

ผลของไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโต การสะสมแคโรทีนอยด์ และปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 สายพันธุ์ไทย

Effect of different bicarbonate concentrations on growth performance, carotenoid accumulation and β -carotene isomer content in Thai *Dunaliella salina* NUAC09

ปฏิพัทธ์ สันปาเป้า¹, วิทยา ทาวงศ์¹, ปิยวัฒน์ ปองผดุง¹ และ สุพัฒน์ พลชา^{1*}

Patipat Sanpapao¹, Wittaya Tawong¹, Piyawat Pongpadung¹ and Supat Ponza^{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* เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีความสำคัญสำหรับการผลิตสารรงควัตถุเบต้าแคโรทีนธรรมชาติ ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง โดยสารกลุ่มนี้ถูกนำไปใช้ทั้งในอุตสาหกรรมที่หลากหลายเช่น ด้านโภชนาการ เภสัชศาสตร์ และเครื่องสำอาง เป็นต้น งานวิจัยนี้มุ่งเน้นเพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโต การสะสมรงควัตถุและปริมาณไอโซเมอร์ *cis* และ *trans* เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 สายพันธุ์ไทย ภายใต้ปริมาณที่แตกต่างกัน (0.000, 0.022, 0.043, 0.065 และ 0.086 g NaHCO₃/L) ของไบคาร์บอเนต (HCO₃⁻) ในสูตรอาหาร Johnson ผลการทดลองพบระดับการเจริญเติบโต (1.42×10^6 cell/mL) ปริมาณคลอโรฟิลล์ *a* (1.75 μ g/mL) และปริมาณแคโรทีนอยด์ (5.36 μ g/mL) ที่เหมาะสมในสาหร่ายสายพันธุ์ทดสอบภายใต้การเลี้ยงในอาหารที่มีไบคาร์บอเนต 0.043 g NaHCO₃/L เมื่อตรวจสอบปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน (*all-trans* และ *9-cis*) และกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH radical พบสูงที่สุดในสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีไบคาร์บอเนต 0.086 g NaHCO₃/L ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณไบคาร์บอเนตมีผลต่อการเจริญเติบโต ปริมาณรงควัตถุและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09

คำสำคัญ: ดูนาลิเอลล่า; ไบคาร์บอเนต; แคโรทีนอยด์; ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน

ABSTRACT: *Dunaliella* is an important green microalga for the production of natural β -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, pharmaceuticals and cosmetics. This study was focused on investigating growth performance, accumulations of pigments and *cis/trans*- β -carotene isomers ratio of Thai *D. salina* NUAC09 under different bicarbonate (HCO₃⁻) concentrations (0.000, 0.022, 0.043, 0.065 and 0.086 g NaHCO₃/L) in Johnson medium. Results showed that the optimum cell density (1.42×10^6 cell/mL), chlorophyll *a* content (1.75 μ g/mL) and carotenoid content (5.36 μ g/mL) occurred in the tested strain cultured at 0.043 g NaHCO₃/L. When determined crude extract, the highest total β -carotene (*all-trans* and *9-cis*) and DPPH radical inhibiting activity found in a strain cultured at 0.086 g NaHCO₃/L. Overall, our results indicated that bicarbonate concentration affected growth, pigment content and β -carotene isomer content of Thai *Dunaliella salina* NUAC09.

Keywords: *Dunaliella*; bicarbonate; carotenoid; β -carotene isomer

* Corresponding author: supatp@nu.ac.th

Received: date; August 13, 2021 Accepted: date; January 13, 2022 Published: date; June 30, 2022

บทนำ

เบต้าแคโรทีน (β -carotene) เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีรงควัตถุเป็นสีส้มและสีเหลือง พบได้ทั่วไปในผัก ผลไม้ และสาหร่ายขนาดเล็ก โดยเบต้าแคโรทีนมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และเป็นสารตั้งต้นของกรดิวตามินเอที่สำคัญต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต ในปัจจุบันเบต้าแคโรทีนถูกนำมาใช้ในหลายอุตสาหกรรม เช่น การผลิตอาหารเสริมสุขภาพของมนุษย์ เนื่องจากเบต้าแคโรทีนมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Xu and Harvey, 2019) ขณะที่ในด้านอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเพื่อเพิ่มมูลค่าสัตว์น้ำ เช่น ปลาแซลมอน ปลาเทราต์ (Amaya and Nickell, 2015) จากเหตุผลดังกล่าวมาทำให้สารกลุ่มเบต้าแคโรทีนมีมูลค่าทางการตลาดสูง (ประมาณ 25,000 บาท/กิโลกรัม) และมีความต้องการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Gallego et al., 2013) สาหร่ายที่ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งของเบต้าแคโรทีนในระดับอุตสาหกรรมแล้วในปัจจุบันได้แก่สาหร่ายสกุล *Dunaliella* ซึ่งนับเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหลักชนิดเดียวในขณะนี้ (Gallego et al., 2013) สาหร่ายขนาดเล็กสกุล *Dunaliella* เป็นหนึ่งในสาหร่ายที่สามารถผลิตเบต้าแคโรทีนได้ โดยสามารถผลิตเบต้าแคโรทีนได้สูงถึง 14 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Srinivasan et al., 2018) ขณะที่ยังมีสารชีวโมเลกุลมูลค่าสูงอื่น ๆ เช่น แคโรทีนอยด์ ไขมัน และกรดไขมัน (Fu et al., 2016) จากรายงานของ Braun (2015) พบว่าสาหร่าย *D. salina* ประเทศโมร็อกโกสามารถผลิตเบต้าแคโรทีนได้ถึง 2,100 mg/100 g DW ขณะที่ในแครอทพบเพียง 8.3 mg/100 g DW เท่านั้น นอกจากนี้โครงสร้างไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนจากสาหร่าย *Dunaliella* เช่น 9-cis, 13-cis, 15-cis และ all-trans นั้นมีความหลากหลายมากกว่าที่ได้จากผักและผลไม้ (Xu et al., 2018) จึงทำให้สาหร่าย *Dunaliella* เป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์มากขึ้น ดังนั้นการผลิตเบต้าแคโรทีนที่ได้จากสาหร่ายจึงเป็นแนวทางเลือกเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ในกระบวนการผลิตเบต้าแคโรทีนจำเป็นต้องกระตุ้นให้สาหร่ายเกิดความเครียดเพื่อให้สาหร่ายผลิตรงควัตถุมากขึ้นกว่าปกติ เนื่องจากสาหร่ายที่ถูกเพาะเลี้ยงและเจริญเติบโตภายใต้สภาพแวดล้อมที่เป็นปฏิปักษ์ (extreme condition) จะมีการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เพิ่มมากขึ้นเพื่อใช้ในการปกป้องเซลล์ จากงานวิจัยของหลายประเทศพบว่าการเสริมธาตุอนินทรีย์คาร์บอนนั้นสามารถช่วยปรับปรุงการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายที่อยู่ในสภาวะปรับตัวได้ (lag phase) (White et al., 2013; Mokashi et al., 2016; Pan-utai et al., 2017) เนื่องจากธาตุคาร์บอนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต ปริมาณไขมันและการสะสมรงควัตถุ (Srinivasan et al., 2018) โดยปกติสาหร่ายจะนำคาร์บอนเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงผ่านเอนไซม์ carbonic anhydrase (Gardner et al., 2012) นอกจากนี้ *Dunaliella* เป็นสาหร่ายไม่กี่ชนิดที่สามารถเจริญเติบโตโดยใช้คาร์บอนในรูปแบบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) ได้ ขณะที่สาหร่ายชนิดอื่นต้องทำการเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นไบคาร์บอเนตก่อนจึงจะสามารถนำไปใช้ภายในเซลล์ได้ (Srinivasan et al., 2015) จากงานวิจัยของ Srinivasan et al. (2015) ที่ศึกษาผลของอนินทรีย์คาร์บอนต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนและกรดไขมันของสาหร่าย *D. salina* พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนตที่ 8.4 ถึง 12.6 g/L มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมปริมาณเบต้าแคโรทีนของสาหร่ายมากถึง 2.36 เท่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (0 g/L) อีกทั้งการเสริมไบคาร์บอเนตร่วมกับการขาดธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซิลิเคต) ยังสามารถช่วยลดการเกิดอนุมูลอิสระ (ROS) และช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต ชีวมวล โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และการสะสมเบต้าแคโรทีน (192.8 $\mu\text{g}/100\text{mg DW}$) ของสาหร่าย *D. salina* ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าปัจจัยธาตุคาร์บอนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุของสาหร่ายเป็นอย่างยิ่ง

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับธาตุคาร์บอนต่อองค์ประกอบของเบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *Dunaliella* ยังน้อย เนื่องจากขาดองค์ความรู้ในการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ซิสเบต้าแคโรทีนของสาหร่ายให้สูงขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของไบคาร์บอเนตต่อการเจริญเติบโต การสะสมแคโรทีนอยด์ องค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน และกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 สายพันธุ์ไทย และผลจากการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาและส่งเสริมการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อการผลิตซิสเบต้าแคโรทีนในเชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเก็บรักษาสาหร่ายพันธุ์สาหร่าย

สาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 จากคลังเก็บสาหร่าย สาขาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร และจากการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ NUAC09 มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ที่สูง จึงถูกคัดเลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) โดยทำการเก็บรักษาหัวเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์บนอาหารแข็งสูตร D medium (Pick et al., 1986) ที่ความเค็ม 1.0 M NaCl ระดับอุณหภูมิ 25 ± 1 °C ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง $70 \mu\text{mol PPFm}^2/\text{s}$ จากนั้นนำหัวเชื้อสาหร่ายมาถ่ายเชื้อลงขวดรูปชมพู่ ขนาด 1 L ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร Johnson (Lv et al., 2016) ปริมาตร 500 mL และ pH เท่ากับ 7.1 ± 0.2 เพาะเลี้ยงตามสภาวะที่กล่าวมาข้างต้น จนสาหร่ายมีปริมาณเพียงพอต่อการทดลองเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น (starter culture)

การทดลองผลของปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) โดยแบ่งการทดลองเป็น 5 ชุดการทดลอง (Treatment; T) ชุดทดลองละ 3 ขั้ว เพาะเลี้ยงสาหร่าย NUAC09 ในอาหารสูตรของ Johnson (Borowitzka, 1988) ที่มีระดับความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) แตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 0.000 (T1), 0.022 (T2), 0.043 (T3; ชุดควบคุม), 0.065 (T4) และ 0.086 (T5) g NaHCO_3/L โดยใช้ระดับโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.043 g NaHCO_3/L เป็นชุดควบคุม (T3) เนื่องจากเป็นระดับที่สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ปกติตามสูตรอาหาร Johnson (Borowitzka, 1988) ในแต่ละการทดลองจะติดตั้งระบบเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้หลอดแก้วขนาด 200 mL และมีปริมาตรการเลี้ยงรวม 190 mL ประกอบด้วยหัวเชื้อสาหร่าย 10 เปอร์เซ็นต์ (ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 cell/mL) ความเข้มแสงแบบต่อเนื่อง $200 \mu\text{mol PPF m}^2/\text{s}$ ช่วงเวลาได้รับแสงแบบต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 ± 2 °C พร้อมทั้งให้อากาศ โดยทำการเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 14 วัน

การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และผลผลิตชีวมวล

ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายทุก ๆ 2 วัน ปริมาตร 2 mL นำมานับจำนวนเซลล์ NUAC09 โดยใช้ โดยใช้สไลด์นับเซลล์ (hemocytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) (Nguyen et al., 2016) จากนั้นนำตัวอย่างที่เหลือมาตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนที่เป็นอาหารออกจนเหลือเพียงตะกอนเซลล์ของสาหร่าย เติมน้ำซีโตนเข้มข้น ปริมาตร 1.5 mL ทั้งไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดคลอโรฟิลล์ เอ และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ตามวิธีการของ Srinivasan et al. (2018) เมื่อสิ้นสุดการทดลองระยะเวลา 14 วัน ทำการตรวจสอบน้ำหนักแห้งของสาหร่าย (biomass dry weight) โดยเก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 rpm แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการชั่งน้ำหนักและรายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (g/L) ตามวิธีการของ Srinivasan et al. (2018) จากผลที่ได้นำไปคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate) ตามสมการคือ $\mu = (\ln X_2 - \ln X_1)/(t_2 - t_1)$ โดย X_1 กับ X_2 คือ ค่าคลอโรฟิลล์เริ่มต้นและวันที่เก็บเกี่ยว ส่วน t_1 กับ t_2 คือ เวลาที่เริ่มเพาะเลี้ยงและวันที่เก็บเกี่ยวสาหร่าย (วัน) (Srinivasan et al., 2018) จากนั้นนำสาหร่ายส่วนที่เหลือไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนอาหารออกจนเหลือเพียงส่วนที่เป็นเซลล์ของสาหร่าย นำเซลล์สาหร่ายไปกำจัดน้ำในระดับเซลล์ด้วยการทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (freeze dryer) เพื่อเก็บไว้ใช้วิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีนและองค์ประกอบของไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน

นำสาหร่ายที่ผ่านการทำแห้งมาสกัดสาร β -carotene โดยชั่งตัวอย่าง 100 mg มาทำละลายด้วย MTBE:MeOH (20:80) ปริมาตร 10 mL จากนั้นตรวจวัดปริมาณโดยใช้เครื่อง HPLC ตามวิธีการของ Xu et al. (2018) โดยใช้ Column YMC C18 สารชะล้างที่ (methanol ต่อ ethanol) อัตราการไหลอยู่ที่ 1.0 mL/minute อุณหภูมิคอลัมน์ 10 °C ก๊าซไนโตรเจนความดัน 60 psi ปริมาตรที่ฉีด 5 μL ระยะเวลา 24 นาที ตัวตรวจสัญญาณ (UV/VIS detection) ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และทำการเปรียบเทียบจากกราฟของสารมาตรฐาน *all-trans* β -carotene (Sigma-Aldrich, USA) นำค่าพื้นที่พีค (peak area) ที่วัดได้สร้างสมการถดถอยเชิงเส้น ซึ่ง

สมการที่ได้ คือ $y = 3338.6x - 9467.7$ ($R^2 = 0.99$) เปรียบเทียบค่าเวลาการคงอยู่ (retention time; RT) ระหว่างสารสกัดสาหร่ายกับสารละลายมาตรฐาน *all-trans* β -carotene และจำแนกพิกของสารตามวิธีการของ Weinrich et al. (2019) กับ Xu et al. (2018) การศึกษาครั้งนี้พิจารณาถึงลักษณะของ *all-trans* และ *9-cis* ซึ่งแสดงลักษณะของพิกได้เด่นชัดที่สุด

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย

วิธี DPPH radical scavenging activity ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nguyen et al. (2016) โดยนำสารสกัดหยาบจากสาหร่ายมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10 – 1,000 $\mu\text{g/mL}$ ด้วยสารละลายอะซิโตนเข้มข้น จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างและสารละลาย DPPH radical ในเมทานอล ที่มีความเข้มข้น 0.05 mM มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Synergy H1, BioTek) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตรวจวัดได้ไปคำนวณเป็นร้อยละความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (%inhibition) ด้วยสมการกราฟมาตรฐาน ascorbic acid ($y = ax + b$) จากนั้นจึงนำค่า %inhibition ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่ได้จากการคำนวณไปสร้างเป็นกราฟเส้นตรงเพื่อใช้คำนวณหาค่า Half maximal inhibitory concentration (IC_{50})

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม R version 4.4.1 (R Development Core Team, 2009)

ผลการศึกษา

ผลของระดับไบคาร์บอเนตต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 ในอาหารสูตร Johnson ที่มีปริมาณไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) 0.000 (T1), 0.022 (T2), 0.043 (T3; ชุดควบคุม), 0.065 (T4) และ 0.086 (T5) g NaHCO_3/L ตามลำดับ จากนั้นทำการติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่าย เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าสาหร่ายในทุกชุดการทดลอง (Figure 1) มีลักษณะการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะปรับตัว (lag phase) ในวันที่ 0 ถึง 2 จากนั้นจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง (exponential phase) ตั้งแต่วันที่ 2 ถึง 14 ในชุดการทดลอง T2, T3, T4 และ T5 ขณะที่ชุดการทดลอง T1 เซลล์จะเข้าสู่ระยะหยุดนิ่ง (stationary phase) หลังจากวันที่ 12 ของการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ชุดการทดลอง T3 (0.043 g NaHCO_3/L) มีจำนวนเซลล์สูงสุด เท่ากับ $1.42 \pm 0.33 \times 10^6$ cell/mL ขณะที่จำนวนเซลล์ต่ำสุด คือ ชุดการทดลอง T1 (0.000 g NaHCO_3/L) เท่ากับ $0.97 \pm 0.27 \times 10^6$ cell/mL ($p > 0.05$) (Table 1)

จากผลการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติในตาราง 1 พบว่าปริมาณรงควัตถุ ผลผลิตชีวมวล อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกชุดการทดลอง ($p > 0.05$) โดยปริมาณคลอโรฟิลล์เอ มีค่าอยู่ในช่วง 1.32 – 1.75 $\mu\text{g/mL}$ และ 1.24 – 1.32 pg/cell (Table 1 และ Figure 2A) ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์รวม มีค่าอยู่ในช่วง 4.33 – 5.36 $\mu\text{g/mL}$ และ 3.64 – 4.43 pg/cell (Table 1 และ Figure 2B) อัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์กับคลอโรฟิลล์เอ มีค่าอยู่ในช่วง 3.29 – 3.43 เท่า การเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดจากน้ำหนักแห้ง (biomass dry weight) มีค่าอยู่ในช่วง 0.22 – 0.37 g/L อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยจำเพาะ (SGR) มีค่าอยู่ในช่วง 0.25 – 0.35 μ/day และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time: td) มีค่าอยู่ในช่วง 2.02 – 2.88 day (Table 1)

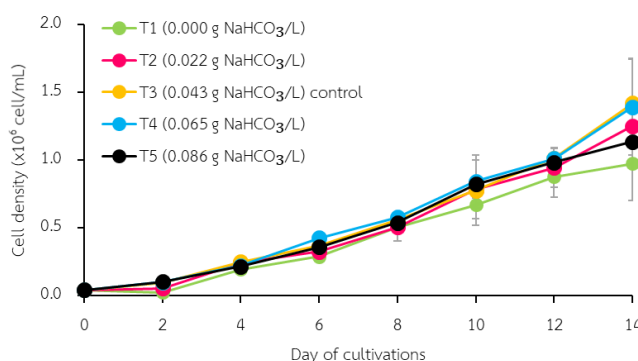


Figure 1 Cell density ($\times 10^6$ cell/mL) of *D. salina* NUAC09 grown in Johnson medium with different bicarbonate concentrations

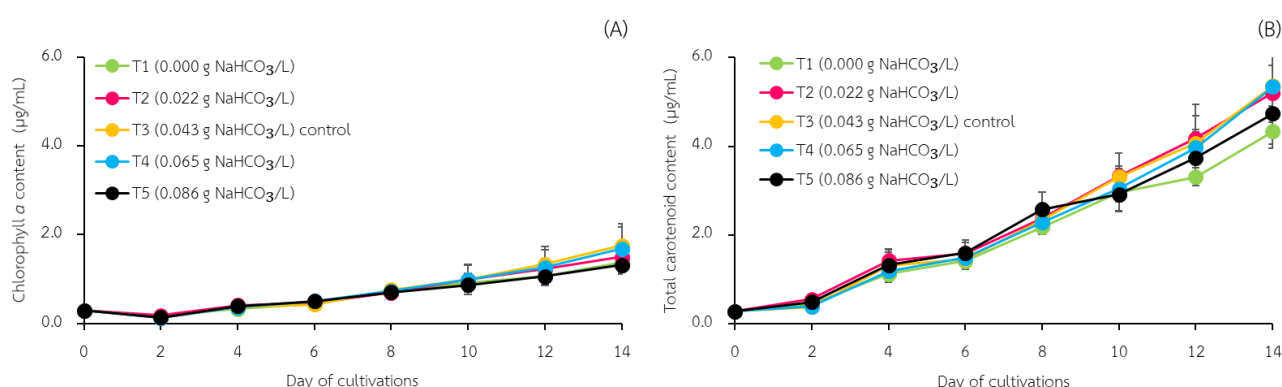


Figure 2 Chlorophyll *a* content (A) and total carotenoid content (B) represents pigment concentrations by *D. salina* NUAC09 grown in Johnson medium under different bicarbonate concentrations

Table 1 The maximum values of growth parameters and pigment contents of *D. salina* NUAC09 grown in different bicarbonate concentration

Parameters	Concentrations of bicarbonate					p-value
	0.000 g	0.022 g	0.043 g	0.065 g	0.086 g	
	NaHCO ₃ /L	NaHCO ₃ /L	NaHCO ₃ /L	NaHCO ₃ /L	NaHCO ₃ /L	
	(T1)	(T2)	(T3)	(T4)	(T5)	
Cell number ($\times 10^6$ unit/mL)	0.97 $\pm$ 0.27	1.25 $\pm$ 0.16	1.42 $\pm$ 0.33	1.39 $\pm$ 0.35	1.14 $\pm$ 0.03	0.26
Chlorophyll <i>a</i> (µg/mL)	1.38 $\pm$ 0.24	1.50 $\pm$ 0.30	1.75 $\pm$ 0.23	1.68 $\pm$ 0.49	1.32 $\pm$ 0.21	0.40
Chlorophyll <i>a</i> (pg/cell)	1.32 $\pm$ 0.04	1.25 $\pm$ 0.12	1.32 $\pm$ 0.03	1.24 $\pm$ 0.02	1.25 $\pm$ 0.06	0.39
Total carotenoid (µg/mL)	4.33 $\pm$ 0.38	5.21 $\pm$ 0.93	5.36 $\pm$ 0.46	5.34 $\pm$ 0.80	4.74 $\pm$ 0.69	0.34
Total carotenoid (pg/cell)	4.11 $\pm$ 0.46	3.88 $\pm$ 0.01	4.18 $\pm$ 0.28	3.64 $\pm$ 0.04	4.43 $\pm$ 0.32	0.06
Carotenoid/Chlorophyll <i>a</i>	3.34 $\pm$ 0.02	3.42 $\pm$ 0.01	3.31 $\pm$ 0.01	3.29 $\pm$ 0.60	3.43 $\pm$ 0.01	0.94
Biomass dry weight (g/L)	0.37 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.07	0.30 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.03	0.06
Specific growth rate* (µ/day)	0.25 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.05	0.35 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.09	0.20
Doubling time (day)	2.76 $\pm$ 0.41	2.88 $\pm$ 0.67	2.40 $\pm$ 0.38	2.02 $\pm$ 0.25	2.18 $\pm$ 0.65	0.24

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

ผลของไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันต่อองค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 หลังจากการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน โดยใช้ HPLC พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ระดับไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน แสดงพีค *all-trans* และ พีค *9-cis* เบต้าแคโรทีน อย่างชัดเจน โดยมีเวลาการคงอยู่ (retention time; RT) เท่ากับ 20.2 และ 20.9 นาที ตามลำดับ ซึ่งพีค *all-trans* จากตัวอย่างสาหร่ายมีเวลาการคงอยู่ (RT) ตรงกับพีคของสารมาตรฐาน *all-trans* เบต้าแคโรทีน

Table 2 Concentrations of β -carotene (*all-trans* and *9-cis*) isomers in *D. salina* NUAC09 grown in different bicarbonate concentration

Concentration of bicarbonate	Concentration of β -carotene isomer (mg/g DW)		
	<i>all-trans</i>	<i>9-cis</i>	Total
0.000 g NaHCO ₃ /L (T1)	124.1±5.8 ^{ns}	43.2±1.3 ^{ns}	167.3±7.1 ^{ns}
0.022 g NaHCO ₃ /L (T2)	114.9±3.9 ^{ns}	43.0±7.6 ^{ns}	157.9±11.5 ^{ns}
0.043 g NaHCO ₃ /L (T3)	120.4±1.5 ^{ns}	44.6±0.3 ^{ns}	165.0±1.8 ^{ns}
0.065 g NaHCO ₃ /L (T4)	135.1±4.5 ^{ns}	50.6±8.2 ^{ns}	185.7±12.7 ^{ns}
0.086 g NaHCO ₃ /L (T5)	140.6±0.5 ^{ns}	46.0±1.6 ^{ns}	186.6±2.1 ^{ns}

Remark: Averages $\pm$ Standard deviation in the same column followed by the different letters are significantly different ($p < 0.05$), ns = not significant

ปริมาณไอโซเมอร์ *all-trans*, *9-cis* และ Total (*all-trans* และ *9-cis*) จากสารสกัดเบต้าแคโรทีนของตัวอย่างสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ระดับไบคาร์บอเนตที่สูงขึ้น มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (Table 2) โดยชุดการทดลองที่มีปริมาณไอโซเมอร์รวม (Total) ของเบต้าแคโรทีนสูงสุด คือ ชุดการทดลอง T5 (0.086 g NaHCO₃/L) มีปริมาณไอโซเมอร์รวม เท่ากับ 186.6±2.1 mg/g DW ขณะที่ชุดการทดลอง T2 (0.022 g NaHCO₃/L) มีปริมาณไอโซเมอร์รวมต่ำสุด เท่ากับ 157.9±11.5 mg/g DW (Table 2)

ผลของระดับไบคาร์บอเนตต่อฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ที่เลี้ยงภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน โดยวิธี DPPH radical scavenging activity พบว่าปริมาณไบคาร์บอเนตในอาหารที่เพิ่มขึ้นส่งผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 3) เมื่อใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยไบคาร์บอเนต 0.065 (T4) และ 0.086 (T5) g NaHCO₃/L ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความสามารถในการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้น 1.20 – 1.30 เท่า ของชุดควบคุม โดยชุดการทดลองที่มีค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุด คือ ชุดการทดลอง T4 (0.065 g NaHCO₃/L) เท่ากับ 63.3±1.1 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดการทดลอง T1 (0.000 g NaHCO₃/L) มีค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำสุด เท่ากับ 57.6±1.0 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) (Table 3) แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถในการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้นเพียง 1.02 เท่า ของชุดควบคุม ($p < 0.05$) และพบว่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไม่มีความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง ($p > 0.05$) เมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นอกจากนี้เมื่อนำค่าร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบมาคำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) พบว่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกชุดการทดลอง ($p < 0.05$) โดยสารสกัดหยาบจากชุดการทดลอง T5 (0.086 g NaHCO₃/L) สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 7.86±0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดหยาบจากชุดการทดลอง T1 (0.000 g NaHCO₃/L) สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ต่ำที่สุด มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 8.63±0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 3)

Table 3 Antioxidant activity content of DPPH inhibition in *D. salina* NUAC09 grown in different bicarbonate concentration

Concentration of bicarbonate	Inhibition DPPH of crude extract (%)			IC ₅₀ (µg/mL)
	10 µg/mL	100 µg/mL	1,000 µg/mL	
0.000 g NaHCO ₃ /L (T1)	57.6±1.0 ^c	72.8±0.2 ^{ab}	74.9±0.4 ^{ns}	8.63±0.06 ^a
0.022 g NaHCO ₃ /L (T2)	59.9±1.6 ^b	72.8±0.2 ^{ab}	75.0±1.0 ^{ns}	8.32±0.03 ^b
0.043 g NaHCO ₃ /L (T3)	58.1±0.5 ^{bc}	72.1±1.1 ^b	74.1±1.0 ^{ns}	8.57±0.04 ^a
0.065 g NaHCO ₃ /L (T4)	63.3±1.1 ^a	73.2±0.2 ^a	74.1±0.2 ^{ns}	7.87±0.02 ^c
0.086 g NaHCO ₃ /L (T5)	63.2±1.0 ^a	73.8±0.4 ^a	74.0±1.0 ^{ns}	7.86±0.05 ^c

Remark: Averages ± Standard deviation in the same row followed by the different letters are significantly different ($p < 0.05$), ns = not significant

วิจารณ์

ไบคาร์บอเนต (bicarbonate) เป็นรูปแบบหนึ่งของธาตุคาร์บอนที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต กระบวนการสังเคราะห์แสง กระตุ้นการผลิตรงควัตถุ รวมถึงช่วยปรับปรุงการเจริญเติบโตของสาหร่ายภายใต้สภาวะความเครียดจากการขาดสารอาหาร (Srinivasan et al., 2018) จากการศึกษาปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 พบว่าปริมาณของไบคาร์บอเนตที่เติมลงไปในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายส่งผลต่อจำนวนเซลล์ ปริมาณรงควัตถุ และอัตราการเจริญเติบโต โดยปริมาณไบคาร์บอเนตที่เพิ่มขึ้น มีแนวโน้มส่งผลทำให้สาหร่าย *D. salina* NUAC09 เจริญเติบโตและสะสมรงควัตถุเพิ่มสูงขึ้น แต่ปริมาณที่เพิ่มขึ้นนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ($p > 0.05$) ซึ่งอาจจะเกิดจากปริมาณไบคาร์บอเนตที่เลือกใช้ในการศึกษานี้ต่ำกว่าการศึกษาอื่น ที่แสดงผลค่อนข้างชัดเจน เช่น การศึกษาของ Kim et al. (2017) ประเทศเกาหลีใต้ พบว่าการเพิ่มปริมาณไบคาร์บอเนตส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดย 5.0 g NaHCO₃/L มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* สูงสุด (0.70 µ/day) ขณะเดียวกันการเจริญเติบโตกลับมีแนวโน้มลดลงเมื่อปริมาณไบคาร์บอเนตสูงกว่า 10.0 g NaHCO₃/L ส่วน Srinivasan et al. (2015) พบว่าการเสริมไบคาร์บอเนต 8.4 g NaHCO₃/L ทำให้สาหร่าย *D. salina* มีการเจริญเติบโต (1.3 OD₆₈₀) ผลผลิตชีวมวล (1.5 g/L) แคโรทีนอยด์รวม (4.1 µg/mL) และเบต้าแคโรทีน (7.1 µg/mL) สูงสุด แสดงให้เห็นว่าต้องใช้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่สูงกว่า 0.086 g NaHCO₃/L จึงจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตรงควัตถุของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลจากการศึกษานี้พบว่าปริมาณไบคาร์บอเนตในการเพาะเลี้ยงเพียง 0.043 g NaHCO₃/L มีแนวโน้มทำให้การเจริญเติบโตและการผลิตรงควัตถุของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 อยู่ในระดับที่เหมาะสมได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การเสริมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหารส่งผลทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella* มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ การให้ไบคาร์บอเนตเพียงปัจจัยเดียว (Srinivasan et al., 2015; Jeon et al., 2016) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาปัจจัยไบคาร์บอเนตควบคู่กับการเสริมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตให้สูงขึ้น

การตรวจวัดองค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ที่เลี้ยงภายใต้ปริมาณไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่ามีพีคปรากฏขึ้นจำนวน 2 พีค (peak) ได้แก่ พีค all-trans β-carotene และพีค 9-cis β-carotene ซึ่งมีลักษณะของพีคสารที่พบสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ผ่านมา (Xu et al., 2018; Weinrich et al., 2019) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเพิ่มไบคาร์บอเนตในอาหารส่งผลทำให้สาหร่าย *D. salina* NUAC09 มีปริมาณไอโซเมอร์ all-trans, 9-cis และ Total (all-trans และ 9-cis) เพิ่มขึ้นตามไปด้วย ($p > 0.05$) แตกต่างกับรายงานของ Davidi และ Pick (2017) ที่กล่าวว่าปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) ของเบต้าแคโรทีนจะเกิดขึ้นในช่วงที่มีการขาดสารอาหาร (nutrient depletion) เช่น ไนโตรเจน ความเค็ม ฟอสฟอรัสและคาร์บอน เป็นต้น จากงานวิจัยอื่นพบว่าสาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีปริมาณไอโซเมอร์ all-trans และ 9-cis เท่ากับ 138 – 474 และ 124 – 425 mg/g DW (Hu et al., 2008; Lin et al., 2010) ขณะที่ในสาหร่าย *Chlorella*

และ *Scenedesmus* มีปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนรวม (all-trans และ 9-cis) เท่ากับ 0.75 และ 5.76 mg/g DW (Aluc et al., 2018) แสดงให้เห็นว่าสภาวะการเลี้ยงและสภาพแวดล้อมที่แตกต่างส่งผลต่อปริมาณและองค์ประกอบไอโซเมอร์ของสาหร่าย อย่างไรก็ตามในสภาวะปกติไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนจะอยู่ทั้งในรูปแบบ cis และแบบ trans มีปริมาณที่ต่างกันสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ โดย Xu และ Harvey (2019) กล่าวว่าภายใต้เอนไซม์ Phytoene synthase (PSY) ที่มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมกลไกและกำหนดรูปแบบการสังเคราะห์ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนในสาหร่าย ซึ่งกระบวนการจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อสาหร่ายเจริญอยู่ในสภาวะที่เป็นปฏิกิริยา (extreme conditions) เช่น การขาดสารอาหาร ความเข้มแสงสูง และปัจจัยอื่น ๆ จะส่งผลให้สาหร่ายเกิดสภาวะเครียดและตอบสนองเพื่อสร้างสารแคโรทีนอยด์ที่มีคุณสมบัติปกป้องเซลล์ ซึ่งปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายผลิตจะบ่งชี้ถึงการผลิตไอโซเมอร์ที่สูงขึ้น (Xu et al., 2018) หลังจากนั้นเอนไซม์ Phytoene synthase (PSY) จะส่งการให้เซลล์ใช้แคโรทีนอยด์ที่ได้จากกระบวนการวิถีเมวาโลเนต (Mevalonate pathway; MEP) เป็นสารตั้งต้นในผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนในรูปแบบ 9-cis, 13-cis, 15-cis และ rest-cis เพิ่มขึ้นทำให้สัดส่วนของ all-trans β -carotene มีปริมาณที่ลดลง (Davidi et al., 2015; Hu and Harvey, 2019) จากที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าไบคาร์บอเนตในอาหาร (0.086 g NaHCO₃/L) มีผลต่อการสังเคราะห์ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนรวมของสาหร่าย NUAC09 สูงสุด อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาปัจจัยอาหารควบคู่กับปัจจัยอื่น ๆ เพื่อเห็นว่าการสังเคราะห์ cis-isomer เบต้าแคโรทีนให้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์กับการเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ในระบบที่ใหญ่มากขึ้นเพื่อผลิตเบต้าแคโรทีนในระดับเชิงพาณิชย์ต่อไป

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity) ของสารสกัดสาหร่าย *D. salina* NUAC09 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไบคาร์บอเนตในอาหารเพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้ร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูงขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากไบคาร์บอเนตส่งผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเพิ่มขึ้น (Srinivasan et al., 2015) ทำให้สาหร่ายเกิดความเครียดและสร้างสารอนุมูลอิสระขึ้นมา เช่น lipid peroxide (MDA) และ hydrogen peroxide (H₂O₂) (White et al., 2013) จากนั้นภายในเซลล์สาหร่ายมีกลไกการป้องกันตัวจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม (Xu et al., 2018) โดยการสะสมสารรงควัตถุและเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารกลุ่มที่เป็นเอนไซม์ (SOD, CAT และ APX) และไม่ใช่เอนไซม์ (phenolic flavonoid และ carotenoid) (Lv et al., 2016) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Singh et al. (2016) ที่ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่าย *Dunaliella* พบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายที่ระดับความเค็ม 3.0 M NaCl ร่วมกับการขาดธาตุไนโตรเจน (0.0 g/L) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น 42 – 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการเลี้ยงปกติ ขณะที่การศึกษาของ Widowati et al. (2016) ประเทศอินโดนีเซีย พบว่าสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL ของสาหร่าย *D. salina* สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH radical ได้เท่ากับ 58.5 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Nguyen et al. (2016) ประเทศสหรัฐฯ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella* จำนวน 12 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะเครียดจากแสงจะส่งผลทำให้สารสกัดจากสาหร่ายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH radical อยู่ระหว่าง 20 – 60 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสาหร่าย *D. salina* NUAC09 มีสารซึ่งเป็นตัวให้อิโธโรเจน แก่ DPPH radical (Srinivasan et al., 2018) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH radical ของสารมาตรฐาน L-ascorbic acid (positive control) พบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่าย *D. salina* NUAC09 สูงกว่าอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดของสาหร่าย *Dunaliella* มีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสารประกอบกลุ่มแคโรทีนอยด์ (β -carotene, lutein, zeaxanthin) รวมถึงสารกลุ่มอื่น เช่น สารฟีนอลิก (Gentis acid, Catechin และ Epicatechin) ที่พบเฉพาะกลุ่มสาหร่ายสีเขียว และจัดว่าเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันสูง (Lopez et al., 2015) นอกจากนี้พบว่าในสาหร่ายสกุลอื่น เช่น *Chlorella*, *Spirulina*, *Nostoc* และ *Haematococcus* สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH radical) ได้ 12 – 65 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 10 – 100 μ g/mL (Assuncao et al., 2017; Gabr et al., 2020; Mtaki et al., 2020) ดังนั้นสรุปได้ว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ไบคาร์บอเนต 0.086 g/L ส่งผลให้ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระมีค่าสูงสุด และ การใช้สารสกัดหยาบสาหร่ายเพียง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก็มีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระอย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระว่าเป็นผลมาจากสารสำคัญชนิดใด รวมถึงการศึกษารายละเอียดที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัด ซึ่งผลที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางในการนำสารสกัดสาหร่ายไปประยุกต์ใช้ในระดับเชิงพาณิชย์ต่อไป

สรุป

การเจริญเติบโต การผลิตรงควัตถุและปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 สายพันธุ์ไทยที่เพาะเลี้ยงในระดับของไบคาร์บอเนตที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 0.000, 0.022, 0.043, 0.065 และ 0.086 g NaHCO₃/L พบว่าเมื่อปริมาณไบคาร์บอเนตเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้จำนวนเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นตามไปด้วย ซึ่งปริมาณไบคาร์บอเนต 0.043 g NaHCO₃/L มีความเหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย องค์ประกอบของเบต้าแคโรทีนในสาหร่ายที่ทดสอบ พบไอโซเมอร์ 2 ชนิด ที่เด่นชัดที่สุด คือ *all-trans* และ *9-cis* เบต้าแคโรทีน และพบว่าการใช้ปริมาณไบคาร์บอเนต 0.086 g NaHCO₃/L ส่งผลให้สาหร่ายผลิตไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนรวม และกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH radical ได้สูงสุด เท่ากับ 186.6 mg/g DW และ 63.2 – 74.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าปริมาณไบคาร์บอเนตมีผลต่อการเจริญเติบโต ปริมาณ ไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีนและกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 สามารถเป็นแนวทางสำหรับการเลี้ยงเชิงพาณิชย์ในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนา รูปแบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและการศึกษาปัจจัยการเลี้ยงอื่นร่วมด้วยยังมีความจำเป็น ซึ่งจะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของสาหร่ายและเหนี่ยวนำให้สาหร่ายเพิ่มปริมาณผลผลิตเบต้าแคโรทีนให้สูงขึ้นได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ประจำปี 2563 ในการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Aluç, Y., G.B. Kankılıç, and İ. Tüzün. 2018. Determination of carotenoids in two algae species from the saline water of Kapulukaya reservoir by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 41(2): 93–100.
- Amaya, E., and D. Nickell. 2015. Using feed to enhance the color quality of fish and crustaceans. P.269–298. In: D.A. Davis (Ed.). *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Woodhead Publishing, Oxford.
- Assuncao, M.F.G., R. Amaral, C.B. Martins, J.D. Ferreira, S. Ressurreicao, S.D. Santos, J.M.T.B. Varejao, and L.M.A. Santos. 2017. Screening microalgae as potential sources of antioxidants. *Journal of Applied Phycology*. 29: 865–877.
- Braun, L., and M. Cohen. 2015. *Herbs and natural supplements an evidence-based guide*. 4th Edition. Elsevier Australia Press, NSW.
- Borowitzka, M.A. 1988. Algal growth media and sources of cultures. P.456–465. In: M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka (Eds.). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Davidi, L., Y. Levin, S. Ben-Dor, and U. Pick. 2015. Proteome analysis of cytoplasmatic and plastidic β-carotene lipid droplets in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*. 167(1): 60–79.
- 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.
- Fan, J., Y. Cui, M. Wan, W. Wang, and Y. Li. 2014. Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology for Biofuels*. 7(1): 17.
- Fu, W., A. Chaiboonchoe, B. Khraiweh, D.R. Nelson, D. Al-Khairi, A. Mystikou, A. Alzahmi, and K. Salehi-Ashtiani. 2016. Algal cell factories: approaches, applications, and potentials. *Marine drugs*. 14(12): 225.
- Gabr, G.A., S.M. El-Sayed, and M.S. Hikal. 2020. Antioxidant activities of phycocyanin, a bioactive compound from *Spirulina platensis*. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 32(2): 73–85.

- Gallego, E., L. Manjarrez, and L. Herrera. 2013. Effect of subbituminous coal on growth and pigments concentration of *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) cultivated in photobioreactor multiple chambers oscillating. *INTROPICA*. 8: 69–78.
- Gardner, R.D., E. Lohman, R. Gerlach, K.E. Cooksey, and B.M. Peyton. 2012. Comparison of CO₂ and bicarbonate as inorganic carbon sources for triacylglycerol and starch accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*. 110(1): 87–96.
- Hu, C.C., J.T. Lin, F.J. Lu, F.P. Chou, and D.J. 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.
- Jeon, H., J. Jeong, K. Baek, Z. McKie-Krisberg, J.E.W. Polle, and E. Jin. 2016. Identification of the carbonic anhydrases from the unicellular green alga *Dunaliella salina* strain CCAP 19/18. *Algal Research*. 19: 12–20.
- Kim, G.Y., J. Heo, S.H. Kim, and J.I. Han. 2017. Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbon utilization efficiency. *Bioresource Technology*. 237: 72–77.
- Lin, J.T., Y.C. Lee, C.C. Hu, Y.C. Shen, F.J. Lu, and D.J. Yang. 2010. Evaluation of carotenoid extract from *Dunaliella salina* against cadmium induced cytotoxicity and transforming growth factor b1 induced expression of smooth muscle α -actin with rat liver cell lines. *Journal of Food and Drug Analysis*. 18: 301–306.
- Lopez, A., M. Rico, J.M. Santana-Casiano, A. Gonzalez, and M. Gonzalez-Davila. 2015. Phenolic profile of *Dunaliella tertiolecta* growing under high levels of copper and iron. *Environmental Science and Pollution Research*. 22: 14820–14828.
- 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.
- Mokashi, K., V. Shetty, S.A. George, and G. Sibi. 2016. Sodium bicarbonate as inorganic carbon source for higher biomass and lipid production integrated carbon capture in *Chlorella vulgaris*. *Achievements in the Life Sciences*. 10: 111–117.
- Mtaki, K., M.S. Kyewalyanga, and M.S.P. Mtolera. 2020. Assessment of antioxidant contents and free radical-scavenging capacity of *Chlorella vulgaris* cultivated in lowcost media. *Applied Sciences*. 10(23): 8611.
- Nguyen, A., D. Tran, M. Ho, C. Louime, H. Tran, and D. Tran. 2016. High light stress regimen on *Dunaliella salina* strains for carotenoids induction. *Integrative Food, Nutrition and Metabolism*. 3: 347–350.
- Pan-utai, W., P. Parakulsuksatid, and N. Phomkaivon. 2017. Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: organic and inorganic. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 12: 152–158.
- 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.
- Singh, P., M. Baranwal, and S.M. Reddy. 2016. Antioxidant and cytotoxic activity of carotenes produced by *Dunaliella salina* under stress. *Pharmaceutical Biology*. 54(10): 2269–75.
- Srinivasan, R., V.A. Kumar, D. Kumar, N. Ramesh, S. Babu, and K.M. Gothandam. 2015. Effect of dissolved inorganic carbon on beta-carotene and fatty acid production in *Dunaliella* sp. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 175(6): 2895–2906.

- Srinivasan, R., A. Mageswari, P. Subramanian, C. Suganthi, A. Chaitanyakumar, V. Aswini, and K.M. 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.
- Weinrich, T., Y. Xu, C. Wosu, P.J. Harvey, and G. Jeffery. 2019. Mitochondrial function, mobility and lifespan are improved in *Drosophila melanogaster* by extracts of 9-cis β -carotene from *Dunaliella salina*. *Marine Drugs*. 17(5): 279.
- White, D.A., A. Pagarette, P. Rooks, and S.T. Ali. 2013. The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. *Journal of Applied Phycology*. 25: 153–165.
- Widowati, I., M. Zainuri, H.P. Kusumaningrum, R. Susilowati, Y. Hardivillier, V. Leignel, N. Bourgougnon, and J. Mouget. 2017. Antioxidant activity of three microalgae *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* and *Isochrysis galbana* clone Tahiti. *IOP Conference Series, Earth and Environmental Science*. 55: 012067.
- Xu, Y., and P.J. Harvey. 2019. Red light control of β -carotene isomerisation to 9-cis β -carotene and carotenoid accumulation in *Dunaliella salina*. *Antioxidants*. 8: 148.
- Xu, Y., I.M. Ibrahim, C.I. Wosu, A. Ben-Amotz, and P.J. Harvey. 2018. Potential of new isolates of *Dunaliella salina* for natural β -carotene production. *Biology*. 7(1): 14.