วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

ผลของระดับไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต การสะสมแคโรทีนอยด์ และไอโซเมอร์ *9-cis* เบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *Dunaliella* sp. NUAC09 สายพันธุ์ไทย

Effect of nitrogen levels on growth performance, carotenoid accumulation and isomerization to *9-cis* ß-carotene in Thai *Dunaliella* sp. NUAC09

ปฏิพัทธ์ สันป่าเป้า[1], สุพัฒน์ พลซา[1], ปิยวัฒน์ ปองผดุง[1] และ วิทยา ทาวงศ์[1]*

Patipat Sanpapao[1], Supat Ponza[1], Piyawat Pongpadung[1] and Wittaya Tawong[1]*

[1] *สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000*

[1] *Program in Fisheries Sciences, Department of Agricultural Sciences, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000*

บทคัดย่อ: *Dunaliella* เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีความสำคัญสำหรับการผลิตสารรงควัตถุธรรมชาติเบต้าแคโรทีนธรรมชาติ ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง โดยสารกลุ่มนี้ถูกนำไปใช้ทั้งในอุตสาหกรรมที่หลากหลายเช่น ด้านโภชนาการ เภสัชศาสตร์ และเครื่องสำอาง เป็นต้น งานวิจัยนี้มุ่งเน้นเพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโต การสะสมรงควัตถุ และสัดส่วนไอโซเมอร์ *cis* และ *trans* เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella* sp. NUAC09 สายพันธุ์ไทย ภายใต้ปริมาณที่แตกต่างกัน (0.0, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 g/L) ของไนโตรเจน (KNO_3) ในสูตรอาหาร Johnson ผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโต (0.82 µ/day) จำนวนเซลล์ (4.38×10^6 cell/mL) และปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (13.79 µg/mL) ที่เหมาะสมสุดในสายพันธุ์ทดสอบที่เลี้ยงด้วยระดับไนโตรเจน 2.0 g/L ขณะที่ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมสูงที่สุด (53.14 µg/mL) พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในระดับไนโตรเจน 0.2 g/L เมื่อตรวจสอบด้วยใช้เทคนิค HPLC พบว่าปริมาณของไอโซเมอร์ *all-trans* และ *9-cis* เบต้าแคโรทีนพบสูงที่สุด เท่ากับ 519.0 ± 84.4 และ 328.7 ± 53.9 mg/g DW ในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่ระดับไนโตรเจน 0.0 g/L ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณไนโตรเจนมีผลต่อการเพิ่มแคโรทีนอยด์และปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09

คำสำคัญ: ดูนาลิเอลล่า; ไนโตรเจน; แคโรทีนอยด์; ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน

ABSTRACT: *Dunaliella* is an important green microalga for the production of natural ß-carotene pigments, which are the economically important substance and high effective radical scavenging capacity. Hence, there are several applications of these pigments in various industries such as nutritional supplements, pharmaceutics and cosmetics. This study was focused on investigating growth performance, accumulations of pigments and *cis*/*trans*-ß-carotene isomers ratio of Thai *Dunaliella* sp. NUAC09 under different nitrogen (KNO_3) concentrations (0.0, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 g/L) in Johnson medium. The results showed that the optimization specific growth rate (0.82 µ/day), cell density (4.38×10^6 cell/mL) and chlorophyll *a* content (13.79 µg/mL) occurred in the tested strain cultured at the 2.0 g KNO_3/L. While, the maximum total carotenoid content (53.14 µg/mL) was found under the tested strain cultured at the 0.2 g KNO_3/L. When determined by HPLC analysis, the highest *all-trans* ß-carotene and *9-cis* ß-carotene were 519.0 ± 84.4 and 328.7 ± 53.9

* Corresponding author: wittayat@nu.ac.th

Received: date; October 29, 2020 Accepted: date; March 17, 2021 Published: date; October 5, 2021

mg/g DW, respectively, found in a strain cultured at 0.0 g KNO_3/L. Overall, our results indicated that nitrogen concentration affected increasing carotenoid and β-carotene isomer content of *Dunaliella* sp. NUAC09.
Keywords: *Dunaliella*; nitrogen; carotenoid; isomer β-carotene

บทนำ

เบต้าแคโรทีน (β-carotene) เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีรงควัตถุเป็นสีส้มและสีเหลือง พบได้ทั่วไปในผัก ผลไม้ และสาหร่ายขนาดเล็ก โดยเบต้าแคโรทีนมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และเป็นสารตั้งต้นของกรดวิตามินเอที่สำคัญต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต (Sadighara et al., 2016) ในปัจจุบันเบต้าแคโรทีนถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม อาหารเสริม อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เครื่องสำอาง และทางด้านเภสัชกรรม โดยไอโซเมอร์เชิงโครงสร้างของเบต้าแคโรทีนที่พบมีอยู่ด้วยกัน 2 รูปแบบ ได้แก่ ไอโซเมอร์แบบ *cis*-isomer และแบบ *trans*-isomer จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเบต้าแคโรทีนในรูป cis มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่ารูปแบบ *all-trans* 1.3 ถึง 2.4 เท่า (Levin et al., 1994; Hu et al., 2008; Relevy et al., 2015; Weinrich et al., 2019) แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันเบต้าแคโรทีนที่ผลิตได้และใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มาจาก การสังเคราะห์ทางเคมีและมีเพียงไอโซเมอร์แบบ *trans* ขณะที่การสกัดจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติจะพบทั้งไอโซเมอร์แบบ *cis* และแบบ*trans* จึงทำให้ผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้ความสนใจกับเบต้าแคโรทีนที่ได้จากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติมากกว่าได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี อีกทั้งการใช้สารเคมีและปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆ ในการสังเคราะห์นั้น อาจก่อให้เกิดสารตกค้างของสารอันตราย จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติที่สามารถผลิตสารดังกล่าวนี้ได้ในปริมาณมาก โดยเฉพาะสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ที่สามารถผลิตเบต้าแคโรทีนได้สูงถึง 14 %ของน้ำหนักแห้ง (Srinivasan et al., 2018) จากรายงานของ Braun (2015) พบว่าสาหร่าย *D. salina* ประเทศโมร็อกโคสามารถผลิตเบต้าแคโรทีนได้ถึง 2,100 mg/100 g DW ขณะที่ในแครอทพบเพียง 8.3 mg/100 g DW เท่านั้น นอกจากนี้โครงสร้างไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนจากสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ได้แก่ *D. salina* และ *D. bardawil* มีความหลากหลายของโครงสร้างไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนทั้งในรูปของ *9-cis*, *13-cis*, *15-cis* และ *all-trans* มากกว่าที่ได้จากผักและผลไม้ (Orset and Young, 2000) โดยเฉพาะอัตราส่วนของ *cis* เบต้าแคโรทีนมีมากกว่าร้อยละ 50 ของไอโซเมอร์ทั้งหมด (Weinrich et al., 2019) จึงทำให้สาหร่ายสกุล *Dunaliella* เป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์มากขึ้น ดังนั้นการผลิตเบต้าแคโรทีนที่ได้จากสาหร่ายจึงเป็นแนวทางเลือกเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ในกระบวนการผลิตเบต้าแคโรทีนจำเป็นต้องกระตุ้นให้สาหร่ายเกิดความเครียดเพื่อทำให้สาหร่ายผลิตรงควัตถุมากขึ้นกว่าปกติ เนื่องจากสาหร่ายที่ถูกเพาะเลี้ยงและเจริญเติบโตภายใต้สภาพแวดล้อมที่เป็นปฏิปักษ์ (extreme condition) จะมีการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เพิ่มมากขึ้นเพื่อใช้ในการปกป้องเซลล์ โดยมีปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียดของสาหร่าย เช่น ความเค็ม (Ahmed et al., 2017) อุณหภูมิ (Wu et al., 2016) ความเข้มแสง (Xu et al., 2019) และการขาดธาตุอาหาร (Mai et al., 2017) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขาดธาตุไนโตรเจน ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายทุกชนิด (Arumugam et al., 2013) โดยปกติสาหร่ายจะนำไนโตรเจนเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Round, 1973) และไนโตรเจนยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสารประกอบหลายชนิดภายในเซลล์ เช่น โปรตีน คลอโรฟิลล์ กรดนิวคลิอิก รวมถึงการสะสมเบต้าแคโรทีน (Andersen, 2005; Wu et al., 2015) จากงานวิจัยของ Sathasivam และคณะ (2018) พบว่าสาหร่าย *D. salina* KU11 สามารถเจริญได้ดีที่ระดับไนเตรท 0.50 g/L มีปริมาณเบต้าแคโรทีนเท่ากับ 115.50±0.40 µg/mL ขณะที่ Lv และคณะ (2016) พบว่าสาหร่าย *D. salina* ในชุดการทดลองที่ขาดธาตุไนโตรเจนมีอัตราส่วนแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์สูงถึง 3.2 เท่า และมีการสะสมเบต้าแคโรทีนมากกว่า 4.1 เท่าเมื่อเทียบชุดการทดลองที่มีธาตุอาหารปกติ นอกจากนี้พบว่าใน *D. teriolecta* สามารถใช้ยูเรียเป็นแหล่งของไนโตรเจนในอาหารได้ และส่งผลต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนมากกว่าเมื่อเทียบกับไนเตรท, ไนไตรท์ และแอมโมเนีย (Herrero et al., 1991) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าปัจจัยธาตุไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญและการเหนี่ยวนำการผลิตเบต้าแคโรทีนของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* เป็นอย่างยิ่ง

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับธาตุไนโตรเจนต่อองค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนในสาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีน้อย รวมถึงขาดองค์ความรู้ในการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ *cis* เบต้าแคโรทีนของสาหร่ายให้สูงขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการ

เจริญเติบโต การสะสมแคโรทีนอยด์ และไอโซเมอร์ *9-cis* เบต้าแคโรทีนในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella* sp. NUAC09 สายพันธุ์ไทย ภายใต้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยผลจากการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาและส่งเสริมการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อการผลิต *cis* เบต้าแคโรทีนในเชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่าย

สาหร่าย *Dunaliella* sp. NUAC09 ที่คัดแยกจากนาเกลือบริเวณอ่าวไทย และจากการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ NUAC09 มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ที่สูง จึงถูกคัดเลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยทำการเก็บรักษาหัวเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์บนอาหารแข็งสูตร D medium (Pick et al., 1986) ที่ความเค็ม 1 M NaCl ระดับอุณหภูมิ 25±1 °C ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 70 µmol PFFm^2/s จากนั้นนำหัวเชื้อสาหร่ายมาถ่ายเชื้อลงขวดรูปชมพู่ขนาด 1 L ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร Johnson (Borowitzka, 1988) ปริมาตร 300 mL และ pH เท่ากับ 7.1±2 เพาะเลี้ยงตามสภาวะที่กล่าวมาข้างต้น จนสาหร่ายมีปริมาตรเพียงพอต่อการทดลองเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น (starter culture)

การทดลองผลของปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design ; CRD) โดยแบ่งการทดลองเป็น 5 ชุดทดลอง (Treatment;T) ชุดทดลองละ 3 ซ้ำ เพาะเลี้ยงสาหร่าย NUAC09 ในอาหารสูตรของ Johnson ที่มีปริมาณของไนโตรเจน (KNO_3) แตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ (T1) 0.0, (T2) 0.2, (T3) 0.5, (T4) 1.0 (ชุดควบคุม) และ (T5) 2.0 g/L ในแต่ละการทดลองจะติดตั้งระบบเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้หลอดแก้วขนาด 200 mL และมีปริมาตรการเลี้ยงรวม 190 mL ประกอบด้วยหัวเชื้อสาหร่าย 10 % ของปริมาตรทั้งหมด (ความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 2.0×10^6 cell/mL) ความเข้มแสงแบบต่อเนื่อง 200 μmol PFF m^2/s ช่วงเวลาได้รับแสงแบบต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 °C และให้อากาศที่มีส่วนผสมของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ด้วยอัตราการไหล 50 mL/min ทำการเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 14 วัน

การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และผลผลิตชีวมวล

ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายสายพันธุ์ NUAC09 ทุกๆ 2 วัน ปริมาตร 2 mL นำมานับจำนวนเซลล์ โดยใช้ hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ที่มีกาลังขยาย 400x (Wongrat and Wongrat, 2003) จากนั้นนำตัวอย่างที่เหลือมาตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนที่เป็นอาหารออกจนเหลือเพียงตะกอนเซลล์ของสาหร่าย เติมแอซิโทนเข้มข้น ปริมาณ 1.5 mL ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดคลอโรฟิลล์ เอ และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ที่ค่าการดูดกลืนแสง 664 , 647 และ 452 nm และคำนวณตามสมการของ Porra และคณะ (1989) และ Rao และคณะ (2009) เมื่อสิ้นสุดการทดลองระยะเวลา 14 วัน ทำการตรวจสอบน้ำหนักแห้งของสาหร่าย (biomass dry weight) โดยเก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 rpm นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการชั่งน้ำหนักและรายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (g/L) ตามวิธีการของ Zhu และคณะ (1997) จากผลที่ได้นำไปคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) ตามสมการคือ $\mu = (\ln X_2 - \ln X_1)/(t_2-t_1)$ โดย X1 กับ X2 คือ ค่าคลอโรฟิลล์เริ่มต้นและวันที่เก็บเกี่ยว ส่วน t1 กับ t2 คือ เวลาที่เริ่มเพาะเลี้ยงและวันที่เก็บเกี่ยวสาหร่าย (วัน) (Xu and Harvey, 2019) จากนั้นนำสาหร่ายส่วนที่เหลือไปทำการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนอาหารออกจนเหลือเพียงส่วนที่เป็นเซลล์ของสาหร่าย นำเซลล์สาหร่ายไปทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (freeze dryer) เพื่อกำจัดน้ำออกในระดับเซลล์ เพื่อเก็บไว้ใช้วิเคราะห์ ปริมาณและองค์ประกอบของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีนและองค์ประกอบของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน

นำสาหร่ายที่ผ่านการทำแห้งมาสกัดสารเบต้าแคโรทีน (β-carotene) โดยชั่งตัวอย่าง 100 mg มาทำละลายด้วย MTBE-MeOH (20:80) ปริมาตร 10 mL จากนั้นตรวจวัดปริมาณโดยใช้เครื่อง HPLC ตามวิธีการของ Xu และคณะ (2018) ได้แก่ Column : YMC C18) สารชะคงที่ (methanol : ethanol) อัตราการไหลอยู่ที่ 1.0 mL/minute, อุณหภูมิคอลัมน์ 10 °C, แก๊ซไนโตรเจนความดัน 60 psi ปริมาตรที่ฉีด 5 µL, ระยะเวลา 24 นาที, ตัวตรวจสัญญาณ (UV/VIS detection) ความยาวคลื่น 450 nm เปรียบเทียบจากกราฟของสารมาตรฐาน *all-trans* เบต้าแคโรทีน (Sigma-Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 13.6, 25.0, 48.2 และ 100.8 ppm นำสารละลายมาตรฐาน *all-trans* เบต้าแคโรทีน ปริมาตร 20 ไมโครลิตรที่เตรียมไว้มาทำการฉีดสารสกัดเข้าสู่เครื่องวิเคราะห์ นำค่าพื้นที่พีค (peak area) ที่วัดได้สร้างสมการถดถอยเชิงเส้น ซึ่งสมการที่ได้ คือ y = 3338.6x - 9467.7 (R^2 = 0.999) เปรียบเทียบค่า retention time (RT) ระหว่างสารสกัดสาหร่ายกับสารละลายมาตรฐาน *all-trans* เบต้าแคโรทีน และจำแนกพีคของ *all-trans* และ *9-cis* ซึ่งแสดงลักษณะของพีคได้เด่นชัดที่สุด ตามวิธีการของ Weinrich และคณะ (2019), Xu และคณะ (2018), Lin และคณะ (2010), Fazeli และคณะ (2009), Hu และคณะ (2007), Bononi และคณะ (2002), Jian-Guo และคณะ (1966) และ Ben-Amotz และคณะ (1987)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range Test ด้วยโปรแกรม R version 3.5.1 (R Development Core Team, 2009)

ผลการศึกษา

ผลของระดับไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย *Dunaliella* sp. NUAC09

เมื่อเพาะเลี้ยง *Dunaliella* sp. NUAC09 ในอาหารสูตร Johnson ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของปริมาณไนโตรเจน (KNO_3) ในอาหาร ได้แก่ (T1) 0.0, (T2) 0.2, (T3) 0.5, (T4) 1.0 (ชุดควบคุม) และ (T5) 2.0 g/L ตามลำดับ จากนั้นทำการติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่าย เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าสาหร่ายในทุกชุดการทดลอง **(Figure 1)** มีลักษณะการเจริญเข้าสู่ระยะปรับตัว (lag phase) ช่วงวันที่ 0 ถึง 2 จากนั้นจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง (log phase) ตั้งแต่วันที่ 2 ถึง 8 ของการทดลอง หลังจากนั้นเซลล์จะเข้าสู่ระยะหยุดนิ่ง (stationary phase) และจำนวนเซลล์จะเริ่มลดลงหลังจากวันที่ 12 จนสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่สาหร่ายในชุดการทดลอง T1 (0.0 g/L) เข้าสู่ระยะหยุดนิ่งตั้งแต่วันที่ 4 จาก **Figure 1** แสดงให้เห็นว่าในวันที่ 10 ชุดการทดลอง T5 (2.0 g/L) มีจำนวนเซลล์สูงสุด เท่ากับ $4.38\pm0.63\times10^6$ cell/mL ขณะที่จำนวนเซลล์ต่ำสุด คือ ชุดการทดลอง T1 (0.0 g/L) เท่ากับ $1.94\pm0.08\times10^6$ cell/mL ในวันที่ 8 ของการทดลอง ($p<0.05$) **(Table 1)** นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น เซลล์สาหร่ายมีการเปลี่ยนแปลงสี จากสีเขียวเป็นสีส้มอย่างเด่นชัดภายใต้การขาดไนโตรเจน **(Figure 2)**

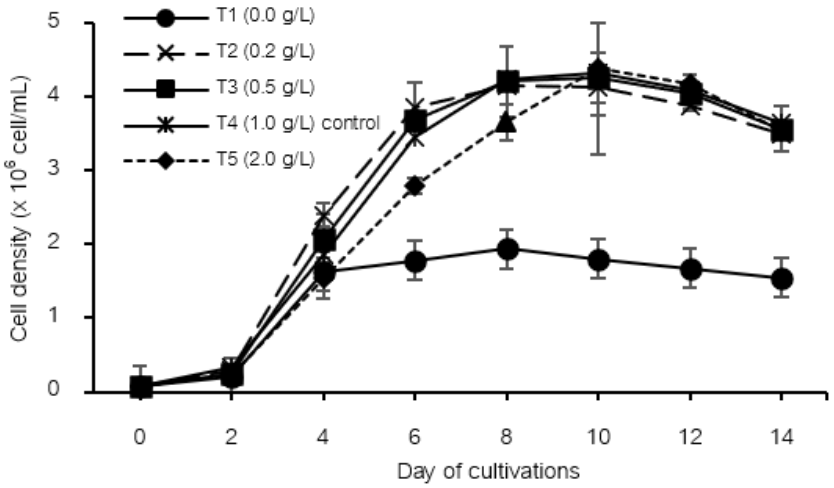

Figure 1 Cell density (×10^6 cell/mL) of *Dunaliella* sp. NUAC09 grown in Johnson medium with different nitrogen concentrations.

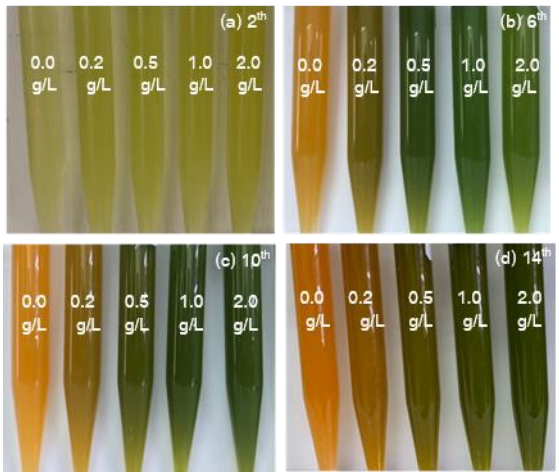

Figure 2 Photographs of *Dunaliella* sp. NUAC09 grown in Johnson medium with different nitrogen concentrations at the inoculation day of (a) 2^{th}, (b) 6^{th}, (c) 10^{th} and (d) 14^{th}

ปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T5 (2.0 g/L) มีปริมาณเท่ากับ 13.79±1.21 µg/mL และ 3.27±0.71 pg/cell ขณะที่ชุดการทดลอง T1 มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอต่ำสุด เท่ากับ 1.39±0.28 และ 0.72±0.13 (p<0.05) **(Figure 3a และ Table 1)** สำหรับปริมาณแคโรทีนอยด์รวม มีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T2 (0.2 g/L) ปริมาณเท่ากับ 53.14±2.24 µg/mL และ 12.09±3.29 pg/cell ขณะที่ชุดการทดลอง T1 (0.0 g/L) มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่ำสุด เท่ากับ 32.32±1.76 µg/mL และ 7.75±2.13 pg/cell (p<0.05) **(Figure 3b และ Table 1)** อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์กับคลอโรฟิลล์เอ พบว่ามีค่าสูงสุด คือ ชุดการทดลอง T1 (0.0 g/L) มีค่าเท่ากับ 19.08±3.74 เท่า และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T5 (2.0 g/L) มีค่าเท่ากับ 2.36±0.28 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดความคุม T4 (p<0.05) การเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดจากน้ำหนักแห้ง (biomass dry weight) พบว่ามีค่าสูงสุด คือ ชุดควบคุม T4 (1.0 g/L) มีค่าเท่ากับ 6.89±1.42 g/Lและมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T1 (0.0 g/L) มีค่าเท่ากับ 3.47±1.90 g/L (p>0.05) อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยจำเพาะ (SGR) มีค่าสูงสุดในชุดควบคุม T5 มีค่าเท่ากับ 0.82±0.00 µ/day และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลอง T1 มีค่าเท่ากับ 0.44±0.03 µ/day

(p<0.05) ระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time: td) มีค่าสูงสุดในชุดการทดลอง T1 (0.0 g/L) มีค่าเท่ากับ 1.56±0.10 µ/day เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลอง T5 (2.0 g/L) ที่มีค่าต่ำสุด (p<0.05) **(Table 1)**

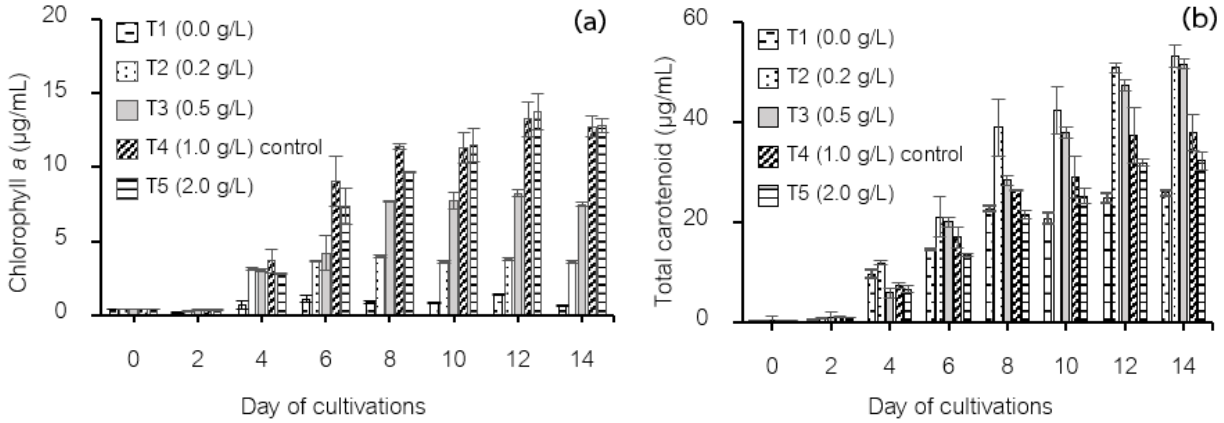

Figure 3 Chlorophyll *a* content (a) and total carotenoid content (b) represents pigment concentrations by *Dunaliella* sp. NUAC09 grown in Johnson medium under different nitrogen concentrations

ผลของระดับไนโตรเจนที่ต่างกันต่อองค์ประกอบปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella* sp. NUAC09 หลังจากการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน โดยใช้ HPLC พบว่าลักษณะโครมาโทรแกรมของสารสกัดเบต้าแคโรทีนจากสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ระดับไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ผลปรากฏที่บ่งชี้ได้ถึงพีค *all-trans* และ พีค *9-cis* เบต้าแคโรทีน โดยมีเวลาการคงอยู่ (retention time; RT) เท่ากับ 20.81 และ 21.43 นาที ซึ่งพีค *all-trans* จากตัวอย่างสาหร่ายมีเวลาการคงอยู่ (RT) ตรงกับพีคของสารมาตรฐาน *all-trans* เบต้าแคโรทีน (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

Table 1 The maximum values of growth parameters and pigment contents of *Dunaliella* sp. NUAC09 grown in Johnson's medium containing different nitrogen concentration

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

Remark: Averages ± Standard deviation in the same row followed by the different letters are significantly different (p<0.05), Specific growth rate* = Based on chlorophyll *a*

ปริมาณไอโซเมอร์ *all-trans* และ *9-cis* จากสารสกัดเบต้าแคโรทีนของตัวอย่างสาหร่ายที่ศึกษา พบว่าระดับของไนโตรเจน (KNO_3) ในอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.0, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 g/L มีผลต่อสัดส่วนของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) **(Table 2)** โดยชุดการทดลองที่มีปริมาณไอโซเมอร์สูงสุด คือ ชุดการทดลอง T1 (0.0 g/L) มีปริมาณ *all-trans* และ *9-cis* เบต้าแคโรทีน เท่ากับ 519.0±84.4 และ 328.7±53.9 mg/g DW ขณะที่ชุดการทดลอง T5 (2.0 g/L) มีปริมาณไอโซเมอร์ต่ำสุด เท่ากับ 125.8±32.2 และ 92.8±33.2 mg/g DW **(Table 2)**

Table 2 Concentrations of β-carotene (*all-trans* and *9-cis*) isomers in *Dunaliella* sp. NUAC09 grown in Johnson medium containing different nitrogen concentration

Treatments	Concentration of nitrogen (g/L)	Concentration of isomer (mg/g DW)	
		all-trans β-carotene	*9-cis* β-carotene
T1	0.0 g/L	519.0±84.4[a]	328.7±53.9[a]
T2	0.2 g/L	253.8±16.3[b]	205.3±16.6[b]
T3	0.5 g/L	201.6±28.3[b]	155.3±37.1[b]
T4 (control)	1.0 g/L	125.8±12.9[c]	96.9±1.3[c]
T5	2.0 g/L	125.8±32.2[c]	92.8±33.2[c]

Remark: Averages ± Standard deviation in the same column followed by the different letters are significantly different (p<0.05)

วิจารณ์

จากการศึกษาผลของระดับไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย สาหร่าย *D. salina* NUAC09 พบว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตร Johnson ภายใต้ปริมาณไนโตรเจน 0.0 ถึง 2.0 g/L KNO_3 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อจำนวนเซลล์ และปริมาณรงควัตถุ โดยไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลทำให้สาหร่าย *Dunaliella* sp. NUAC09 มีจำนวนเซลล์, ค่าคลอโรฟิลล์ และผลผลิตชีวมวลเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับ Sathasivam และคณะ (2018) ที่รายงานว่าการเลี้ยง *D.salina* KU11 ในปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (0.2 - 1.0 g/L) แสดงให้เห็นว่าปริมาณไนโตรเจน 1.0 g/L KNO_3 ช่วยให้สาหร่าย *D. salina* KU11 มีการเจริญเติบโตสูงสุด เท่ากับ $1.45\pm0.11\times10^6$ cell/mL ขณะที่การลดระดับไนโตรเจนให้เหลือเพียง 0.5 g/L KNO_3 จะช่วยเพิ่มปริมาณแคโรทีนอยด์มากที่สุดเท่ากับ 177.10±0.56 µg/mL ส่วน Kharati-Koupaei และคณะ (2016) รายงานว่าสาหร่าย *D. viridis* MSV-1 จากประเทศอิร่าน ซึ่งเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิคที่ระดับปริมาณไนโตรเจน ($NaNO_3$) 0.5 - 0.8 g/L มีจำนวนเซลล์สูงที่สุด เท่ากับ 1.30×10^6 cell/mL จากงานวิจัยที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าความเหมาะสมของปริมาณไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์สาหร่าย ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาครั้งนี้มีแนวโน้มว่าระดับไนโตรเจนที่ 2.0 g/L มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Dunaliella* sp. NUAC09

ในการศึกษาครั้งนี้สาหร่าย *Dunaliella* sp. NUAC09 มีค่าแคโรทีนอยด์สูงสุด (53.14±2.24 µg/mL) ที่ระดับไนโตรเจน 0.2 g/L โดยเมื่อเข้าสู่วันที่ 6 ของการเลี้ยงสาหร่ายเริ่มมีการเปลี่ยนสีของเซลล์เป็นสีเหลืองหรือสีส้มอ่อน **(Figure 2)** สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ควบคู่ไปกับการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ ซึ่งบ่งชี้ถึงการเริ่มสะสมรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเบต้าแคโรทีน (Ben-Amotz et al. 1989) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sathasivam และคณะ (2018) พบว่าการจำกัดโพแทสเซียมไนเตรท 0.20 g/L ทำให้สาหร่าย *D. salina* KU11 มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด เท่ากับ 160.5±0.03 µg/mL และ Gomez และคณะ (2003) พบว่าสาหร่าย *D. bardawil* ที่ได้รับโซเดียมไนเตรท 0.05 g/L จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 23.3 mg/L นอกจากนี้สาหร่ายสีเขียว *Haematococcus pluvialis* ที่ถูกจำกัดโพแทสเซียมไนเตรท 0.25 g/L พบว่ามีปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 6.0 mg/L (Orosa et al.,

2004) สำหรับอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์ สัดส่วนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เมื่อระดับไนโตรเจนลดต่ำลง เนื่องจากเมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะปกติเซลล์จะมีอัตราการเจริญและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ต่ำ แต่เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียด เซลล์สาหร่ายจะเริ่มสังเคราะห์รงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์เพื่อใช้ปกป้องเซลล์ทำให้อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์กับคลอโรฟิลล์เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย (Telfer et al., 2008)

การวิเคราะห์องค์ประกอบไอโซเมอร์ด้วยเทคนิค HPLC ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่ามีพีคปรากฏขึ้นจำนวน 2 พีค (peak) โดยพีค *all-trans* และ *9-cis* เบต้าแคโรทีน มีค่า Retention time (RT) เท่ากับ 20.81 และ 21.43 นาที ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hu และคณะ (2008) ที่พบว่าค่า RT ของสารทั้งสองชนิดเท่ากับ 26.9 และ 29.7 ซึ่งมีลักษณะของพีคสาร *all-trans* และ *9-cis* เบต้าแคโรทีนสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ผ่านมา (Weinrich et al., 2019, Xu et al., 2018; Lin et al., 2010; Fazeli et al., 2009; Hu et al., 2007; Bononi et al., 2002; Jian-Guo et al., 1996 และ Ben-Amotz et al., 1987) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อสาหร่าย *Dunaliella* sp. NUAC09 ถูกลดระดับของไนโตรเจนในอาหารจะทำให้มีการสะสมไอโซเมอร์ และอัตราส่วนของ *cis* และ *trans* เบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Davidi และ Pick (2017) ที่กล่าวว่าปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) ของเบต้าแคโรทีนจะเกิดขึ้นในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงสารอาหาร เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Jian-Guo และคณะ (1996) รายงานว่าสาหร่าย *D. salina* จากประเทศจีนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับของไนโตรเจนลดลง ส่งผลให้ปริมาณของ *all-trans* เบต้าแคโรทีนลดลงตามไปด้วย แต่ Total *cis* เบต้าแคโรทีนกลับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยปริมาณของไนเตรทที่ 0.0 g/L มีปริมาณไอโซเมอร์ *cis* ต่อ *trans* เบต้าแคโรทีนสูงสุด เท่ากับ 60.8 ต่อ 39.3 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อศึกษาปริมาณไนเตรทที่ 0.1 g/L ทำให้อัตราส่วนของไอโซเมอร์ *cis* ต่อ *trans* เบต้าแคโรทีน เท่ากับ 82.8 ต่อ 17.3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Hu และคณะ (2008) ทำการตรวจวัดไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนใน *D. salina* ที่เลี้ยงในสภาวะปกติ พบว่าปริมาณไอโซเมอร์ *all-trans* และ *9-cis* เบต้าแคโรทีน มีค่าเท่ากับ 138.25 และ 124.65 mg/g DW นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่าย *Heterochlorella luteoviridis* มีปริมาณไอโซเมอร์ *all-trans* และ *9-cis* เบต้าแคโรทีนสูงสุดเท่ากับ 0.39 และ 0.19 mg/g DW เมื่อได้รับปริมาณของโซเดียมไนเตรท 0.036 g/L (Menegol et al., 2017) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณไนโตรเจน (KNO_3) ในอาหารที่ 0.0 g/L มีผลต่อการสังเคราะห์ไอโซเมอร์ *cis* และ *trans* เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย NUAC09 สูงสุด ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์กับการเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Dunaliella* เพื่อผลิตเบต้าแคโรทีน ขณะที่ควรมีการศึกษาปัจจัยไนโตรเจนควบคู่กับปัจจัยอื่นๆ เพื่อเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ *cis*-isomer เบต้าแคโรทีนให้เพิ่มมากขึ้น

สรุป

การเจริญเติบโต การผลิตเบต้าแคโรทีนและสัดส่วนไอโซเมอร์ของสาหร่าย *Dunaliella* sp. NUAC09 สายพันธุ์ไทยที่เพาะเลี้ยงในระดับของไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 0.0, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 g/L พบว่าเมื่อปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้จำนวนเซลล์ ค่าคลอโรฟิลล์เอ และผลผลิตชีวมวลเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ซึ่งปริมาณไนโตรเจน 2.0 g/L มีความเหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย องค์ประกอบของเบต้าแคโรทีนในสาหร่ายที่ทดสอบ พบไอโซเมอร์ 2 ชนิดที่เด่นชัดที่สุด คือ *all-trans* และ *9-cis* เบต้าแคโรทีน และพบว่าการใช้ปริมาณไนโตรเจน 0.0 g/L ส่งผลให้สาหร่ายผลิตไอโซเมอร์แบบ *9-cis* เบต้าแคโรทีน ได้สูงสุด เท่ากับ 328.7±53.9 mg/g DW (มากกว่าชุดควบคุม 3.5 เท่า) การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าปริมาณไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญเติบโต และปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella* sp. NUAC09 ซึ่งสามารถเป็นแนวทางสำหรับการเลี้ยงเชิงพาณิชย์ในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย เช่น การเพาะเลี้ยงรูปแบบสองขั้นตอนยังมีความจำเป็น ซึ่งจะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของสาหร่ายและเหนี่ยวนำให้สาหร่ายเพิ่มปริมาณผลผลิตเบต้าแคโรทีนให้สูงขึ้นได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร ประจำปี 2563 ในการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Ahmed, RA., M. He, RA. Aftab, S. Zheng, M. Nagi, R. Bakri, and C. Wang. 2017. Bioenergy application of *Dunaliella salina* SA 134 grown at various salinity levels for lipid production. Scientific reports. 7(1): 8118.

Andersen, R.A. 2005. Algal culturing techniques. Academic Press, USA., ISBN: 9780120884261.

Arumugam, M., A. Agarwal, M.C. Arya, and Z. Ahmed. 2013. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. Bioresource Technology. 131: 246–249.

Ben-Amotz, A., J. Gressel, and M. Avron. 1987. Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition. Journal of Phycology. 23: 176–181.

Bononi, M., I. Commissati, E. Lubian, A. Fossati, and F. Tateo. 2002. A simplified method for the HPLC resolution of Alpha - carotene and β – carotene (*trans* and *cis*) isomers. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 372(2): 401–403.

Borowitzka, M.A. 1988. Algal media and sources of algal cultures. In Borowitzka, M.A. and L.J. Borowitzka. Eds. Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp 456–465.

Braun, L. 2015. Herbs and natural supplements an evidence-based guide, Marc Cohen. Chatswood, NSW: Elsevier Australia.

Davidi, L., and U. Pick. 2017. Novel *9-cis/all-trans* β-carotene isomerases from plastidic oil bodies in *Dunaliella bardawil* catalyze the conversion of all-trans to *9-cis* β -carotene. Plant Cell Reports. 36: 807–814.

Fazeli, M.R., H. Tofighi, A. Madadkar-Sobhani, AR.Shahverdi, T. Nejad-Sattari, S. Mirzaie, and H. Jamalifar. 2009. Nicotine inhibition of lycopene cyclase enhances accumulation of carotenoid intermediates by *Dunaliella salina* CCAP 19/18. European Journal of Phycology. 44(2): 215–220.

Gomez, PI., A. Barriga, A.S. Ifuentes, and M.A. Gonzalez. 2003. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) chlorophyta. Biological research. 36: 185–192.

Herrero, C., J. Abalde, and J. Fabregas. 1991. Beta carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalgae *Dunaliella teriolecta* cultured with different nitrogen sources. Bioresource Technology. 38: 121–125.

Hu, CC., JT. Lin, FJ. Lu, FP. Chou, and DJ. Yang. 2008. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. Food Chemistry. 109(2): 439–446.

Jian-Guo, L., W. Chao-Yuan, C. Nian-Hong, W. Yu-Jun, and Y. Li-Dong. 1996. Effect of nitrate and phosphate on accumulation of β-carotene isomers in *Dunaliella salina*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 14: 165–169.

Kharati-Koupaei, M., and A. Moradshahi. 2016. Effects of sodium nitrate and mixotrophic culture on biomass and lipid production in hypersaline microalgae *Dunaliella Viridis* Teod. Brazilian Archives of Biology and Technology, Agricultura. Agribusiness and Biotechnology. 59: 1–10.

Levin, G., and S. Mokady. 1994. Antioxidant activity of 9-cis compared to *all-trans* beta- carotene in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*. 17(1): 77–82.

Lin, JT., YC. Lee, CC. Hu, YC. Shen, FJ. Lu, and DJ. Yang. 2010. Evaluation of carotenoid extract from *Dunaliella salina* against cadmium induced cytotoxicity and transforming growth factor b1 induced expression of smooth muscle a-actin with rat liver cell lines. Journal of Food and Drug Analysis. 18: 301–306.

Lv, H., X. Cui, F. Wahid, F. Xia, C. Zhong, and S. Jia. 2016. Analysis of the physiological and molecular responses of *Dunaliella salina* to macronutrient deprivation. PLoS One. 11(3): 1–19.

Mai, T., P. Nguyen, T. Vo, H. Huynh, S. Tran, T. Nim, D. Tran, H. Nguyen, and P. Bui. 2017. Accumulation of lipid in *Dunaliella salina* under nutrient starvation condition. American Journal of Food and Nutrition. 5(2): 58–61.

Menegol, T., A.B. Diprat, E. Rodrigues, and R. Rech. 2017. Effect of temperature and nitrogen concentration on biomass composition of *Heterochlorella luteoviridis*. Food Science and Technology International. 37(Special issue): 28–37.

Orset, S.C., and A.J. Young. 2000. Exposure to low irradiances favors the synthesis of *9-cis* beta, beta-carotene in *Dunaliella salina* (Teod.). Plant Physiology. 122: 609–618.

Orosa, M., D. Dranqueira, A. Cid and J. Abalde. 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology. 96: 373–378.

Pick, U., L. Karni and M. Avron. 1986. Determination of ion content and ion fluxes in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. Plant Physiology. 81: 92–96.

Relevy, N.Z., R. Ruhl, A. Harari, I. Grosskopf, I.Barshack, A. Ben-Amotz, U. Nir, H.E. Gottlieb, Y. Kamari, D. Harats, and A. Shaish. 2015. *9-cis* ß-carotene inhibits atherosclerosis development in female LDLR-/- mice. Functional Foods in Health and Disease. 5(2): 67–79.

Round, F.E. 1973. The Biology of the Algae. 2nd Edn., Edward Arnold Publishers, London, UK.

Sadighara, P., M. Saghafi, A. Erfanmanesh, and M. Mahdaviyekta. 2016. Antioxidant activity and properties of outer shell pistachios in different temperature of cooking. Der Pharmacia Lettre. 8(12): 263–266.

Sathasivam, R., P. Pongpadung, J. Praiboon, A. Chirapart, S. Trakulnaleamsai, S. Roytrakul, and N. Juntawong. 2018. Optimizing NaCl and KNO_3 concentrations for high beta-carotene production in photobioreactor by *Dunaliella salina* KU11 isolated from saline soil sample. Chiang Mai Journal of Science. 45(1): 106–115.

Srinivasan, R., A. Mageswari, P. Subramanian, C. Suganthi, A. Chaitanyakumar, V. Aswini, and KM. Gothandam. 2018. Bicarbonate supplementation enhances growth and biochemical composition of *Dunaliella salina* V-101 by reducing oxidative stress induced during macronutrient deficit conditions. Scientific Reports. 8: 69–72.

Telfer, A., A. Pascal, and A. Gall. 2008. Carotenoids in photosynthesis. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander J (eds) Carotenoids, vol 4., Natural functions. Birkhauser. pp 265–308.

Weinrich, T., Y. Xu, C. Wosu, PJ. Harvey, and G. Jeffery. 2019. Mitochondrial Function, Mobility and Lifespan Are Improved in *Drosophila melanogaster* by Extracts of *9-cis* ß-Carotene from *Dunaliella salina*. Marine Drugs. 17(5): 279.

Wu, Z., P. Duangmanee, P. Zhao, N. Juntawong, and C. Ma. 2016. The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three *Dunaliella salina* strains isolated from saline soil. Jundishapur Journal of Microbiology. 1: 1–9.

Xu, Y., and P.J. Harvey. 2019. Carotenoid production by *Dunaliella salina* under red light. Antioxidants. 8(5): 123.

Xu, Y., and P.J. Harvey. 2019. Red light control of ß-Carotene isomerisation to *9-cis* ß-carotene and carotenoid accumulation in *Dunaliella salina*. Antioxidants. 8(5): 148.

Xu, Y., IM. Ibrahim, CI. Wosu, A. Ben-Amotz, and PJ. Harvey. 2018. Potential of new isolates of *Dunaliella salina* for natural ß-carotene production. Biology. 7(1): 14.