



ผลของอุณหภูมิและการเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอนต่อมวลชีวภาพและการสะสม แคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Scenedesmus* PY215

Temperature effect and two-step cultivation on biomass production and carotenoid accumulation in green microalga *Scenedesmus* PY215

กวินนาฏ เสืออบ¹ และ ัญณันท์ วรรณธง บรอกเคิลเฮิร์สต์^{1*}

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ถนนราชมรรคาใน อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

Corresponding Author, E-mail: twbrocklehurst@gmail.com

Received: 13 June 2018 | Revised: 22 November 2018 | Accepted: 22 January 2019

บทคัดย่อ

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตที่นิยมนำมาใช้เป็นแหล่งศึกษาการสังเคราะห์และผลิตสารแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ เนื่องจากแคโรทีนอยด์กลุ่มนี้มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงมากจึงได้รับความสนใจมากกว่ากลุ่มอื่น ๆ งานวิจัยนี้ได้ทำการวินิจฉัยชนิดของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กไอโซเลท PY215 ที่แยกได้จากดินโป่งยุบ จ.ราชบุรี ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยาโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *tufA* ผลการวินิจฉัยพบว่า สาหร่ายชนิดนี้คือ *Scenedesmus bijugus* การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสร้างมวลชีวภาพและการสะสมแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายชนิดนี้พบว่า *S. bijugus* PY215 (PY215) จัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายชอบอุณหภูมิปานกลาง เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีที่ 25 และ 35 องศาเซลเซียสเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะмикโครฟ (ให้แสง + อะซิเตตอาหารเหลว TAP) โดยเก็บเกี่ยวผลผลิตมวลชีวภาพได้เท่ากับ 0.84 และ 0.82 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อลิตรตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ในอาหาร TAP ที่ลดปริมาณธาตุไนโตรเจนเหลือเพียง 10% พบว่าสภาวะดังกล่าวกระตุ้นให้สาหร่ายมีการสะสมชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มมากขึ้น จากการตรวจสอบชนิดของแคโรทีนอยด์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวน้ำมันพบว่า สาหร่าย PY215 สะสมแคโรทีนอยด์ชนิดเบต้าแคโรทีน เอคินีโนน แคนธาแซนธิน และแอสตาแซนธิน โดยสามารถผลิตแคโรทีนอยด์รวมได้สูงถึง 448.74 ± 18.70 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (สูงกว่า 1.19 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) ในขณะที่ส่งผลให้มวลชีวภาพของสาหร่ายลดลงถึงเกือบ 4 เท่า เมื่อทดลองใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอน (25 องศาเซลเซียส ในอาหาร TAP ปกติแล้วย้ายไปอาหารสูตรลดไนโตรเจน) พบว่า สาหร่าย PY215 สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายได้มากขึ้นทั้งในอาหารที่ลดไนโตรเจนเหลือร้อยละ 50 และที่ไม่มีไนโตรเจน เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (เพาะเลี้ยงต่อเนื่องในอาหาร TAP) จึงอาจนำเทคนิคนี้มาใช้เพิ่มศักยภาพของการผลิตแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่าย PY215 ได้

ABSTRACT

Microalgae are considered the principal source for secondary carotenoids in both pigment biosynthesis and production. These carotenoids possess potent antioxidant activity hence they are more favorable to others. In this study, the green microalga PY215, from Pong Yoob soil (Ratchaburi), was isolated and identified. Algal identification by morphological characteristics and molecular trait, using a partial sequence of *tufA* gene, indicated that PY215

alga is *Scenedesmus bijugus*. The temperature effect on biomass production and carotenoid accumulation were also investigated. This alga is classified as a mesophilic alga due to its well propagation under mixotrophic condition (light/acetate in liquid TAP) at 25°C and 35°C with the obtained dry cell of 0.84, 0.82 gDW. l⁻¹, respectively. After cultivation of *S. bijugus* PY215 (PY215) in nitrogen-reduced TAP (to 10%), the alga accumulated a greater number of carotenoid derivatives and content. The accumulation of secondary carotenoids such as β -carotene, echinenone, canthaxanthin and astaxanthin was revealed by thin layer chromatography with a total carotenoid production of 448.74 $\pm$ 18.70 μ g. gDW⁻¹ (1.19-fold in comparison to a control). In adequate, biomass reduction was prominently obtained (less than 4-fold). Thereafter, two-step cultivation was employed in order to maximize the total carotenoid production in PY215. Higher biomasses were mixotrophically achieved from the two-step cultivations (25°C in TAP then nitrogen reduction TAP) in both 50% and 0% nitrogen conditions compared to the control (continuously cultivated in TAP) subsequently potentially enhancing the total carotenoid production in PY215.

คำสำคัญ: ผลของอุณหภูมิ แครโทีนอยด์ แครโทีนอยด์ทุติยภูมิ *Scenedesmus bijugus* การเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอน

Keywords: Temperature effect, Carotenoid, Secondary carotenoid, *Scenedesmus bijugus*, Two-step cultivation

บทนำ

แครโทีนอยด์เป็นสารที่มีสีส้ม เหลือง และแดง แบ่งเป็น 2 ชนิดหลักคือ แครโทีน (carotene) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) สารกลุ่มนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งแก่พืชและสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic organism) โดยทำหน้าที่สำคัญเป็น accessory light-harvesting pigments ที่ช่วยเก็บเกี่ยวพลังงานจากแสงเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช (photosynthesis) และยังมีหน้าที่ปกป้องพืชจากการถูกทำลายด้วยแสง (photodamage) (Alcaino et al., 2016) นอกจากความสำคัญต่อพืชแล้ว แครโทีนอยด์ยังเป็นสารให้สีจากธรรมชาติ (natural colourant) แก่สัตว์น้ำและสัตว์ปีกหลายชนิดในระดับอุตสาหกรรม เช่น ปลาแซลมอน กุ้ง ปู ไก่ รวมถึงช่วยให้เกิดสีแดงที่จำเป็นต่อการผสมพันธุ์ของนกฟลามิงโกในธรรมชาติ (Henríquez et al., 2016) ยิ่งไปกว่านั้น ยังมีการนำแครโทีนอยด์บางชนิดมาใช้ประโยชน์ในทางเภสัชศาสตร์และโภชนศาสตร์ เนื่องจากความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่มีประสิทธิภาพสูงของสารกลุ่มนี้ในการลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งชนิดต่าง ๆ และส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Das et al., 2007) อย่างไรก็ตาม สัตว์และมนุษย์นั้นไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์สารกลุ่มนี้ได้ (Barker and Pilbeam, 2015) จึงทำให้จำเป็นต้องได้รับจากอาหารที่บริโภคเข้าไปเพียงเท่านั้น ด้วยเหตุนี้แครโทีนอยด์จึงเป็น

ที่ต้องการของตลาดเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น (Pulz and Gross, 2004)

วิธีการสังเคราะห์แครโทีนอยด์ (carotenoid biosynthesis pathway) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสง รวมไปถึงจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียและฟังไจบางชนิด เช่น ราและยีสต์ (Goodwin, 1972) โดยมีรายงานว่า สิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างและสะสมสารกลุ่มนี้ได้มาก คือ สาหร่ายขนาดเล็กหรือ microalgae หลายสกุล เช่น *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Muriellopsis* และ *Haematococcus* (Pulz and Gross, 2004) และเนื่องจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว อีกทั้งยังไม่มีรายงานการสร้างสารที่เป็นพิษต่อมนุษย์ สิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้จึงได้รับความสนใจนำมาใช้ในการเป็นแหล่งผลิตสารกลุ่มแครโทีนอยด์ในระดับอุตสาหกรรม (Chacón-Lee and González-Mariño, 2010; Pulz and Gross, 2004) อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อผลิตแครโทีนอยด์ในระดับอุตสาหกรรมนั้นยังมีข้อจำกัดที่สำคัญหลายประการ เช่น สาหร่าย *H. pluvialis* ที่มีผลการวิจัยระบุว่าสามารถสะสมโคแคโรทีนอยด์มูลค่าสูงได้มากกว่าสาหร่ายชนิดอื่นนั้น (Leu and Boussiba, 2014; Olaizola and Huntley, 2003) เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส (Fan et al., 1994) ซึ่งค่อนข้างต่ำ จึงไม่เหมาะกับการเพาะเลี้ยงในสภาพอากาศของประเทศเขตร้อนเช่นประเทศไทยที่มีปริมาณแสงและอุณหภูมิเฉลี่ยค่อนข้างสูง อีกทั้งมี

รายงานว่าการเพาะเลี้ยงมักเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ง่าย (Leu and Boussiba, 2014) เหตุเหล่านี้ล้วนเป็นอุปสรรคที่ส่งผลต่อการเพิ่มต้นทุนของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ในระดับอุตสาหกรรมทั้งสิ้น ประเทศไทยซึ่งอยู่ในภูมิภาคเขตร้อนชื้นมีแสงแดดตลอดปี และมีแหล่งน้ำที่สมบูรณ์ ปัจจัยที่กล่าวมาเหล่านี้ส่งผลให้ประเทศไทยเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นอย่างมาก อีกทั้งยังมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงและมีการคาดการณ์ว่ายังมีสิ่งมีชีวิตที่น่าสนใจอีกหลายชนิดที่ยังไม่ถูกค้นพบรวมถึงสาหร่ายขนาดเล็ก (Baimai, 2010) คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการแยกเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาศึกษาสาหร่ายจากจุดเก็บตัวอย่างในท้องถิ่นที่ชื่อว่า โป่งยุบ ซึ่งมีลักษณะทางธรณีที่ค่อนข้างแห้งแล้งและถูกกัดกร่อนด้วยแรงน้ำและลมเป็นเวลานาน จนเกิดการยุบตัวลงกลายเป็นโตรกผาลึกและเสาดินตะกอนจำนวนมาก ดินที่พบในบริเวณดังกล่าวมีลักษณะเป็นดินเหนียวปนทรายไม่เหมาะแก่การใช้เป็นพื้นที่เกษตร (กรมทรัพยากรธรณี, 2554) หากสามารถแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ผลิตคลอโรฟิลล์ได้น้อยได้ปริมาณสูงจากบริเวณพื้นที่ดังกล่าว น่าจะนำมาซึ่งสาหร่ายสายพันธุ์ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงกว่าสาหร่ายที่แยกได้จากดินทั่วไป ผลการทดลองเพื่อหาสภาวะเลี้ยงที่เหมาะสมและระดับการสะสมคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายที่เกิดจากการศึกษาวิจัยนี้ย่อมสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปสู่การศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับศักยภาพการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อการผลิตคลอโรฟิลล์ภายใต้สภาพภูมิอากาศของประเทศไทยในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

สาหร่าย *Scenedesmus* PY215 เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่แยกได้จากดินตัวอย่างที่เก็บจากโป่งยุบ อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ที่คณะผู้วิจัยทดสอบเบื้องต้นแล้วพบว่า สาหร่ายไอโซเลตนี้มีความสามารถในการผลิตและสะสมสารจำพวกคลอโรฟิลล์หลายชนิด ได้แก่ ลูทีน (lutein) อโดนิแซนธิน (adonixanthin) แคนธาแซนธิน (canthaxanthin) และแอสตาแซนธิน (astaxanthin) จึงเป็นที่มาของจุดมุ่งหมายหลักของการวิจัยที่จะศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Scenedesmus* PY215 เพื่อทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มมวลชีวภาพและปริมาณการสะสมคลอโรฟิลล์รวม จากนั้นทดสอบเทคนิคการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบ 2 ขั้นตอนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตคลอโรฟิลล์ ทั้งนี้ด้วยมุ่งหวังว่า หากสาหร่ายสายพันธุ์นี้สามารถเจริญเติบโตได้

ภายใต้อุณหภูมิสูงตามสภาพแวดล้อมของประเทศไทย ในขณะเดียวกันที่สามารถผลิตคลอโรฟิลล์ได้น้อยได้ปริมาณมาก ย่อมจะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงและการวิจัยเชิงลึกในสาหร่ายเพื่อเป็นแหล่งผลิตคลอโรฟิลล์จากธรรมชาติต่อไป

วิธีการศึกษา

การเก็บรักษาสาหร่ายสายพันธุ์สาหร่าย PY215 และการจัดจำแนก

สาหร่าย PY215 เป็นสาหร่ายที่คัดแยกจากดินโป่งยุบ ต.ท่าเคย อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี ได้รับการดูแลและเก็บรักษาไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร โดยทำการเก็บรักษาบนอาหารแข็งสูตร TAP หรือ tris acetate phosphate (Harris, 2013) ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 55-60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาทีตลอดเวลาในการศึกษาวิจัยจะนำสาหร่ายมาถ่ายเชื้อลงอาหารเหลวสูตรเดียวกันเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น (starter culture) โดยสภาวะของการเพาะเลี้ยงตลอดการทดลองนี้ดำเนินการโดยให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 55-60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาทีตลอดเวลา อาหารแข็งใช้ขึ้น 1.5 % ส่วนในอาหารเหลวจะทำการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ตามระดับอุณหภูมิที่ระบุตามการทดลองแต่ละหัวข้อ

การจัดจำแนกสาหร่าย PY215 ทำได้โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา ด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงร่วมกับเอกสารประกอบการจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายสีเขียว (Groover and Bold, 1969; Herndon, 1958; Prescott, 1962; Wehr et al., 2015) และการสกัดดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *tufA* (Fučíková et al., 2010) จากนั้นนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนดังกล่าวมาจัดเรียงเปรียบเทียบ (BLAST) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ตามที่บรรยายไว้ในงานวิจัยของ Dyo และคณะ (2013)

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อมวลชีวภาพและการสะสมคลอโรฟิลล์ของสาหร่าย PY215

ศึกษาผลเบื้องต้นของอุณหภูมิต่อการสร้างมวลชีวภาพของสาหร่ายด้วยเทคนิค Spot test ที่ปรับปรุงจาก Cherdchuk-keattisak และคณะ (2018) โดยหยด สาหร่ายปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหยดลงบนอาหารแข็งสูตร TAP แล้วบ่มที่อุณหภูมิ

25 30 35 38 และ 40 องศาเซลเซียส โดยให้แสงตลอดเวลาที่ระดับความเข้มแสงในช่วง 55-60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายทุกวันโดยถ่ายรูปด้วยกล้องดิจิทัล จากนั้นนำระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย PY215 ที่ได้จากการทดลองนี้ไปทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อมวลชีวภาพและการสะสมแคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร TAP ที่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญเติบโตโดยวัดค่า optical density ที่ 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำข้อมูลที่ได้สร้าง growth curve ส่วนการศึกษามวลชีวภาพ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร) ที่สาหร่ายสร้างขึ้นทำได้โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3500 รอบต่อวินาที เพื่อเก็บเซลล์แล้วนำไปอบที่ 55 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสาหร่ายมีน้ำหนักคงที่

การศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอนต่อมวลชีวภาพและการสะสมแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย PY215

เพาะเลี้ยงสาหร่าย PY215 ในอาหารเหลวสูตร TAP ปริมาตร 400 มิลลิลิตร (ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร จำนวน 5 ขวด) โดยใช้ระดับอุณหภูมิที่ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตดีที่สุดจากการทดลองก่อนหน้านี้จนสาหร่ายเข้าสู่ระยะปลายของ exponential phase นำเซลล์สาหร่ายทั้งหมดมารวมกันก่อนนำไปแยกทดสอบการเลี้ยงในขั้นตอนที่ 2 (ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร) โดยนำเซลล์สาหร่ายที่เก็บได้จากการเลี้ยงขั้นตอนแรกปริมาณ 100 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ 3500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ที่เก็บได้ 3 ครั้ง ด้วยอาหารใหม่ที่จะย้ายสาหร่ายไปเลี้ยง ได้แก่ อาหารเหลวสูตร TAP ที่มีไนโตรเจนเหลือเพียง 50% (TAP 50%N) และอาหารเหลวสูตร TAP ที่ไม่มีไนโตรเจน (TAP -N) แต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 3 ซ้ำ (อุณหภูมิ ปริมาณแสงและความเร็วการเขย่าเช่นเดียวกับการเลี้ยงขั้นตอนแรก) ทำการเพาะเลี้ยงในขั้นตอนที่ 2 จนกว่าสาหร่ายชุดใดชุดหนึ่งของการทดลองเปลี่ยนสีไปเป็นสีส้มชัดเจน จากนั้นทำการเก็บเซลล์เพื่อวัดปริมาณมวลชีวภาพและแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายสะสม โดยมีชุดควบคุม คือ สาหร่ายปริมาณ 100 มิลลิลิตรจากการเลี้ยงขั้นตอนแรกที่ไม่ผ่านการเก็บและล้างเซลล์

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ในสาหร่าย

การสกัดรงควัตถุทำได้โดยนำตัวอย่างแห้งของสาหร่าย 20 มิลลิกรัม บดให้ละเอียดร่วมกับทราย (sea sand) ด้วยโกร่งทำการสกัดรงควัตถุในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ด้วยการเติมน้ำกลั่น 400 ไมโครลิตร และ methanol 400 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที เติมน้ำ chloroform ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และผสมสารสกัดอีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนล่างไปกำจัดตัวทำละลายโดยตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควันที่บ่มเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและปลดแสงจนกว่าจะทำการวิเคราะห์

การศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์ด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) ทำตามวิธีของ Grung และคณะ (1992) เพื่อคำนวณหา R_f (retention factor) โดยเทียบกับ β -carotene, canthaxanthin มาตรฐาน และสารสกัดจากสาหร่าย *H. pluvialis* ยี่ห้อ NUTRAKAL® มี mobile phase คือ acetone:hexane (25:75 v/v) และมี silica gel plate ทำหน้าที่เป็น stationary phase ส่วนการศึกษาปริมาณของแคโรทีนอยด์รวม (total carotenoid) ทำได้โดยเติม petroleum ether 1 มิลลิลิตร ลงในสารสกัดสาหร่ายที่แห้งสนิทแล้ว ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เพื่อกำจัดฝุ่นละอองและส่วนที่ไม่ละลายให้ตกตะกอน นำสารละลายส่วนใสมาเติม petroleum ether ให้ได้สารละลายที่มีปริมาตรรวม 2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470, 644 และ 662 นาโนเมตร โดยใช้ petroleum ether เป็น blank จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณ total carotenoid ตามสมการของ Lichtentaler และ Wellburn (1987)

$$C = \frac{(1000A_{470}) - (1.280(10.05A_{662} - 0.766A_{644})) - 56.7(16.37A_{644} - 3.140A_{662})}{230}$$

เมื่อ C คือ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (Total carotenoid) ในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ของสาหร่าย และ A_{470} , A_{644} และ A_{662} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470, 644 และ 662 นาโนเมตร ตามลำดับ

การวิเคราะห์ชนิดของแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

เซลล์สาหร่าย PY215 ทั้งที่สภาวะสีเขียวและสีแดงซึ่งได้รับความอนุเคราะห์การตรวจวัดชนิดของแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC จาก Prof. Paul D. Fraser, School of Biological Sciences, Royal Holloway University แห่งสหราชอาณาจักร ตามวิธีการที่อธิบายไว้ในงานวิจัยของ Nogueira และคณะ (2013)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างและจัดกลุ่มของข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ (จำนวนไม่น้อยกว่า 3 ซ้ำในแต่ละการทดลอง) ใช้วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย one-way ANOVA และ post hoc test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ผลการศึกษาและการวิจารณ์

ลักษณะทางสัณฐานและการจัดจำแนกสาหร่าย PY215

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า สาหร่าย PY215 เป็นสาหร่ายที่มีสองลักษณะ (dimorphic algae) คือ ภายใต้สภาวะเลี้ยงเดียวกันสามารถพบลักษณะเซลล์ทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและโคโลนี (รูปที่ 1A และ 1B) โดยเซลล์เดี่ยวมีลักษณะทั้งแบบค่อนข้างกลมและรี ขนาดของเซลล์เฉลี่ย 5.36×4.40 ไมโครเมตร ภายในเซลล์พบแวคิวโอลขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ พบไฟรีนอยด์มีลักษณะกลมใสเพียง 1 ไฟรีนอยด์อยู่กลางค่อนข้างปลายด้านหนึ่งของเซลล์ ไม่พบแฟลกเจลลา (รูปที่ 1A) ส่วนโคโลนีนั้นประกอบด้วยเซลล์จำนวน 4 เซลล์เรียงต่อกันด้านข้างตามความยาวของเซลล์ ในส่วนของลักษณะทางสรีรวิทยาของสาหร่าย PY215 ที่น่าสนใจประการหนึ่งคือ เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร TAP เป็นระยะเวลาประมาณ 30 วัน สาหร่ายจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองส้ม และเปลี่ยนสีเร็วขึ้น (20 วัน) เมื่อเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีปริมาณไนโตรเจนลดเหลือเพียงร้อยละ 10 (TAP10%N) (รูปที่ 1B) ผู้วิจัยคาดว่า การเปลี่ยนสีนั้นเกิดจากการสะสมรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์สาหร่าย ซึ่งภายหลังผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค TLC ตรวจสอบเปรียบเทียบสารสกัดจากสาหร่ายกลุ่มนี้ระหว่างตัวอย่างทั้งสีเขียวและสีแดงเทียบกับแคโรทีนอยด์มาตรฐาน ผลการทดลองสามารถยืนยันได้ว่า สาหร่าย PY215 ที่

ระยะเซลล์สีแดงมีการสร้างและสะสมรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์บางชนิดที่ต่างไปจากระยะที่เซลล์มีสีเขียว

หลังจากศึกษาและรวบรวมข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของสาหร่าย PY215 ตามเอกสารของ Prescott (1962) และทำการศึกษาทางด้านอนุชีววิทยาด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *tufA* ความยาว 896 คู่เบส ของสาหร่าย PY215 กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *tufA* ของ สาหร่าย PY215 (GenBank Accession number: MG902954) มีความเหมือนสูงสุดกับสาหร่าย *Scenedesmus bijugus* (Accession number: KT778005.1) ที่ร้อยละ 99%

ผลของอุณหภูมิต่อมวลชีวภาพและการสะสมแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย PY215

จากการทดลองเบื้องต้นเพื่อทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงของสาหร่าย *Scenedesmus* สายพันธุ์ PY215 (ต่อไปจะเรียกว่าสาหร่าย PY215) โดยเทคนิค spot test บนอาหารแข็งสูตร TAP ด้วยสภาวะмикโซโทรฟที่อุณหภูมิต่างกัน 5 ระดับ เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่า สาหร่าย PY215 เจริญได้ดี ไม่แตกต่างกันที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 38 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้แต่ไม่ได้อย่างเห็นได้ชัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (รูปที่ 1C) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบการเจริญในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 25 35 และ 38 องศาเซลเซียส พบว่า มวลชีวภาพของสาหร่ายที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียสมีค่าไม่แตกต่างกัน (0.84 และ 0.82 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อลิตร) และมีค่ามากกว่ามวลชีวภาพจากสาหร่ายที่เลี้ยงที่ 38 องศาเซลเซียส (0.49 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงในกราฟแท่ง (รูปที่ 1D)

ผลที่เกิดจากการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย PY215 ทั้งในอาหารเหลวและแข็งชี้ให้เห็นถึงอิทธิพลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากอุณหภูมิเกี่ยวข้องกับโดยตรงกับอัตราการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายในเซลล์ การนำธาตุอาหารและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่เซลล์ (Ahlgren, 1987) ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมาล้วนส่งผลต่อเนื่องไปถึงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายทุกชนิด (Gibson and Foy, 1989) โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายอยู่ในช่วง 15 ถึง 30 องศาเซลเซียส หากเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงกว่านี้อาจ

เกิดอันตราย และ/หรือ ส่งผลให้เซลล์สาหร่ายตาย (Singh and Singh, 2015) โดยส่วนหนึ่งของผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของสาหร่าย PY215 ในการเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ กว้าง คือ 25 - 40 องศาเซลเซียส อีกทั้งเจริญได้ดีที่ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าอุณหภูมิที่สาหร่ายทั่วไปเจริญ และสามารถมีชีวิตอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 38 และ 40 องศาเซลเซียส ดังนั้น จึงสามารถจัดสาหร่ายชนิดนี้ให้อยู่ในกลุ่ม Mesophilic algae ได้ตามช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (Willey, 2008)

เมื่อพิจารณากราฟรูปแบบการเจริญเติบโต (รูปที่ 1E) พบว่า สาหร่าย PY215 ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียสมีรูปแบบการเจริญที่คล้ายคลึงกัน มีการเจริญที่เร็วและผลิตชีวมวลสูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส กล่าวได้ว่า ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย PY215 อยู่ที่ 25 และ 35 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการผลิตชีวมวล 0.14 กรัมต่อลิตรต่อวัน (รูปที่ 1D และ 1E) ซึ่งพบว่าสูงกว่าสาหร่ายที่อยู่ในสกุลเดียวกันภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟฟิงที่พบในรายงานของ Xin (2011) ซึ่งทำการทดลองพบว่า *Scenedesmus* sp. LX1 สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 10 ถึง 30 องศาเซลเซียส และสร้างมวลชีวภาพสูงสุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (0.10 กรัมต่อลิตรต่อวัน) เมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Haematococcus pluvialis* ซึ่งเป็นสาหร่ายที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตแอสตาแซนทีนในระดับอุตสาหกรรม พบว่า สาหร่าย *H. pluvialis* มีอัตราการเจริญที่ต่ำ และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 20-28 องศาเซลเซียส (Fan et al., 1994; Giannelli et al., 2015) หากเปรียบเทียบกับ *Chlorella vulgaris* ซึ่งเป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่เจริญเติบโตเร็วมากด้วยความสามารถในการผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.254 กรัมต่อลิตรต่อวัน (เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) จึงถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการผลิตกรดไขมัน (Liang et al., 2009) เมื่อเปรียบเทียบกับพบว่าสาหร่าย PY215 มีการเจริญที่ต่ำกว่า *C. vulgaris* เกือบ 2 เท่า

ผลของสภาวะขาดไนโตรเจนต่อมวลชีวภาพและการสะสมแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย PY215

จากผลการทดลองเบื้องต้นด้วยเทคนิค spot test แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่าย PY215 แต่ไม่กระตุ้นการสะสมแคโรทีนอยด์เนื่องจากไม่พบการเปลี่ยนสีของโคโลนีสาหร่าย (รูปที่ 1C) ผู้วิจัยจึงทำการทดลอง

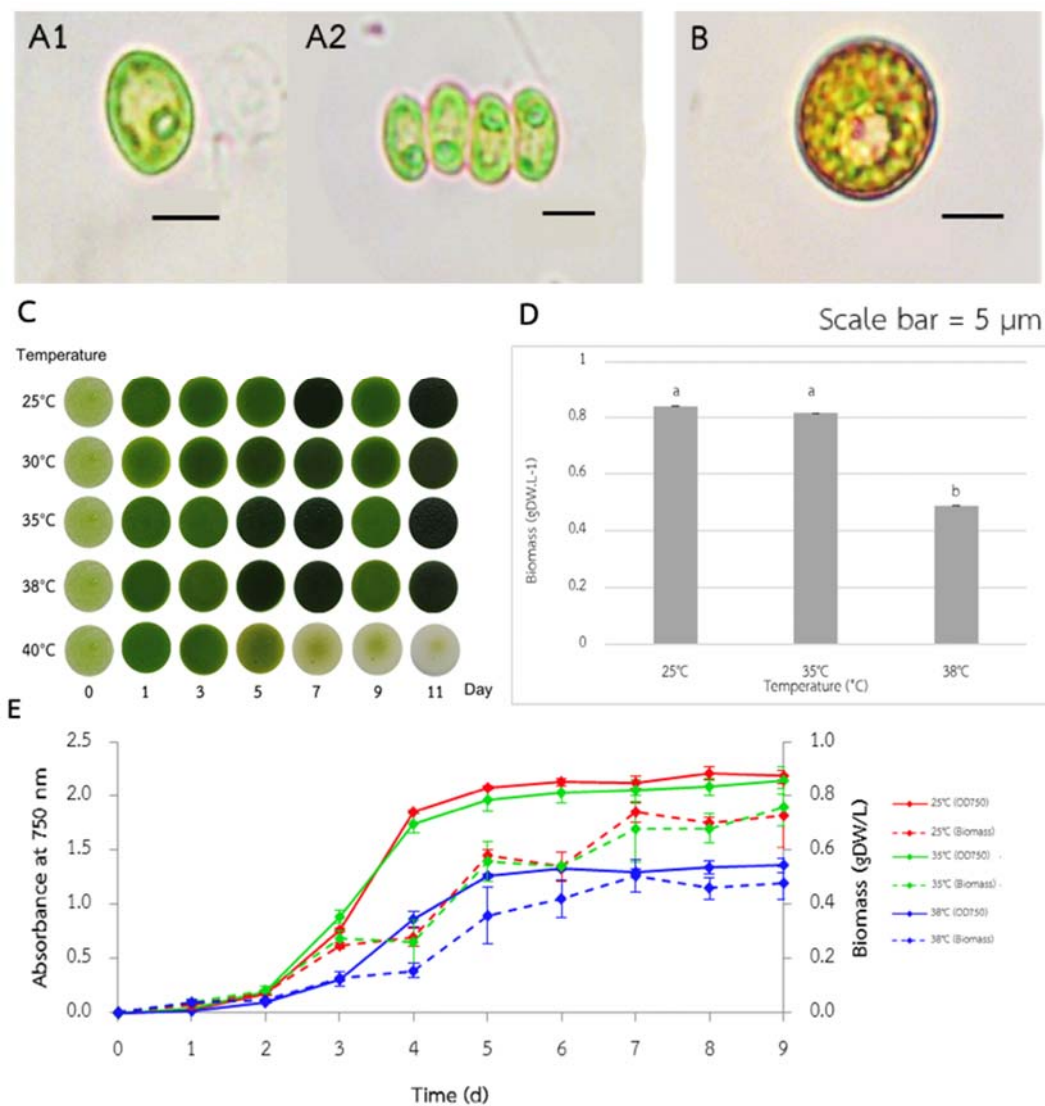
เพิ่มปัจจัยกระตุ้นโดยการลดปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงสาหร่าย ซึ่งทำให้เกิดปรากฏการณ์การเปลี่ยนสีของโคโลนีจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองส้มของสาหร่าย PY215 (รูปที่ 2A) สามารถมองเห็นได้ชัดเจนด้วยตาเปล่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แถบควบคุม รูปที่ 2A) เมื่อสังเกตเพิ่มเติมถึงผลของระดับอุณหภูมิต่อการสะสมแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายชนิดนี้เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่ลดไนโตรเจนแล้ว กลับไม่สามารถระบุความแตกต่างของสีส้มได้เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า ความแตกต่างของรงควัตถุที่สาหร่ายผลิตและสะสมในแต่ละอุณหภูมิตรวจพบได้เมื่อเก็บเกี่ยวเซลล์แล้วนำมาวิเคราะห์ชนิดของรงควัตถุด้วยการสกัดสารสีแล้วแยกชนิดด้วยเทคนิค TLC ผลดังแสดงใน รูปที่ 2B

เมื่อทำการเปรียบเทียบสารสกัดจากสาหร่าย PY215 ในสภาพที่มีไนโตรเจนปกติกับสภาวะที่ปริมาณไนโตรเจนลดลงเหลือเพียงร้อยละ 10 (เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) กับสารมาตรฐานแคโรทีนอยด์ที่เป็นชนิดอ้างอิง ได้แก่ เบต้าแคโรทีน แคนธาแซนธินบิสซูทธี และสารสกัดจากสาหร่าย *H. pluvialis* ยี่ห้อ NUTRAKAL® ซึ่งมีแอสตาแซนธินเป็นรงควัตถุชนิดเด่น พบว่า การลดไนโตรเจนลงเหลือเพียงร้อยละ 10 กระตุ้นให้สาหร่าย PY215 ผลิตสารกลุ่มแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นจากปกติที่มีเพียง 2 ชนิด คือ เบต้าแคโรทีนและลูทีน (กลุ่มควบคุม ตัวอย่าง T รูปที่ 2B) สังเกตได้จากแถบสีของแคโรทีนอยด์ที่มีสีค่อนข้างแดงหลายแถบ (ตัวอย่าง T10 2B) ซึ่งมีค่า R_f ที่ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานแคนธาแซนทินและสารสีหลักที่พบในสารสกัดจากสาหร่าย *H. pluvialis* (ตัวอย่าง H รูปที่ 2B) ผลการทดลองนี้บ่งบอกได้เบื้องต้นว่า สาหร่าย PY215 สะสมสารแคโรทีนอยด์กลุ่มที่มีหมู่คีโตนโมเลกุลภายใต้สภาวะการลด (ขาดแคลน) ไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังพบว่าขนาดของแถบสีของลูทีนนั้นเล็กแสดงถึงปริมาณการสร้างและสะสมลูทีนที่ลดลง อีกทั้งแคโรทีนอยด์ชนิดเด่น (major pigment) เปลี่ยนจากลูทีนเป็นแคนธาแซนธิน

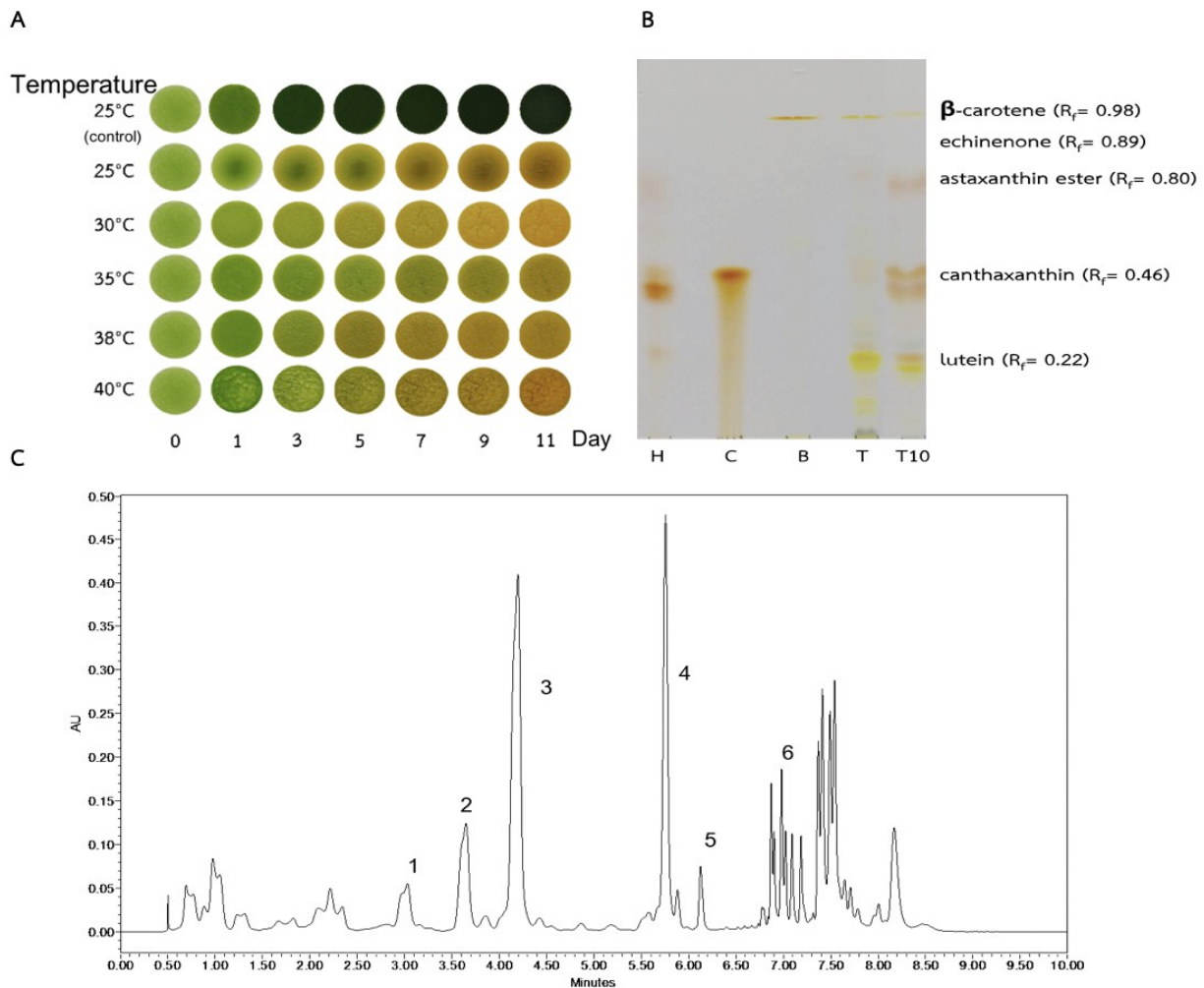
ในสภาวะการเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟฟิงที่มีปริมาณไนโตรเจนเพียงพอ (อาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนระดับปกติ) สาหร่าย PY215 สร้างลูทีนเป็นแคโรทีนอยด์ชนิดเด่น ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะทั่วไปที่พบในสาหร่ายสีเขียวหลายชนิดเช่น *Chlorella regularis* สายพันธุ์ S-50 (Sansawa and Endo, 2004), *Muriellopsis* sp. (Del Campo et al., 2000) และ *Scenedesmus* sp. สายพันธุ์ CCALA 1074 (Přibyl et al.,

2016) เมื่อทำการตรวจสอบแคโรทีนอยด์ในสาหร่าย PY215 โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เปรียบเทียบกับเทคนิค TLC พบว่ามีผลสอดคล้องกัน (รูปที่ 2C) ซึ่งสามารถระบุชนิดของแคโรทีนอยด์กลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ได้เพิ่มเติมจากแคนธาแซนธิน อีก 4 ชนิด ได้แก่ แอสตาแซนธิน อะโดนิแซนธิน เอคิเนโนน และ ไฮดรอกซีเอคิเนโนน รวมเป็น 5 ชนิด โดยที่แคโรทีนอยด์สองชนิดแรกเป็นแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิในกลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นที่ต้องการในตลาดและมีราคาสูง (Boussiba, 2000; Guedes et al., 2011, Enzing et al., 2014) การตรวจพบสารแคโรทีนอยด์มากขึ้นทั้งชนิดและปริมาณในสารสกัดจากสาหร่าย PY215 ที่เลี้ยงบนอาหารที่ลดปริมาณธาตุไนโตรเจนมีเซลล์สีส้ม หรือกล่าวได้ว่าเป็นลักษณะของการสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์โดยเฉพาะแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ (secondary carotenoid) ภายใต้สภาวะเครียด ซึ่งเป็นลักษณะที่สามารถพบได้ในสาหร่ายสีเขียวหลายชนิด เช่น *Chlorella zofingiensis* (Mulders et al., 2015), *Scenedesmus* sp. (Pancha et al., 2014), และ *Muriellopsis* sp. (Del Campo et al., 2000) หลายงานวิจัยทำการทดลองและสรุปผลในทิศทางเดียวกันว่าการสร้างสารแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิของสาหร่ายสีเขียวเป็นกลไกการตอบสนองต่อความเครียดเพื่อป้องกันเซลล์จากอนุมูลอิสระอันเนื่องมาจากสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม และหลักการนี้เองที่ผู้ประกอบการเลี้ยงสาหร่ายนำไปประยุกต์ใช้ในการกระตุ้นให้สาหร่าย *H. pluvialis* สร้างแอสตาแซนธินเพิ่มขึ้นในระดับอุตสาหกรรมด้วยการลดสารประกอบไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง (Kakizono et al., 1992; Li et al., 2011)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณมวลชีวภาพของสาหร่าย PY215 จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่า ในอาหาร TAP 10%N สาหร่ายมีปริมาณมวลชีวภาพเท่ากับ 0.58 ± 0.05 กรัมต่อลิตรซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุมเกือบ 4 เท่า (2.00 กรัมต่อลิตร) ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์รวมที่ตรวจพบในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 377.43 ± 12.00 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่สาหร่าย PY215 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร TAP 10%N ตรวจพบปริมาณแคโรทีนอยด์รวมเท่ากับ 448.74 ± 18.70 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หรือเพิ่มขึ้น 1.2 เท่าจากชุดควบคุม (ตารางที่ 1) ผลการทดลองนี้ (มวลชีวภาพ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม และศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *S. bijugus* PY215) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhekisheva และคณะ (2011) ที่ทำการเลี้ยง สาหร่าย *H. pluvialis* ในอาหารที่ขาดไนโตรเจน ซึ่งพบว่ามวลชีวภาพของสาหร่ายลดลงเกือบ 3 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เมื่อขาดธาตุไนโตรเจนจึงส่งผลให้เซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่ลดลงและส่งผลโดยตรงต่อศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ (total carotenoid production) ดังนั้นเพื่อลดต้นทุนในการผลิตและเพิ่มศักยภาพการผลิตแอสตาแซนธิน จึงมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายหลากหลายวิธี ทั้งการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง (photobioreactor) การเลือกภูมิประเทศ ภูมิอากาศที่เหมาะสมและเอื้อต่อการเจริญเติบโตแก่สาหร่าย การเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอน (Aflalo et al., 2007; Li et al., 2011) รวมไปถึงการค้นหายีนส์สาหร่ายที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์มูลค่าสูงแต่เลี้ยงง่ายและมีอัตราการเจริญที่รวดเร็ว (Orosa et al., 2000)



รูปที่ 1 ผลของอุณหภูมิต่อ *S. bijugus* PY215 ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะмикโซโทรฟ A: สัณฐานวิทยาของ *S. bijugus* PY215; A1; เซลล์เดี่ยวสีเขียว A2; โคโลนีสีเขียว (TAP, 20 วัน), B; เซลล์สีส้มแดง (TAP10%, 20 วัน) scale bar = 5 μ m. C; การเจริญภายใต้ อุณหภูมิต่างๆของ *S. bijugus* PY215 บนอาหารแข็ง TAP เลี้ยงโดยเทคนิค spot test (สำหรับอายุ 11 วัน) D; มวลชีวภาพ ของ *S. bijugus* PY215 (TAP, 10 วัน) จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-Way ANOVA ($P < 0.05$) โดยค่า a, b และ c แสดงการจัดกลุ่มด้วยสถิติของ Duncan, E; กราฟการเจริญเติบโตของ *S. bijugus* PY215 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 35 และ 38 องศาเซลเซียส (เส้นทึบแสดง OD₇₅₀ และเส้นประแสดงมวลชีวภาพ)



รูปที่ 2 ผลของอุณหภูมิและสภาวะขาดแคลนไนโตรเจนต่อสาหร่าย *S. bijugus* PY215. A; การเปลี่ยนสีของโคโลนีของสาหร่าย *S. bijugus* PY215 บนอาหาร TAP 10% N (ชุดควบคุม; อาหาร TAP ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) B; Carotenoid profile ของสาหร่าย *S. bijugus* PY215 โดย thin layer chromatography (TLC); H= สารสกัดจาก *H. pluvialis* (แหล่ง astaxanthin) C=Canthaxanthin และ B= β -Carotene standard C; HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากสาหร่าย PY215 (TAP 10%N, อายุ 21 วัน) แคโรทีนอยด์ที่สำคัญได้แก่ 1; Astaxanthin, 2; Adonixanthin, 3; Lutein, 4; Canthaxanthin, 5; 3-OH-echinenone, 6; Echinenone.

ตารางที่ 1 มวลชีวภาพ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *S. bijugus* PY215

อาหาร	มวลชีวภาพ (gDW.l ⁻¹)	ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (μg.gDW ⁻¹)	ศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวม (μg.l ⁻¹)
TAP	2.00±0.28	377.43±12.00	756.25±121.69
TAP 10%N	0.58*±0.05	448.74*±18.70	260.7*±33.17

หมายเหตุ *แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากการวิเคราะห์ด้วย t-test

ศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวม (μg.l⁻¹) คำนวณได้จากมวลชีวภาพคูณกับปริมาณแคโรทีนอยด์รวมที่ได้จากการผลคูณของมวลชีวภาพ (gDW.l⁻¹) กับ แคโรทีนอยด์รวม (μg.gDW⁻¹)

ผลของการเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอนต่อมวลชีวภาพและการสะสมแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย PY215

จากการทดลองก่อนหน้านี้ทำให้ทราบถึงสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเพิ่มมวลชีวภาพของสาหร่าย *Scenedesmus* PY215 และสภาวะที่สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์มากขึ้น แต่อุปสรรคสำคัญอย่างหนึ่งที่พบคือ มวลชีวภาพของสาหร่าย PY215 ลดลงอย่างมากเมื่อสาหร่ายเจริญในอาหารที่มีปริมาณธาตุไนโตรเจนน้อย ถึงแม้ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งสาหร่ายจะเพิ่มขึ้นก็ตาม หากเมื่อพิจารณาศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวมแล้ว การลดไนโตรเจนในอาหารตั้งแต่เริ่มเลี้ยงสาหร่ายทำให้ศักยภาพการผลิตแคโรทีนอยด์ต่ำกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารปกติเนื่องจากการเก็บเกี่ยวมวลชีวภาพของสาหร่ายได้น้อยนั่นเอง ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอนมาประยุกต์ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ โดยขั้นแรกทำการเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่สาหร่ายเจริญได้ดีที่สุด (25 องศาเซลเซียส) เพื่อเพิ่มมวลชีวภาพก่อนเป็นเวลา 6 วัน จากนั้นจึงกระตุ้นให้สาหร่ายสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์โดยย้ายสาหร่ายลงสู่อาหารสูตร TAP ที่ลดปริมาณไนโตรเจนลง 50% (TAP 50%N) อาหารที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) และมีสาหร่ายที่ทำการเลี้ยงต่อเนื่องในสภาวะเดิม (TAP continue) เป็นชุดควบคุม

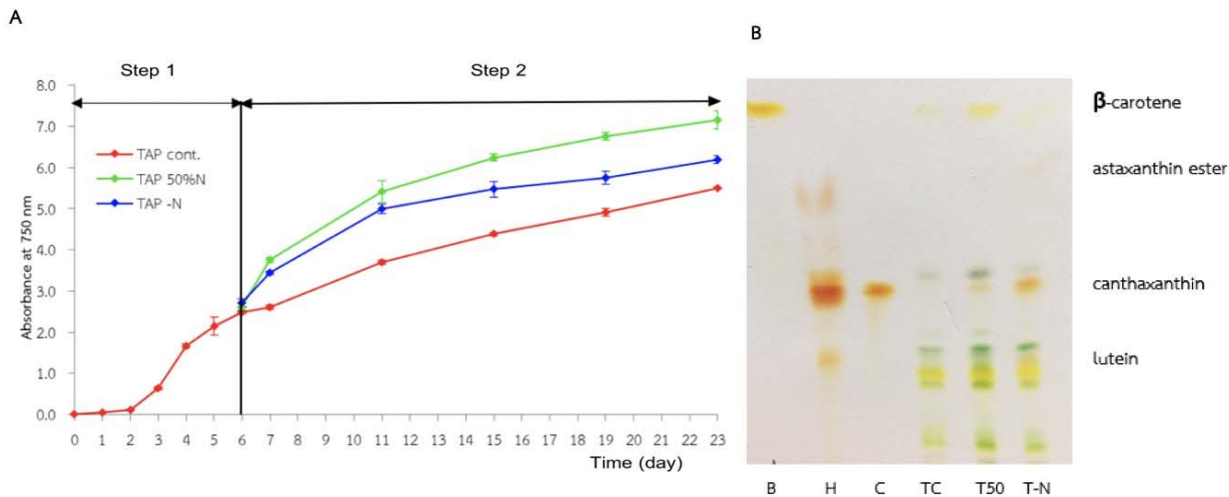
เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอนทำให้ *Scenedesmus* PY215 มีรูปแบบการเจริญดังแสดงในรูปที่ 3A จากผลการทดลองที่เกิดขึ้น เมื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์มวลชีวภาพของสาหร่าย PY215 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร TAP continue (ชุดควบคุม) เปรียบเทียบกับสาหร่ายที่ย้ายไปเลี้ยงในอาหาร TAP 50%N และ TAP-N พบว่า การขาดแคลนธาตุไนโตรเจนส่งผลให้มวลชีวภาพและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่าย PY215 เปลี่ยนไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยผู้วิจัยเก็บเกี่ยวมวลชีวภาพได้สูงสุดจากการเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP 50%N, TAP-N และชุดควบคุมตามลำดับ สาหร่ายมีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ชนิดเด่นเพียงสองชนิด คือ เบต้าแคโรทีนและลูทีนในชุดควบคุม ในขณะที่ตรวจพบการสะสมแคนธาแซนธินเพิ่มเติมในตัวอย่างสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP 50%N และอาหาร TAP-N ปริมาณแคนธาแซนธินในตัวอย่างที่เลี้ยงในอาหาร TAP-N มีมากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP 50%N สังเกตได้จากความเข้มของแถบแคนธาแซน-

ธินบนแผ่น TLC (รูปที่ 3B) อีกทั้งตรวจพบการลดลงของปริมาณเบต้าแคโรทีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นรวมถึงแคนธาแซนธิน (Ye et al., 2008) ในสาหร่าย PY215 ที่เลี้ยงในอาหาร TAP-N ซึ่งผลการทดลองสนับสนุนความเป็นไปได้ว่า แคนธาแซนธินที่เพิ่มขึ้นนี้มาจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารเบต้าแคโรทีนในวิถีการสังเคราะห์ผ่านการเติมหมู่คีโตที่วงแหวนเบต้าที่ปลายทั้งสองข้างเมื่อสาหร่ายถูกกระตุ้นด้วยความเครียดจากการขาดไนโตรเจน (Paniagua-Michel et al., 2012)

เมื่อพิจารณาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในการเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน พบว่า สาหร่ายที่ย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ลดปริมาณธาตุไนโตรเจนนั้นมีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมสูงขึ้นจากชุดควบคุมโดยสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP 50%N และ TAP-N มีค่าไม่แตกต่างกันแต่มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม 1.47 และ 1.83 เท่าตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในเซลล์สาหร่ายวันแรกของการย้าย พบว่า มีค่าสูงขึ้นถึง 5 เท่า ข้อมูลนี้มีแนวโน้มเป็นไปได้ในทางเดียวกันกับค่าศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวมซึ่งมีค่าสูงถึง 2287.94 และ 2692.06 ไมโครกรัมต่อลิตร เนื่องจากค่าศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวมนั้นคำนวณได้จากค่ามวลชีวภาพคูณกับค่าปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ซึ่งเมื่อมวลชีวภาพและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมีค่าสูงขึ้นย่อมส่งผลให้ศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวมสูงขึ้นตามไปด้วย เมื่อเปรียบเทียบค่าศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่าย PY215 ร่วมกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นตามการรายงานของ Orosa และคณะ (2000) ที่ได้ศึกษาการผลิตมวลชีวภาพและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่าย 5 ชนิด ได้แก่ สาหร่าย *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *S. vacuolatus* และ *Chlorella zofingiensis* โดยการให้แสงความเข้มแสงสูง (350 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที) เพื่อกระตุ้นให้สาหร่ายเหล่านี้เพิ่มการผลิตแคโรทีนอยด์และเลี้ยงเป็นเวลา 24 วัน ผลการทดลองพบว่า ศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่าย PY215 ที่เลี้ยงในอาหาร TAP-N ของการเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอนนี้มีค่ามากกว่าสาหร่าย *P. botryoides*, *S. oocystiformis*, *S. vacuolatus* แต่น้อยกว่าสาหร่าย *C. zofingiensis* และ *N. wimmeri* ถึงแม้ว่าภาพรวมของการผลิตแคโรทีนอยด์รวม (total carotenoid productivity) ของสาหร่าย PY215 จะมีค่าน้อย

กว่าสาหร่าย *C. zofingiensis* และ *N. wimmeri* อยู่เกือบ 2 เท่า แต่วิธีการกระตุ้นโดยแสงนั้นย่อมเพิ่มต้นทุนการผลิต ซึ่งแตกต่างจากการลดปริมาณธาตุไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่จะช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้ดังที่มีรายงานในผลการวิจัยของ Li และ

คณะ (2011) ว่า การลดธาตุไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงสาหร่าย *H. pluvialis* ในระดับอุตสาหกรรมจะทำให้สามารถลดต้นทุนของการผลิตลงไปได้ประมาณ 7500 ดอลลาร์สหรัฐหรือคิดเป็น 1.5 % จากต้นทุนทั้งหมด



รูปที่ 3 การเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอนของสาหร่าย *S. bijugus* PY215 A; กราฟการเจริญเติบโตของ *S. bijugus*; ขั้นตอนแรกเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะมิกโซโทรฟ (TAP) ที่ 25 องศาเซลเซียส 6 วันแล้วย้ายไปสู่อาหารใหม่ (TAP 50%N, TAP -N) ซึ่งล้างเซลล์ด้วยอาหารใหม่ 3 ครั้งก่อนการย้าย B; Carotenoid profiles ของ *S. bijugus* PY215 (วันที่ 23 ของการทดลอง) B= สารมาตรฐาน β -carotene, H= สารสกัดจาก *Haematococcus pluvialis* (แหล่ง astaxanthin), C= สารมาตรฐาน canthaxanthin, TC= TAP เพาะเลี้ยงต่อเนื่องในอาหารเดิม (control), T50= TAP ที่มีไนโตรเจน 50%, T-N= TAP ที่ไม่มีไนโตรเจน

ตารางที่ 2 มวลชีวภาพ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *S. bijugus* PY215 ของการเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอน (วันที่ 17 หลังการย้าย วันที่ 23 ของการทดลอง)

อาหารใน ขั้นตอนที่ 2	มวลชีวภาพ (gDW.L ⁻¹)	ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (μ g.gDW ⁻¹)	ศักยภาพในการผลิต แคโรทีนอยด์รวม (μ g.L ⁻¹)	ผลิตภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวม 23 วัน (μ g.L ⁻¹ .day ⁻¹)
TAP (Day 6)	1.32 ^c ±0.131	379.24 ^c ±8.33	522.88 ^c ±22.21	-
TAP continue	2.25 ^b ±0.10	502.67 ^{bc} ±55.46	1129.68 ^b ±123.00	49.12 ^b ±5.35
TAP 50%N	3.08 ^a ±0.06	741.06 ^{ab} ±141.39	2287.94 ^a ±457.51	99.48 ^a ±19.98
TAP-N	2.92 ^a ±0.06	921.60 ^a ±117.39	2692.06 ^a ±375.91	117.05 ^a ±16.34

หมายเหตุ ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-way ANOVA (P<0.05) ค่า a, b และ c แสดงการจัดกลุ่มด้วยสถิติของ Duncan

ศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวม (μ g.L⁻¹) คำนวณได้จากมวลชีวภาพคูณกับปริมาณแคโรทีนอยด์รวม

ผลิตภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์รวม (μ g.L⁻¹.day⁻¹) คำนวณได้จากมวลชีวภาพคูณกับปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและหารด้วยจำนวนวัน

สรุป

จากการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงศักยภาพในการสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์ชนิดที่มีมูลค่าสูงของสาหร่ายสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากดินที่เก็บมาจากแหล่งท้องถิ่นภูมิภาคตะวันตกของ

ประเทศไทย เพื่อเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรสิ่งมีชีวิตเมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยภูมิอากาศแบบร้อนชื้นของประเทศไทย เนื่องจากลักษณะความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูง อัตราการเจริญที่รวดเร็ว และความสามารถในการ

ผลิตแคโรทีนอยด์ชนิดที่มีมูลค่าสูงได้อย่างโดดเด่นนี้ ทำให้สำหรับ *S. bijugus* PY215 มีความน่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำไปศึกษาต่อถึงกลไกทางชีวเคมีในการกระตุ้นการสร้างและสะสมรงควัตถุควบคู่กับการสร้างมวลชีวภาพเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตแคโรทีนอยด์บางอนุพันธ์ในระดับที่ใหญ่ขึ้น รวมไปถึงแนวทางการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อการผลิตสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในระดับอุตสาหกรรมของประเทศไทยได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) สำหรับทุนการศึกษาและวิจัยสำหรับนักศึกษาวิไลลักษณ์ เสืออบ และขอบคุณความช่วยเหลือในการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ในสาหร่ายของ Prof. Paul D. Fraser, School of Biological Sciences, Royal Holloway University, London, UK

เอกสารอ้างอิง

- กรมทรัพยากรธรณี .(2554). แหล่งเรียนรู้ทางธรณีวิทยาจังหวัดราชบุรี . สืบค้นเมื่อ 25 มกราคม 2561, แหล่งข้อมูล: http://www.dmr.go.th/download/article/article_20110209135017pdf
- Aflalo, C., Meshulam, Y., Zarka, A., and Boussiba, S. (2007). On the relative efficiency of two-vs. One-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology and bioengineering* 98(1): 300-305.
- Ahlgren, G. (1987). Temperature functions in biology and their application to algal growth constants. *Oikos* 49(2): 177-190.
- Ahmad, A., Yasin, N. M., Derek, C., and Lim, J. (2011). Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15(1): 584-593.
- Alcaino, J., Baeza, M., and Cifuentes, V. (2016). Carotenoid distribution in nature. *Carotenoids in nature* Springer. pp. 3-33.
- Baimai, V. (2010). Biodiversity in Thailand. *The Journal of the Royal Institute of Thailand* 2: 107-114.
- Barker, A. V., and Pilbeam, D. J. (2015). *Handbook of plant nutrition*, second edition: CRC Press.
- Boussiba. (2000). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum* 108(2): 111-117.
- Chacón-Lee, T., and González-Mariño, G. (2010). Microalgae for “healthy” foods possibilities and challenges. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(6): 655-675.
- Cherdchueattisak, P., Fraser, P. D., Purton, S., and Brocklehurst, T. W. (2018). Detection and Enhancement of keto-carotenoid accumulation in the newly isolated sarcinoid green microalga *Chlorosarcinopsis* PY02. *Biology* 7(1): 17
- Das, A., Yoon, S.-H., Lee, S.-H., Kim, J.-Y., Oh, D.-K., and Kim, S.-W. (2007). An update on microbial carotenoid production: Application of recent metabolic engineering tools. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77(3): 505.
- Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodriguez, H., Angeles Vargas, M., Rivas, J. n., and Guerrero, M. G. (2000). Carotenoid content of Chlorophycean microalgae: Factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (chlorophyta). *Journal of Biotechnology* 76(1): 51-59.
- Dyo, Y., Vonlanthen, S., Purton, S., and Zayadan, B. (2013). Evaluating new isolates of microalgae from Kazakhstan for biodiesel production. *Russian journal of plant physiology* 60(4): 549-554.
- Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M., and Sijsma, L. (2014). Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. *JRC Scientific and policy reports* 19-37.
- Fan, L., Vonshak, A., and Boussiba, S. (1994). Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae). *Journal of Phycology* 30(5): 829-833.
- Fu Ω ikova, K., Chien, L., LEWIS, L. A., and KAROL, K. G. (2010). An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. *Cryptogamie, Algologie* 31(4): 529-555.
- Giannelli, L., Yamada, H., Katsuda, T., and Yamaji, H. (2015). Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119(3): 345-350.
- Gibson, C. E., and Foy, R. H. (1989). On temperature-independent growth of phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 11(3): 605-607.

- Goodwin, T. (1972). Carotenoids in fungi and non-photosynthetic bacteria. *Progress in industrial microbiology* 11: 29-88.
- Groover, R. D., and 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.
- Grung, M., D'Souza, F. M., Borowitzka, M., and Liaaen-Jensen, S. (1992). Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3s, 3' s) - astaxanthin esters. *Journal of Applied Phycology* 4(2), 165-171.
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., and Malcata, F. X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine drugs* 9(4): 625-644.
- Harris, E. H. (2013). *The Chlamydomonas sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use:* Elsevier Science.
- Henríquez, V., Escobar, C., Galarza, J., and Gimpel, J. (2016). Carotenoids in microalgae. In C. Stange (Ed.), *Carotenoids in nature: Biosynthesis, regulation and function.* Cham: Springer International Publishing. pp. 219-237.
- Herndon, W. (1958). Studies on Chlorosphaeracean algae from soil. *American Journal of Botany* 298-308.
- Kakizono, T., Kobayashi, M., and 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(6): 403-405.
- Leu, S., and Boussiba, S. (2014). Advances in the production of high- value products by microalgae. *Industrial Biotechnology* 10(3): 169-183.
- Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., and Wang, G. (2011). An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology advances* 29(6): 568-574.
- Liang, Y., Sarkany, N., and Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters* 31(7): 1043-1049.
- Lichtenthaler, H. K., and Wellburn, Alan R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents: Portland Press Limited.
- Mulders, K. J., Weesepeel, Y., Bodenies, P., Lamers, P. P., Vincken, J.-P., Martens, D. E., Gruppen, H., and Wijffels, R. H. (2015). Nitrogen- depleted *Chlorella zofingiensis* produces astaxanthin, ketolutein and their fatty acid esters: A carotenoid metabolism study. *Journal of applied phycology* 27(1): 125-140.
- Nogueira, M., Mora, L., Enfissi, E. M., Bramley, P. M., and Fraser, P. D. (2013). Subchromoplast sequestration of carotenoids affects regulatory mechanisms in tomato lines expressing different carotenoid gene combinations. *The Plant Cell* 25(11): 4560-4579.
- Olaizola, M., and Huntley, M. E. (2003). Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae. *Biomaterials and Bioprocessing* (Fingerman, M. and Nagabhushanam, R., eds) Science Publishers.
- Orosa, M., Torres, E., Fidalgo, P., and Abalde, J. (2000). Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology* 12(3): 553-556.
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., and Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. *Cnm* 1077. *Bioresource technology* 156: 146-154.
- Paniagua-Michel, J., Olmos-Soto, J., and Ruiz, M. A. (2012). Pathways of carotenoid biosynthesis in bacteria and microalgae. In J.-L. Barredo (Ed.), *Microbial carotenoids from bacteria and microalgae: Methods and protocols* (pp. 1-12). Totowa, NJ: Humana Press.
- Prescott, G. W. (1962). *Algae of the western great lakes area.* Dubuque, Iowa, W. C. Brown Co.
- Přibyl, P., Pilný, J., Cepák, V., and Kaštánek, P. (2016). The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp. *Algal Research* 16: 69-75.
- Putz, O., and Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology* 65(6): 635-648.
- Sansawa, H., and Endo, H. (2004). Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98(6): 437-444.

- Singh, S., and Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50: 431-444.
- Wehr, J. D., Sheath, R. G., and Kocielek, J. P. (2015). *Freshwater algae of North America: Ecology and classification*: Elsevier.
- Wiley, J. (2008). Prescott, Harley, and Klein's Microbiology- 7th international ed./Joanne M. Willey, Linda M. Sherwood, Christopher J. Woolverton: New York: McGraw- Hill Higher Education.
- Ye, Z.-W., Jiang, J.-G., and Wu, G.-H. (2008). Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnology advances* 26(4): 352-360.
- Zhekisheva, M., Boussiba, S., Khozin-Goldberg, I., Zarka, A., and Cohen, Z. (2002). Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *Journal of Phycology* 38(2): 325-331.

