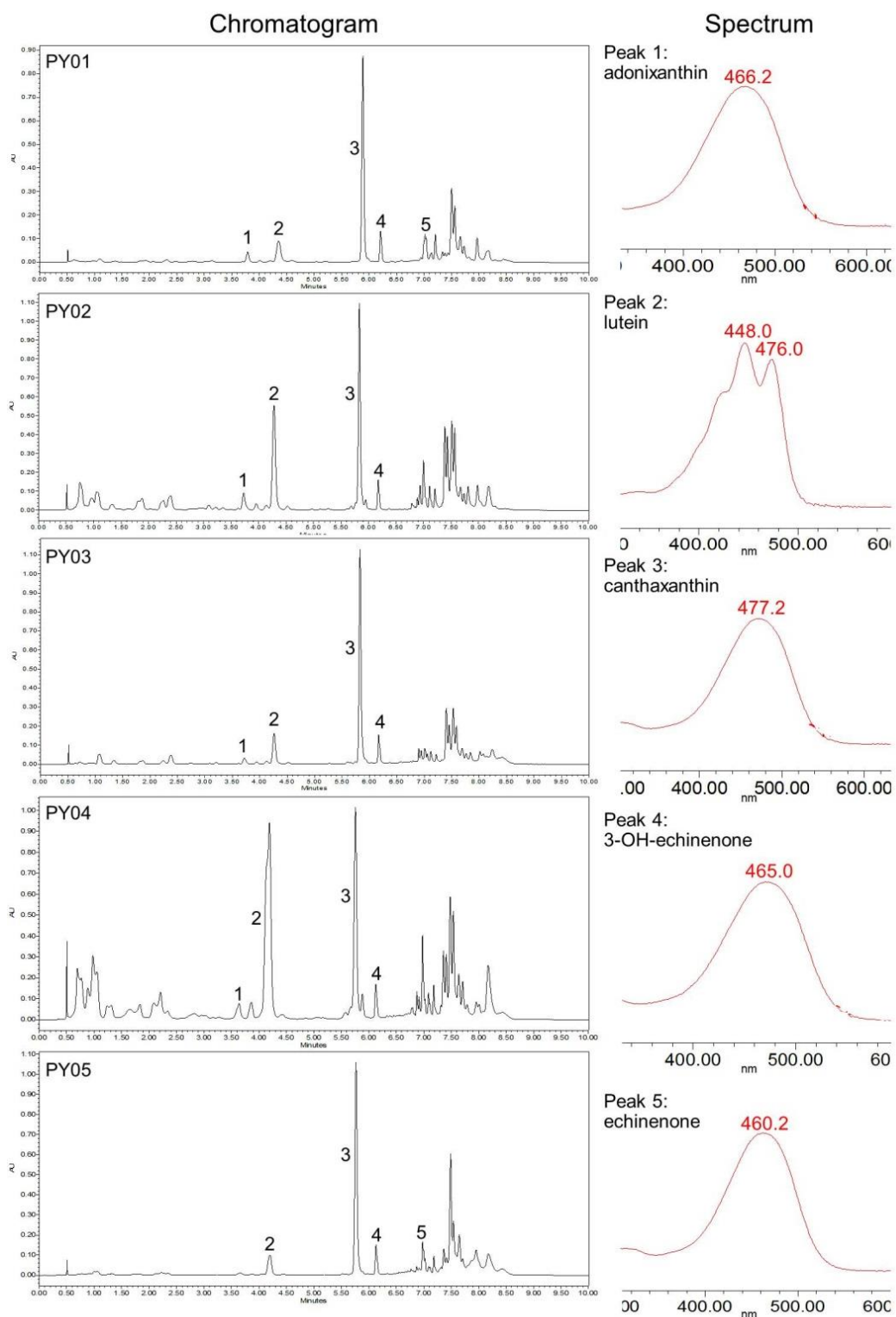
ตารางที่ 4-1 แคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่ายโป่งยุบ

สาหร่าย	แคโรทีนอยด์ที่ตรวจพบ				
	Lutein	Adonixanthin	Canthaxanthin	3-OH-echinenone	Echinenone
PY01	+	+	+	+	+
PY02	+	+	+	+	-
PY03	+	+	+	+	-
PY04	+	+	+	+	-
PY05	+	-	+	+	+

หมายเหตุ: 1) ตัวอย่างเซลล์สาหร่ายทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร TAP เป็นเวลา 35 วัน

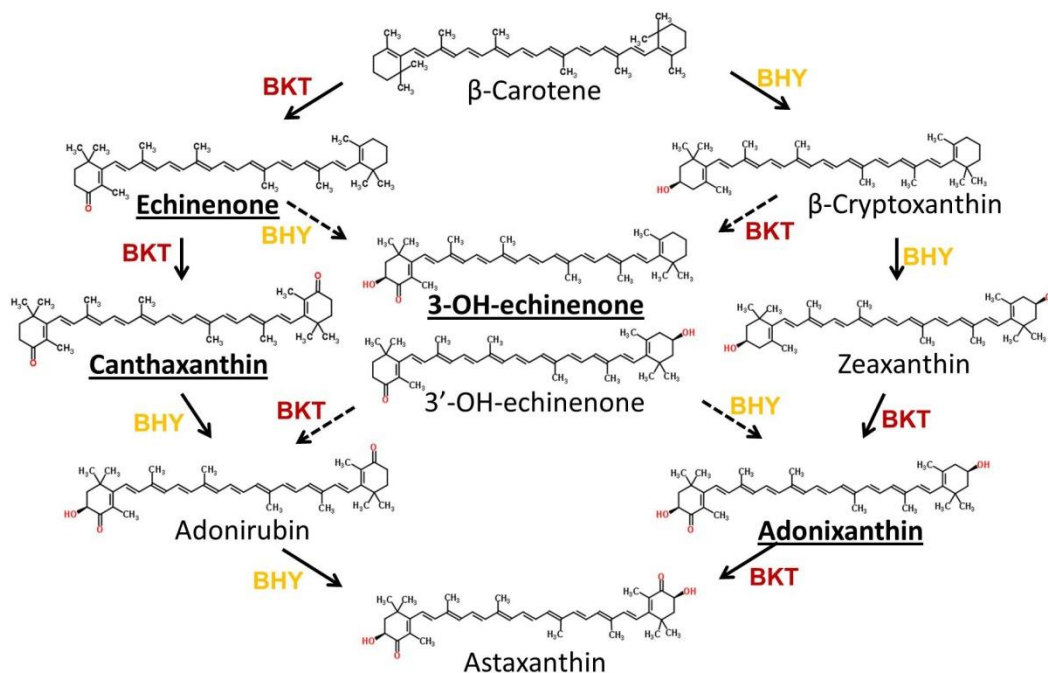
2) + = ตรวจพบแคโรทีนอยด์ชนิดดังกล่าว, - = ตรวจไม่พบแคโรทีนอยด์ชนิดดังกล่าว

3) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC ณ Royal Holloway University of London, UK



รูปที่ 4-5 โครมาโตแกรมและสเปกตรัมของแคโรทีนอยด์จากสารสกัดของสาหร่ายโป่งยุบ จากการวิเคราะห์สารสกัดสาหร่ายในระยะเซลล์สีแดงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร TAP อายุ 35 วัน (chromatogram) โครมาโตแกรมของสาหร่ายแต่ละไอโซเลท (spectrum) สเปกตรัมของแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดที่เกิดขึ้นในโครมาโตแกรม

แม้ว่าสาหร่ายไปงยุบทั้ง 5 ไอโซเลทจะมีรูปแบบการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ที่คล้ายคลึงกัน แต่ก็ยังพบความแตกต่างจากการตรวจพบและไม่พบคีโตแคโรทีนอยด์บางชนิด ในกรณีของสาหร่ายบางไอโซเลทที่ตรวจไม่พบ echinenone ซึ่งได้แก่ไอโซเลท PY02 PY03 และ PY04 ผู้วิจัยมีความเห็นว่าเป็นความแตกต่างที่ไม่มีนัยสำคัญ เนื่องจากในสาหร่ายทั้ง 3 ไอโซเลทนี้ยังคงตรวจพบ 3-OH-echinenone ซึ่งเป็นคีโตแคโรทีนอยด์ชนิดที่มี echinenone เป็นสารตั้งต้น (รูปที่ 4-6) จึงมีโอกาที่ echinenone จะถูกใช้ไปในการสังเคราะห์ 3-OH-echinenone แต่ในกรณีของการตรวจไม่พบ adonixanthin ในสาหร่ายไอโซเลท PY05 ผู้วิจัยมีความเห็นว่าเป็นความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ เนื่องจากหากพิจารณาทางด้านความสามารถในการเติมหมู่คีโตน (ketone group) ของเอ็นไซม์เบตาแคโรทีนคีโตเลส ( $\beta$ -carotene ketolase) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่เป็นตัวกำหนดความสามารถในการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ในสิ่งมีชีวิต (Cunningham and Gantt, 2005) จะพบการรายงานว่า ความสามารถในการเติมหมู่คีโตนให้กับสารตั้งต้นใดๆ ของเอ็นไซม์ดังกล่าวในวิถีการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์จะมีความแตกต่างกันออกไปในสาหร่ายแต่ละชนิด (Zhong et al., 2011, Huang et al., 2012) ซึ่งเมื่อนำมาพิจารณาในงานวิจัยนี้อาจกล่าวได้ว่า การทำงานของเอ็นไซม์  $\beta$ -carotene ketolase ในสาหร่ายไอโซเลท PY05 มีความแตกต่างจากไอโซเลทอื่นๆ โดยไม่สามารถเติมหมู่คีโตนให้กับ zeaxanthin ได้



รูปที่ 4-6 วิถีการสังเคราะห์แอสตาแซนธินโดยมีเบตาแคโรทีนเป็นสารตั้งต้น

ที่มา: ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Mann และคณะ (2000) และ Huang และคณะ (2006)

ตัวหนาและขีดเส้นใต้แทนคีโตแคโรทีนอยด์ที่พบในงานวิจัยนี้ และลูกศรทึบและประหมายถึงวิถีการสังเคราะห์ที่พบปกติและวิถีที่ไม่แน่นอน ตามลำดับ

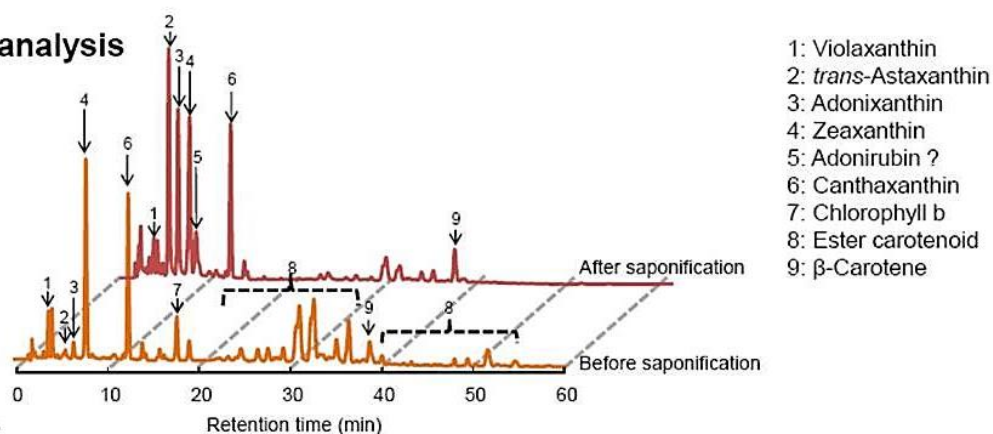
(BHY)  $\beta$ -carotene hydroxylase แทนการทำงานของเอ็นไซม์ดังกล่าวด้วยตัวหนังสือสีเหลือง

(BKT)  $\beta$ -carotene ketolase แทนการทำงานของเอ็นไซม์ดังกล่าวด้วยตัวหนังสือสีแดง

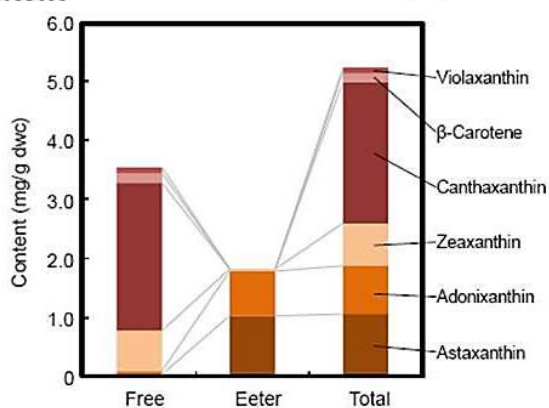
จากแผนภาพในรูปที่ 4-6 จะเห็นว่า ในการทดลองนี้ตรวจไม่พบ astaxanthin ในตัวอย่าง เซลล์ของสาหร่ายโพงยุบทั้ง 5 ไอโซเลท แต่ยังคงพบหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายทั้ง 5 อาจ สามารถสังเคราะห์และสะสม astaxanthin ได้ เนื่องจากสามารถยืนยันได้ว่าสาหร่ายทั้งหมดมีการ ทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่สำคัญในวิถีการสังเคราะห์ astaxanthin ได้แก่  $\beta$ -carotene ketolase ซึ่งทำหน้าที่ในการเติมหมู่คีโตนให้กับ  $\beta$ -carotene (Huang et al., 2006) และ เบตาแคโรทีนไฮดรอกซีเลส ( $\beta$ -carotene hydroxylase) ซึ่งทำหน้าที่ในการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ให้กับ  $\beta$ -carotene (Tan et al., 2007) จากการตรวจพบ 3-OH-echinenone และ adonixanthin ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า astaxanthin ที่สาหร่ายโพงยุบทั้ง 5 สะสมภายใน เซลล์มีปริมาณที่ต่ำมาก หรือ อาจอยู่ในรูปอื่นๆ เช่นอยู่ในรูปของเอสเทอร์ (ester-type) ทำให้ไม่สามารถตรวจจับได้ด้วยระบบที่ใช้ในการทดลองนี้ (Aburai et al., 2015, Aburai et al., 2013) ซึ่ง ภายหลังเมื่อผู้วิจัยได้ส่งตัวอย่างสาหร่ายไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ต่างออกไป โดยการนำสารสกัด สาหร่ายไปผ่านกระบวนการ saponification ก่อน แล้วจึงทำการตรวจวิเคราะห์โดยความอนุเคราะห์ ของ Asst. Prof. Katsuya Abe (Department of chemistry and life science, Kogakuin university, Japan) ก็สามารถตรวจพบ astaxanthin ในสาหร่ายโพงยุบและพบว่าสารดังกล่าวอยู่ใน รูปของเอสเทอร์ (ester-type) ดังแสดงในรูปที่ 4-7 เมื่อสังเกตที่โครมาโตแกรมจะพบว่า สารสกัดที่ ผ่านกระบวนการ saponification แล้วนั้นจะมีพีคที่ 2 (trans-astaxanthin) สูงกว่าผลการตรวจ วิเคราะห์สารสกัดที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการ saponification (ซึ่งจะพบว่าพีคดังกล่าวค่อนข้างต่ำมาก) นอกจากนี้เมื่อคำนวณอัตราการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ (esterification rate) ของ astaxanthin ก็ พบว่ามีค่าสูงถึง 97%

ในด้านของการวิเคราะห์ปริมาณคีโตแคโรทีนชนิดเด่นในสาหร่ายโพงยุบทั้ง 5 ไอโซเลท ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแคนธาแซนทินที่สะสมภายในเซลล์ (canthaxanthin content) โดยการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟกับกราฟมาตรฐาน canthaxanthin พบว่า สาหร่ายไอโซเลท PY02 มีปริมาณ canthaxanthin content สูงที่สุด และรองลงมาได้แก่ PY05 PY03 PY01 และ PY04 โดยมีปริมาณเท่ากับ 440 310 142 44 และ 28 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$ ) ดัง แสดงไว้ในรูปที่ 4-8 แต่เนื่องจากในการทดลองนี้มีการวิเคราะห์ผลเพียงหนึ่งซ้ำเท่านั้น ปริมาณ canthaxanthin content ที่คำนวณได้จึงอาจไม่สามารถเป็นตัวแทนของปริมาณ canthaxanthin ที่ สาหร่ายชนิดนั้นๆ มีความสามารถในการสะสมได้ อย่างไรก็ตามเซลล์สาหร่ายที่นำมาวิเคราะห์เป็น ตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อเดียวกันและเก็บเซลล์ ณ วันเดียวกัน ผู้วิจัยจึงเห็นว่าสามารถ เปรียบเทียบความมากน้อยของค่าดังกล่าวระหว่างสาหร่ายแต่ละไอโซเลทได้

### HPLC analysis



### Content



Composition	mg/g dwt		
	Free	Eeter	Total
Astaxanthin	0.03	1.03	1.06
Adonixanthin	0.06	0.76	0.82
Zeaxanthin	0.68	0.04	0.72
Canthaxanthin	2.51	—	2.51
β-Cartene	0.17	—	0.17
Violaxanthin	0.09	—	0.09
Total	3.54	1.82	5.36

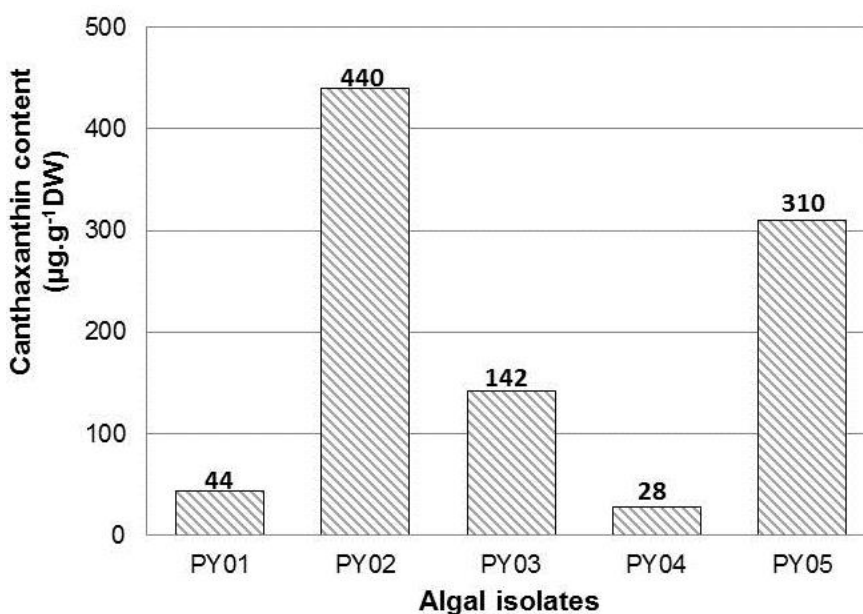
Esterification rate	
Astaxanthin	97%
Adonixanthin	93%
Zeaxanthin	7%
Total	70%

รูปที่ 4-7 ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายไอโซเลท PY02

หมายเหตุ: ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยความอนุเคราะห์ของ Prof. Dr. Katsuya Abe ดังวิธีที่แสดงไว้ใน Aburai และคณะ (2015)







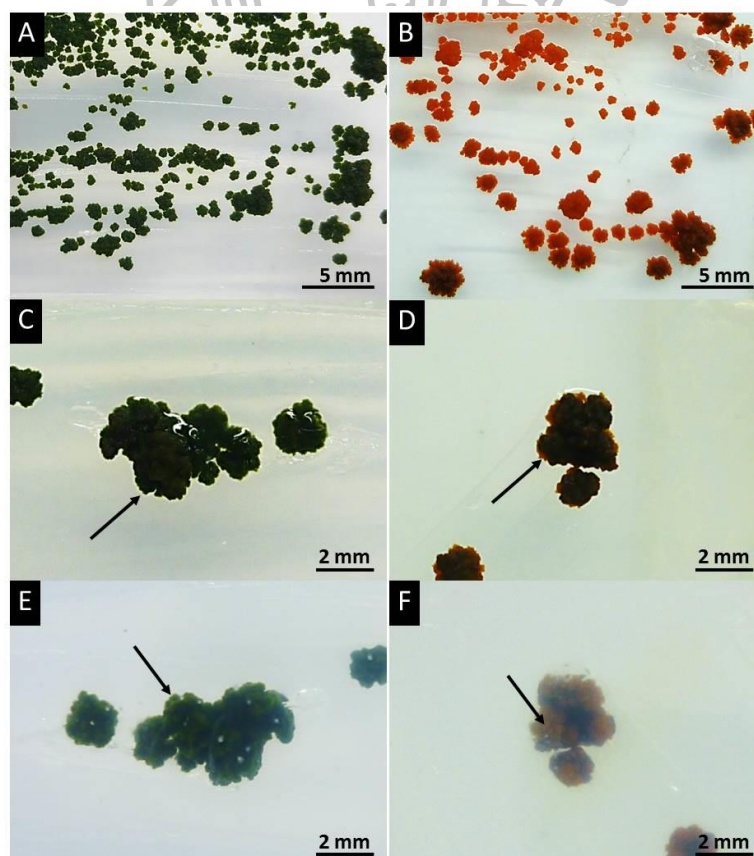
รูปที่ 4-8 ปริมาณแคนธาแซนธินในสาหร่ายโป่งยุบจากการวิเคราะห์สารสกัดสาหร่ายในระยะเซลล์สีแดงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร TAP อายุ 35

ถึงแม้ในปัจจุบัน astaxanthin จะเป็นคีโตแคโรทีนอยด์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีมูลค่าต่อกิโลกรัมสูงสุด และมีผลงานวิจัยที่ยืนยันถึงประโยชน์ต่อผู้บริโภคเป็นจำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตาม canthaxanthin ก็เป็นคีโตแคโรทีนอยด์ชนิดที่ได้รับการกล่าวถึงประโยชน์ไม่น้อยเช่นกัน ไม่ว่าจะเป็นประโยชน์ในด้านสุขภาพของมนุษย์ (Palozza et al., 1998) หรือ ที่ถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย นั่นคือ การใช้เป็นสารให้สีจากธรรมชาติ (natural colourant) และพร้อมกันนี้ยังช่วยส่งเสริมผลผลิตจากการเติมสารให้สีดังกล่าวระหว่างการเพาะเลี้ยงในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์หลายชนิดอีกด้วย (Amaya and Nickell, 2015, Baker and Gunther, 2004, Baker et al., 2002) ดังนั้น สาหร่ายโป่งยุบที่สามารถคัดแยกได้ทั้ง 5 ไอโซเลท จึงนับว่าเป็นสาหร่ายที่น่าสนใจอย่างมากแก่การศึกษาต่อถึงปัจจัยในการกระตุ้นให้สาหร่ายมีศักยภาพในการผลิต canthaxanthin เพิ่มมากขึ้น หรือแม้กระทั่งการกระตุ้นให้สาหร่ายสังเคราะห์ astaxanthin เพื่อเพิ่มมูลค่าต่อไป

#### 4. การจัดจำแนกสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลท

##### 4.1 การจัดจำแนกสาหร่ายด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะเด่นที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าของสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลทนั้น นอกจากจะพบว่าการเปลี่ยนสีโคโลนีจากสีเขียวไปเป็นสีแดงเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร TAP เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 1 เดือนแล้ว ยังพบว่า เมื่อเพาะเชื้อสาหร่ายลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิค streaking โคโลนีที่เกิดจากเชื้อจะมีขนาดค่อนข้างใหญ่ (2-5 มิลลิเมตร) มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ขอบและผิวของโคโลนีมีลักษณะขรุขระอย่างเด่นชัด ดังรูปที่ 4-9 (แสดงลักษณะข้างต้นโดยรูปถ่ายของสาหร่ายไอโซเลท PY02 เป็นตัวแทน) ทั้งนี้เนื่องจากโคโลนีสาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขนาดทั้งในแนวราบและแนวตั้ง (นูนขึ้นมาจากผิวหน้าอาหารแข็ง) ดังจะเห็นได้จากบริเวณที่มีลูกศรชี้ในรูปที่ 4-9C และสามารถสังเกตการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นของสาหร่ายได้จากการนูนสูงชันของโคโลนี นอกจากนี้ในรูปที่ 4-9E ซึ่งเป็นภาพถ่ายจากด้านล่างของจานอาหาร (bottom plate) ณ บริเวณที่มีลูกศรชี้จะเห็นว่าเกิดรอยแตกของวุ้นอาหารที่ขอบของโคโลนี อันเนื่องมาจากโคโลนีสาหร่ายมีการเจริญฝังแน่นเข้าไปในเนื้อของวุ้นอาหาร



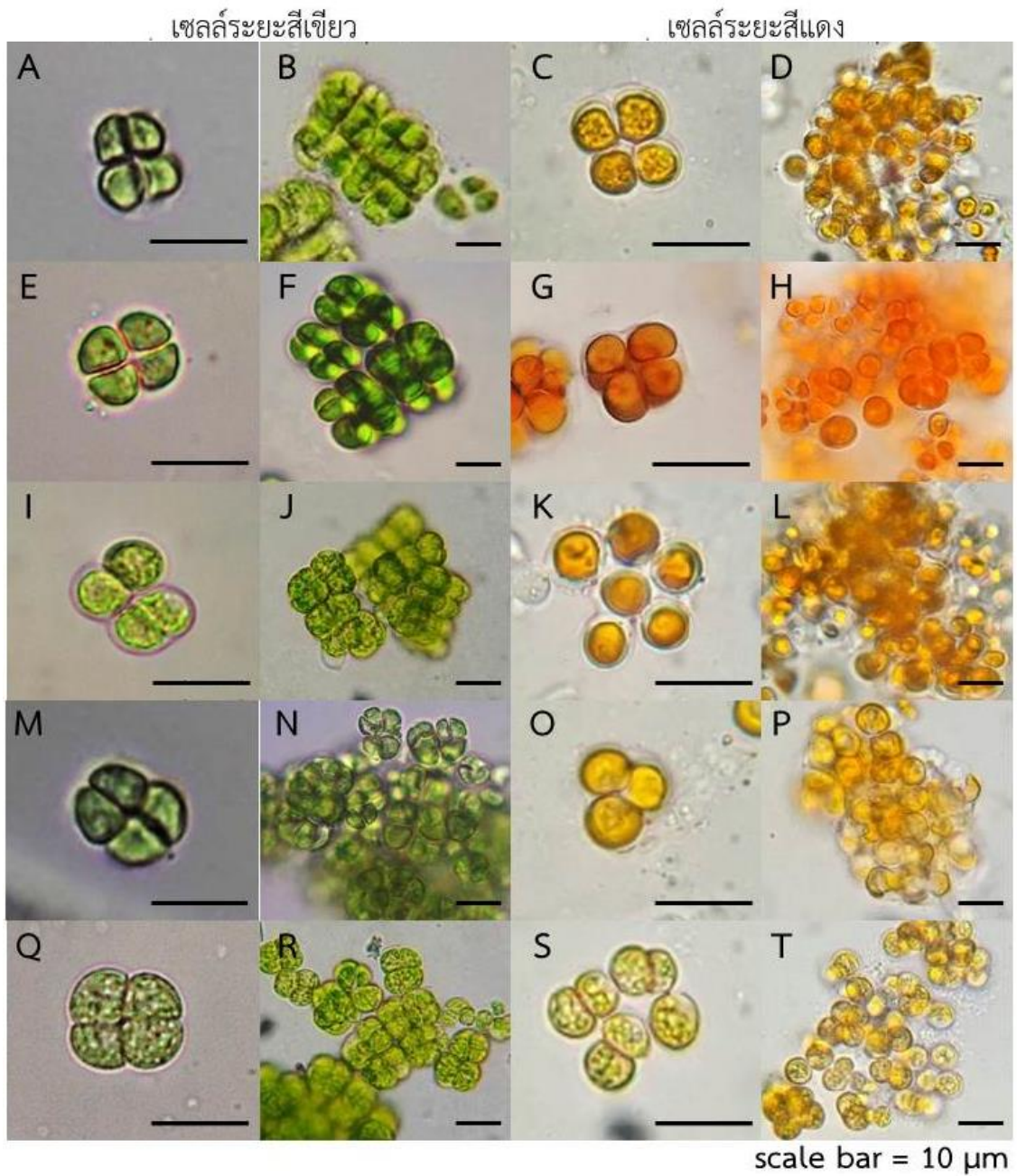
รูปที่ 4-9 ลักษณะโคโลนีของสาหร่าย PY02 บนอาหารแข็งจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

(A-D) โคโลนีสาหร่ายถ่ายจากด้านหน้าของจานเพาะเชื้อ

(E-F) โคโลนีสาหร่ายถ่ายจากด้านล่างของจานเพาะเชื้อ

เมื่อศึกษาสาหร่ายโพงยุบทั้ง 5 ไอโซเลทภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 4-10) พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สาหร่ายแต่ละไอโซเลทที่สังเกตเห็นได้มีความคล้ายคลึงกันมาก โดยลักษณะที่พบคือ ในสภาวะปกติ เซลล์ของสาหร่ายที่เป็น vegetative cells มีลักษณะกลมขนาดประมาณ 4-10 ไมโครเมตร แต่ละเซลล์จะมี 1 คลอโรพลาสต์ ซึ่งเป็นคลอโรพลาสต์ที่แผ่ติดไปกับผนังเซลล์ เรียกว่าแบบ parietal chloroplast มี 1 ไพเรโนยด์ (pyrenoid) อย่างไรก็ตามภายใต้กล้องจุลทรรศน์มักพบเห็นเซลล์สาหร่ายอยู่ติดกัน 2-8 เซลล์ ภายในโครงสร้างลูกบาศก์สามมิติ (3 dimensional cubic-packets) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นเฉพาะของสาหร่ายในกลุ่ม sarcinoid algae นอกจากนี้เมื่อบดสาหร่ายด้วยด้วยสากขนาดเล็ก (micro pestle) จะพบว่าสาหร่ายโพงยุบทั้ง 5 ไอโซเลทมีการสร้างซุโอสปอร์ (zoospore) ที่มีแฟลกเจลลา 2 เส้น (flagella) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4-11A พร้อมทั้งนี้ก็พบว่าเมื่อเซลล์สาหร่ายถูกบดจนแตกจะพบถุงไขมันหรือ lipid droplet ที่มีสารสีส้มแดงอยู่ภายในไหลออกมาจากเซลล์เป็นจำนวนมาก (รูปที่ 4-11B) ซึ่งลักษณะนี้พบเช่นเดียวกันในสาหร่ายที่มีความสามารถในการสะสมแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ เช่น ในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ที่พบว่า สังเคราะห์ astaxanthin และสะสมไว้ใน lipid droplet ซึ่งเมื่อมีจำนวนมากขึ้นก็ทำให้มองเห็นเซลล์ของสาหร่ายดังกล่าวเป็นสีแดง (Wayama et al., 2013)

จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นทำให้สามารถระบุได้ว่า สาหร่ายโพงยุบทั้ง 5 ไอโซเลทเป็นสาหร่ายในสกุล (genus) *Chlorosarcinopsis* (Herndon, 1958, Groover and Bold, 1969) แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่กล่าวมาแล้วนั้นไม่เพียงพอต่อการระบุสาหร่ายจนถึงระดับชนิด (specie) ได้ สอดคล้องกับที่กล่าวไว้ในรายงานของ Watanabe และคณะ (2006) ซึ่งในรายงานดังกล่าวได้แนะนำถึงการระบุชนิดของสาหร่ายกลุ่มนี้ไว้ว่า การศึกษาข้อมูลในระดับ subcellular ultrastructure ของเซลล์เพิ่มเติม เช่น จำนวนของไทลาคอยด์ (thylakoid) การมีหรือไม่มีผนังเซลล์ของ zoospore รวมไปถึงตำแหน่งของ flagella และ stigma บน zoospore ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) จะช่วยให้สามารถระบุชนิดของสาหร่ายในกลุ่มนี้ได้ ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้มีการทดลองเพื่อที่จะศึกษาลักษณะของ zoospore ของสาหร่ายที่แยกได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน หากแต่ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากขาดความเชี่ยวชาญในการเตรียมตัวอย่าง จึงทำให้การระบุชนิดสาหร่ายด้วยลักษณะสัณฐานของเซลล์สามารถทำได้เพียงใช้ข้อมูลจากกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและแบบเลนส์ประกอบเท่านั้น



รูปที่ 4-10 สัณฐานวิทยาของเซลล์สาหร่ายไปงยุบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ

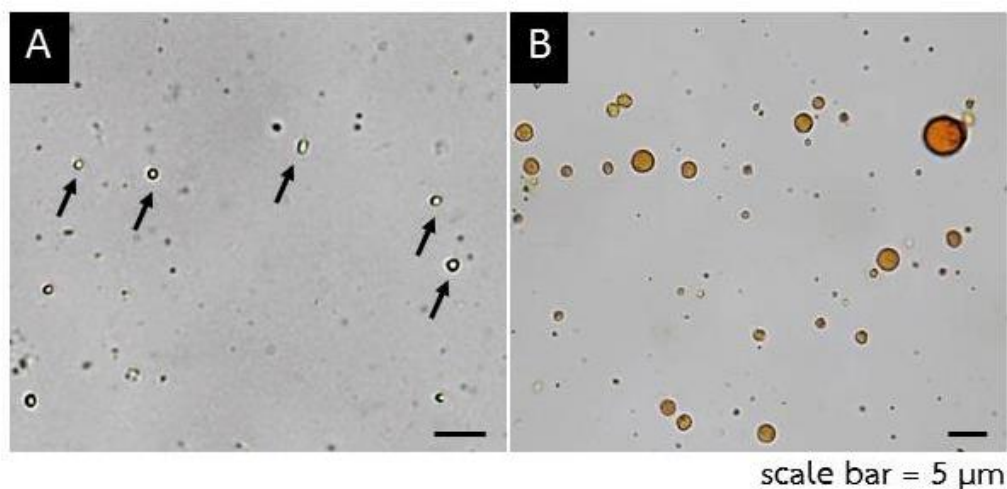
(A-D) สาหร่ายไอโซเลท PY01

(E-H) สาหร่ายไอโซเลท PY02

(I-L) สาหร่ายไอโซเลท PY03

(M-P) สาหร่ายไอโซเลท PY04

(Q-T) สาหร่ายไอโซเลท PY05



รูปที่ 4-11 ลักษณะของซูโอสปอร์และถุงไขมันใต้กล้องจุลทรรศน์ในสาหร่ายโป่งยุบ

(A) ซูโอสปอร์ (ปลายลูกศร) ตัวอย่างเตรียมจากสาหร่ายที่มีอายุประมาณ 2 สัปดาห์

(B) ถุงไขมัน (lipid droplet) ตัวอย่างเตรียมจากสาหร่ายที่มีอายุประมาณ 2 สัปดาห์

#### 4.2 การจัดจำแนกสาหร่ายด้วยลักษณะทางสรีรวิทยา

คุณลักษณะทางสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ เช่น ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนหรือไนโตรเจนเป็นคุณลักษณะเบื้องต้นที่ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์อย่างแพร่หลาย รวมถึงการจัดจำแนกสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* (Watanabe et al., 2006, Groover and Bold, 1969) ประกอบกับลักษณะที่สามารถมองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของสาหร่ายโป่งยุบมีความคล้ายคลึงกันมาก การทดสอบทางสรีรวิทยาจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อใช้ระบุความแตกต่างระหว่างชนิดของสาหร่ายในสกุลเดียวกัน ในการนี้เอง ผู้วิจัยจึงได้รวบรวมผลจากการทดลองที่ 2 มาปรับเปลี่ยนให้ข้อมูลอยู่ในระบบตัวเลขเพื่อให้สามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติและคอมพิวเตอร์ที่เหมาะสม ไม่ว่าจะเป็นความสามารถในการเจริญเติบโต (ตารางที่ 3-5) การจัดกลุ่มทางสถิติของน้ำหนักแห้งจากเซลล์สาหร่ายที่เก็บ ณ วันที่ 14 ของการทดลอง การวัดความแตกต่างของสีโคโลนีของสาหร่ายสาหร่ายที่แตกต่างกันบนอาหารแต่ละชนิด จากระบบสี RGB ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Adobe Photoshop CS3 จากนั้นนำค่า R ที่โปรแกรมอ่านได้ไปวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มทางสถิติ เมื่อพิจารณาข้อมูลในตารางที่ 3-5 ร่วมกัน จากลักษณะทางสรีรวิทยาทั้งหมด 37 ลักษณะ พบว่ามีเพียง 16 ลักษณะต่อไปนี้ที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลตได้

- 1) ความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารที่มี fructose
- 2) ความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารที่มี xylose
- 3) ความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารที่เติมเกลือเข้มข้น 20 g/L
- 4) มวลชีวภาพบนอาหารที่มี acetate
- 5) มวลชีวภาพบนอาหารที่มี pyruvate

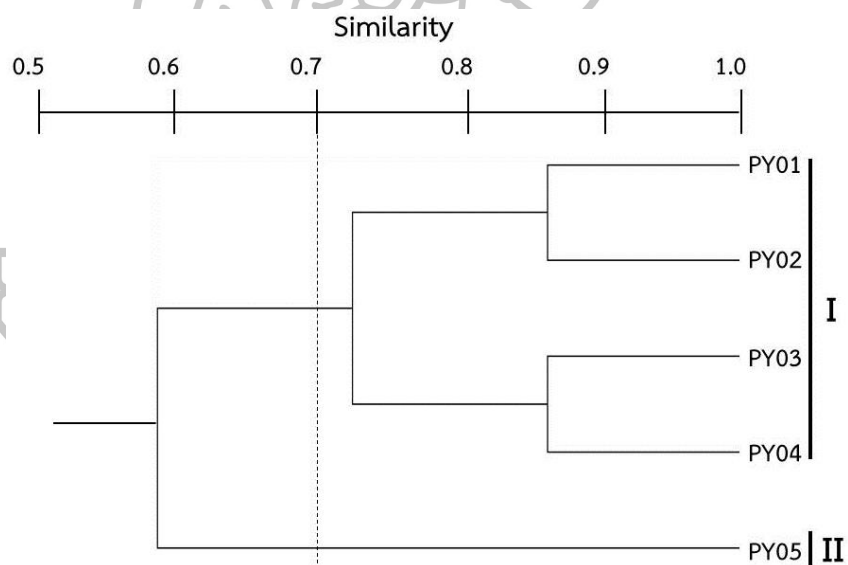
- 6) มวลชีวภาพบนอาหารที่มี fructose
- 7) มวลชีวภาพบนอาหารที่มี xylose
- 8) มวลชีวภาพบนอาหารที่เติมเกลือเข้มข้น 10 g/L
- 9) มวลชีวภาพบนอาหารที่เติมเกลือเข้มข้น 15 g/L
- 10) มวลชีวภาพบนอาหารที่เติมเกลือเข้มข้น 20 g/L
- 11) สีของโคโลนีบนอาหารที่มี acetate
- 12) สีของโคโลนีบนอาหารที่มี pyruvate
- 13) สีของโคโลนีบนอาหารที่มี fructose
- 14) สีของโคโลนีบนอาหารที่เติมเกลือเข้มข้น 5 g/L
- 15) สีของโคโลนีบนอาหารที่เติมเกลือเข้มข้น 10 g/L
- 16) สีของโคโลนีบนอาหารสูตร BBM 28 วัน

ข้อมูลทางสรีรวิทยาที่ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในระบบตัวเลขในตารางที่ 3-5 (หน้า 34) ได้ถูกนำมาคำนวณเพื่อสร้างตารางค่าดัชนีความเหมือน (similarity matrix) เพื่อแสดงระดับความเหมือนของสายร้ายแต่ละไอโซเลทโดยการเปรียบเทียบทีละคู่ ซึ่งผลดังกล่าวแสดงไว้ในตารางที่ 4-2 ที่ระบุว่าสายร้ายทั้ง 5 ไอโซเลทมีค่าดัชนีความคล้ายคลึงที่คำนวณจากลักษณะทางสรีรวิทยาอยู่ระหว่าง 56.8% ถึง 86.5% โดยคู่ที่มีความคล้ายคลึงต่ำสุดได้แก่ไอโซเลท PY04 กับ PY05 และคู่ที่มีความคล้ายคลึงสูงสุดได้แก่ไอโซเลท PY01 กับ PY02 และ PY03 กับ PY04 และเมื่อนำลักษณะทางสรีรวิทยาทั้ง 37 ลักษณะมาสร้างแผนโทรแกรมความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA cluster analysis พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มสายร้ายออกเป็น 2 กลุ่ม ณ ระดับค่าความคล้ายคลึงร้อยละ 70 (รูปที่ 4-12) โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายร้ายไอโซเลท PY01 PY02 PY03 และ PY04 ในขณะที่ไอโซเลท PY05 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งแยกออกจากไอโซเลทอื่นๆ

จากการทบทวนเอกสารในปี 1969 ที่ Groover และ Bold ได้รวบรวมผลการทดสอบทางสรีรวิทยาภายในงานวิจัยตนเองและของ Herndon (1958) เพื่อสร้างเอกสารสำหรับการวินิจฉัยสายร้ายในระดับชนิด (key to species) ของสกุล *Chlorosarcinopsis* พบว่า สีของโคโลนีสายร้ายถูกจัดให้เป็นลักษณะสำคัญในการวินิจฉัยชนิดของสายร้ายสกุลนี้ (รายละเอียดแสดงในบททบทวนเอกสารหัวข้อชีววิทยาและการจัดจำแนกสายร้ายสกุล *Chlorosarcinopsis*) แต่ผู้วิจัยมีความเห็นว่าหากนำเอกสารดังกล่าวมาใช้กับผลการทดลองในงานวิจัยครั้งนี้ โดยการตัดสินใจจากสีที่มองเห็น เช่น น้ำตาลแกมเหลือง หรือเขียวมน้ำตาล ตามที่ในเอกสารกำหนดไว้ว่าเป็นสีเฉพาะของ *Chlorosarcinopsis* แต่ละชนิดนั้นเป็นไปได้ยากและอาจก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนจากตัวผู้วิจัยได้ค่อนข้างสูง ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้สีของโคโลนีที่แตกต่างกันมาใช้จำแนกเพียงความแตกต่างระหว่างไอโซเลทเท่านั้น ไม่สามารถระบุถึงระดับชนิดได้ตามเอกสารที่กล่าวไปข้างต้น แต่อย่างไรก็ตาม จากการทดลองครั้งนี้ทำให้ได้รับข้อมูลที่ยืนยันว่า ชนิดของอาหารที่แสดงให้เห็นความแตกต่างของสายร้าย *Chlorosarcinopsis* ในระดับชนิดได้ดีและสอดคล้องกับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานตามการผลทดลองของ Watanabe และคณะ (2006) คือ อาหารสูตร BBM และการเจริญเติบโตบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน เป็นคุณลักษณะที่สามารถจำแนกความแตกต่างได้สอดคล้องกับการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ด้วยข้อมูลทางอณูชีววิทยา

ตารางที่ 4-2 ดัชนีความคล้ายคลึงจากลักษณะทางสรีรวิทยา 37 ลักษณะของสาหร่ายโป่งยูบ จากวิธี simple matching ของ Sneath และ Sokal (1973)

TAXA	PY01	PY02	PY03	PY04	PY05
PY01	1.000				
PY02	0.865	1.000			
PY03	0.729	0.757	1.000		
PY04	0.729	0.757	0.865	1.000	
PY05	0.595	0.595	0.568	0.649	1.000



รูปที่ 4-12 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์จากลักษณะทางสรีรวิทยาของสาหร่ายโป่งยูบ ด้วยวิธี UPGMA cluster analysis โดยใช้โปรแกรม PAUP 4.0

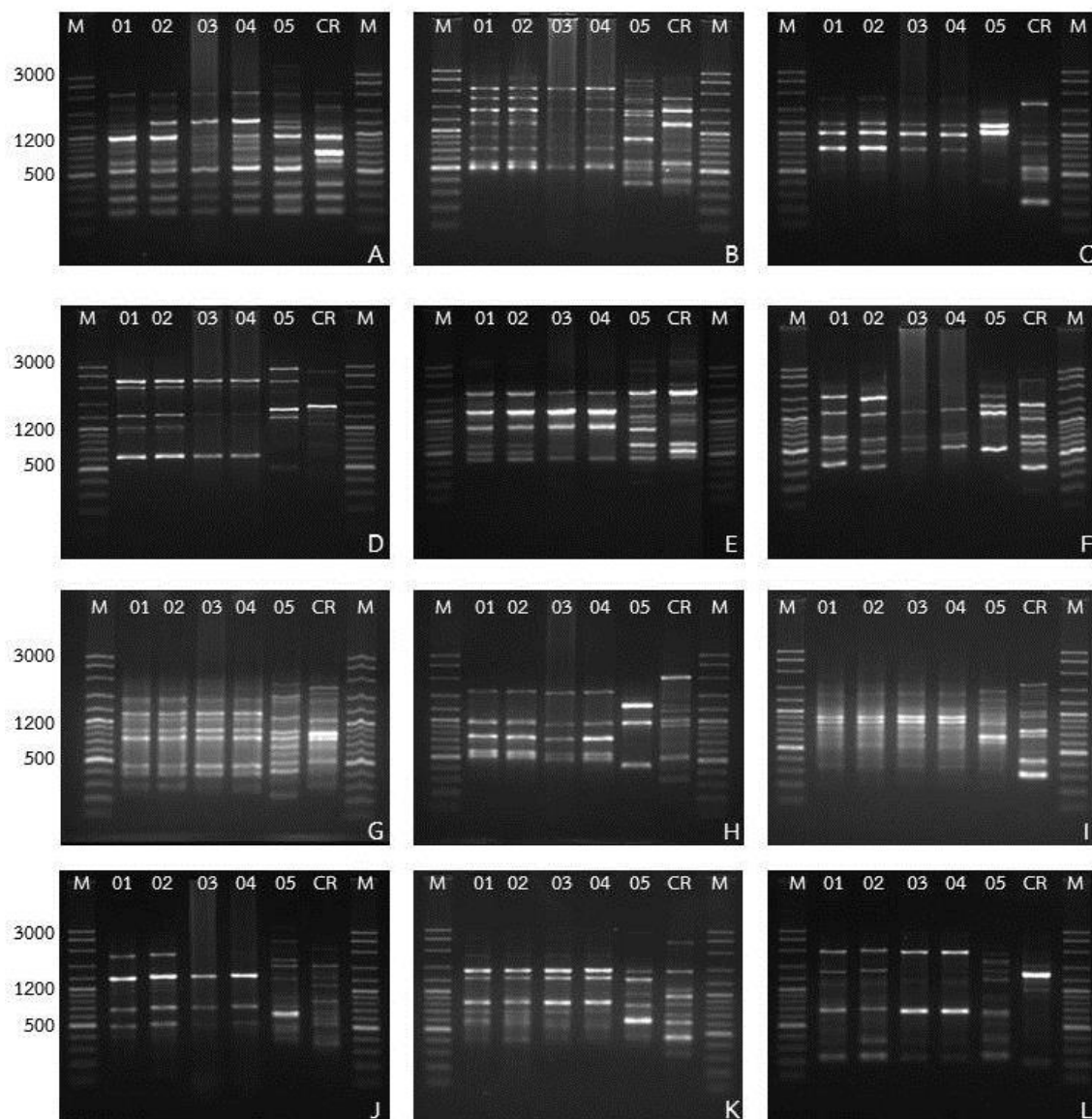
เนื่องจากการทดลองนี้ไม่สามารถที่จะนำสาหร่ายสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) อันหมายถึงสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* ชนิดที่ทราบสายพันธุ์แน่ชัดมาใช้ในการทดสอบร่วม เนื่องจาก สาหร่าย *Chlorosarcinopsis* ที่ทราบชนิดและมีการเก็บรักษาไว้ใน culture collection มีราคาค่อนข้างสูง รวมถึงไม่มีการนำสาหร่ายนอกกลุ่ม (out group) มาทดลองเพื่อเปรียบเทียบไปพร้อมกัน จึงทำให้ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางสรีรวิทยาสามารถอธิบายได้เพียงแนวโน้มของการจัดจำแนกและความใกล้ชิดของสาหร่ายแต่ละไอโซเลทเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ที่ได้รับก็ทำให้ทราบว่ามีความเป็นไปได้สูงที่สาหร่ายโปงยุบทั้ง 5 ไอโซเลทนั้นไม่ใช่สาหร่ายชนิด (species) เดียวกัน และจากข้อสรุปนี้เองที่แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของลักษณะทางสรีรวิทยาของสาหร่ายสกุลเดียวกัน ซึ่งลักษณะนี้ย่อมเกี่ยวเนื่องไปถึงความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรมของ (Gomez and Gonzalez, 2001) ของสาหร่ายกลุ่มนี้ด้วย

#### 4.3 การจัดจำแนกสาหร่ายด้วยลักษณะทางอนุชีววิทยา

##### 4.3.1 ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RAPD

สืบเนื่องจากการทดสอบทางสรีรวิทยาบางประการที่ได้แสดงความแตกต่างอย่างเด่นชัดระหว่างสาหร่ายโปงยุบทั้ง 5 ไอโซเลท ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดของสาหร่ายดังกล่าวในระดับพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย RAPD โดยทำการทดลองเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ OPD-20 OPM-04 OPM-05 OPR-03 OPR-07 OPR-09 OPR-12 OPR-13 OPZ-04 OPZ-06 OPZ-11 และ OPZ-13 ในสาหร่ายทั้ง 5 ร่วมกับ *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งใช้เป็นสาหร่ายนอกกลุ่ม (out group) ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 12 ชนิดสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของสาหร่ายทั้ง 6 ตัวอย่างได้ อีกทั้งเมื่อผลการทดลองสามารถทำซ้ำ (reproducible) ทั้ง 3 ครั้งและให้ผลคงเดิม ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ที่เกิดขึ้น (รูปที่ 4-13) พบว่า ไพรเมอร์ทุกชนิดก่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphic band) แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์ทั้งหมดจากสาหร่าย *Chlorosarcinopsis* ทั้ง 5 ไอโซเลทและสาหร่ายสายพันธุ์นอกกลุ่มมีจำนวนทั้งหมด 150 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างสาหร่าย 5 ไอโซเลท 75 แถบ ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 200 ถึง 2,500 คู่นิวคลีโอไทด์ (bp) คิดเป็นค่าเฉลี่ย 6.25 แถบต่อไพรเมอร์ 1 ชนิด โดยไพรเมอร์ที่สามารถสังเกตพบความแตกต่างอย่างชัดเจนได้แก่ไพรเมอร์ชนิด OPM-05 OPR-03 OPR-07 OPR-09 OPZ-06 และ OPZ-13





รูปที่ 4-13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RAPD ของสาหร่ายโพงยุบจากไซรเมอร์ 12 ชนิด โดย เลข 01-05 = PY01-PY05 และ CR = *Chlamydomonas reinhardtii* ทำหน้าที่เป็น out group 1.5% agarose gel ใน 1X TAE buffer M = 100 bp DNA ladder

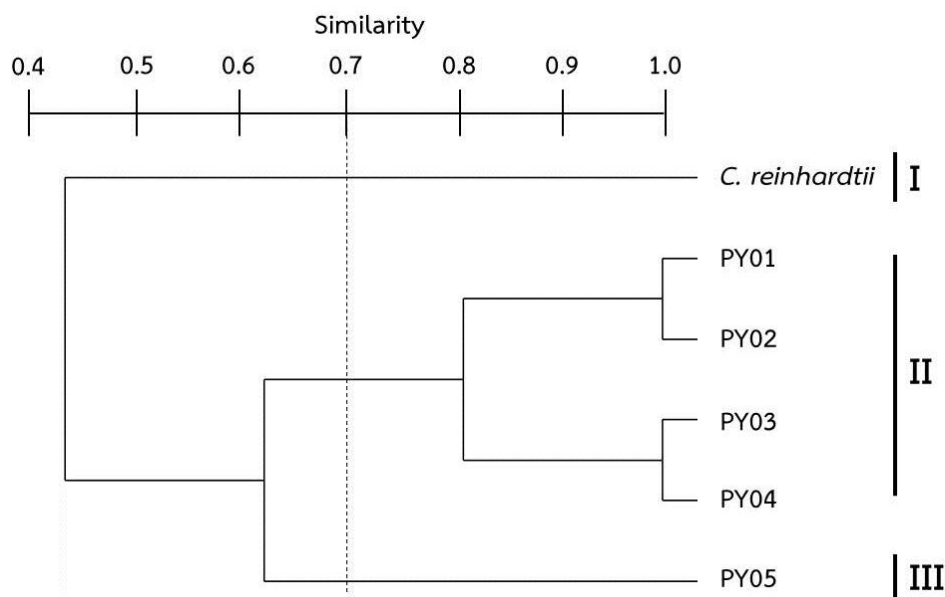
- |            |            |
|------------|------------|
| (A) OPD-20 | (B) OPM-04 |
| (C) OPM-05 | (D) OPR-03 |
| (E) OPR-07 | (F) OPR-09 |
| (G) OPR-12 | (H) OPR-13 |
| (I) OPZ-04 | (J) OPZ-06 |
| (K) OPZ-11 | (L) OPZ-13 |

การปรากฏของลายพิมพ์ดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างสามารถนำมาเปรียบเทียบความเหมือน/ความแตกต่างและคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง (similarity coefficient) ของ Dice (Nei and Li, 1979) แล้วจึงแสดงในรูปแบบของตารางแสดงดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (similarity matrix) ของสาหร่าย 6 ตัวอย่าง ซึ่งจะแสดงการเปรียบเทียบความใกล้ชิดทีละคู่ (ตารางที่ 4-3) พบว่า ดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมีค่าอยู่ในช่วง 0.430-1.000 สาหร่ายคู่ที่มีค่าดัชนีความใกล้ชิดสูงสุดได้แก่ PY01 กับ PY02 และ PY03 กับ PY04 โดยมีค่า 1.000 ซึ่งหมายความว่า สาหร่ายทั้งสองคู่มียายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 100% ส่วนตัวอย่างสาหร่ายคู่ที่มีดัชนีความใกล้ชิดน้อยที่สุด (เมื่อไม่รวมสาหร่ายนอกกลุ่ม) ได้แก่ ไอโซเลท PY03 กับ PY05 และ PY04 กับ PY05 โดยมีค่าเป็น 0.536 หรือหมายถึงสาหร่ายแต่ละคู่นั้นมีความใกล้ชิดกันเพียง 53.6% และเมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA cluster analysis ด้วยโปรแกรม PAUP version 4.0 และแสดงผลในรูปแบบแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ณ ค่าดัชนีความใกล้ชิด 70% สามารถแบ่งสาหร่ายออกเป็น 3 กลุ่ม (รูปที่ 4-14) ได้แก่ กลุ่มที่ 1 สาหร่ายนอกกลุ่ม *C. reinhardtii* กลุ่มที่ 2 สาหร่ายไอโซเลท PY01 PY02 PY03 และ PY04 และกลุ่มที่ 3 สาหร่ายไอโซเลท PY05 ซึ่งจะเห็นได้ชัดว่าที่ระดับความใกล้ชิดดังกล่าว PY05 เป็นสาหร่ายที่แยกออกมาจากไอโซเลทอื่นๆ อย่างชัดเจน

ตารางที่ 4-3 ดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของสาหร่ายโป่งยวบ จากวิธีของ Dice (Nei and Li, 1979)

TAXA	PY01	PY02	PY03	PY04	PY05	CR
PY01	1.000					
PY02	1.000	1.000				
PY03	0.880	0.880	1.000			
PY04	0.880	0.880	1.000	1.000		
PY05	0.545	0.545	0.536	0.536	1.000	
CR	0.461	0.461	0.430	0.430	0.497	1.000

หมายเหตุ CR = *Chlamydomonas reinhardtii* ทำหน้าที่เป็น out group



รูปที่ 4-14 แผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากข้อมูล RAPD ของสาหร่ายโพงยุบ ด้วยวิธี UPGMA cluster analysis โดยใช้โปรแกรม PAUP 4.0

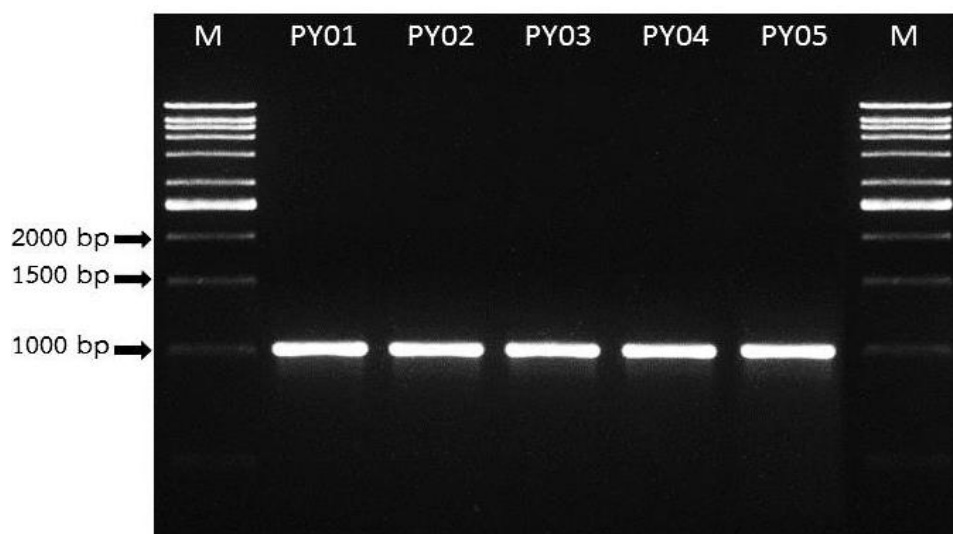
จากผลการทดลองในช่วงแรก (4.1) จะเห็นได้ว่าแม้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายทั้ง 5 ไอโซเลทจะมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มโดยเทคนิค RAPD สามารถแสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่บอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ (genetic polymorphism) เนื่องจากข้อได้เปรียบของเทคนิค RAPD นั้น นอกจากจะเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายแล้ว ยังเป็นการศึกษาความแตกต่างแบบสุ่มทั้งจีโนม (genome) ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการศึกษาจึงเกิดขึ้นมากกว่า 1 ตำแหน่งยีนทำให้มีโอกาสสูงที่จะพบบริเวณที่บอกความแตกต่างได้ (Lynch and Milligan, 1994, Weising et al., 1994) ยิ่งไปกว่านั้นผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ที่ได้ยังสอดคล้องกับการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยลักษณะทางสรีรวิทยาอีกด้วย (รูปที่ 4-12) โดยจะเห็นได้จาก PY01-PY04 จะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันในขณะที่ PY05 ถูกแยกออกจากสาหร่ายไอโซเลทอื่นๆเช่นกัน ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสรีรวิทยาและผลการวิเคราะห์โดย RAPD นี้ พบเช่นเดียวกันในงานวิจัยของ Gomez และ Gonzalez (2001) ในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *Dunaliella salina* ผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของสาหร่ายที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางอนุกรมวิธานในงานวิจัยนี้ได้ ซึ่งผลที่ปรากฏนั้นเป็นไปตามที่ Valatka และคณะ (2000) Oppen และคณะ (1994) และผลงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้กล่าวเน้นไว้ว่าเทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่เหมาะสมแก่การนำไปใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสาหร่ายที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดสูงทางอนุกรมวิธาน

เมื่ออ้างอิงจากการศึกษาผลความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RAPD ข้างต้น สามารถสรุปได้ว่า สาหร่ายที่คัดแยกได้ 5 ไอโซเลทอาจจำแนกออกเป็นสาหร่ายที่แตกต่างกัน 3 ชนิดได้แก่ PY01/PY02 PY03/PY04 และ PY05 ทั้งนี้เนื่องจากสาหร่ายไอโซเลทคู่ PY01 กับ PY02 และคู่ PY03 กับ PY04 มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 100% แต่อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ยังคงมีข้อจำกัดในการบ่งชี้ชนิดสาหร่ายอย่างจำเพาะเจาะจง เนื่องจากหากต้องการบ่งชี้สาหร่ายจนถึงระดับดังกล่าวจำเป็นต้องนำดีเอ็นเอของสาหร่ายที่เป็น reference strain ในสกุล *Chlorosarcinopsis* มาทำการศึกษาร่วมด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นมาใช้ในการศึกษาสาหร่ายที่แยกได้ทั้ง 5 ไอโซเลทต่อไป

#### 4.3.2 การจำแนกและการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *tufA*

ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นในผลการทดลองที่ 4.1 ถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ยากต่อการจัดจำแนกและวินิจฉัยสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* ประกอบกับคู่มือที่ใช้วินิจฉัยสาหร่ายชนิดนี้มีข้อจำกัด ผู้วิจัยจึงได้นำวิธีการจัดจำแนกสาหร่ายด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาใช้ในการศึกษาสาหร่ายที่แยกได้เพื่อยืนยันการวินิจฉัยจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเพื่อศึกษาชนิดและ/หรือชนิดที่มีความใกล้ชิดกันในสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เนื่องจากข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปจัดเรียงเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI GenBank ซึ่งมีชุดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายที่ทราบชนิดแน่ชัดเป็นจำนวนมาก เปรียบเสมือนการใช้ชุดข้อมูลเหล่านั้นเป็นข้อมูลของ reference strains

จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่ตำแหน่งยีน *tufA* ในสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลท ด้วยไพรเมอร์ *tufAF* และ *tufAR* (Hall et al., 2010) พบว่า ไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของสาหร่ายทั้งหมดได้ โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่เกิดขึ้นมีขนาดประมาณ 1000 bp (รูปที่ 4-15) เมื่อส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ทั้งหมดไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ร่วมกับทั้งไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (forward primer) และไพรเมอร์รีเวิร์ส (reverse primer) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ภายหลังการรวมข้อมูลจากทั้งสองทิศทางมีความยาวในช่วง 796 - 913 bp (ตารางที่ 4-4) และเมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงเปรียบเทียบ (BLAST search) กับฐานข้อมูลใน NCBI GenBank ณ วันที่ 10 มกราคม 2559 ได้ผลการวิเคราะห์ที่สนับสนุนผลที่เกิดจากการศึกษาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา กล่าวคือ ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าทั้งหมดเป็นสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามจะพบว่าชนิดสาหร่ายที่มีความเหมือนสูงสุดกับสาหร่ายโป่งยุบในฐานข้อมูลมีมากกว่าหนึ่งชนิดและมีร้อยละความเหมือน (% identity) สูงเท่ากัน จึงทำให้ไม่สามารถระบุสาหร่ายจนถึงระดับชนิด (species) ได้ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าผลดังกล่าวเกิดจากการที่ไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *tufA* ของสาหร่ายชนิดที่ตรงกับสาหร่ายไอโซเลท PY01-PY05 อยู่ในฐานข้อมูล เนื่องจากเมื่อตรวจสอบกลับไปในฐานข้อมูล พบข้อมูลยีน *tufA* ของสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* เพียง 3 ชนิดดังที่แสดงในตารางที่ 4-4 เท่านั้น



รูปที่ 4-15 ผลิตรหัสดีเอ็นเอของยีน *tufA* จากสาหร่ายโป่งยุบ  
1.5% agarose gel ใน 1X TAE buffer M = 1 kb-DNA ladder

ตารางที่ 4-4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tufA* กับฐานข้อมูล NCBI GenBank

ตัวอย่างสาหร่าย	ความยาว	สาหร่ายที่ความเหมือนสูงสุด (98% similarity)
PY01	913	
PY02	796	<i>Chlorosarcinopsis eremi</i> strain BCP-SEV2VF1 (HQ246370.1)
PY03	912	<i>Chlorosarcinopsis eremi</i> strain UTEX1186 (HQ246369.1)
PY04	900	<i>Chlorosarcinopsis</i> sp. AKF-2011 strain ZA1-10 (HQ246367.1)
PY05	901	

หมายเหตุ: ผลการเปรียบเทียบ ณ วันที่ 10 มกราคม 2559

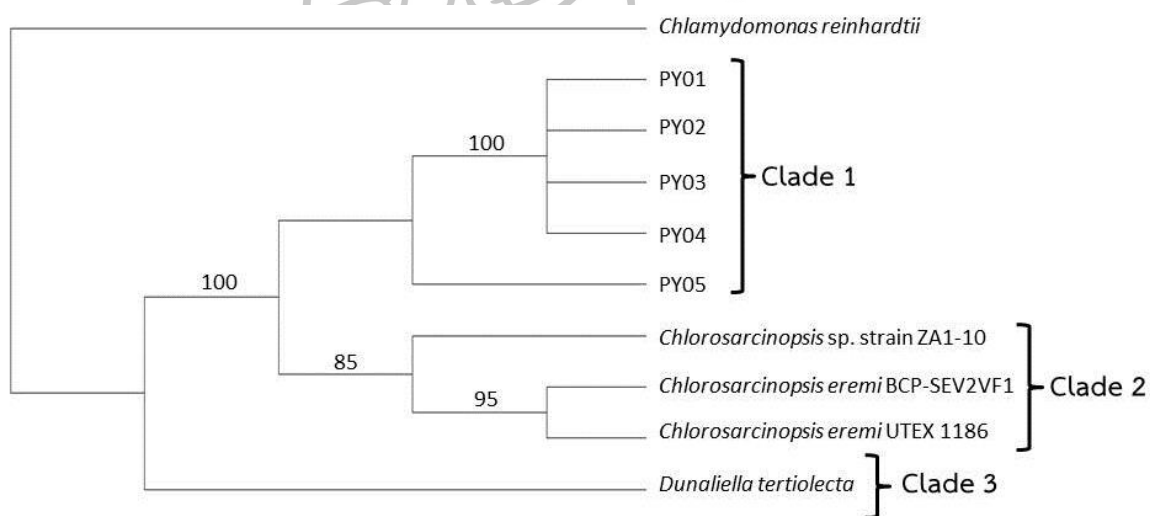
ในการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tufA* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายนอกกลุ่ม สาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* และสาหร่ายในสกุลใกล้เคียงที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI (ตารางที่ 4-8) ได้ถูกนำมาจัดเรียงร่วมกับสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลท โดยใช้โปรแกรม Bioedit v. 7.0.9 (Hall, 1999) เมื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีความชัดเจนบริเวณส่วนหัวและส่วนท้ายแล้ว ได้ชุดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tufA* ที่ได้มีความยาว 802 bp (802 characters) ลำดับที่ได้จัดเรียงแล้วจะถูกนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (cladogram) ด้วยโปรแกรม PAUP version 4.0 โดยค่า bootstrap support จะแสดงบนกิ่ง (branch) ของแผนภูมิ ปรากฏผลดังแสดงในรูปที่ 4-15

เนื่องจากในฐานข้อมูลไม่พบข้อมูล *tufA* ของสาหร่ายสกุลใกล้เคียง (*Neochlorosarcina* และ *Desmotetra*) ผู้วิจัยจึงได้เลือกสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ซึ่งมีความใกล้เคียงกับสกุล *Chlorosarcinopsis* ในระดับหนึ่งมาใช้วิเคราะห์ร่วมในครั้งนี้นี้ด้วย โดยแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *tufA* แสดงในรูปที่ 4-16 แผนภูมิที่ได้มีค่า CI (consistency index) เท่ากับ 0.9667 และค่า RI (retention index) เท่ากับ 0.9259 ซึ่งถือว่าแผนภูมิที่ได้มีคุณภาพที่ดี (ทั้งสองค่านี้ออกถึงคุณภาพที่ดีของแผนภูมิเมื่อมีค่าเข้าใกล้ 1) จากแผนภูมิที่เกิดขึ้น สาหร่ายทั้งหมดถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (clade) ซึ่งสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลทจัดอยู่ใน clade 1 ทั้งหมด โดยที่ไอโซเลท PY01 - PY04 มีความใกล้เคียงกันสูงสุดด้วยค่า bootstrap support เท่ากับ 100 ซึ่งหมายความว่า การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *tufA* ด้วยโปรแกรมมีความเชื่อมั่นว่า สาหร่ายไอโซเลท PY01-PY04 จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน 100%

ในแง่ของการจัดจำแนกนั้นอาจกล่าวได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *tufA* ยังไม่เหมาะสมนักที่จะนำมาให้จัดจำแนกสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* เนื่องจากเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tufA* ของสาหร่าย 5 ไอโซเลทที่ได้ทำการจัดเรียงแล้วมาคำนวณร้อยละความคล้ายคลึง (percentage of nucleotide sequence similarity) โดยเปรียบเทียบทีละคู่ (ตารางที่ 4-5) พบว่า ยีนตำแหน่งดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกันสูงมากถึง 97.9 – 100% ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการทดลองของ Hall และคณะ (2010) ที่ได้กล่าวว่ายีน *tufA* เป็นตำแหน่งที่สามารถบอกความแตกต่างในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) ได้ดี และยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า แผนภูมิที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *tufA* ไม่สามารถจำแนกไอโซเลท PY01- PY04 ออกจากกันได้ ซึ่งเป็นผลที่ไม่สอดคล้องกับเดนโดแกรมที่ได้จากการทดสอบทางสรีรวิทยาและ RAPD (รูปที่ 4-12 และรูปที่ 4-14) แต่อย่างไรก็ตามจากแผนภูมิทำให้สามารถสันนิษฐานได้ว่า สาหร่ายที่คัดแยกได้มีแนวโน้มสูงที่จะไม่ใช่สาหร่ายชนิดเดียวกันกับ *Chlorosarcinopsis* ชนิดที่มีในฐานข้อมูล เนื่องจากข้อมูลที่มีน้อยในฐานข้อมูล NCBI ประกอบกับจะเห็นว่าสาหร่ายจากฐานข้อมูลทั้งหมดจะถูกจัดอยู่คนละ clade กับสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลท

ตารางที่ 4-5 ร้อยละความคล้ายคลึงของสาหร่ายโพงยุบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tufA* คำนวณโดยโปรแกรม Bioedit V.7.0.9 (Hall, 1999)

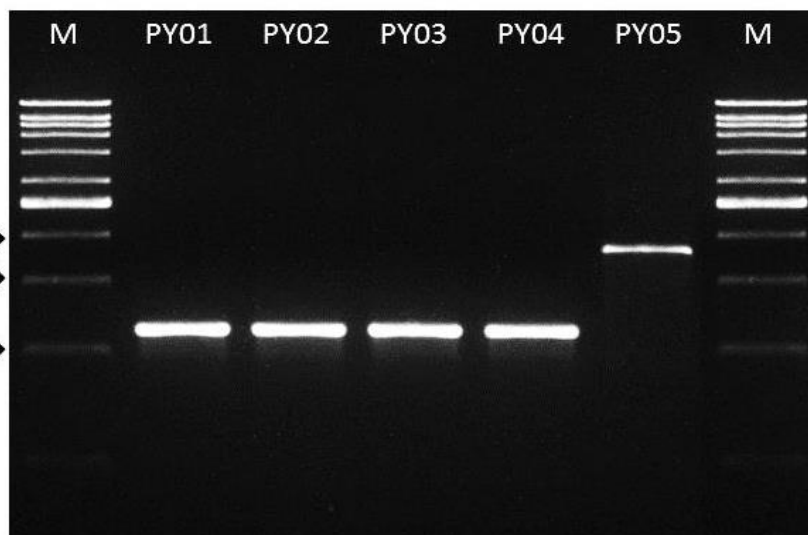
TAXA	PY01	PY02	PY03	PY04	PY05
PY01	100				
PY02	99.7	100			
PY03	100	99.7	100		
PY04	99.8	99.6	99.8	100	
PY05	99.1	98.8	97.9	97.9	100



รูปที่ 4-16 แผนภูมิสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่ายโพงยุบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *tufA* หมายเหตุ: ตัวเลขบนกิ่งของแผนภูมิแสดงค่า bootstrap support

#### 4.3.3 การจำแนกและการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA ในสาหร่ายโป่งยุบ ทั้ง 5 ไอโซเลท โดยสาหร่ายไอโซเลท PY01 - PY04 ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 107F (Suutari et al., 2010) และ ChloroR (Moro et al., 2009) และได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,200 bp (รูปที่ 4-17) ส่วนในสาหร่ายไอโซเลท PY05 จะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 18S-42F และ 18S-1498R (López-García et al., 2003) โดยได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,800 bp (รูปที่ 4-17) ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายหลังการรวมดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ทั้งสองทิศทางมีความยาวในช่วง 1,120 – 1,679 bp ซึ่งแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4-6 เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงเปรียบเทียบ (BLAST search) กับฐานข้อมูลใน NCBI GenBank ณ วันที่ 10 มกราคม 2559 ผลที่ได้สอดคล้องกับทั้งผลจากการศึกษาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tufA* คือ ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าทั้งหมดเป็นสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามจะพบว่า ชนิดสาหร่ายที่มีความเหมือนสูงสุดในฐานข้อมูลมีมากกว่าหนึ่งชนิดและมีร้อยละความเหมือน (% identity) เท่ากัน จึงเท่ากับว่าไม่สามารถระบุสาหร่ายจนถึงระดับชนิด (species) ได้



รูปที่ 4-17 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน 18S rDNA จากสาหร่ายโป่งยุบ

1.5% agarose gel ใน 1X TAE buffer M = 1 kb DNA ladder



ตารางที่ 4-6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA กับฐานข้อมูล NCBI GenBank

ตัวอย่างสาหร่าย	ความยาว	สาหร่ายที่ความเหมือนสูงสุด (98% similarity)
PY01	1171	
PY02	1182	<i>Chlorosarcinopsis</i> sp. WJT43VFNP28 (JX446414.1)
PY03	1120	<i>Chlorosarcinopsis eremi</i> (AB218706.1) <i>Chlorosarcinopsis arenicola</i> (AB218701.1)
PY04	1173	
PY05	1679	

หมายเหตุ: ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ ณ วันที่ 10 มกราคม 2559

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลทมา คำนวณหา % similarity โดยเปรียบเทียบทีละคู่ (ตารางที่ 4-7) พบว่ามีค่าดังกล่าวอยู่ในช่วง 94.9 – 97.7 % ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วในการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น จะยอมรับว่าสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษาคือเป็นชนิดเดียวกันก็ต่อเมื่อมีค่าดังกล่าวตั้งแต่ 97 % ขึ้นไป (Portillo et al., 2009) นั่นก็หมายความว่าจากการทดลองในสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* จากโป่งยุบนี้ ยีน 18S rDNA เป็นตำแหน่งที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างแต่ละไอโซเลทได้ดี โดยเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปจัดเรียงเปรียบเทียบบนลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 18S rDNA ของ *Chlamydomonas reinhardtii* (accession number: AB511834.1) ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบของสาหร่าย (model organism) พบว่า บริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 18S rDNA มากที่สุดอยู่ตั้งแต่ประมาณลำดับที่ 1,000 ถึง 1,200 ของยีน (Nakada et al., 2010) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่า มีความเป็นไปได้สูงที่ในฐานข้อมูลจะไม่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* ที่เป็นชนิดเดียวกับสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลทปรากฏอยู่ในขณะนี้ (วันที่ 31 กรกฎาคม 2559)

ตารางที่ 4-7 ร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายโป่งยุบ  
คำนวณโดยโปรแกรม Bioedit V.7.0.9 (Hall, 1999)

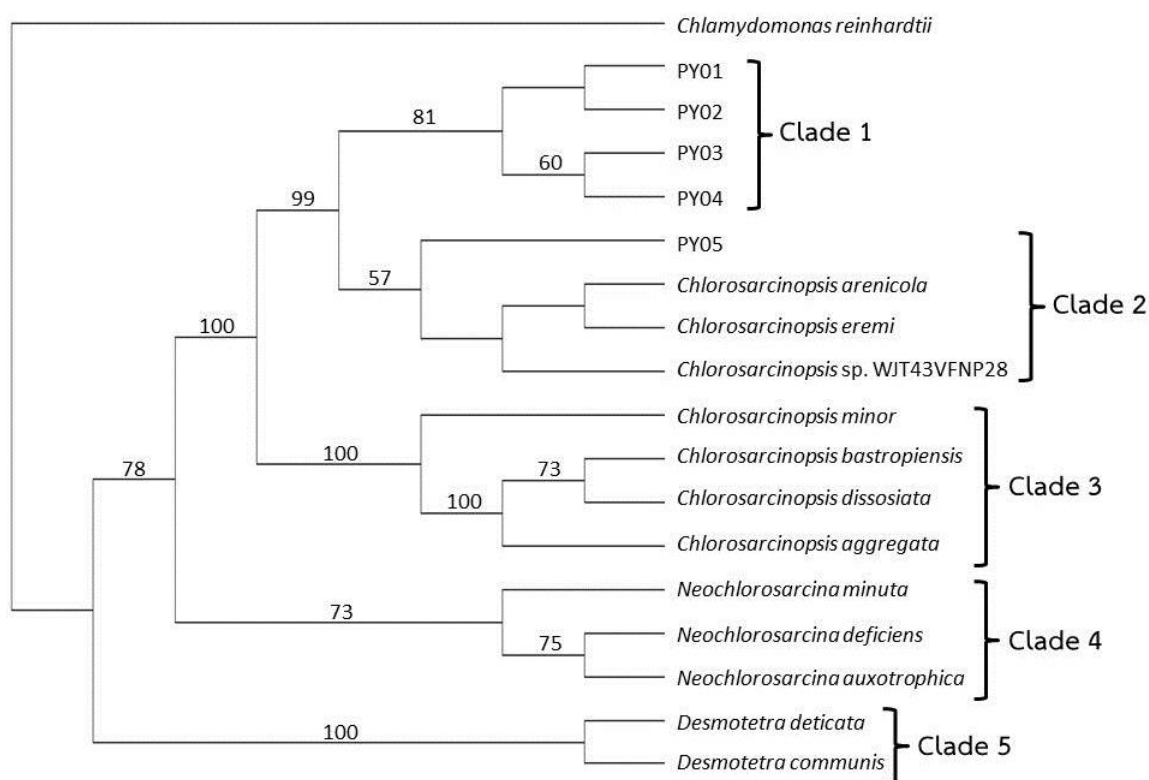
TAXA	PY01	PY02	PY03	PY04	PY05
PY01	100				
PY02	97.1	100			
PY03	96.5	95.2	100		
PY04	96.8	96.1	96.0	100	
PY05	97.7	96.0	94.9	95.3	100

ในการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rDNA นิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 และสาหร่ายชนิดอื่นๆ ที่ได้นำมาวิเคราะห์ร่วมด้วยแสดงใน ตารางที่ 4-8 หลังจากการจัดเรียง ปรับแต่งและแก้ไขด้วยโปรแกรม Bioedit v. 7.0.9 (Hall, 1999) โดยการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีความชัดเจนบริเวณส่วนหัวและส่วนท้ายของลำดับแล้ว ทำให้ได้ ชุดลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rDNA ที่มีความยาว 1,165 bp (1,165 characters) ซึ่ง เมื่อนำไปสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้วิธีเช่นเดียวกันกับที่ได้กล่าวไปแล้วใน การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tufA* แผนภูมิที่ได้มีค่า CI เท่ากับ 0.8364 และมีค่า RI เท่ากับ 0.8333 ซึ่งจัดอยู่ในระดับที่ดี

จากแผนภูมิ (รูปที่ 4-18) จะเห็นว่าสาหร่ายทั้งหมดถูกแบ่งออกเป็น 5 clade ด้วยข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rDNA ใน clade 1 ประกอบด้วยสาหร่ายโป่งยุบไอโซเลท PY01-PY04 โดยที่พบว่าสาหร่าย PY01 กับ PY02 และ PY03 กับ PY04 มีความใกล้เคียงกันสูงที่สุดในขณะที่ไอโซเลท PY05 ถูกจัดอยู่ใน clade 2 ร่วมกับสาหร่าย 3 ชนิดที่มีความเหมือนสูงสุดในฐานข้อมูลจาก ตารางที่ 4-6 ซึ่งหากพิจารณาสาหร่ายเพียง 5 ไอโซเลท จะพบว่า ผลที่ได้ดังกล่าวมีความสอดคล้องกับแผนภูมิที่ได้จากการทดสอบทางสรีรวิทยาและ RAPD (รูปที่ 4-12 และ 4-14)

ข้อได้เปรียบของการศึกษาโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ที่ชัดเจนคือ ยีน ตำแหน่งนี้เป็นตำแหน่งที่มีนักวิจัยนิยมศึกษาเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้มีข้อมูลยีนนี้เป็นจำนวนมากใน ฐานข้อมูลที่จะสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ร่วม ดังนั้นจึงทำให้มีข้อมูลทั้งทางสัณฐานวิทยาและอนุ ชีววิทยาของสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* มากพอ และทำให้สามารถพิจารณาถึงลักษณะทาง สัณฐานวิทยา ร่วมกับการจัดกลุ่มในแต่ละ clade ได้ ซึ่งจากการพิจารณาก็พบว่า ในแต่ละ clade มี ลักษณะที่สอดคล้องกันซึ่งแสดงไว้ในเอกสารวิชาการที่ศึกษาสาหร่ายกลุ่มนี้ (Herndon, 1958, Groover and Bold, 1969, Watanabe et al., 2006) แผนภูมิจากยีน 18S rDNA จึงมีความ น่าเชื่อถือที่จะสรุปว่า สาหร่ายไอโซเลท PY01 – PY04 ไม่ใช่สาหร่ายชนิดเดียวกับสาหร่าย PY05 ซึ่ง มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายใน clade 2 มากกว่าสาหร่ายจากโป่งยุบไอโซเลทอื่น (รูปที่ 4-18)

นอกจากสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* แล้ว จะเห็นว่าสาหร่ายในสกุลใกล้เคียงได้ถูกนำมาวิเคราะห์ร่วมด้วยในการทดลองนี้ ทั้งนี้เนื่องจากการที่สาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ยากต่อการวินิจฉัย และมักพบว่าเกิดความสับสนระหว่างสาหร่ายสกุลใกล้เคียง ได้แก่ สาหร่ายสกุล *Neochlorosarcina* และ *Desmotetra* เนื่องจากเดิมสาหร่ายบางสปีชีส์ในทั้งสองสกุลดังกล่าวเคยถูกจัดอยู่ในสกุล *Chlorosarcinopsis* แล้วจึงแยกออกมาภายหลัง (Flechtner et al., 2013) ยิ่งไปกว่านี้ จากแผนภูมิลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rDNA (รูปที่ 4-18) เป็นผลการทดลองที่สนับสนุนทางอ้อมว่า การวินิจฉัยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลทที่คัดแยกมาได้เป็นไปอย่างถูกต้องและเป็นสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* จริง เนื่องจากหนึ่งในลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกสกุล *Neochlorosarcina* และ *Desmotetra* ออกจาก *Chlorosarcinopsis* นั้น จำเป็นต้องศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ซึ่งในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการศึกษาดังกล่าวไว้ก่อนหน้านี้



รูปที่ 4-18 แผนภูมิมายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่ายโป่งยุบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

หมายเหตุ: ตัวเลขบนกิ่งของแผนภูมิแสดงค่า bootstrap support

ตารางที่ 4-8 สำหรับสายสีเขียวขนาดเล็กที่ใช้ร่วมในการสร้างแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ จากฐานข้อมูล NCBI GenBank

Algal strains	Genes	Accession number	Reference
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> *	<i>tufA</i>	FJ458268.1	Smith and Lee (2009)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> *	18S rDNA	AB511835.1	Nakada et al. (2010)
<i>Chlorosarcinopsis</i> sp. AKF-2011 strain ZA1-10	<i>tufA</i>	HQ246367.1	Hall et al. (2010)
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i> strain UTEX 1186	<i>tufA</i>	HQ246369.1	Hall et al. (2010)
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i> strain BCP-SEV2VF1	<i>tufA</i>	HQ246370.1	Hall et al. (2010)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>tufA</i>	JQ039091.1	Unpublished
<i>Chlorosarcinopsis arenicola</i>	18S rDNA	AB218701.1	Watanabe et al. (2006)
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i>	18S rDNA	AB218706.1	Watanabe et al. (2006)
<i>Chlorosarcinopsis</i> sp. WJT43VFNP28	18S rDNA	JX446414.1	Flechtner (2013)
<i>Chlorosarcinopsis minor</i>	18S rDNA	AB049415.1	Watanabe et al. (2001)
<i>Chlorosarcinopsis bastropiensis</i>	18S rDNA	JF343794.1	Unpublished
<i>Chlorosarcinopsis dissociata</i>	18S rDNA	AB218702.1	Watanabe et al. (2006)
<i>Chlorosarcinopsis aggregata</i>	18S rDNA	AB218695.1	Watanabe et al. (2006)
<i>Neochlorosarcina minuta</i>	18S rDNA	AB218698.1	Watanabe et al. (2006)
<i>Neochlorosarcina deficiens</i>	18S rDNA	AB218697.1	Watanabe et al. (2006)
<i>Neochlorosarcina auxotrophica</i>	18S rDNA	AB218696.1	Watanabe et al. (2006)
<i>Desmotetra deticata</i>	18S rDNA	AB218710.1	Watanabe et al. (2006)
<i>Desmotetra communis</i>	18S rDNA	AB218705.1	Watanabe et al. (2006)

หมายเหตุ \* ชนิดสายที่ใช้เป็นสายนอกกลุ่ม (out group) ในการสร้างแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

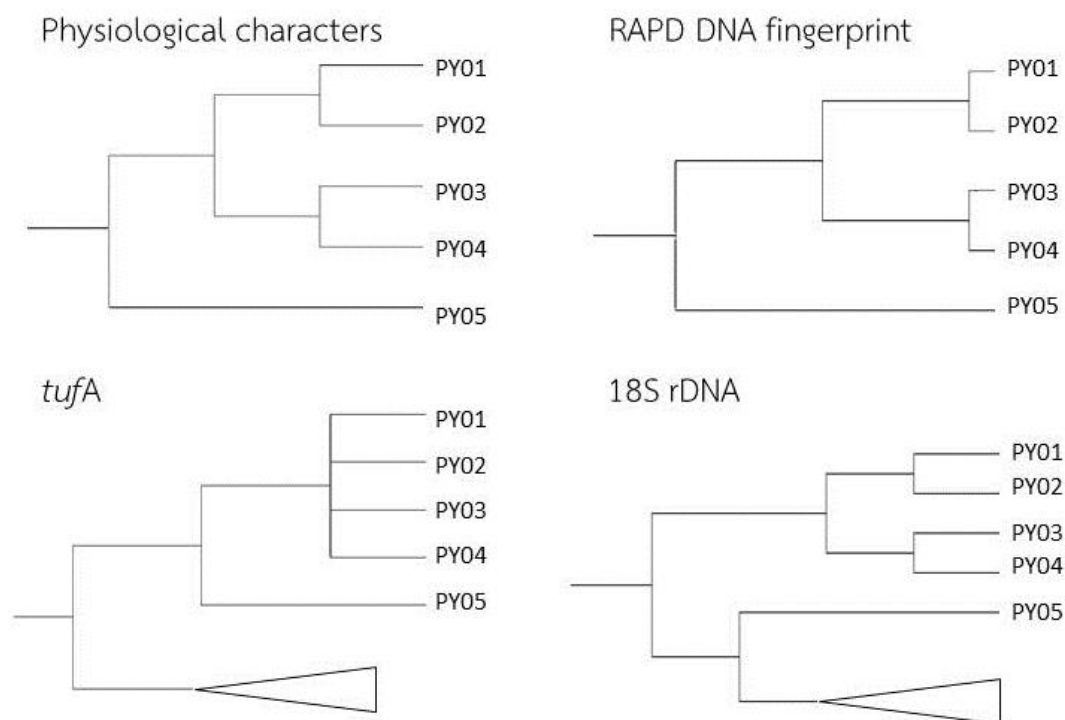
#### 4.4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิคที่นำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่าง และจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis*

ลักษณะสัณฐานวิทยาที่เด่นชัดของสาหร่ายโพงยุบทั้ง 5 ไอโซเลท ที่เรียกว่า sarcinoid ซึ่งหมายถึงการเรียงติดกันของเซลล์แบบ 3 มิติในลักษณะลูกบาศก์นั้น ช่วยทำให้การวินิจฉัยในระดับสกุลเป็นไปได้ง่ายขึ้น แต่เมื่อต้องการระบุชนิดในระดับสปีชีส์แล้ว กลับพบว่าข้อมูลลักษณะของเซลล์ที่ได้จากกล้องแบบเลนส์ประกอบนั้นไม่เพียงพอ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการรวบรวมข้อมูลด้านอื่นๆ เพื่อนำมาเป็นข้อมูลเสริมในการจัดกลุ่มและระบุชนิดของสาหร่ายที่แยกได้จากห้องถ้ำในครั้งนี้

เมื่อนำแผนภูมิความสัมพันธ์ของสาหร่ายโดยพิจารณาเพียงสาหร่ายโพงยุบ 5 ไอโซเลทที่เกิดจากข้อมูลแต่ละชนิดมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกัน ได้แก่ ข้อมูลจากการทดสอบทางสรีรวิทยา (รูปที่ 4-19) ข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *tufA* และยีน 18S rDNA พบว่า สาหร่ายโพงยุบทั้ง 5 ไอโซเลทเป็นสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* ชนิดที่แตกต่างจากสาหร่าย *Chlorosarcinopsis* ที่มีอยู่แล้วในฐานข้อมูล และทั้ง 5 ไอโซเลทนี้สามารถจัดเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 PY01 PY02 PY03 และ PY04 และกลุ่มที่ 2 คือ PY05 เพียงไอโซเลทเดียว แต่ผลการเปรียบเทียบแผนภูมิแสดงให้เห็นว่า จากการผลทดลองทั้งหมด 4 การทดลอง มีเพียงแผนภูมิจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tufA* เท่านั้นที่ให้ผลไม่สอดคล้องกับแผนภูมิจากข้อมูลอื่นๆ ประกอบกับผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ละคู่ของ *tufA* แล้ว (ตารางที่ 4-5) ผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่ายีน *tufA* ยังไม่เหมาะสมต่อการนำมาจัดจำแนกสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* ในระดับสปีชีส์

ส่วนผลการศึกษาด้วยลักษณะทางสรีรวิทยา ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD และลำดับข้อมูลนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rDNA นั้น ให้ผลสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันทั้งหมด ซึ่งหมายความว่า การจำแนกสาหร่ายโพงยุบด้วยข้อมูลทั้ง 3 ลักษณะข้างต้นประสบความสำเร็จตามจุดมุ่งหมายเป็นอย่างดี (จำแนกความแตกต่างของสาหร่าย 5 ไอโซเลทได้สอดคล้องกับลักษณะทางสรีรวิทยา ซึ่งเป็นลักษณะที่เห็นได้ด้วยตาและชัดเจนที่สุด) อย่างไรก็ตามผู้วิจัยมีความเห็นว่า วิธีที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างมากที่สุดคือการทดสอบทางสรีรวิทยา เนื่องจากทำได้ง่ายกว่าและมีต้นทุนที่ถูกกว่าเทคนิค RAPD และเทคนิคที่ต้องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) โดยลักษณะสรีรวิทยาที่บอกความแตกต่างได้ชัดเจนที่สุดคือ ความสามารถในการเจริญเติบโตและสีของโคโลนีบนอาหารที่มีการเติมน้ำตาล Fructose และการเปลี่ยนสีบนอาหารสูตร BBM

สำหรับการจัดจำแนกและระบุชนิดสาหร่ายในเชิงลึก รวมไปถึงการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* นั้น การใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rDNA นับได้ว่าเป็นข้อมูลที่มีความเหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากข้อมูลบริเวณดังกล่าวมีความหลากหลาย (ตารางที่ 4-8) อีกทั้งยังเป็นตำแหน่งยีนที่มีข้อมูลของสาหร่ายชนิดอื่นที่มีความใกล้ชิดจำนวนมาก ทำให้สามารถเปรียบเทียบกับลักษณะอื่นได้อย่างครอบคลุม นอกจากนี้ ผลการทดลองในแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นในครั้งนี้ ก็ยังยืนยันความสอดคล้องกับการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาอีกด้วย



รูปที่ 4-19 การจัดกลุ่มสาหร่ายโพงยุบด้วยข้อมูลลักษณะต่างๆ แผนภูมิทั้งหมดข้างต้นสร้างจากการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลแต่ละลักษณะ โดยมุ่งเน้นเพียงสาหร่ายโพงยุบ 5 ไอโซเลตเท่านั้น สัญลักษณ์  $\Delta$  แทนสาหร่ายสกุล *Chlorosarcinopsis* ชนิดอื่นจากฐานข้อมูล NCBI GenBank



## 5. ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต และการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorosarcinopsis* PY02

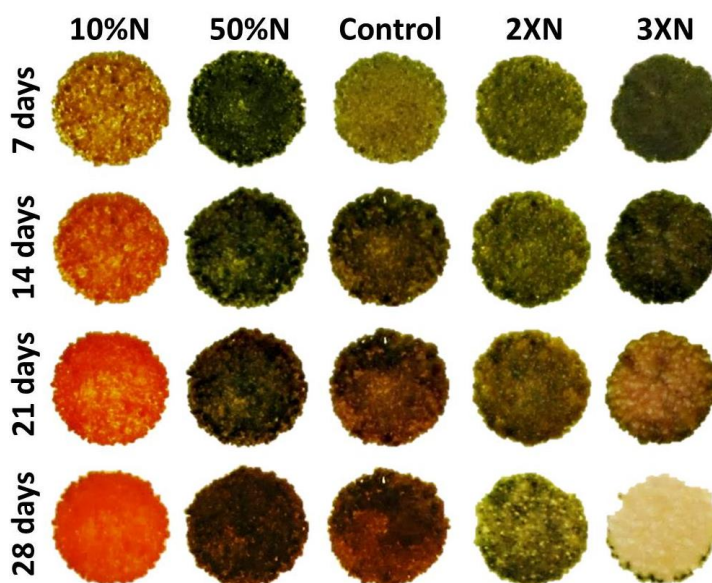
สืบเนื่องจากผลการทดลองที่บ่งชี้ว่าสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลทเป็นสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* และถึงแม้ว่าจะมีลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่จากแผนภูมิสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการก็ยังพบว่าสาหร่ายทั้ง 5 มีความใกล้เคียงกันค่อนข้างสูง ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกสาหร่ายไอโซเลท PY02 เพียงไอโซเลทเดียวมาทำการศึกษาต่อ จากคุณสมบัติของการให้ปริมาณ canthaxanthin content สูงสุด (รูปที่ 4-8 ในผลการทดลองที่ 3)

### 5.1 ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์

เพื่อคัดเลือกระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมแก่การกระตุ้นให้สาหร่าย PY02 ผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ในปริมาณที่มากขึ้น ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเบื้องต้นด้วยวิธี spot test โดยเพาะเลี้ยง PY02 บนอาหารสูตร TAP ที่ลดและเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนจากอาหารสูตรปกติ จากนั้นติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนีและการเจริญเติบโตโดยการบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล ผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารยิ่งสูงขึ้นก็ยิ่งส่งผลในทางลบต่อการเจริญเติบโตของ PY02 ดังจะเห็นได้ว่า ณ วันที่ 28 ของการทดลอง โคโลนีสาหร่ายบนอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนขึ้น 2 เท่า (2XN) และ 3 เท่า (3XN) มีลักษณะบางส่วนซีดขาวและตาย (รูปที่ 4-20) อีกทั้งไม่พบการสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์สาหร่ายในระหว่างการทดลอง

ในทางตรงกันข้าม เมื่อลดความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารลงกลับให้ผลส่งเสริมทั้งการเจริญเติบโตและการสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ของ PY02 (รูปที่ 4-20) ดังจะเห็นได้ว่า ณ วันที่ 7 ของการทดลอง โคโลนีสาหร่ายบนอาหารที่ลดความเข้มข้นของไนโตรเจนลงเหลือ 50% (50%N) มีสีเขียวเข้มและมีความหนาแน่นของสาหร่ายมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ส่วนโคโลนีสาหร่ายบนอาหารที่ลดความเข้มข้นของไนโตรเจนลงเหลือ 10% (10%N) ก็พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสีเหลืองส้มตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง และมีสีส้มเข้มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง

แม้ว่าไนโตรเจนจะเป็นธาตุอาหารหลัก (macronutrient) ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมไปถึงสาหร่าย (Painter, 1970, Flynn, 1990) เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโน (amino acid) ซึ่งสำคัญต่อการสังเคราะห์โปรตีนที่ทำหน้าที่ต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น ส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane protein) โครงร่างค้ำจุนเซลล์ (cytoskeleton) และ เอนไซม์ (enzyme) ชนิดต่างๆ (Ortiz-Lopez et al., 2000, Brosnan and Brosnan, 2013, Leuchtenberger et al., 2005) อย่างไรก็ตามปริมาณไนโตรเจนในสิ่งแวดล้อมที่มากเกินไปก็สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์สาหร่ายได้ ดังเช่นผลงานวิจัยจำนวนมากที่รายงานว่าไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนีย (ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับในอาหารสูตร TAP) ที่เข้มข้นสูงนั้นเป็นพิษต่อสาหร่าย ส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลงและตายเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (Källqvist and Svenson, 2003, Collos and Harrison, 2014) ซึ่งก็สอดคล้องกับผลที่พบใน PY02 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกเฉพาะความเข้มข้นไนโตรเจนที่ลดลงที่สาหร่ายยังคงสามารถเจริญเติบโตได้ ไปทำการศึกษาต่อถึงผลของความเข้มข้นไนโตรเจนในอาหารต่ออัตราการเจริญเติบโตและปริมาณ canthaxanthin ที่สาหร่ายดังกล่าวสะสม



รูปที่ 4-20 ผลของปริมาณไนโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงสีของ *Chlorosarcinopsis* PY02

10%N = อาหารสูตร TAP ที่ลดไนโตรเจนลงเหลือ 50%

50%N = อาหารสูตร TAP ที่ลดไนโตรเจนลงเหลือ 50%

Control = อาหารสูตร TAP ปกติ

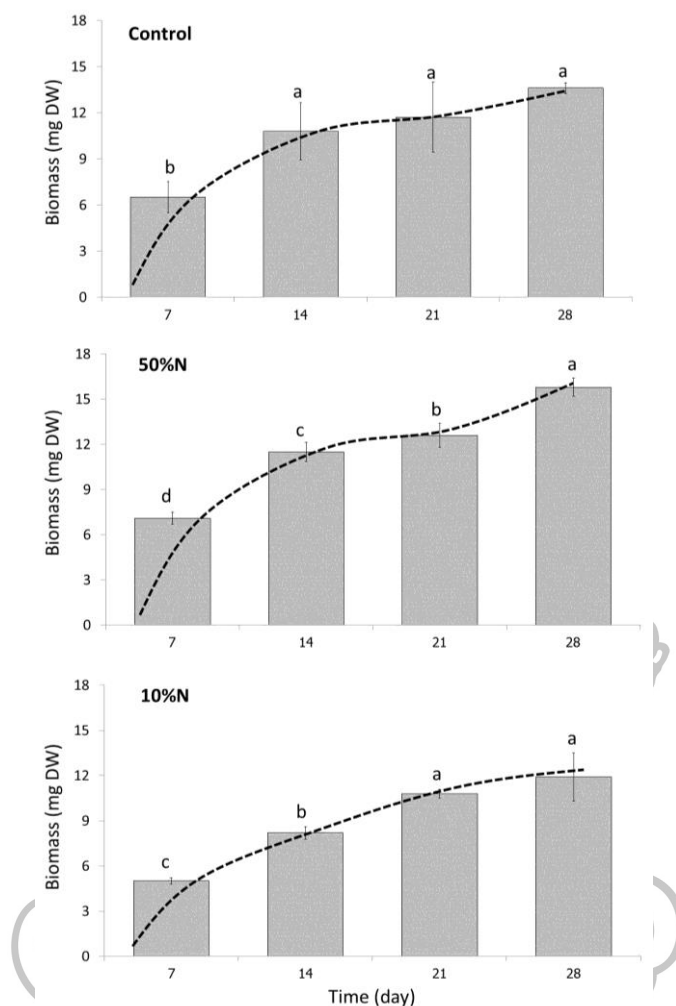
2XN = อาหารสูตร TAP ที่เพิ่มไนโตรเจนขึ้น 2 เท่าจากปกติ

3XN = อาหารสูตร TAP ที่เพิ่มไนโตรเจนขึ้น 3 เท่าจากปกติ

## 5.2 ปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตมวลชีวภาพ

สืบเนื่องจากผลการทดลองที่ 5.1 สาหร่าย PY02 จึงถูกนำมาทำการทดลองเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร TAP ที่มีการลดไนโตรเจนลงซ้ำอีกครั้ง ได้แก่ 50%N และ 10%N โดยมีอาหารสูตร TAP ปกติเป็นชุดควบคุม เพื่อวัดอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตมวลชีวภาพ (Biomass) ของสาหร่ายโดยการชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) และจากการเก็บผลทุกๆ 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง (28 วัน) พบว่า การลดปริมาณไนโตรเจนในอาหารส่งผลให้การเจริญเติบโตของ PY02 เข้าสู่ระยะหยุดนิ่ง (stationary phase) ช้าลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 4-21) โดยจะเห็นได้จากผลการทดสอบทางสถิติของน้ำหนักแห้งที่วัดได้ในแต่ละชุดทดลอง ที่พบว่า ในชุดควบคุม PY02 เริ่มเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 14 ของการทดลอง (น้ำหนักแห้งตั้งแต่ วันที่ 14 ถึง 28 ของการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ) ในขณะที่ชุดทดลองที่มีปริมาณไนโตรเจนในอาหารต่ำที่สุด (10%N) เริ่มเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 21 ของการทดลอง ส่วนใน 50%N นั้นพบว่าสาหร่ายยังไม่เข้าสู่ stationary phase ใดๆก็ตามเนื่องจากผล spot test (รูปที่ 4-20) พบว่า 10%N ให้ผลกระตุ้นการสะสมคีโตแคโรทีนอยด์เด่นชัดที่สุด ผู้วิจัยจึงเลือกสิ้นสุดการเก็บผลการทดลองตามการเข้าสู่ระยะ stationary phase ของสถานะดังกล่าว นั่นคือ 28 วัน





รูปที่ 4-21 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorosarcinopsis* PY02

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงการจัดกลุ่มทางสถิติโดย post hoc Duncan's test (one-way ANOVA)  $n=3$   $P<0.05$

Control = อาหารสูตร TAP ปกติ

50%N = อาหารที่ลดไนโตรเจนลงเหลือ 50%

10%N = อาหารที่ลดไนโตรเจนลงเหลือ 10%

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตมวลชีวภาพของสาหร่าย PY02 ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 28 วัน บนอาหารที่มีการลดไนโตรเจนลงแต่ละระดับ (ตารางที่ 4-9) พบว่าที่ 50%N ให้มวลชีวภาพและมีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (relative growth rate; RGR) สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) โดยมีค่าเท่ากับ  $15.8\pm 0.6$  มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง (mg DW) และ  $0.370\pm 0.005$  มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมต่อวัน ( $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) ตามลำดับ ในขณะที่ 10%N ให้มวลชีวภาพและ RGR ต่ำสุด โดยมีค่าเท่ากับ  $11.9\pm 1.6$  mg DW และ  $0.353\pm 0.004$   $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่าง 10%N กับชุดควบคุมที่ให้มวลชีวภาพและมี RGR เท่ากับ  $13.6\pm 0.4$  mg DW และ  $0.357\pm 0.001$   $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน

ดังที่ได้กล่าวไปแล้วในการทดลองก่อนหน้านี้ว่าไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการสร้างมวลชีวภาพของสาหร่าย ดังนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย PY02 ในสถานะที่มีไนโตรเจนเหลืออยู่เพียง 10% หรือสถานะเครียดจากการขาดแคลนไนโตรเจน จึงไม่น่าแปลกใจนักที่พบว่า สาหร่ายมีมวลชีวภาพลดลงจากชุดควบคุม เนื่องจากไนโตรเจนในอาหารไม่เพียงพอที่จะใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ ผลดังกล่าวนี้พบเช่นเดียวกันในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กหลายชนิด เช่น *Haematococcus pluvialis* (Borowitzka et al., 1991) *Parietochloris incisa* (Solovchenko et al., 2008) และ *Chlorella* spp. (Shen et al., 2016, Zhu et al., 2015) แต่ผลที่น่าสนใจและน่าจะเป็นข้อดีที่พบในสาหร่าย PY02 คือ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งในสถานะที่ลดไนโตรเจนลงเหลือ 50% กลับพบว่าสาหร่ายมีมวลชีวภาพที่เพิ่มมากขึ้นจากชุดควบคุมถึง 16% ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4-9 (เมื่อให้การเจริญเติบโตของชุดควบคุมเป็น 100%) ซึ่งกล่าวได้ว่าที่ 50%N หรือเท่ากับไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้น 3.74 มิลลิโมลาร์ (mM) อาจเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของ PY02 นั้นเอง และเช่นเดียวกับผลงานวิจัยในสาหร่ายหลายชนิดที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของสาหร่าย (Fabregas et al., 1989, Xin et al., 2010) จากผลข้างต้นผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่า ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญที่ควรมีการศึกษาเพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตมวลชีวภาพของสาหร่าย

ตารางที่ 4-9 ผลของไนโตรเจนต่อการผลิตมวลชีวภาพและอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ของ *Chlorosarcinopsis* PY02

ความเข้มข้นไนโตรเจน	มวลชีวภาพ (mgDW)	อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (mg.mg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	ร้อยละของการเจริญเติบโต (%)
TAP Control	13.6±0.4 <sup>a</sup>	0.357±0.001 <sup>a</sup>	100
TAP 50%N	15.8±0.6 <sup>b</sup>	0.370±0.005 <sup>b</sup>	116
TAP 10%N	11.9±1.6 <sup>a</sup>	0.353±0.004 <sup>a</sup>	88

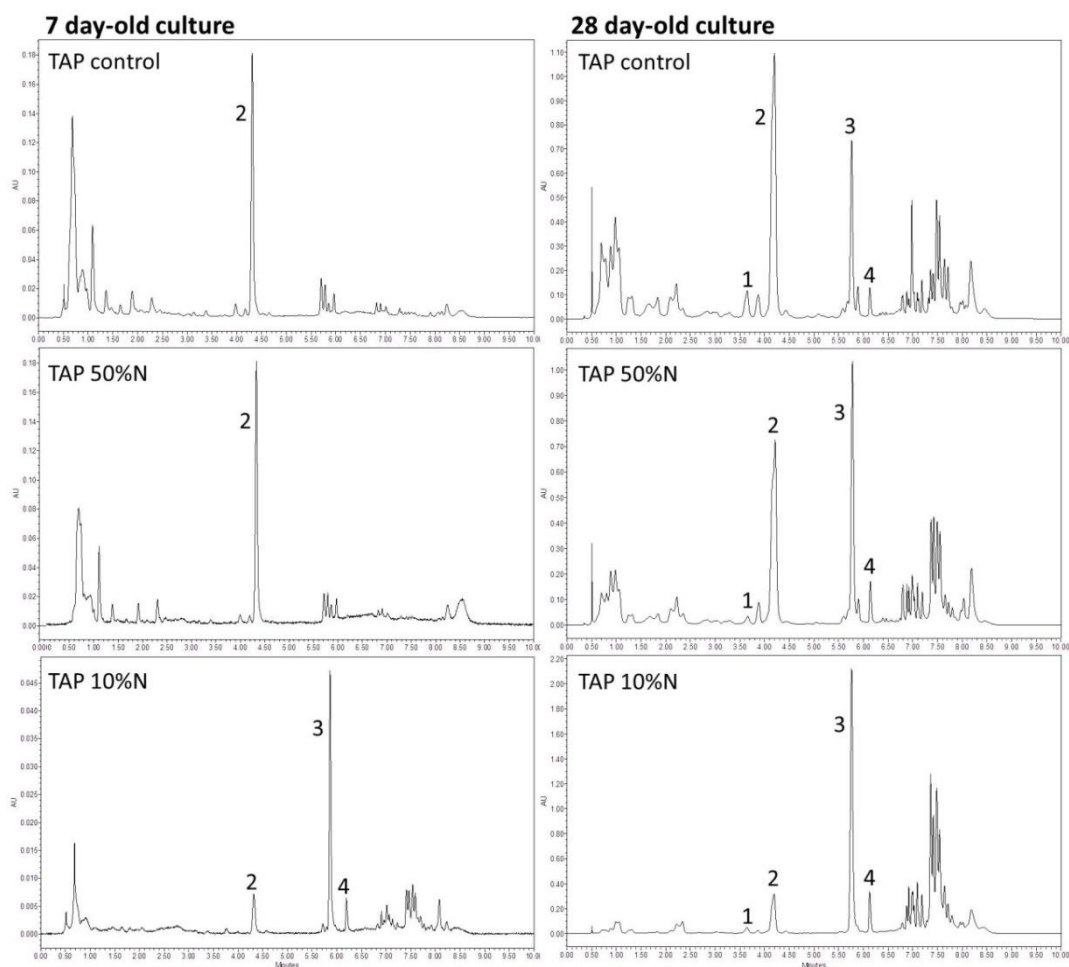
หมายเหตุ: 1) เก็บตัวอย่าง ณ วันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง

2) อักษรด้วยภาษาอังกฤษแสดงการจัดกลุ่มทางสถิติโดย post hoc Duncan's test (one-way ANOVA) n=3 P<0.05

### 5.3 ผลของไนโตรเจนที่ลดลงต่อการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์และแคนธาแซนธินภายในเซลล์

เมื่อนำตัวอย่างเซลล์ของสาหร่าย PY02 ที่ได้ทำการวัดการเจริญเติบโตในผลการทดลองที่ 5.2 มาสกัดสารสีและวิเคราะห์ชนิดของแคโรทีนอยด์ที่มีการสะสมในเซลล์สาหร่ายด้วยเครื่อง UPLC ผลจากโครมาโตแกรมชี้ว่า 10%N นั้นกระตุ้นให้ PY02 มีการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์เร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 4-22 จะเห็นได้ว่าโครมาโตแกรมของตัวอย่างสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบน 10%N สามารถตรวจพบพีคของ canthaxanthin และ 3-OH-echinenone ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง ในขณะที่ในวันเดียวกันนี้โครมาโตแกรมของชุดควบคุมและ 50%N นั้นพบเพียงพีคของ lutein แต่ไม่พบพีคของคีโตแคโรทีนอยด์เลย และ ณ วันสุดท้ายของการทดลองก็ยังตรวจพบการสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ของ PY02 ที่ทุกระดับความเข้มข้นไนโตรเจน ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC ข้างต้นนี้ สอดคล้องกับผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงสีโคลนในสาหร่ายในผลการทดลองที่ 5.1 (รูปที่ 4-20) ที่พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบน 10%N เริ่มสังเกตเห็นเป็นสีเหลืองส้มตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง ในขณะที่ในวันเดียวกันนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีในชุดควบคุมและ 50%N และเช่นเดียวกันในวันที่ 28 ของการทดลองที่พบว่า สาหร่ายที่ลดไนโตรเจนลงทุกระดับรวมไปถึงชุดควบคุมเปลี่ยนไปเป็นสีส้มจนถึงแดงเข้ม ซึ่งความสอดคล้องที่เกิดขึ้นนี้อาจสามารถสรุปได้ว่าการเริ่มเปลี่ยนสีโคลนของสาหร่าย PY02 (ในกรณีของช่วงสีตั้งแต่สีส้มจนถึงแดง) สามารถบ่งบอกถึงการเริ่มสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ของสาหร่ายดังกล่าวได้

อีกข้อสังเกตที่พบจากโครมาโตแกรมของสารสกัดสาหร่าย PY02 นั่นคือ ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงนั้นแปรผันตรงกับสัดส่วนความสูงของพีค lutein ในโครมาโตแกรมเมื่อเปรียบเทียบกับความสูงของพีค canthaxanthin ดังจะเห็นได้จากโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่มีอายุ 28 วัน (รูปที่ 4-22) จะพบว่าพีคของ lutein ในชุดควบคุมมีความสูงมากกว่าพีคของ canthaxanthin ส่วนใน 50%N นั้นพบว่าต่ำกว่าพีคของ canthaxanthin เล็กน้อย และที่ 10%N สูงเพียง 1 ใน 6 ของพีค canthaxanthin ข้อสังเกตนี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ที่พบว่าเมื่อสาหร่ายถูกกระตุ้นด้วยสภาวะเครียดจะส่งผลให้มีสัดส่วนการผลิตแคโรทีนอยด์ปฐมภูมิแต่ละชนิดลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแคโรทีนอยด์ชนิด lutein (Vidhyavathi et al., 2008) ในขณะเดียวกันสาหร่ายดังกล่าวก็จะสะสมแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ (secondary carotenoid) ขึ้นภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว เพื่อปกป้องเซลล์และสามารถฟื้นคืนสู่สภาพปกติหลังจากเผชิญกับสภาวะความเครียด (Hagen et al., 1994)



รูปที่ 4-22 ผลของไนโตรเจนต่อ carotenoid profile ของสาหร่าย *Chlorosarcinopsis* PY02 อายุ 7 และ 28 วัน

(peak 1) adonixanthin (peak 2) lutein  
 (peak 3) canthaxanthin (peak 4) 3-OH-echinenone  
 (7 day-old culture) แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดสาหร่ายที่มีอายุ 7 วัน  
 (28 day-old culture) แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดสาหร่ายที่มีอายุ 28 วัน

เมื่อพิจารณาถึงผลการวิเคราะห์ปริมาณแคนธาแซนทินที่สะสมภายในเซลล์ (canthaxanthin content) ของสาหร่าย PY02 ณ วันสุดท้ายของการทดลอง (28 วัน) พบว่า ปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงนั้นกระตุ้นการสะสม canthaxanthin ของ PY02 ให้เพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4-10 จะเห็นได้ว่า ในชุดทดลองที่ลดไนโตรเจนลงมีปริมาณ canthaxanthin content สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยพบว่า แม้ที่ 10%N จะกระตุ้นให้สาหร่ายเริ่มมีการสะสม canthaxanthin ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง (รูปที่ 4-22) แต่ในวันที่ 28 นั้นกลับพบว่า 50%N (ซึ่งสังเกตไม่พบความแตกต่างสีโคลโรฟิลล์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม) มีปริมาณ canthaxanthin content สูงที่สุดคือ  $1,504.2 \pm 108.9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  รองลงมาได้แก่ 10%N ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ  $1,426.7 \pm 255.9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มี canthaxanthin content เท่ากับ  $520.9 \pm 178.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  ก็พบว่ามากกว่าถึงประมาณ 3 เท่า (ตารางที่ 4-10)

งานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกที่พบว่าสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* มีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ได้ ดังนั้นจึงไม่มีข้อมูลจากงานวิจัยอื่นเพื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณ canthaxanthin content ที่พบในสาหร่ายสกุลนี้ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบ canthaxanthin content ที่มีค่าสูงสุดในการทดลองนี้ ( $1,504.2 \pm 108.9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$ ) กับสาหร่ายในสกุลอื่นที่มีรายงาน ก็พบว่า canthaxanthin content ของสาหร่าย PY02 จัดว่ามีปริมาณที่ค่อนข้างสูง โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่นที่มีรายงานว่าผลิต canthaxanthin ได้ดีก็พบว่ามีความใกล้เคียงกัน เช่น ในสาหร่าย *Scenedecmus* spp. ที่พบว่ามีความสามารถผลิต canthaxanthin content สูงสุดในแต่ละไอโซเลทเท่ากับ 410, 1,010 และ  $1,660 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  (Aburai et al., 2013) หรือในสาหร่าย *Dactylococcus* (ประมาณ  $1,700 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$ ) ที่พบว่า PY02 มีปริมาณ canthaxanthin content ต่ำกว่าเล็กน้อย ในขณะที่ *Dactylococcus* ถูกกระตุ้นจากทั้งการลดไนโตรเจน การเติมเกลือ และการให้แสงที่มีความเข้มสูง (Grama et al., 2014) นอกจากนี้ยังพบว่า PY02 มีปริมาณ canthaxanthin content ต่ำกว่าผลการรายงานในสาหร่ายบางชนิดอยู่มากเช่นกัน เช่น ในสาหร่าย *Chlorella zofingiensis* (ประมาณ  $8,500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$ ) ที่ทำการทดลองโดย Pelah และคณะ (2004) หรือในสาหร่าย *Coelastrella striolata* ที่สะสม canthaxanthin ได้มากถึง 4.7% ของมวลชีวภาพ (Abe et al., 2007) แต่อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยเชื่อว่าในอนาคตเป็นไปได้ที่จะกระตุ้นให้ PY02 เพิ่มการสะสม canthaxanthin หรือแม้กระทั่งสะสม astaxanthin ได้ โดยเพิ่มเติมปัจจัยความเครียดอื่นๆ ซึ่งยังต้องการการศึกษาต่อไป

จากผลการวิเคราะห์การผลิตมวลชีวภาพพร้อมกับปริมาณ canthaxanthin content ในวันสุดท้ายของการทดลองของสาหร่าย PY02 แสดงให้เห็นว่าปริมาณไนโตรเจนในอาหารที่ 50%N เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตแคนธาแซนธินใน PY02 มากที่สุดในการทดลองนี้ ดังจะเห็นได้จากตารางที่ 4-10 ที่พบว่าสาหร่าย PY02 มีศักยภาพการผลิตแคนธาแซนธิน (canthaxanthin production) สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยมีค่าเท่ากับ  $23.7 \pm 1.3$  ไมโครกรัม ( $\mu\text{g}$ ) ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมที่มีค่าเท่ากับ  $7.1 \pm 2.5 \mu\text{g}$  ถึง 3 เท่า และมากกว่า 10%N ที่มีค่าเท่ากับ  $16.5 \pm 2.0 \mu\text{g}$  ประมาณ 1.5 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะที่ลดไนโตรเจนลงเหลือ 50% นั้น ส่งเสริมทั้งการผลิตมวลชีวภาพและปริมาณ canthaxanthin content ของสาหร่าย PY02 ดังนั้นผลที่สรุปได้จากการเปรียบเทียบปริมาณ canthaxanthin production ในแต่ละสภาวะนี้แสดงให้เห็นว่า หากต้องการเพิ่มปริมาณผลผลิตที่ต้องการเก็บเกี่ยวจากเซลล์ของสาหร่ายควรมีการศึกษาทั้งสภาวะที่จะส่งเสริมทั้งมวลชีวภาพและกระตุ้นผลผลิตที่ต้องการ

ตารางที่ 4-10 ผลของไนโตรเจนต่อปริมาณและศักยภาพในการผลิตแคนธาแซนธินของ

*Chlorosarcinopsis* PY02

ความเข้มข้นไนโตรเจน	Canthaxanthin content ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$ )	Canthaxanthin production ( $\mu\text{g}$ )
Control	520.9 $\pm$ 178.2 <sup>a</sup>	7.1 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>
50%N	1504.2 $\pm$ 108.9 <sup>b</sup>	23.7 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>
10%N	1426.7 $\pm$ 255.9 <sup>b</sup>	16.5 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>

หมายเหตุ: 1) เก็บตัวอย่าง ณ วันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง

2) อักษรด้วยภาษาอังกฤษแสดงการจัดกลุ่มทางสถิติโดย post hoc Duncan's test (one-way ANOVA) n=3 P<0.05

กลไกที่เกิดขึ้นเมื่อสภาวะเครียดจากการขาดแคลนไนโตรเจนกระตุ้นให้สาหร่ายสะสมคีโตแคโรทีนอยด์หรือแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิชนิดอื่นๆ โดยตรง ในปัจจุบันยังไม่พบงานวิจัยที่ศึกษาและอธิบายกลไกดังกล่าวโดยตรง แต่อย่างไรก็ตาม เอกสารงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาสาหร่ายชนิดที่มีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ก็กล่าวตรงกันว่า เมื่อสาหร่ายได้รับสภาวะเครียดไม่ว่าจะเป็นการขาดแคลนอาหาร สารเคมีบางชนิด ความเข้มแสงสูง หรืออุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม สาหร่ายจะสร้างสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) ขึ้นภายในเซลล์ (Lemoine and Schoefs, 2010) และผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อรักษาสมดุลและป้องกันอันตรายที่อาจเกิดกับเซลล์ (Dong et al., 2007, Li et al., 2009, Schoefs et al., 2001, Wang et al., 2003) ซึ่งผลการรายงานทั้งหมดข้างต้นอาจเป็นกลไกที่เกิดขึ้นเช่นเดียวกันในสาหร่าย PY02 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเครียดจากการขาดแคลนไนโตรเจน

นอกจากนี้ อีกปัจจัยที่ผู้วิจัยคาดว่ามีส่วนกระตุ้นให้ PY02 สังเคราะห์ canthaxanthin มากขึ้นเช่นกัน คือ อัตราส่วนของปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับในการทดลองนี้ที่ไนโตรเจนในอาหารสูตร TAP ถูกลดลงจึงทำให้ค่า C/N ratio เพิ่มขึ้น และเนื่องจากมีผลงานวิจัยจำนวนมากที่พบว่าเมื่อค่า C/N ratio เพิ่มมากขึ้นจะมีผลกระตุ้นให้สาหร่ายสะสมคีโตแคโรทีนอยด์เพิ่มมากขึ้นไปด้วย ไม่ว่าจะสาหร่ายจะขาดแคลนธาตุอาหารชนิดไนโตรเจนหรือไม่ก็ตาม เช่น ผลการทดลองในสาหร่าย *Chlorella zofingiensis* ที่เติมน้ำตาลชนิดต่างๆ กระตุ้นการผลิต astaxanthin เนื่องจากมีค่า C/N ratio เพิ่มมากขึ้น (Sun et al., 2008) และในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ที่พบว่ามีการสะสม astaxanthin แปรผันตามค่า C/N ratio (Kakizono et al., 1992, Kang et al., 2007)

จากปัจจัยการขาดแคลนไนโตรเจนและ C/N ratio ที่งานวิจัยจำนวนมากกล่าวถึง จึงทำให้ผู้วิจัยมีข้อสันนิษฐานว่า ผลการทดลองที่เกิดขึ้นใน 50%N (ตารางที่ 4-10) อาจไม่ได้เป็นสภาวะเครียดสำหรับสาหร่าย PY02 (เนื่องจากพบว่าสาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีกว่าชุดควบคุม) แต่อาจเนื่องมาจาก ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนดังกล่าวเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย PY02 จึงทำให้สาหร่ายดังกล่าวเจริญเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก ซึ่งในระยะเวลาต่อมาสารอาหารที่มีอยู่รวมถึงไนโตรเจนก็ถูกใช้และหมดไปอย่างรวดเร็วเช่นกัน เมื่อไนโตรเจนลดลงสาหร่ายจึงเกิดความเครียดประกอบกับมีค่า C/N ratio ที่เพิ่มมากขึ้น สาหร่าย PY02 จึงถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์ canthaxanthin ขึ้นอย่างรวดเร็วในท้ายที่สุด

## 6. ปริมาณของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorosarcinopsis* PY02

สืบเนื่องจากที่งานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกสาหร่ายจากดินในบริเวณที่มีสภาพภูมิประเทศที่ค่อนข้างแห้งแล้ง ทั้งนี้อาศัยการสังเกตจากสีของโคลนที่ตามองเห็น โดยคัดเลือกโคลนที่เปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีส้มจนถึงแดง จากวิธีการดังกล่าวทำให้สามารถคัดแยกสาหร่ายได้ 5 ไอโซเลท ซึ่งทั้งหมดสามารถสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ได้ จึงอาจเป็นไปได้ว่า เหตุที่พบสาหร่ายที่มีความสามารถดังกล่าวถึง 5 ไอโซเลทในบริเวณที่มีลักษณะภูมิประเทศแห้งแล้งที่เดียวกันนี้ อาจเพราะสาหร่ายเหล่านั้นถูกคัดเลือกโดยธรรมชาติจากความสามารถในการป้องกันตนเองจากสภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่เกิดจากความแห้งแล้งได้ดี เนื่องจากมีงานวิจัยจำนวนมากพบว่า สภาวะความแห้งแล้งหรือการขาดน้ำ (drought) จะกระตุ้นให้เกิด oxidative stress ในสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงได้หลายชนิด (Moran et al., 1994, Munne-Bosch and Penuelas, 2004, Sharma and Dubey, 2005) และเป็นไปได้ว่าการที่สาหร่ายเหล่านี้อยู่รอดได้เนื่องจากมีความสามารถในการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ เพื่อตอบสนองต่อความเครียดที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้นั่นเอง (Lemoine and Schoefs, 2010)

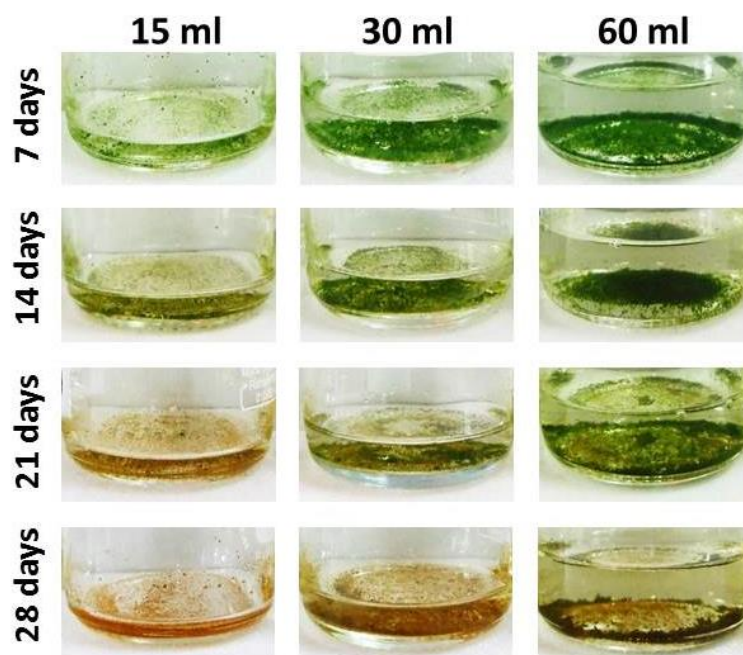
ดังนั้น เพื่อศึกษาผลของปริมาณน้ำในสิ่งแวดล้อมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย PY02 รวมถึงเพื่อเป็นแนวทางเบื้องต้นในการศึกษาต่อในอนาคตถึงสภาวะเครียดจากการขาดแคลนน้ำหรือ drought stress ในการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย PY02 ในอาหารเหลวสูตร TAP 50%N ที่มีปริมาณอาหารแตกต่างกัน ได้แก่ 60 30 และ 15 มิลลิลิตร (ml) ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะที่มีปริมาณน้ำในสิ่งแวดล้อมไม่เท่ากัน ผลจากการติดตามการเปลี่ยนแปลงสีเซลล์ของสาหร่าย PY02 นั้น พบว่า ปริมาณอาหารที่ลดลงส่งผลให้เซลล์สาหร่ายเริ่มเปลี่ยนเป็นสีแดงเร็วขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4-23 จะพบว่าในชุดทดลองที่มีปริมาณอาหารน้อยที่สุดคือ 15 ml จะสังเกตเห็นว่าเซลล์สาหร่ายเปลี่ยนเป็นสีส้มตั้งแต่วันที่ 21 ของการทดลอง ซึ่งเร็วที่สุดเมื่อเทียบกับปริมาณอื่นๆ ในขณะที่ร่องลงมาคือ 30 ml และ 60 ml ตามลำดับ

ในด้านของการเจริญเติบโต (ตารางที่ 4-11) ณ วันสุดท้ายของการทดลอง (28 วัน) พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ 60 ml ให้มวลชีวภาพและมีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (relative growth rate; RGR) สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) มีค่าเท่ากับ  $61.60 \pm 1.81$  mg และ  $0.412 \pm 0.002$  mg.mg.d<sup>-1</sup> ตามลำดับ ในขณะที่รองลงมาได้แก่ที่ 30 ml และ 15 ซึ่งมีมวลชีวภาพเท่ากับ  $38.00 \pm 1.14$  และ  $23.60 \pm 0.60$  mg และมี RGR เท่ากับ  $0.395 \pm 0.002$  และ  $0.378 \pm 0.002$  mg.mg.d<sup>-1</sup> ตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม เมื่อวิเคราะห์ค่าความหนาแน่นของมวลชีวภาพต่อปริมาตรอาหาร (dry weight per ml; DPM) กลับพบว่าที่ 15 ml มีค่าดังกล่าวสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และรองลงมาได้แก่ 30 ml และ 60 ml ตามลำดับ นั้นหมายความว่าในสภาวะที่มีปริมาณอาหารเหลวน้อยสำหรับสาย PY02 สามารถเจริญเติบโตได้หนาแน่นกว่าสภาวะที่มีปริมาณอาหารมากกว่า

เมื่อนำเซลล์สายสำหรับข้างต้นไปสกัดสารสีและวิเคราะห์ปริมาณคีโตแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง UPLC พบว่า ที่ 15 ml กระตุ้นให้สาย PY02 มีปริมาณ canthaxanthin content และ canthaxanthin production สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยมีค่าเท่ากับ  $898.2 \pm 101$  µg.g<sup>-1</sup>DW และ  $1.421 \pm 0.228$  µg.ml<sup>-1</sup> ตามลำดับ ในขณะที่รองลงมาได้แก่ 30 ml และ 60 ml ซึ่งมี canthaxanthin content เท่ากับ  $576.8 \pm 96$  และ  $335.3 \pm 64$  µg.g<sup>-1</sup>DW และมี canthaxanthin production เท่ากับ  $0.735 \pm 0.174$  และ  $0.348 \pm 0.065$  µg.ml<sup>-1</sup> ตามลำดับ (ตารางที่ 4-11) นอกจากนี้ ในการวิเคราะห์ชนิดของแคโรทีนอยด์ที่พบในเซลล์สายของการทดลองนี้ สามารถตรวจพบ β-carotene ในตัวอย่างเซลล์ของ PY02 ที่ 7 และ 14 วัน แต่หลังจากวันที่ 14 เป็นต้นไปก็ตรวจไม่พบสารดังกล่าวในขณะที่ canthaxanthin ถูกสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากกระบวนการในการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ตามธรรมชาติ ที่ต้องการ β-carotene เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ (Cunningham and Gantt, 2005, Cunningham and Gantt, 2007)







รูปที่ 4-23 ผลของปริมาณอาหารต่อการเปลี่ยนสีของสาหร่าย *Chlorosarcinopsis* PY02  
 หมายเหตุ: การทดลองนี้เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร TAP ที่ลดไนโตรเจนลงเหลือ 50%  
 (15 ml) อาหารที่มีปริมาตร 15 ml (30ml) อาหารที่มีปริมาตร 30 ml  
 (60 ml) อาหารที่มีปริมาตร 60 ml

ตารางที่ 4-11 ผลของปริมาณอาหารต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคนธาแซนทินของสาหร่าย  
*Chlorosarcinopsis* PY02

ปริมาณอาหาร (ml)	มวลชีวภาพ (mg)	RGR (mg.mg.d <sup>-1</sup> )	DPM (mg.ml <sup>-1</sup> )	CA content (µg.g <sup>-1</sup> DW)	CA production (µg.ml <sup>-1</sup> )
15	23.60±0.60 <sup>c</sup>	0.378±0.002 <sup>c</sup>	1.580±0.05 <sup>a</sup>	898.2±101 <sup>a</sup>	1.421±0.228 <sup>a</sup>
30	38.00±1.14 <sup>b</sup>	0.395±0.002 <sup>b</sup>	1.260±0.04 <sup>b</sup>	576.8±96 <sup>b</sup>	0.735±0.174 <sup>b</sup>
60	61.60±1.81 <sup>a</sup>	0.412±0.002 <sup>a</sup>	1.040±0.02 <sup>c</sup>	335.3±64 <sup>c</sup>	0.348±0.065 <sup>c</sup>

หมายเหตุ: 1) RGR = relative growth rate, DPM = dry weight per ml, CA = canthaxanthin

2) อักษรด้วยภาษาอังกฤษแสดงการจัดกลุ่มทางสถิติโดย post hoc Duncan's test (one-way ANOVA) n=3 P<0.05

จากผลการทดลอง ผู้วิจัยสันนิษฐานว่า สาเหตุที่ทำให้ปริมาณอาหารที่น้อยกว่ากระตุ้นให้สาหร่าย PY02 มีการผลิตมวลชีวภาพ (dry weight per ml) สูงกว่า อาจเนื่องมาจากระดับความลึกของอาหารที่เกิดขึ้นจากปริมาณอาหารที่แตกต่างกันซึ่งส่งผลให้มีระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันไปด้วย โดยเมื่อมีระดับความลึกของอาหารต่ำแสงก็จะสามารถส่องผ่านไปถึงเซลล์สาหร่าย PY02 (ซึ่งเจริญอยู่บริเวณก้นภาชนะเลี้ยงตลอดเวลา) ได้มากกว่า (Kirk, 1988) ทำให้ในชุดทดลองที่มีปริมาณอาหารต่ำกว่านั้นสาหร่ายได้รับแสงมากกว่าและเจริญเติบโตได้ดีกว่า ในขณะที่เดียวกันเมื่อสาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีกว่าก็ส่งผลให้สารอาหารที่มีอยู่รวมถึงไนโตรเจนก็ถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วเช่นกัน และเมื่อไนโตรเจนลดต่ำลงสาหร่ายจึงเกิดความเครียดจากการขาดแคลนไนโตรเจนอีกทั้งยังส่งผลให้มีค่า C/N ratio เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองที่ 5 พบว่าปัจจัยทั้งสองกระตุ้นการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ในสาหร่าย PY02 ดังนั้นสาหร่าย PY02 ในชุดทดลองที่มีปริมาณอาหารน้อยกว่านั้นจึงถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์ canthaxanthin เร็วกว่าและปริมาณมากกว่า สาเหตุนี้เองเมื่อพิจารณาถึง canthaxanthin production ในอาหารทั้ง 3 ระดับแล้วจึงทำให้ตรวจพบการผลิตสูงสุดในชุดทดลองที่ใช้อาหารเพียง 15 ml เช่นกัน

เมื่อเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตแคนธาแซนธิน (canthaxanthin production) ของสาหร่าย PY02 กับสาหร่ายชนิดอื่นและแบคทีเรียบางชนิดที่มีรายงานว่าสามารถผลิต canthaxanthin ได้ในปริมาณมาก (ตารางที่ 4-12) พบว่า สาหร่าย PY02 มี canthaxanthin production อยู่ในระดับค่อนข้างดี เนื่องจากค่าดังกล่าวแตกต่างจากสาหร่ายชนิดอื่นที่ยกมาเป็นตัวอย่างไม่มากนัก และลักษณะเด่นอย่างหนึ่งของ PY02 ที่พบเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวคือสาหร่ายจะมีการเจริญเป็นก้อนและตกตะกอนอยู่ที่ก้นภาชนะ คล้ายกับระยะที่มีการตกตะกอนตามธรรมชาติของยีสต์บางชนิด (flocculation) ซึ่งลักษณะนี้ถือเป็นข้อดีที่อาจสามารถช่วยลดต้นทุนในการเก็บเกี่ยวผลผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้มากกว่า 30% (Horiuchi et al., 2003, Zittelli et al., 2006) ดังจะเห็นได้จากการที่เริ่มมีงานวิจัยที่หันมาสนใจศึกษาการกระตุ้นให้สาหร่ายเกิด flocculation ก่อนทำการเก็บเกี่ยวเพื่อลดต้นทุนการผลิต (Ndikubwimana et al., 2014) จากทั้งหมดที่ได้กล่าวมานี้ ผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าสาหร่าย PY02 เป็นสาหร่ายที่มีศักยภาพและน่าสนใจเป็นอย่างมาก ที่จะนำไปศึกษาต่อเพื่อพัฒนาให้สามารถเป็นสายพันธุ์ที่ใช้เป็นแหล่งในการผลิต canthaxanthin ระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศไทยต่อไป

ตารางที่ 4-12 ข้อมูลเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตแคนธาแซนธิน

ชนิดของสิ่งมีชีวิต	CA <sup>1</sup> production (µg.L <sup>-1</sup> )	เอกสารอ้างอิง
<i>Chlorosarcinopsis</i> PY02 <sup>2</sup> (เพาะเลี้ยงใน 15 ml)	1,421	ผลจากงานวิจัยนี้
<i>Chlorella emersoni</i>	600	Malis และคณะ (1993)
<i>Chlorella zofingensis</i>	2,269	Pelah และคณะ (2004)
<i>Dactylococcus</i> sp.	1,600	Grama และคณะ (2014)
<i>Dietzia notronolimena</i> (แบคทีเรีย)	4,000	Khodaiyan และคณะ (2007)

หมายเหตุ: 1) CA = canthaxanthin

2) เพาะเลี้ยงในอาหาร 15 ml

## บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการคัดแยกสาหร่ายที่มีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ภายในห้องถ้ำ รวมถึงจัดจำแนกและศึกษาปัจจัยที่กระตุ้นให้สาหร่ายมีความสามารถในการผลิตมวลชีวภาพและคีโตแคโรทีนอยด์มากขึ้น ผลจากการคัดแยกสาหร่ายจากตัวอย่างดินที่เก็บจากโป่งยุบ อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี สามารถคัดแยกสาหร่ายที่มีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลท โดยพบว่า canthaxanthin เป็นคีโตแคโรทีนอยด์ชนิดเด่นในสาหร่ายทั้งหมด การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับลักษณะทางอณูชีววิทยาของยีน *tufA* และ 18S rDNA บ่งชี้ว่าสาหร่ายโป่งยุบทั้ง 5 ไอโซเลทเป็นสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* โดยไม่สามารถจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์ได้ และแม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของสาหร่ายทั้ง 5 ไอโซเลทนั้นจะมีความคล้ายคลึงกันสูง แต่ข้อมูลของลักษณะทางสรีรวิทยาและทางอณูชีววิทยา (ยกเว้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tufA*) นั้นสามารถจำแนกสาหร่ายไอโซเลท PY05 ออกจากกลุ่มได้ เห็นได้ว่าลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการเป็นข้อมูลที่สามารถนำมาใช้ร่วมกับข้อมูลทางอณูชีววิทยาแล้วช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจัดจำแนกสาหร่ายกลุ่มนี้ได้ดีขึ้น

เมื่อศึกษาผลของสภาวะขาดแคลนไนโตรเจนและปริมาณอาหารที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายไอโซเลท PY02 ที่คัดเลือกมาทำการศึกษาพบว่า การลดปริมาณไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงลงเหลือ 50% ให้ผลกระตุ้นทั้งการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสะสมภายในเซลล์ อีกทั้งปริมาณอาหารที่น้อยลงก็ยังส่งผลให้สาหร่ายมีศักยภาพในการผลิตมวลชีวภาพและ canthaxanthin เพิ่มขึ้นด้วย เมื่อประกอบกับชนิดของคีโตแคโรทีนอยด์ที่มีมูลค่าสูงที่สาหร่ายชนิดนี้ผลิตได้ จึงทำให้สาหร่ายดังกล่าวน่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำไปทำการศึกษาต่อถึงศักยภาพในการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้นต่อไปในอนาคต

ผลจากการวิจัยชิ้นนี้ยังได้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของทรัพยากรชีวภาพที่มีอย่างอุดมสมบูรณ์ในประเทศไทย ซึ่งหมายรวมไปถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสาหร่ายด้วย จากการทบทวนเอกสารที่เคยมีการศึกษาสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* ที่ผ่านมา พบว่า งานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกถึงความสามารถในการสังเคราะห์คีโตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายจากสกุล *Chlorosarcinopsis* ดังนั้น นอกจากการค้นพบนี้จะเป็นข้อมูลใหม่ที่มีประโยชน์ต่อวงการวิจัยสาหร่ายแล้ว ยังอาจเป็นไปได้ว่าสาหร่ายที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้เป็นสาหร่ายชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีบันทึกมาก่อน อย่างไรก็ตามเพื่อพิสูจน์ข้อสันนิษฐานข้างต้น ผู้วิจัยมีความเห็นว่าในอนาคตควรมีการนำสาหร่ายในสกุล *Chlorosarcinopsis* ชนิดที่เคยมีการบันทึกไว้แล้วมาทำการศึกษาเปรียบเทียบกับสาหร่ายที่คัดแยกได้ใหม่ในงานวิจัยนี้ โดยใช้ข้อมูลจากการศึกษาด้วยเทคนิค RAPD และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายด้วยอุปกรณ์และสารเคมีพื้นฐานที่มีในห้องปฏิบัติการ ทั้งยังบอกถึงความแตกต่างได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ และการเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนีบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร BBM

### เอกสารอ้างอิง

- ABE, K., HATTORI, H. & HIRANO, M. 2007. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. *Food chemistry*, 100, 656-661.
- ABURAI, N., OHKUBO, S., MIYASHITA, H. & ABE, K. 2013. Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. *Algal Research*, 2, 237-243.
- ABURAI, N., SUMIDA, D. & ABE, K. 2015. Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp.(Chlorophyceae). *Algal Research*, 8, 30-36.
- ADARME-VEGA, T. C., THOMAS-HALL, S. R. & SCHENK, P. M. 2014. Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. *Current opinion in biotechnology*, 26, 14-18.
- ADMIRAAL, W. 1977. Tolerance of estuarine benthic diatoms to high concentrations of ammonia, nitrite ion, nitrate ion and orthophosphate. *Marine Biology*, 43, 307-315.
- AGARWAL, S. & RAO, A. V. 2000. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal*, 163, 739-744.
- AMAYA, E. & NICKELL, D. 2015. Using feed to enhance the color quality of fish and crustaceans. *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*, 269.
- ANTÓN, J. 2011. Halotolerance. In: GARGAUD, M., AMILS, R., QUINTANILLA, J. C., CLEAVES, H. J., IRVINE, W. M., PINTI, D. L. & VISO, M. (eds.) *Encyclopedia of Astrobiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- AOKI, H., KIEU, N. T. M., KUZE, N., TOMISAKA, K. & CHUYEN, N. V. 2002. Carotenoid pigments in GAC fruit (*Momordica cochinchinensis* SPRENG). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66, 2479-2482.
- BAKER, R. & GUNTHER, C. 2004. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in food science & technology*, 15, 484-488.
- BAKER, R., PFEIFFER, A.-M., SCHONER, F.-J. & SMITH-LEMMON, L. 2002. Pigmenting efficacy of astaxanthin and canthaxanthin in fresh-water reared Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Animal Feed Science and Technology*, 99, 97-106.
- BAR, E., RISE, M., VISHKAUTSAN, M. & ARAD, S. 1995. Pigment and Structural Changes in *Chlorella zofingiensis* upon Light and Nitrogen Stress. *Journal of plant physiology*, 146, 527-534.

- BARKER, A. V. & PILBEAM, D. J. 2015. *Handbook of plant nutrition*, CRC press.
- BARTLEY, G. E. & SCOLNIK, P. A. 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell*, 7, 1027-1038.
- BIDIGARE, R., ONDRUSEK, M. E., KENNICUTT, M. C., ITURRIAGA, R., HARVEY, H. R., HOHAM, R. W. & MACKO, S. 1993. Evidence a photoprotective for secondary carotenoids of snow algae. *Journal of Phycology*, 29, 427-434.
- BOLD, H. C. & WYNNNE, M. 1978. *Introduction to the algae: structure and reproduction*, Prentice Hall.
- BOROWITZKA, M. A., HUISMAN, J. M. & OSBORN, A. 1991. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type. *Journal of Applied Phycology*, 3, 295-304.
- BOROWITZKA, M. A. & SIVA, C. J. 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, 19, 567-590.
- BOUSSIBA, S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, 108, 111-117.
- BOUSSIBA, S., FAN, L. & VONSHAK, A. 1992. [36] Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Methods in enzymology*, 213, 386-391.
- BOUSSIBA, S. & VONSHAK, A. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*1. *Plant and Cell Physiology*, 32, 1077-1082.
- BRITTON, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9, 1551-1558.
- BROSNAN, J. T. & BROSNAN, M. E. 2013. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids*, 45, 413-418.
- CHEN, B., PENG, H. & CHEN, H. 1995. Changes of carotenoids, color, and vitamin A contents during processing of carrot juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1912-1918.
- CHEN, S. F., SUN, Z., ZHANG, J., SUN, P. P. & CHEN, T. P. 2013. Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health. *Food & Function*.
- CHEW, B. P., PARK, J. S., WONG, M. W. & WONG, T. S. 1998. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer Research*, 19, 1849-1853.

- CHO, J., ZHANG, Z. & KIM, I. 2013. Effects of canthaxanthin on egg production, egg quality, and egg yolk color in laying hens. *Journal of Agricultural Science*, 5, 269.
- COLLOS, Y. & HARRISON, P. J. 2014. Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. *Marine pollution bulletin*, 80, 8-23.
- CUA, L. S. & STEIN, L. Y. 2011. Effects of nitrite on ammonia-oxidizing activity and gene regulation in three ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 319, 169-75.
- CUNNINGHAM, F. & GANTT, E. 2007. A portfolio of plasmids for identification and analysis of carotenoid pathway enzymes: *Adonis aestivalis* as a case study. *Photosynthesis Research*, 92, 245-259.
- CUNNINGHAM, F. X. & GANTT, E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49, 557-583.
- CUNNINGHAM, F. X. & GANTT, E. 2005. A study in scarlet: enzymes of ketocarotenoid biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*. *The Plant Journal*, 41, 478-492.
- CUNNINGHAM, F. X. & GANTT, E. 2011. Elucidation of the pathway to astaxanthin in the flowers of *Adonis aestivalis*. *THE PLANT CELL ONLINE*, 23, 3055-3069.
- DAVIES, B., MATTHEWS, S. & KIRK, J. 1970. The nature and biosynthesis of the carotenoids of different colour varieties of *Capsicum annum*. *Phytochemistry*, 9, 797-805.
- DAVIES, B. H. 1965. Analysis of carotenoid pigments. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*.
- DEASON, T. R. 1959. Three Chlorophyceae from Alabama soil. *American Journal of Botany*, 572-578.
- DEASON, T. R. & FLOYD, G. L. 1987. Comparative ultrastructure of three species of *chlorosarcina* (chlorosarcinaceae, chlorophyta) 1, 2. *Journal of phycology*, 23, 187-195.
- DEL CAMPO, J. A., RODRIGUEZ, H., MORENO, J., VARGAS, M. A., RIVAS, J. & GUERRERO, M. G. 2004. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Applied microbiology and biotechnology*, 64, 848-854.
- DEUFEL, J. 1965. Pigmentierungsversuche mit canthaxanthin bei regenbogenforellen. *Archiv fur Fischereiwissenschaft*, 16, 125-&.
- DIPAK, P. & LELE, S. 2005. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian J Biotechnol*, 4, 476-483.

- DONG, Q.-L., ZHAO, X.-M., XING, X.-Y., HU, J.-Z. & GONG, J.-X. 2007. Mechanism of salt stress inducing astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Chemical Engineering (China)*, 1, 011.
- DROOP, M. 1974. Heterotrophy of carbon. *Algal physiology and biochemistry*, 530-559.
- DUCREY SANPIETRO, L. M. & KULA, M. R. 1998. Studies of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Effect of inhibitors and low temperature. *Yeast*, 14, 1007-1016.
- EONSEON, J., LEE, C.-G. & POLLE, J. E. W. 2006. Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): biosynthesis, regulation, and biotechnology. *Journal of microbiology and biotechnology*, 16, 821-831.
- FABREGAS, J., ABALDE, J. & HERRERO, C. 1989. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*, 83, 289-304.
- FABREGAS, J., DOMINGUEZ, A., ALVAREZ, D., LAMELA, T. & OTERO, A. 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*, 20, 623-626.
- FAMA, P., WYSOR, B., KOOISTRA, W. H. C. F. & ZUCCARELLO, G. C. 2002. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene1. *Journal of Phycology*, 38, 1040-1050.
- FAN, L., VONSHAK, A. & BOUSSIBA, S. 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 30, 829-833.
- 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.
- FASSETT, R. G. & COOMBES, J. S. 2011. Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Marine drugs*, 9, 447-465.
- FASSETT, R. G. & COOMBES, J. S. 2012. Astaxanthin in cardiovascular health and disease. *Molecules*, 17, 2030-2048.
- FLECHTNER, V. R., PIETRASIAK, N. & LEWIS, L. A. 2013. Newly revealed diversity of green microalgae from wilderness areas of Joshua Tree National Park (JTNP). *Monographs of the Western North American Naturalist*, 6, 43-63.

- FLYNN, K. J. 1990. The determination of nitrogen status in microalgae. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 61, 297-307.
- FRANCISCO, E. C., FRANCO, T. T., WAGNER, R. & JACOB-LOPES, E. 2014. Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37, 1497-1505.
- FRASER, P. D., SCHUCH, W. & BRAMLEY, P. M. 2000. Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts-partial purification and biochemical properties. *Planta*, 211, 361-369.
- FRASER, P. D., SHIMADA, H. & 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.
- FRIEDMANN, E. I. & OCAMPO, R. 1976. Endolithic blue-green algae in the dry valleys: primary producers in the Antarctic desert ecosystem. *Science*, 193, 1247-1249.
- FUJIMAKI, H., SHIOZAWA, S. & INOUE, M. 2003. Effect of salty crust on soil albedo. *Agricultural and forest meteorology*, 118, 125-135.
- GAO, Z., MENG, C., CHEN, Y. C., AHMED, F., MANGOTT, A., SCHENK, P. M. & LI, Y. 2015. Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress. *Journal of Applied Phycology*, 27, 1853-1860.
- GAO, Z., MENG, C., ZHANG, X., XU, D., MIAO, X., WANG, Y., YANG, L., LV, H., CHEN, L. & YE, N. 2012. Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and microbial technology*, 51, 225-230.
- GOMEZ, P. I. & GONZALEZ, M. A. 2001. Genetic polymorphism in eight Chilean strains of the carotenogenic microalga *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyta). *Biological Research*, 34, 23-30.
- GÓMEZ, P. I. & GONZÁLEZ, M. A. 2004. Genetic variation among seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with industrial potential, based on RAPD banding patterns and on nuclear ITS rDNA sequences. *Aquaculture*, 233, 149-162.
- GOODWIN, T. 2012. *The biochemistry of the carotenoids: volume I plants*, Springer Science & Business Media.
- GORMAN, D. S. L., R.P. 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , 54, 1665-1669.



- GOTO, S., KOGURE, K., ABE, K., KIMATA, Y., KITAHAMA, K., YAMASHITA, E. & TERADA, H. 2001. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1512, 251-258.
- GRAMA, B. S., CHADER, S., KHELIFI, D., AGATHOS, S. N. & JEFFRYES, C. 2014. Induction of canthaxanthin production in a *Dactylococcus* microalga isolated from the Algerian Sahara. *Bioresource technology*, 151, 297-305.
- GROOVER, R. D. & BOLD, H. C. 1969. Phycological Studies--VIII. The Taxonomy and Comparative Physiology of the Chlorosarcinales and Certain Other Edaphic Algae. *Univ. Texas Publ.* . No. 6907, 165 pp.
- GRÜNEWALD, K., ECKERT, M., HIRSCHBERG, J. & HAGEN, C. 2000. Phytoene Desaturase Is Localized Exclusively in the Chloroplast and Up-Regulated at the mRNA Level during Accumulation of Secondary Carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae). *Plant Physiology*, 122, 1261-1268.
- GRUNEWALD, K., HIRSCHBERG, J. & HAGEN, C. 2001. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Biol Chem*, 276, 6023-9.
- GUARATINI, T., CARDOZO, K. H. M., PINTO, E. & COLEPICCOLO, P. 2009. Comparison of diode array and electrochemical detection in the C30 reverse phase HPLC analysis of algae carotenoids. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 1609-1616.
- GUEDES, A. C., MEIRELES, L. A., AMARO, H. M. & MALCATA, F. X. 2010. Changes in lipid class and fatty acid composition of cultures of *Pavlova lutheri*, in response to light intensity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 791-801.
- GUERIN, M., HUNTLEY, M. E. & OLAIZOLA, M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21, 210-216.
- HA, S.-H., KIM, J.-B., PARK, J.-S., LEE, S.-W. & CHO, K.-J. 2007. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3135-3144.
- HAGEN, C., BRAUNE, W. & BJÖRN, L. O. 1994. Functional aspects of secondary carotenoids in *haematococcus lacustris* (volvocales). III. Action as a "sunshade". *Journal of Phycology*, 30, 241-248.

- HALL, J. D., FUCIKOVA, K., LO, C., LEWIS, L. A. & KAROL, K. G. 2010. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. *Cryptogamie. Algologie*, 31, 529-555.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series, 1999. 95-98.
- HAMILTON, S. K., LEWIS JR, W. M. & SIPPEL, S. J. 1992. Energy sources for aquatic animals in the Orinoco River floodplain: evidence from stable isotopes. *Oecologia*, 89, 324-330.
- HAN, D., LI, Y. & HU, Q. 2013. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. *Algae*, 28, 131-147.
- HATA, N., OGBONNA, J., HASEGAWA, Y., TARODA, H. & TANAKA, H. 2001. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *Journal of Applied Phycology*, 13, 395-402.
- HEALTHCARE AND PHARMA, (2015). Global Astaxanthin Market – Sources, Technologies and Applications. [online] India: Industry expert. Available at: <http://industry-experts.com/verticals/healthcare-and-pharma/global-astaxanthin-market-sources-technologies-and-applications> [Accessed 15 Jul. 2016].
- HEBERT, P. D., CYWINSKA, A. & BALL, S. L. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 313-321.
- HEMAISWARYA, S., RAJA, R., KUMAR, R. R., GANESAN, V. & ANBAZHAGAN, C. 2011. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1737-1746.
- HERNDON, W. 1958. Studies on chlorosphaeracean algae from soil. *American Journal of Botany*, 298-308.
- HIGUERA-CIAPARA, I., FELIX-VALENZUELA, L. & GOYCOOLEA, F. 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46, 185-196.
- HOFFMANN, W. A. & POORTER, H. 2002. Avoiding bias in calculations of relative growth rate. *Annals of Botany*, 90, 37-42.
- HORIUCHI, J.-I., OHBA, I., TADA, K., KOBAYASHI, M., KANNO, T. & KISHIMOTO, M. 2003. Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH control. *Journal of bioscience and bioengineering*, 95, 412-415.

- HUANG, J.-C., WANG, Y., SANDMANN, G. & CHEN, F. 2006. Isolation and characterization of a carotenoid oxygenase gene from *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 473-479.
- 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.
- IP, P.-F. & CHEN, F. 2005. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochemistry*, 40, 733-738.
- IP, P.-F., WONG, K.-H. & CHEN, F. 2004. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture. *Process Biochemistry*, 39, 1761-1766.
- ITO, T., TANAKA, M., SHINKAWA, H., NAKADA, T., ANO, Y., KURANO, N., SOGA, T. & TOMITA, M. 2013. Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxiophycean alga in nitrogen-deficient conditions. *Metabolomics*, 9, 178-187.
- JEON, Y.-C., CHO, C.-W. & YUN, Y.-S. 2006. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 490-495.
- JOHNSON, E. J. 2002. The role of carotenoids in human health. *Nutrition of clinical care*, 5, 56-65.
- KAKIZONO, T., KOBAYASHI, M. & NAGAI, S. 1992. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of fermentation and bioengineering*, 74, 403-405.
- KÄLLQVIST, T. & SVENSON, A. 2003. Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*, Chlorophyta. *Water research*, 37, 477-484.
- KANG, C. D., LEE, J. S., PARK, T. H. & SIM, S. J. 2007. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. *Applied microbiology and biotechnology*, 74, 987-994.
- KHODAIYAN, F., RAZAVI, S. H., EMAM-DJOMEH, Z., MOUSAVI, S. M. A. & HEJAZI, M. A. 2007. Effect of culture conditions on canthaxanthin production by *Dietzia natronolimnaea* HS-1. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17, 195.
- KIDD, P. 2011. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Altern Med Rev*, 16, 355-64.

- KIRK, J. T. O. 1988. Solar heating of water bodies as influenced by their inherent optical properties. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* (1984-2012), 93, 10897-10908.
- KOBAYASHI, M., HIRAI, N., KURIMURA, Y., OHIGASHI, H. & TSUJI, Y. 1997a. Abscisic acid-dependent algal morphogenesis in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant growth regulation*, 22, 79-85.
- KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T. & NAGAI, S. 1991. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *Journal of fermentation and bioengineering*, 71, 335-339.
- KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T. & NAGAI, S. 1993. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 867-873.
- KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T., NISHIO, N. & NAGAI, S. 1992a. Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74, 61-63.
- KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T., YAMAGUCHI, K., NISHIO, N. & NAGAI, S. 1992b. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74, 17-20.
- KOBAYASHI, M., KURIMURA, Y. & TSUJI, Y. 1997b. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnology Letters*, 19, 507-509.
- KOBAYASHI, M. & SAKAMOTO, Y. 1999. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*, 21, 265-269.
- KRINSKY, N. I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7, 617-635.
- LEITE, G. B., ABDELAZIZ, A. E. M. & HALLENBECK, P. C. 2013. Algal biofuels: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 145, 134-141.
- LEMOINE, Y. & SCHOEFS, B. 2010. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research*, 106, 155-177.

- LEUCHTENBERGER, W., HUTHMACHER, K. & DRAUZ, K. 2005. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 1-8.
- LEWIS JR, W. M. & MORRIS, D. P. 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. *Transactions of the American fisheries society*, 115, 183-195.
- LI, M., WU, W., ZHOU, P., XIE, F., ZHOU, Q. & MAI, K. 2014. Comparison effect of dietary astaxanthin and *Haematococcus pluvialis* on growth performance, antioxidant status and immune response of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture*, 434, 227-232.
- LI, M., ZHU, W., GAO, L. & LU, L. 2013. Changes in extracellular polysaccharide content and morphology of *Microcystis aeruginosa* at different specific growth rates. *Journal of applied phycology*, 25, 1023-1030.
- LI, Y., HORSMAN, M., WANG, B., WU, N. & LAN, C. Q. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 81, 629-636.
- LI, Y., HUANG, J., SANDMANN, G. & CHEN, F. 2009. High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* (CHLOROPHYCEAE). *Journal of Phycology*, 45, 635-641.
- LIND, O., DÁVALOS-LIND, L., LÓPEZ, C., LÓPEZ, M. & BRESSIE, J. D. 2016. Seasonal morphological variability in an in situ Cyanobacteria monoculture: example from a persistent *Cylindrospermopsis* bloom in Lake Catemaco, Veracruz, Mexico. *Journal of Limnology*, 75.
- LÓPEZ-GARCÍA, P., PHILIPPE, H., GAIL, F. & MOREIRA, D. 2003. Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 697-702.
- LÓPEZ, M., ARCE, L., GARRIDO, J., RIOS, A. & VALCÁRCEL, M. 2004. Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. *Talanta*, 64, 726-731.
- LORENZ, R. T. & CYSEWSKI, G. R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *TRENDS in Biotechnology*, 18, 160-167.
- LOTAN, T. & HIRSCHBERG, J. 1995. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding beta-C-4-oxygenase, that converts beta-carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS Letters*, 364, 125-128.

- LYNCH, M. & MILLIGAN, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular ecology*, 3, 91-99.
- MALIS, S. A., COHEN, E. & BEN AMOTZ, A. 1993. Accumulation of canthaxanthin in *Chlorella emersonii*. *Physiologia Plantarum*, 87, 232-236.
- MANN, V., HARKER, M., PECKER, I. & HIRSCHBERG, J. 2000. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat Biotech*, 18, 888-892.
- MAOKA, T. 2011. Carotenoids in marine animals. *Marine drugs*, 9, 278-293.
- MARGALITH, P. Z. 1999. Production of ketocarotenoids by microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 51, 431-438.
- 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.
- MAWSON, R. 1995. Astaxanthin from flowers of the genus *Adonis*. Google Patents.
- MCCARTY, M. F. 2007. Clinical potential of *Spirulina* as a source of phycocyanobilin. *Journal of medicinal food*, 10, 566-570.
- MEEREN, T. D. 1991. Algae as first food for cod larvae, *Gadus morhua* L.: filter feeding or ingestion by accident. *Journal of Fish Biology*, 39, 225-237.
- MELKONIAN, M. 1978. Structure and significance of cruciate flagellar root systems in green algae: comparative investigations in species of *Chlorosarcinopsis* (Chlorosarcinales). *Plant Systematics and Evolution*, 130, 265-292.
- MILLEDGE, J. J. 2011. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10, 31-41.
- MISAWA, N., SATOMI, Y., KONDO, K., YOKOYAMA, A., KAJIWARA, S., SAITO, T., OHTANI, T. & MIKI, W. 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *Journal of Bacteriology*, 177, 6575-6584.
- MORAN, J. F., BECANA, M., ITURBE-ORMAETXE, I., FRECHILLA, S., KLUCAS, R. V. & APARICIO-TEJO, P. 1994. Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, 194, 346-352.
- MORO, C. V., CROUZET, O., RASCONI, S., THOUVENOT, A., COFFE, G., BATAISSON, I. & BOHATIER, J. 2009. New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in environmental samples. *Applied and environmental microbiology*, 75, 5729-5733.

- MULLER-FEUGA, A., MOAL, J. & KAAS, R. 2003. The microalgae of aquaculture. *Live feeds in marine aquaculture*, 206-252.
- MUNNE-BOSCH, S. & PENUELAS, J. 2004. Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. *Plant Science*, 166, 1105-1110.
- NAGENDRAPRABHU, P. & SUDHANDIRAN, G. 2011. Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NFkB and COX-2. *Investigational new drugs*, 29, 207-224.
- NAGUIB, Y. M. A. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1150-1154.
- NAKADA, T., SHINKAWA, H., ITO, T. & TOMITA, M. 2010. Recharacterization of *Chlamydomonas reinhardtii* and its relatives with new isolates from Japan. *Journal of plant research*, 123, 67-78.
- NAKAJIMA, Y., INOKUCHI, Y., SHIMAZAWA, M., OTSUBO, K., ISHIBASHI, T. & HARA, H. 2008. Astaxanthin, a dietary carotenoid, protects retinal cells against oxidative stress in vitro and in mice in vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60, 1365-1374.
- NAKAO, R., NELSON, O. L., PARK, J. S., MATHISON, B. D., THOMPSON, P. A. & CHEW, B. P. 2010. Effect of dietary astaxanthin at different stages of mammary tumor initiation in BALB/c mice. *Anticancer research*, 30, 2171-2175.
- NDIKUBWIMANA, T., ZENG, X., LIU, Y., CHANG, J.-S. & LU, Y. 2014. Harvesting of microalgae *Desmodesmus* sp. F51 by bioflocculation with bacterial bioflocculant. *Algal Research*, 6, 186-193.
- NEI, M. & LI, W.-H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 5269-5273.
- NEILSON, A. & LEWIN, R. 1974. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry\*. *Phycologia*, 13, 227-264.
- 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. & JINNO, K. 2002. Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev*, 21, 257-64.
- NOGUEIRA, M., MORA, L., ENFISSI, E. M. A., BRAMLEY, P. M. & FRASER, P. D. 2013. Subchromoplast sequestration of carotenoids affects regulatory mechanisms

- in tomato lines expressing different carotenoid gene combinations. *The Plant Cell Online*, 25, 4560-4579.
- OJIMA, K., BREITENBACH, J., VISSER, H., SETOGUCHI, Y., TABATA, K., HOSHINO, T., VAN DEN BERG, J. & SANDMANN, G. 2006. Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Molecular Genetics and Genomics*, 275, 148-158.
- OKE, O. 1966. Nitrite toxicity to plants.
- OLSON, J. A. 1989. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of beta-carotene into vitamin A. *The Journal of nutrition*, 119, 105-108.
- OPPEN, M. J., DIEKMANN, O. E., WIENCKE, C., STAM, W. T. & OLSEN, J. L. 1994. TRACKING DISPERSAL ROUTES: PHYLOGEOGRAPHY OF THE ARCTIC-ANTARCTIC DISJUNCT SEAWEED ACROSIPHONIA ARCTA (CHLOROPHYTA) 1. *Journal of phycology*, 30, 67-80.
- OREN, A. 2009. Saltern evaporation ponds as model systems for the study of primary production processes under hypersaline conditions. *Aquatic Microbial Ecology*, 56, 193-204.
- OROSA, M., VALERO, J., HERRERO, C. & ABALDE, J. 2001. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnology Letters*, 23, 1079-1085.
- OROUD, I. 2001. A new formulation of evaporation-temperature dynamics. *Water Resources Research*, 37, 2513-2520.
- ORTIZ-LOPEZ, A., CHANG, H. C. & BUSH, D. R. 2000. Amino acid transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465, 275-280.
- PAINTER, H. A. 1970. A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. *Water Research*, 4, 393-450.
- PALOZZA, P. & KRINSKY, N. I. 1992. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 297, 291-295.
- PALOZZA, P., MAGGIANO, N., CALVIELLO, G., LANZA, P., PICCIONI, E., RANELLETTI, F. O. & BARTOLI, G. M. 1998. Canthaxanthin induces apoptosis in human cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 19, 373-376.
- 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 technology*, 156, 146-154.
- PARK, J. S., CHYUN, J. H., KIM, Y. K., LINE, L. L. & CHEW, B. P. 2010. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition and Metabolism*, 7.
- PELAH, D., SINTOV, A. & COHEN, E. 2004. The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 483-486.
- PEREZ-GARCIA, O., DE-BASHAN, L. E., HERNANDEZ, J. P. & BASHAN, Y. 2010. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Journal of Phycology*, 46, 800-812.
- PETTERSSON, A. & LIGNELL, A. 1999. Astaxanthin deficiency in eggs and fry of Baltic salmon (*Salmo salar*) with the M74 syndrome. *Ambio*, 28, 43-47.
- PIRASTRU, L., DARWISH, M., CHU, F. L., PERREAULT, F., SIROIS, L., SLENO, L. & POPOVIC, R. 2012. Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment. *Journal of applied phycology*, 24, 117-124.
- PORTILLO, M., SRIRIN, V., KANOKSILAPATHAM, W. & GONZALEZ, J. 2009. Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand. *Extremophiles*, 13, 321-331.
- QIN, S., LIU, G.-X. & HU, Z.-Y. 2008. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Process Biochemistry*, 43, 795-802.
- RAMOS, A. A., POLLE, J., TRAN, D., CUSHMAN, J. C., JIN, E. & 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, 3.
- REMIAS, D., LÜTZ-MEINDL, U. & LÜTZ, C. 2005. Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *European Journal of Phycology*, 40, 259-268.
- RISE, M., COHEN, E., VISHKAUTSAN, M., COJOCARU, M., GOTTLIEB, H. E. & ARAD, S. M. 1994. Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. *Journal of Plant Physiology*, 144, 287-292.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 2016. Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20-26.

- RODRIGUEZ-SÁIZ, M., DE LA FUENTE, J. L. & BARREDO, J. L. 2010. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Applied microbiology and biotechnology*, 88, 645-658.
- ROWAN, K. S. 1989. *Photosynthetic pigments of algae*, CUP Archive.
- SALGUERO, A., DE LA MORENA, B., VIGARA, J., VEGA, J. M., VILCHEZ, C. & LEON, R. 2003. Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomol Eng*, 20, 249-53.
- SCHAUB, P., YU, Q., GEMMECKER, S., POUSSIN-COURMONTAGNE, P., MAILLIOT, J., MCEWEN, A. G., GHISLA, S., AL-BABILI, S., CAVARELLI, J. & BEYER, P. 2012. On the structure and function of the phytoene desaturase CRTI from *Pantoea ananatis*, a membrane-peripheral and FAD-dependent oxidase/isomerase. *PLoS one*, 7, e39550.
- SCHOEFS, B. T., RMIKI, N.-E., RACHADI, J. & LEMOINE, Y. 2001. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. *FEBS Letters*, 500, 125-128.
- SCIBILIA, L., GIROLOMONI, L., BERTEOTTI, S., ALBORESI, A. & BALLOTTARI, M. 2015. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 12, 170-181.
- SHARMA, P. & DUBEY, R. S. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant growth regulation*, 46, 209-221.
- SHEIKHZADEH, N., TAYEFI-NASRABADI, H., OUSHANI, A. K. & ENFERADI, M. H. N. 2012. Effects of *Haematococcus pluvialis* supplementation on antioxidant system and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish physiology and biochemistry*, 38, 413-419.
- SHEN, X.-F., LIU, J.-J., CHAUHAN, A. S., HU, H., MA, L.-L., LAM, P. K. S. & ZENG, R. J. 2016. Combining nitrogen starvation with sufficient phosphorus supply for enhanced biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* fed on acetate. *Algal Research*, 17, 261-267.
- SMITH, D. R. & LEE, R. W. 2009. Nucleotide diversity of the *Chlamydomonas reinhardtii* plastid genome: addressing the mutational-hazard hypothesis. *BMC evolutionary biology*, 9, 1.
- SNEATH, P. H. & SOKAL, R. R. 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*.
- SOLOVCHENKO, A. E., KHOZIN-GOLDBERG, I., DIDI-COHEN, S., COHEN, Z. & MERZLYAK, M. N. 2008. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total

- fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*, 20, 245-251.
- SOLTIS, D. E. & SOLTIS, P. S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. *Molecular systematics of plants II*. Springer.
- SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E. & ISAMBERT, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng*, 101, 87-96.
- STAHL, W. & SIES, H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345-351.
- STANIER, R., KUNISAWA, R., MANDEL, M. & COHEN-BAZIRE, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological reviews*, 35, 171.
- STARR, R. C. 1955. comparative study of *Chlorococcum meneghini*, and other spherical, zoospore-producing genera of the Chlorococcales.
- STEIN, J. R. 1979. *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*, CUP Archive.
- SUEOKA, N., CHIANG, K.S. AND KATES, J.R. 1967. Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *J. Mol. Biol.*, 25, 44-67.
- SUN, N., WANG, Y., LI, Y.-T., HUANG, J.-C. & CHEN, F. 2008. Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Process Biochemistry*, 43, 1288-1292.
- 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, 86.
- SWOFFORD, D. L. 2003. PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10.
- TACON, A. J. 2003. Aquaculture production trends analysis. *FAO Fisheries Circular*, 886, 5-29.
- TAKAICHI, S. 2011. Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 9, 1101-1118.
- TAN, C.-P., ZHAO, F.-Q., SU, Z.-L., LIANG, C.-W. & QIN, S. 2007. Expression of beta-carotene hydroxylase gene ( *crtR-B* ) from the green alga *Haematococcus pluvialis* in chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, 19, 347-355.

- TANSAKUL, P. 2007. Factors affecting growth of beta-carotene content of *Chlorosarcinopsis* sp.(PSU/CHL20) in batch culture.
- TJAHJONO, A. E., HAYAMA, Y., KAKIZONO, T., TERADA, Y., NISHIO, N. & NAGAI, S. 1994. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnology Letters*, 16, 133-138.
- TOLASA, S., CAKLI, S. & OSTERMEYER, U. 2005. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. *European Food Research and Technology*, 221, 787-791.
- TORRISSEN, O. J. 1984. Pigmentation of salmonids-effect of carotenoids in eggs and start-feeding diet on survival and growth rate. *Aquaculture*, 43, 185-193.
- VALATKA, S., MÄKINEN, A. & YLI-MATTILA, T. 2000. Analysis of genetic diversity of *Furcellaria lumbricalis* (Gigartinales, Rhodophyta) in the Baltic Sea by RAPD-PCR technique. *Phycologia*, 39, 109-117.
- VARELA, J. C., PEREIRA, H., VILA, M. & LEÓN, R. 2015. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. *Photosynthesis research*, 125, 423-436.
- VIDHYAVATHI, R., VENKATACHALAM, L., SARADA, R. & RAVISHANKAR, G. A. 2008. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 59, 1409-18.
- WANG, B., ZARKA, A., TREBST, A. & BOUSSIBA, S. 2003. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process during high irradiance. *Journal of Phycology*, 39, 1116-1124.
- WATANABE, S. 1983. New and interesting green algae from soils of some Asian and Oceanian regions. *Archiv für Protistenkunde*, 127, 223-270.
- WATANABE, S., KURODA, N. & MAIWA, F. 2001. Phylogenetic status of *Helicodictyon planctonicum* and *Desmochloris halophila* gen. et comb. nov. and the definition of the class *Ulvophyceae* (Chlorophyta). *Phycologia*, 40, 421-434.
- WATANABE, S., MITSUI, K., NAKAYAMA, T. & INOUE, I. 2006. Phylogenetic relationships and taxonomy of sarcinoid green algae: *Chlorosarcinopsis*, *Desmotetra*, *Sarcinochlamys* gen. nov., *Neochlorosarcina*, and *Chlorosphaeropsis* (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 42, 679-695.
- WATANABE, Y., MARTINI, J. E. J. & OHMOTO, H. 2000. Geochemical evidence for terrestrial ecosystems 2.6 billion years ago. *Nature*, 408, 574-578.
- WAYAMA, M., OTA, S., MATSUURA, H., NANGO, N., HIRATA, A. & KAWANO, S. 2013. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation

- during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS One*, 8, e53618.
- WEHR, J. D., SHEATH, R. G. & KOCIOLEK, J. P. 2015. *Freshwater algae of North America: ecology and classification*, Elsevier.
- WEISING, K., NYBOM, H., PFENNINGER, M., WOLFF, K. & MEYER, W. 1994. *DNA fingerprinting in plants and fungi*, CRC press.
- WILBERG, V. C. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1995. HPLC quantitation of major carotenoids of fresh and processed guava, mango and papaya. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 474-480.
- XIN, L., HONG-YING, H., KE, G. & YING-XUE, S. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology*, 101, 5494-5500.
- XU, N., ZHANG, X., FAN, X., HAN, L. & ZENG, C. 2001. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp.(Eustigmatophyta). *Journal of Applied Phycology*, 13, 463-469.
- YANG, S., WANG, J., CONG, W., CAI, Z. & OUYANG, F. 2004. Utilization of nitrite as a nitrogen source by *Botryococcus braunii*. *Biotechnology letters*, 26, 239-243.
- YOKOYAMA, A., IZUMIDA, H. & MIKI, W. 1994. Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58, 1842-1844.
- 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 & food research*, 55, 150-165.
- ZHANG, D.-H. & LEE, Y.-K. 2001. Two-step process for ketocarotenoid production by a green alga, *Chlorococum* sp. strain MA-1. *Applied microbiology and biotechnology*, 55, 537-540.
- ZHANG, J., LIU, Y. J., TIAN, L. X., YANG, H. J., LIANG, G. Y., YUE, Y. R. & XU, D. H. 2013. Effects of dietary astaxanthin on growth, antioxidant capacity and gene expression in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 19, 917-927.
- ZHONG, Y.-J., HUANG, J.-C., LIU, J., LI, Y., JIANG, Y., XU, Z.-F., SANDMANN, G. & CHEN, F. 2011. Functional characterization of various algal carotenoid ketolases reveals that ketolating zeaxanthin efficiently is essential for high production of astaxanthin in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3659-3669.

- ZHU, S., WANG, Y., SHANG, C., WANG, Z., XU, J. & YUAN, Z. 2015. Characterization of lipid and fatty acids composition of *Chlorella zofingiensis* in response to nitrogen starvation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 120, 205-209.
- ZITTELLI, G. C., RODOLFI, L., BIONDI, N. & TREDICI, M. R. 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, 261, 932-943.





ภาคผนวก

## การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

### 1. การเตรียมอาหารสูตร HSM

#### 1.1 salts solution (Beijerinck's solution)

$\text{NH}_4\text{Cl}$  100.0 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.0 g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.0 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

#### 1.2 phosphate solution

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  288.0 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  144.0 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

#### 1.3 Hutner's trace elements

EDTA disodium salt 50 g/ 250 ml

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  22 g/ 100 ml

$\text{H}_3\text{BO}_3$  11.4 g/ 200 ml

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  5.06 g/ 50 ml

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.61 g/ 50 ml

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1.57 g/ 50 ml

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.10 g/ 50 ml

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.99 g/ 50 ml

เมื่อเตรียมสารแล้วทำการผสมสารดังนี้

salts solution #1 5 ml

phosphate solution #2 5 ml

trace elements solution #3 1.0 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

### 2. การเตรียมอาหารสูตร TAP

#### 2.1 TAP salt

$\text{NH}_4\text{Cl}$  15.0 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.0 g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.0 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร



## 2.2 phosphate solution

$K_2HPO_4$  28.8 g

$KH_2PO_4$  14.4 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

## 2.3 Hutner's trace elements

EDTA disodium salt 50 g/ 250 ml

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  22 g/ 100 ml

$H_3BO_3$  11.4 g/ 200 ml

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$  5.06 g/ 50 ml

$CoCl_2 \cdot 6H_2O$  1.61 g/ 50 ml

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$  1.57 g/ 50 ml

$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  1.10 g/ 50 ml

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$  4.99 g/ 50 ml

เมื่อเตรียมสารแล้วทำการผสมสารดังนี้

Tris 2.42 g

solution #1 (salts) 25 ml

solution #2 (phosphate) 0.375 ml

solution #3 (trace elements) 1.0 ml

glacial acetic acid 1.0 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

## 3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BBM

ทำการเตรียม stock solution ก่อนดังนี้

1.  $NaNO_3$  10.0 g/400 ml

2.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  3.0 g/400 ml

3.  $NaCl$  1.0 g/400 ml

4.  $K_2HPO_4$  3.0 g/400 ml

5.  $KH_2PO_4$  7.0 g/400 ml

6.  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  1.0 g/400 ml

7. Trace elements solution (autoclave to dissolve)

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  8.82 g

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$  1.44 g

$MoO_3$  0.71 g

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$  1.57 g

$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  0.49 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

8.  $\text{H}_3\text{BO}_3$  11.42 g/1 L

9. EDTA 50.0 g + KOH 31.0 g/1 L

10.  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.98 g +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (conc) 1 ml/1 L

เมื่อเตรียมสารแล้วทำการผสมสารดังนี้

สารละลายข้อ 1-6 อย่างละ 10 ml

สารละลายข้อ 7-10 อย่างละ 1 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

#### 4. การเตรียมอาหารสูตร BG11

4.1 เตรียม BG11 Trace metal

$\text{H}_3\text{BO}_3$  2.86 g

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.81 g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.222 g

$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.39 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.079 g

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.494 mg

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

4.2 เตรียมอาหารสูตร BG11 โดยเติมสารเคมีดังต่อไปนี้

$\text{NaNO}_3$  1.5 g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.04 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.075 g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.036 g

Citric acid 0.006 g

Ferric ammonium citrate 0.006 g

EDTA (disodium salt) 0.001 g

$\text{NaCO}_3$  0.02 g

BG11 Trace metal 1.0 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

ควรปรับค่า pH ให้อยู่ที่ประมาณ 7.1

## การเตรียมสารละลายที่ใช้ในเทคนิคอณูชีววิทยา

### 1. การเตรียม TEN buffer (100 ml)

1M Tris HCL	1 ml
0.5M EDTA	8 ml
5M NaCl	3 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร

### 2. SDS-EB buffer (100 ml)

1M Tris HCL	10 ml
0.5M EDTA	8 ml
5M NaCl	8 ml
10% SDS	20 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร

### 3. Phenol:Chloroform:Isoamyl-alcohol 25:24:1 (100 ml)

Phenol	50 ml
Chloroform	48 ml
Isoamyl-alcohol	2 ml

### 4. 50X TAE buffer (1 L)

Tris Base	242 g
Glacial Acetic Acid	57.1 ml
500 mM EDTA, pH 8.0	100 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

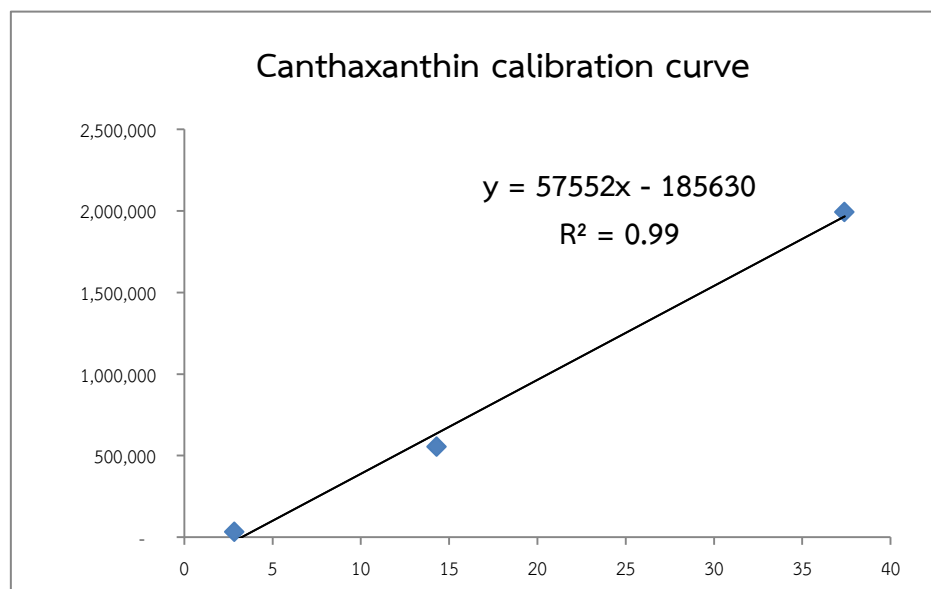
### 5. 6X DNA loading dye (100 ml)

Glycerol	30 ml
bromophenol blue	0.25 g
xylene cyanol FF	0.25 g

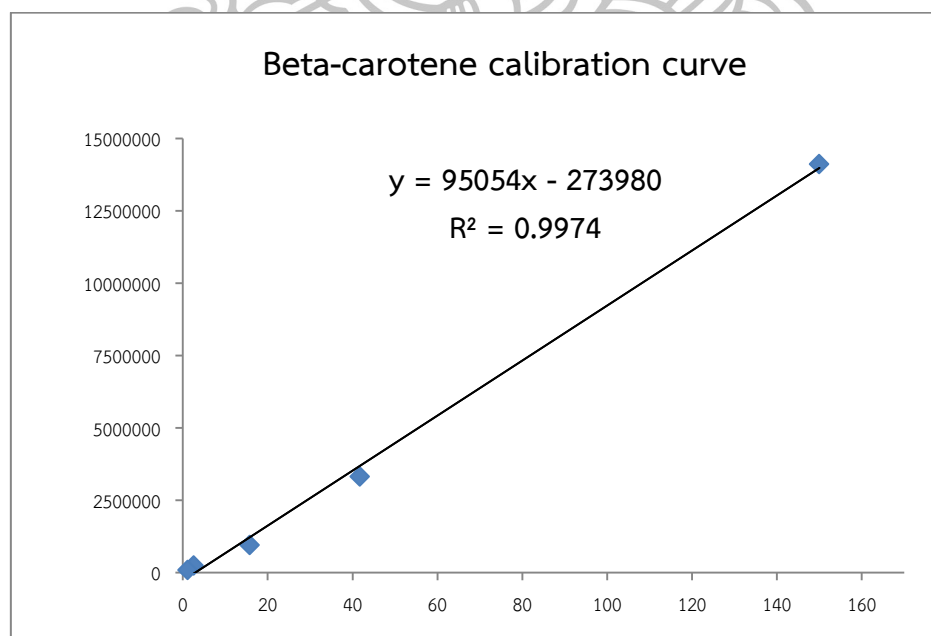
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 100 ml

## กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์

### 1. กราฟมาตรฐานของ canthaxanthin



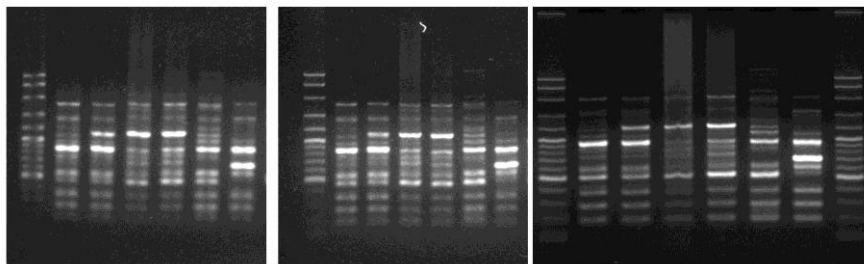
### 2. กราฟมาตรฐานของ $\beta$ -carotene



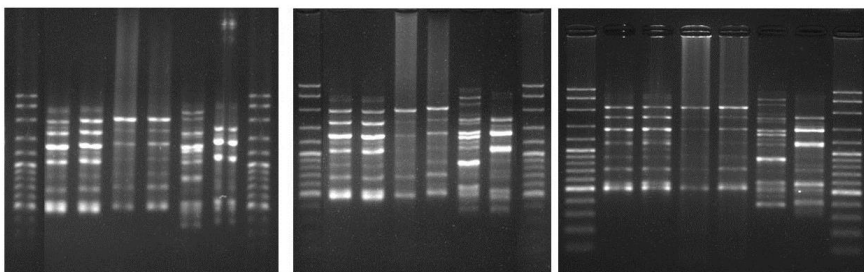
## รูปลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมดจากเทคนิค RAPD

โดยเรียงลำดับในแต่ละหลุมของเจลดังนี้ ladder PY01 PY02 PY03 PY04 PY05 และ out-group

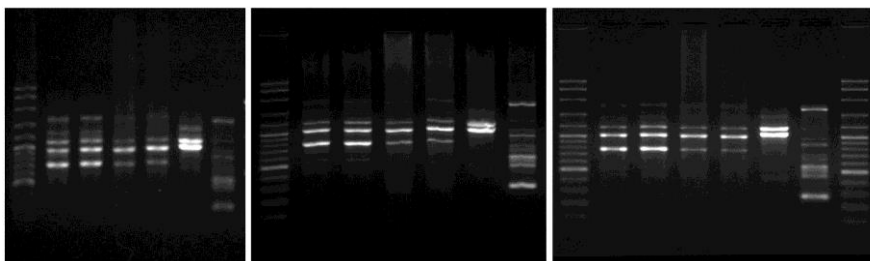
### 1. ไพรเมอร์ OPD-20



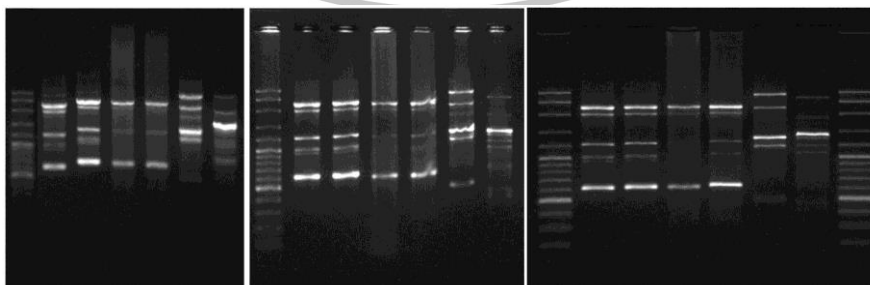
### 2. ไพรเมอร์ OPM-04



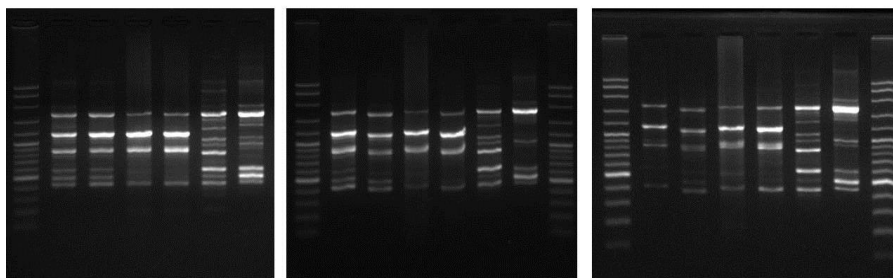
### 3. ไพรเมอร์ OPM-05



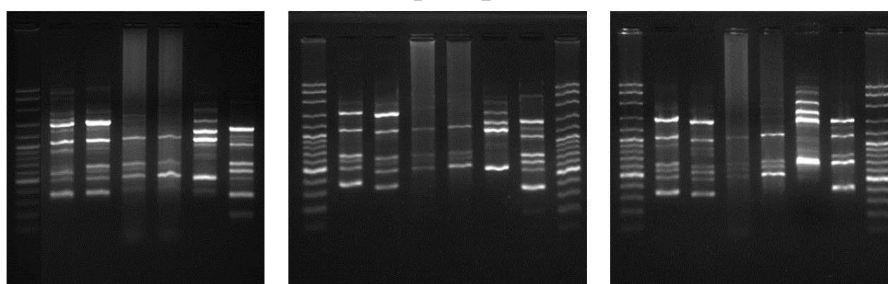
### 4. ไพรเมอร์ OPR-03



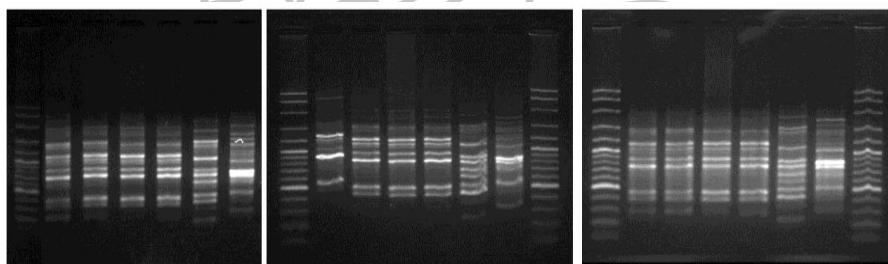
5. ไพรเมอร์ OPR-07



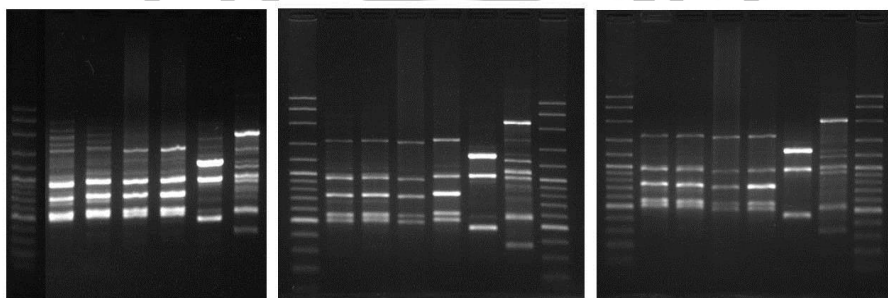
6. ไพรเมอร์ OPR-09



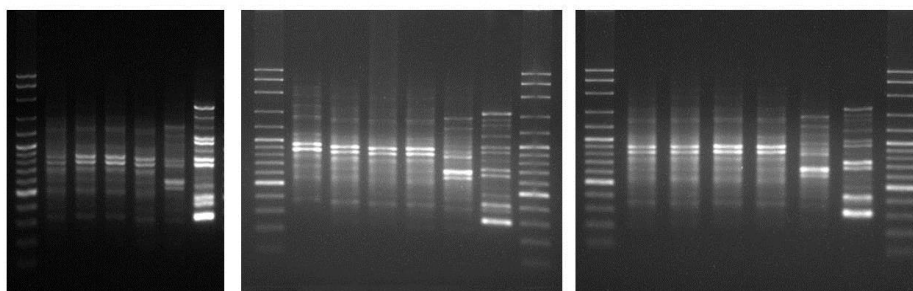
7. ไพรเมอร์ OPR-12



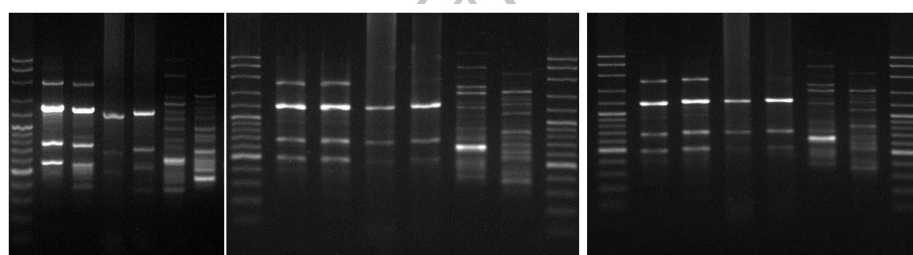
8. ไพรเมอร์ OPR-13



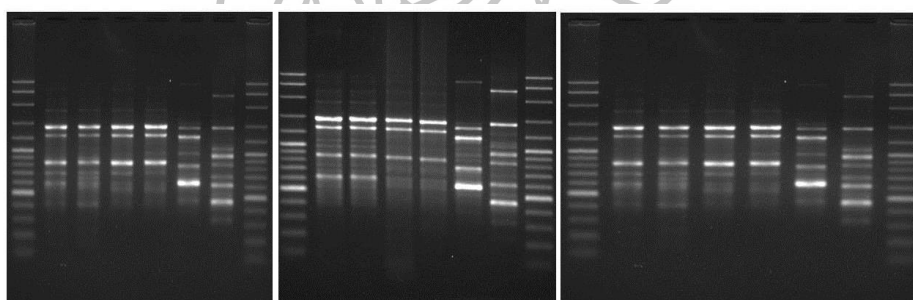
## 9. ไพรเมอร์ OPZ-04



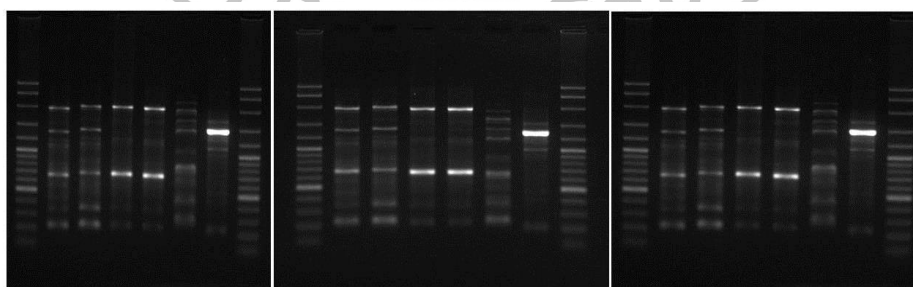
## 10. ไพรเมอร์ OPZ-06



## 11. ไพรเมอร์ OPZ-11



## 12. ไพรเมอร์ OPZ-13



ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tufA*

&gt;PY01

CATGATTACAGGTGCAGCACAAATGGACGGTGCAATTTTAGTAGTATCAGGTGCTGATGGTCCAA  
 TGCCTCAAACAAAAGAGCACATTCTATTAGCTAAGCAAGTAGGTGTACCAAACATTGTAGTATTTT  
 TAAACAAAGAAGACCAAGTAGACGACAAAGAATTATTAGAATTAGTAGAATTAGAAGTTCGTGAA  
 ACTTTAGATAAATATGAATTCCTGGAGATGAAATCCAATCGTTCCAGGTTCCAGCATTATTAGCT  
 TTAGAAGCTTTAGTTGAAAACCCTAAAACCTCAACGTGGCGAAAACCCATGGGTAGACAAAATCCA  
 TGAATTAATGGATAAAGTAGATAGCTACATTCCAACCTCCTCAACGTGAAACAGACAAACATTCTT  
 ATTAGCTGTTGAAGACGTATTATCTATTACTGGTCGTGGTACAGTAGCAACAGGACGTGTTGAAC  
 GTGGTACTTTAAAAGTAGGTGAAAACGTTGAAGTTGTAGGTTTAAAAGAACTAAAACCTTCAGTT  
 GTTACTGGTTTAGAAATGTTCAAGAAAACATTAGATGAAACTATGGCTGGTGACAACGTTGGTGT  
 TTTATTACGTGGTGTTCAAAAGAAAAGAAATTGAACGTGGTATGGTATTAGCTAAACCAGGATCAAT  
 TACACCTCACACTAAATTTGAAGCACAAGTTTATATCTTAACTAAAGAAGAAGGCGGTCGTCACT  
 CTGCTTTCTTAGTTGGTTACCAACCACAATTCTATGTACGTACAACAGACGTAACCTGGAAAAGTT  
 ACTTCATTCACTCACATTCAAATGCGTAACCCTTCTTCAGTTGCTGAAGAAAACCTCAAACAAAAT  
 GGCTATGCCAGGTGACCGTATCAGTATGGTAGTTGAATTAATCAACCCAATTGCCATCGAAAAG

&gt;PY02

TAGTATCAGGTGCTGATGGTCCAATGCCTCAAACAAAAGAGCACATTCTATTAGCTAAGCAAGTA  
 GGTGTACCAAACATTGTAGTATTTTAAAACAAAGAAGACCAAGTAGACGACAAAGAATTATTAGAA  
 TTAGTAGAATTAGAAGTTCGTGAACTTTAGATAAATATGAATTCCTGGAGATGAAATCCAATC  
 GTTCCAGGTTCCAGCATTATTAGCNTTAGAAGCTTTAGTTGAAAACCCTAAAACCTCAACGTGGCGA  
 AAACCCATGGGTAGACAAAATCCATGAATTAATGGATAAAGTAGATAGCTACATTCCAACCTCCTCA  
 ACGTGAAACAGACAAACCTTCTATTAGCTGTTGAAGACGTATTATCTATTACTGGTCGTGGTAC  
 AGTAGCAACAGGACGTGTTGAACGTGGTACTTTAAAAGTAGGTGAAAACGTTGAAGTTGTAGGT  
 TAAAAGAACTAAAACCTTCAGTTGTTACTGGTTTAGAAATGTTCAAGAAAACATTAGATGAAACT  
 ATGGCTGGTGACAACGTTGGTGTTTTATTACGTGGTGTTCAAAAGAAAAGAAATTTGAACGTGGTA  
 TGGTATTAGCTAAACCAGGATCAATTACACCTCACACTAAATTTGAAGCACAAGTTTTATATCTAA  
 CTAAGAAGAAGGCGGTCGTCACTNTGCTTTCTTAGTTGGTTACCAACCACAATTATATGTACGT  
 ACANCAGACGTAACCTGGAAAAGTTACTTCATTCACTCACATTCAAATGCGTAACCNTTNTCAGT  
 TGCTGAAGAAA



>PY03

CAGGNCACGCTGACTACGTAAAAACATGATTACAGGTGCAGCACAAATGGACGGTGCAATTTTA  
GTAGTATCAGGTGCTGATGGTCCAATGCCTCAAACAAAAGAGCACATTCTATTAGCTAAGCAAGT  
AGGTGTACCAAACATTGTAGTATTTTTAAACAAAGAAGACCAAGTAGACGACAAAGAATTATTAG  
AATTAGTAGAATTAGAAGTTCGTGAAACTTTAGATAAATATGAATTCCTGGAGATGAAATTC  
TCGTTCCAGGTTGAGCATTATTAGCTTTAGAAGCTTTAGTTGAAAACCCTAAAACCTCAACGTGGC  
GAAAACCCATGGGTAGACAAAATCCATGAATTAATGGATAAAGTAGATAGCTACATTCAACTCCT  
CAACGTGAAACAGACAAACCATTCTTATTAGCTGTTGAAGACGTATTATCTATTACTGGTCGTGGT  
ACAGTAGCAACAGGACGTGTTGAACGTGGTACTTTAAAAGTAGGTGAAAACGTTGAAGTTGTAG  
GTTTTAAAAGAACTAAAACCTTCAGTTGTTACTGGTTTAGAAAATGTTCAAGAAAACATTAGATGAA  
ACTATGGCTGGTGACAACGTTGGTGTGTTTATTACGTGGTGTTCAAAAGAAAAGAAATTGAACGTGG  
TATGGTATTAGCTAAACCAGGATCAATTACACCTCACACTAAATTTGAAGCACAAGTTTATATCTT  
AACTAAAGAAGAAGGCGGTGTCCTGCTTTCTTAGTTGGTTACCAACCACAATTCTATGTAC  
GTACAACAGACGTAACCTGAAAAGTTACTTCATTCACTCACATTCAAATGCGTAACCCTTCTTCA  
GTTGCTGAAGAAAACCTCAAACAAATGGCTATGCCAGGTGACCGTATCAGTAT

>PY04

AAACATGATTACAGGTGCAGCACAAATGGACGGTGCAATTTTAGTAGTATCAGGTGCTGATGGTC  
CAATGCCTCAAACAAAAGAGCACATTCTATTAGCTAAGCAAGTAGGTGTACCAAACATTGTAGTAT  
TTTTAAACAAAGAAGACCAAGTAGACGACAAAGAATTATTAGAATTAGTAGAATTAGAAGTTCGT  
GAAACTTTAGATAAATATGAATTCCTGGAGATGAAATTCGAATCGTTCAGGTTGAGCATTATTA  
GCTTTAGAAGCTTTAGTTGAAAACCCTAAAACCTCAACGTGGCGAAAACCCATGGGTAGACAAAAT  
CCATGAATTAATGGATAAAGTAGATAGCTACATTCCAACTCCTCAACGTGAAACAGACAAACCATT  
CTTATTAGCTGTTGAAGACGTATTATCTATTACTGGTCGTGGTACAGTAGCAACAGGACGTGTTGA  
ACGTGGTACTTTAAAAGTAGGTGAAAACGTTGAAGTTGTAGGTTTTAAAAGAACTAAAACCTTCAG  
TTGTTACTGGTTTAGAAATGTTCAAGAAAACATTAGATGAACTATGGCTGGTGACAACGTTGGT  
GTTTTATTACGTGGTGTTCAAAAGAAAAGAAATTGAACGTGGTATGGTATTAGCTAAACCAGGATC  
AATTACACCTCACACTAAATTTGAAGCACAAGTTTATATCTTAACTAAAGAAGAAGGCGGTGTC  
ACTCTGCTTTCTTAGTTGGTTACCAACCACAATTCTATGTACGTACAACAGACGTAACCTGGGAAA  
GTTACTTCATTCACTCACATTCAAATGCGTAACCCTTCTTCAAGTTGCTGAAGAAAACCTCAAACAA  
AATGGCTATGCCAGGTGACCGTATCAGTATGGTAGTTGAATTAATCAACCC

>PY05

ACAGGTGCAGCACAAATGGACGGTGCAATTTTAGTAGTATCAGGTGCTGATGGTCCAATGCCTCA  
AACAAAAGAGCACATTCTATTAGCTAAGCAAGTAGGTGTACCAAACATTGTAGTATTTTTAAACAA  
AGAAGACCAAGTAGACGACAAAGAATTATTAGAATTAGTAGAATTAGAAGTTCGTGAAACTTTAG  
ATAAATATGAATTCCTGGAGACGAAATCCAATCGTTCAGGTTCCAGGTTCCAGCATTATTAGCTTTAGAAG  
CTTTAGTTGAAAACCCCTAAAACCTCAACGTGGTGGAAAACCCATGGGTAGACAAAATCCATGAATTA  
ATGGATAAAGTAGATAGCTACATTCCAACCTCAACGTGAAACAGACAAACCATTCTTATTAGCT  
GTTGAAGACGTATTATCTATTACTGGTCGTGGTACAGTAGCAACAGGACGTGTTGAACGTGGTAC  
TTTTAAAGTAGGTGAAAACGTTGAAGTTGTAGGTTTTAAAGATACTAAAACCTTCAGTTGTTACTG  
GTTTAGAAATGTTCAAGAAAACATTAGATGAAACTATGGCTGGTGACAACGTTGGTGTTTTATTAC  
GTGGTGTTCAAAAGAAAGAAATTTGAACGTGGTATGGTATTAGCTAAACCAGGCTCAATTACACCT  
CACACTAAATTTGAAGCACAAAGTTTATATTTAACTAAAGAAGAAGGTGGTCGTCACCTCGCTTT  
CTTAGTTGGTTACCAACCACAATCTATGTACGTACAACAGACGTAACCTGGAAAGTAACTTCATTC  
ACTCACATTCAAATGCGTAACCCCTTCCTCAGTTGCTGAAGAAAATCAAACAAATGGCTATGCCAG  
GTGACCGTATCAGTATGGTAGTTGATTAATCANCCNATTGCATTGAAAAGG

**ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA**

>PY02

GGGAATTGATGGTCTCTTTACTCGGATACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCC  
CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACTCTTGCGGA  
ATCATGATAACTTCACGAATCGCACGGCCTCGCGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCT  
ATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTT  
CGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAA  
TTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCCTTTGGTCTGGTA  
ATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGTATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGC  
AGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT  
GGATTCGGGTGGTGTGCGCGGTCTGCCTCTGGTATGTACTGGCGCTGCTCACCTTTCTGCCG  
GGGACGGGCTCCTGGGCTTAACGTCTGGGACTCGGAGTCGGCGTTGTTACTTTGAGTAAATTA  
GAGTGTTCAAAGCAAGCCTTCGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGC  
CTATCTTGTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCTGATTTT  
CATTGTCAGAGGTGAAATTTGGATTTATGAAAGACGAACCTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGG  
ATGTTTTATTGATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTC  
AACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCAGGTGTTTCATTGATGACCCTGCCAGCACCTTAT  
GAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTTAAAGGAATT  
GACGGAAGGCACCACCAGGCGTTGAGCTGCGGCTTAATTTGACTCACACGGGAAACTTACCAGT

CCAGAACACGGAGATGACGGATGAGAGCTCTTTTCTTGATTCTGTGGAGGTGTGCATGCGGTCT  
 AGTGTGGGTTGCTTGCCAGGTTGATTCAA

>PY01

TATTTGATGGTCTCTTTACTCGGATACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGA  
 CTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACTCTTGCGAATC  
 ATGATAACTTCACGAATCGCACGGCCTCGCGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATC  
 AACTTTGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGA  
 TTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTA  
 CCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCCTTTGGTCTGGTAATT  
 GGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGTATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGC  
 CGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGGA  
 TTTCCGGTGGGTGTCGCCGGTCTGCCTCTGGTATGTACTGGCGCTGCTCACCTTTCTGCCGGGG  
 ACGGGCTCCTGGGCTTAACTGTCTGGGACTCGGAGTCGGCGTTGTTACTTTGAGTAAATTAGAG  
 TGTTCAAAGCAAGCCTTCGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTA  
 TCTTGTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTTCGTATTTTCAT  
 TGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATGAAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTCGAAGGATG  
 TTTTCATTGATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAAC  
 CATAACGATGCCGACTAGGGATTGGCAGTGTTCATTGATGACCCTGCCAGCACCTTATGAGA  
 ATCAAAGTTTTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTTAAAGGAATTGACGG  
 AAGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGCTAATTTGACTCACAACGGAACTTACAGTTCAGAAC  
 ACGGGAGAATTGAAGATTGAAGCTCTTCCTGATCCGTGGGTGGGTGCATGGCCGTCCTGTGCGT  
 TGCTGTGAGGTGATTCAA

>PY03

GGAGGTCGGTCGAAACTAGTCTGCCCCTGCGATAGTAGTTCTGGAGCGAATGATTTCGCGTAAA  
 TCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACTCTTG  
 CGAATCATGATAACTTCACGAATCGCACGGCCTCGCGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGC  
 CCTATCAACTTTTCATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGG  
 GTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGC  
 AAATTACCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCCTTTGGTCTG  
 GTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGTATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC  
 AGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTA  
 GTTGGATTTCCGGTGGGTGTCGCCGGTCTGCCTCTGGTATGTACTGGCGCTGCTCACCTTTCTG  
 CCGGGACGGGCTCCTGGGCTTAACTGTCTGGGACTCGGAGTCGGCGTTGTTACTTTGAGTAAA  
 TTAGAGTGTTCAAAGCAAGCCTTCGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCT  
 GGCCTATCTTGTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTTCGTA

TTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTGCGCA  
 AGGATGTTTTTCATTGATCAAGAACGAAAGTTGTGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTTCGTAGT  
 CTC AACATAACGATGCCGACTAGGGATTGGCAGGTGTTTCATTGATGACCCTGCCAGCACCTT  
 ATGAGAATCAAAGTTTTTGGTTTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGCTGAAACTTAAGAATTGACG  
 AAGCACACCAGCGTGAGCCTGCGCTTATTTGACTCACACGGTAAACTTACAGTCAGACACGGGG  
 AGATTGACGATTGGAAGCTTCTTTTCTTGAATC

>PY04

GGAGTCATTTACGCACGGTTGCGATAGTAGCCCTGGAGCTAATGATGTGCGTAAATCCCGACTT  
 CTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACTCTTGGCGAATCATG  
 ATA ACTTCACGAATCGCACGGCCTCGCGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAAC  
 TTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTTCGATT  
 CGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC  
 AATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCCTTTGGTCTGGTAATTGGA  
 ATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGTATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTT  
 GGGTGGGTGTCGCCGGTCTGCCTCTGGTATGTACTGGCGCTGCTCACCTTTCTGCCGGGGACG  
 GGCTCCTGGGCTTAACTGTCTGGGACTCGGAGTCGGCGTTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGT  
 TCAAAGCAAGCCTTCGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCT  
 TGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTTCGTATTTTCATTGT  
 CAGAGGTGAAATTCCTTGGATTTATGAAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTT  
 TCATTGATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTTCGTAGTCTCAACCAT  
 AAACGATGCCGACTAGGGATTGGCAGGTGTTTCATTGATGACCCTGCCAGCACCTTATGAGAAA  
 TCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGA  
 AGGGCACACAGGCGTGGAGCTGGCGGCTAATTTGACTCACACGGAAACTACAAGTCAGACCCGG  
 GGAGATGACGATGAGAGCTCTTTCTGATTCGTGGGTGGTGGTGCATGCGTCTAGTGGGTGGCT  
 GCTGCTCGCGCAGGTTGATCACA

>PY05

GAGTCGTAGTGTCTCAAGATTATGCCATGCATAACAAGGTTTCCGTAGGTGTCTCAAAGATGGA  
 ACTCTTTACTCCGATGACCGTATTAGTGCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGA  
 AGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACTCTTGGTGAATCATGATAAC  
 TTCACGAATCGCATGGCCTCGAGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCCG  
 ATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTTCGATTCCGGA  
 GAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATC  
 CCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCCTTTGGTCTGGTAATTGGAATGA  
 GTACAATCTAAATCCCTTAACGAGTATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA

ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGT  
GGGTGTCGCCGGTCTGCCTCTGGTATGTAAGTGGCGCTGCTCACCTTTCTGCCGGGGACGGGCTC  
CTGGGCTTAACTGTCTGGGACTCGGAGTCGGCGTTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAA  
GCAAGCCTTCGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTTG  
GTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTTCGTATTTTCATTGTCAGAG  
GTGAAATTCTTGATTTATGAAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTTCATT  
GATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACG  
ATGCCGACTAGGGATTGGGCTGTGTTTTATTGATGACCCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCAA  
GTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGC  
ACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCCAGAC  
ACGGGGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTCTTGATTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTT  
TTAGTTGGTGGGTTGCCCTGTGAGGTTGATTCGGTAACGAACGAGACCTCCGCTGCTAAATA  
GTCACGCGCACCTCCGGGTGCACGCCTGACTTCTTAGAGGGACTACCGGCGATTAGTCGGTTGG  
AAGTGGGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACT  
GATGCATTCAACGAGCCTATCCTTGGCCGAGAGGTCCGGGTAATCTTTGAACTGCATCGTGAT  
GGGATAGATTATTGCAATTATTAGTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCATGTCATCAGC  
ATGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTGTACACACCGCCCGTCTCCTACCGTCTCAAGGATTA  
ACCCATGCATAACAAGGTTTCCGTAGGTGTCTCAAGGATTAAGCCATGCATAACAAGGTTACCG  
TAGGACTCAGATGACCC



## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล ปीलดา เชิดชูเกียรติศักดิ์  
 ที่อยู่ 331 หมู่ที่ 20 ถ.สุมนามัย ต.บ้านไผ่  
 อ.บ้านไผ่ จ.ขอนแก่น 40110  
 เบอร์โทรศัพท์ 087-7630604  
 อีเมลล์ ch.peelada@hotmail.com



สถานศึกษา มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จ. นครปฐม

## ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2552 - 2556 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จ. นครปฐม  
 พ.ศ. 2556 - 2559 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จ. นครปฐม

## ทุน/รางวัล

- พ.ศ. 2556 ทุนช่วยเหลืองานวิจัยสำหรับนักศึกษาบัณฑิตที่ผ่านการสอบโครงร่างงานวิจัยภายใน 1 ปีการศึกษา  
 พ.ศ. 2558 รางวัลนักศึกษาที่สร้างชื่อเสียงให้แก่คณะวิทยาศาสตร์  
 รางวัลชมเชยการประกวดภาพสัทร่ายและแพลงก์ตอน ในงานประชุมวิชาการสัทร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 โรงแรมนารายณ์ กรุงเทพฯ

## งานประชุมวิชาการ

นำเสนอผลงานแบบบรรยาย หัวข้อเรื่อง “การประเมินความสามารถของสัทร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่แยกจากดินเพื่อการผลิตคีโตแคโรทีนอยด์” งานประชุมวิชาการสัทร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 วันที่ 25- 27 มีนาคม 2558 โรงแรมนารายณ์ กรุงเทพมหานคร

Poster Presentation in the title “Enhancement of biomass and ketocarotenoid production in sarcinoid alga *Chlorosarcinopsis* PY02 isolated from arid soil of western Thailand by nitrogen deprivation under mixotrophic culture” 5<sup>TH</sup> International conference on Algal Biomass Biofuels and Bioproducts 7-10 June 2015 Paradise point resort and spa, San Diego, USA