ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อผลผลิตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของ *Spirulina (Arthrospira) platensis*

The Effect of Nitrogen Sources on the Productivity and Biochemical Composition of *Spirulina (Arthrospira) platensis*

เจณตี้ธิดา เกียรติ์มนตรี[1*] และ สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์[1]
Janethida Kiatmontri[1*] and Suneerat Ruangsomboon[1]

บทคัดย่อ

การประเมินแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *S. platensis* เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ให้ได้ผลผลิตชีวมวลและรงควัตถุซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น โดยเพาะเลี้ยง *S. platensis* ที่ได้รับแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 6 รูปแบบ (โซเดียมไนเตรต, โพแทสเซียมไนเตรต, แอมโมเนียมซัลเฟต, ยูเรีย, แอมโมเนียมไนเตรตและแอมโมเนียมคลอไรด์) โดยทุกชุดการทดลองได้รับปริมาณไนโตรเจนเท่ากัน คือ 0.4 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ผลการศึกษาพบว่า *S. platensis* ที่ได้รับโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลผลิตชีวมวล (0.24 ± 0.01 กรัมต่อลิตร) โปรตีน (68.10 ± 2.92 เปอร์เซ็นต์) ไฟโคไซยานิน (198.74 ± 11.11 มิลลิกรัมต่อกรัม) ไฟโคอิริธรินสูงที่สุด (155.46 ± 9.81 มิลลิกรัมต่อกรัม) และมีแคโรทีนอยด์ 0.0011 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งแคโรทีนอยด์ ไฟโคไซยานินและไฟโคอิริธรินเป็นรงควัตถุที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ขณะที่ *S. platensis* ที่ได้รับโพแทสเซียมไนเตรตมีไขมันสูงที่สุดเท่ากับ 34.65 ± 1.78 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า *S. platensis* ที่ได้รับแอมโมเนียมไนเตรตมีกรดไขมันชนิดที่มีประโยชน์ที่อยู่ในกลุ่มโอเมก้า-6 สูงที่สุด คือ Gamma-Linolenic acid (GLA) มีค่า 22.08 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *S. platensis* เนื่องจากทำให้สาหร่ายมีชีวมวล โปรตีนและสารต้านอนุมูลอิสระสูง

คำสำคัญ: สไปรูลินา แหล่งไนโตรเจน ผลผลิตชีวมวล ไฟโคไซยานิน ไฟโคอิริธริน

Abstract

Assessed an appropriate nitrogen source for *S. platensis* culture to achieve higher biomass yields and pigments. Cultivated *S. platensis* in six different nitrogen sources (sodium nitrate, potassium nitrate, ammonium sulfate, urea, ammonium nitrate, and ammonium chloride). All experiments received the same concentration of nitrogen, 0.4 g nitrogen per liter. The results showed that *S. platensis* cultivated under sodium nitrate as a nitrogen source had the highest biomass yield (0.24 ± 0.01 g/l), protein (68.10 ± 2.92 percent), phycocyanin (198.74 ± 11.11 mg/g), and phycoerythrin (155.46 ± 9.81 mg/g). Carotenoids were also high, 0.0011 ± 0.00 mg/g which carotenoids, phycocyanin and phycoerythrin are important pigments with antioxidant activity. While *S. platensis* fed potassium nitrate had the highest lipid profile, 35.32 ± 7.50 percent, *S. platensis* treated with ammonium nitrate were high in omega-6 beneficial fatty acids. The highest was Gamma-linolenic acid (GLA) at 22.08 percent. This study demonstrates that sodium nitrate is an ideal nitrogen source for *S. platensis*.

Keywords: *Spirulina*, nitrogen source, biomass production, phycocyanin, phycoerythrin

[1]คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1]Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
*Corresponding author, Email: 63604025@kmitl.ac.th

คำนำ

Spirulina (Arthrospira) platensis อยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถสร้างอาหารคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันได้ โดย *S. platensis* ได้ถูกนำเข้าสู่ตลาดอย่างกว้างขวางในวัตถุประสงค์การใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย เนื่องจากองค์ประกอบที่อุดมไปด้วยโปรตีน 50-70% กรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ Aspartate และ Glutamate ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ กรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยเฉพาะกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 และ 6 เช่น Alpha-linolenic acid (ALA), Eicosapentaenoic acid (EPA), Docosahexaenoic acid (DHA), Linoleic acid (LA) และ Gamma linolenic acid (GLA) โดยโอไมก้า-3 มีส่วนช่วยต้านอนุมูลอิสระ ลดคอเลสเตอรอล ควบคุมความดันเลือด มีความจำเป็นต่อการสร้างและซ่อมแซมเซลล์ ในส่วนของโอเมก้า-6 มีส่วนช่วยทำให้ผิวหนังมีสุขภาพดี สาหร่ายชนิดนี้ยังมีวิตามิน (โดยเฉพาะ บี12) รงควัตถุ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิโปรตีน (ไฟโคไซยานินและไฟโคอิริธริน) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบและมีโพลิฟีนอลที่ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ มีประโยชน์ในด้านโภชนเภสัช จึงนิยมนำสาหร่ายชนิดนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง ใช้เป็นสีผสมอาหารและสีย้อม เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ นิยมนำมาผสมในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในมนุษย์ อาหารสัตว์ นอกจากนี้คาร์โบไฮเดรตและไขมันจากสาหร่ายสามารถเปลี่ยนเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพได้ (Ruangsomboon, 2020)

จากคุณสมบัติของ *S. platensis* ที่ได้รับการยอมรับจาก FAO จึงมีการผลิตเป็นอาหารฟังก์ชัน หรืออาหารพลังงานในด้านอาหารสำหรับนักบินอวกาศ ด้วยคุณค่าทางโภชนาการที่สูง มีส่วนช่วยให้ระดับพลังงานเพิ่มขึ้น ช่วยในการปลดปล่อยพลังงานและมนุษย์สามารถย่อยโพลีแซคคาไรด์ได้ง่ายเนื่องจาก *S. platensis* ไม่มีผนังเซลล์ที่เป็นเซลลูโลส องค์กร NASA จึงส่งเสริมให้เป็นอาหารแห่งโลกอนาคต ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สะดวกและรวดเร็วในการบริโภค นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในการควบคุมน้ำหนักและสำหรับนักกีฬาที่ออกกำลังกายย่อมต้องการอาหารที่ให้พลังงานสูง โดยระหว่างออกกำลังกายย่อมมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมาก ดังนั้นอาหารที่เหมาะสมสำหรับนักกีฬาคือเป็นอาหารที่มีโปรตีนและสารต้านอนุมูลอิสระสูง ย่อยง่ายให้พลังงานได้รวดเร็ว ซึ่งพบว่า *S. platensis* สามารถเป็นอาหารที่เหมาะสมให้กับนักกีฬาได้ เนื่องจากให้ปริมาณโปรตีนได้สูงและมีสารที่ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระได้ โดยมีทั้งไฟโคบิลิโปรตีน คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ วิตามินซี วิตามินอี ฟลาโวนอยด์และดีเอชเอ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในการปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกันและลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งได้อีกด้วย (Sudhakar & Premalatha, 2012)

การเพาะเลี้ยง *S. platensis* เพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณมากและมีคุณภาพตรงตามความต้องการนำไปใช้ประโยชน์มีผลมาจากปัจจัยทั้งกายภาพและเคมี เช่น ธาตุอาหารที่เหมาะสม แสง อุณหภูมิ ความเค็ม pH คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนมากที่สุด คือไนโตรเจน (Costa et al., 2001) โดยไนโตรเจนเป็นสารประกอบของกรดอะมิโนและโปรตีน ซึ่งเป็นสารอาหารหลักของสาหร่ายมีหน้าที่ช่วยในการสังเคราะห์แสง สร้างรงควัตถุและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ปัจจุบันมีการศึกษาเรื่องการใช้ไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้งในรูปแบบอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจนอย่างต่อเนื่อง เช่น กรด อะมิโน ไนเตรต ไนไตรต์และยูเรีย (Shanti et al., 2018) โดยรูปแบบที่เหมาะสมจะส่งผลให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ดี รวมทั้งสามารถเพิ่มผลผลิต โปรตีนและรงควัตถุที่ต้องการเพิ่มขึ้น เพื่อนำไปใช้ในการผลิตอาหารพลังงานที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง

การใช้ชนิด หรือแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันพบว่าส่งผลให้มีการเจริญเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายแตกต่างกัน โดยในการศึกษาของ Costa et al. (2001) รายงานว่าการใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยง *S. platensis* ให้ผลผลิตชีวมวล โปรตีนและคลอโรฟิลล์สูงเมื่อเทียบกับยูเรีย เนื่องจากเซลล์สามารถดูดซับอะตอมง่ายกว่า ต่างกับการศึกษาของ Soletto et al. (2005) ที่รายงานว่ายูเรียทำให้ *S. platensis* มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่าแอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับ *S. platensis* นั้นแตกต่างกันในสาหร่ายที่ต่างสายพันธุ์ (strain) กัน ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายสูงที่สุดในการเพาะเลี้ยง จึงควรทราบแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อสายพันธุ์สาหร่ายนั้นๆ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของ *S. platensis* สายพันธุ์ KMITL

วิธีการศึกษา

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis*

เตรียมหัวเชื้อ *S. platensis* สายพันธุ์ KMITL ที่เพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร Zarrouk's medium (Zarrouk, 1966) จนเข้าสู่ระยะปลายการเจริญเติบโตเต็มที่ จากนั้นนำไปเป็นหัวเชื้อสำหรับทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารผันแปรแหล่งไนโตรเจน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งออกเป็น 6 ชุดการทดลอง ดำเนินการทดลอง 4 ซ้ำ ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร Zarrouk's medium ที่ปรับให้มีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ประกอบด้วยโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3), แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$), ยูเรีย ($CH_4N_2O_{16}$), แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3), แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) (ชุดควบคุม) ปริมาณ 2.9, 1.9, 0.86, 1.14, 1.5 และ 2.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (เทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.4 กรัมต่อลิตร ทุกชุดการทดลอง) โดยคำนวณจากการหาค่าน้ำหนักของเลขมวลอะตอมโดยใช้ปริมาณของไนโตรเจนจากสูตร Zarrouk's medium เป็นเกณฑ์ เพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 14 วัน ในฟลาสก์แก้วขนาด 1 ลิตร ให้แสงโดยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ระดับความเข้มแสง 5600 ลักซ์ (ใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์จำนวน 2 หลอด) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิที่ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ให้ฟองอากาศเพื่อให้มีการหมุนเวียนของสาหร่ายต่อเนื่องตลอดเวลา ทำการเก็บข้อมูลเวลา 09.00 น. ทุก 2 วัน และสิ้นสุดการทดลอง

การบันทึกผลการทดลอง

วิเคราะห์น้ำหนักแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (Ruangsomboon, 2020) วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Lowry's method ทำการย่อยและทำให้เกิดสีด้วย Folin-Ciocalteau และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (Lowry et al., 1951) วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Phenol Sulphuric acid method โดยการย่อยด้วย H_2SO_4 และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร (Becker, 1994) วิเคราะห์คลอโรฟิลล์โดยสกัดด้วยเมทานอลและวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 655 นาโนเมตร (Becker, 1994) วิเคราะห์แคโรทีนอยด์โดยสกัดด้วยอะซีโตนและวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 480 นาโนเมตร (Becker, 1994) วิเคราะห์ไฟโคไซยานินโดยสกัดด้วยฟอสเฟตบัฟฟอร์และนำไปแช่เย็น 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 545 และ 620 นาโนเมตรตามวิธีของ Becker (1994) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเมทานอล (Bligh & Dyer, 1959) และวิเคราะห์กรดไขมันโดยการฉีดตัวอย่างด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography) (Ruangsomboon, 2020)

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลจากผลการศึกษาไปคำนวณและวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี ANOVA : One way (Turkey's (HSD)) และวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis*

การเพาะเลี้ยง *S. platensis* โดยแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 6 รูปแบบ ได้แก่ โพแทสเซียมไนเตรต, แอมโมเนียมซัลเฟต, ยูเรีย, แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมคลอไรด์และโซเดียมไนเตรต พบว่าที่สิ้นสุดการทดลองชุดการทดลองที่ได้รับโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลผลิตชีวมวลสูงที่สุด คือ 0.24 ± 0.01 กรัมต่อลิตร (Figure 1) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่ได้รับแอมโมเนียมไนเตรตและแอมโมเนียมซัลเฟต

เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้ *S. platensis* มีการเจริญเติบโตแตกต่างกัน โดย Costa et al. (2001) กล่าวว่าเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถดูดซึมไนเตรตและแอมโมเนียมไอออนได้รวดเร็วจึงอาจส่งผลให้ *S. platensis* ดูดซึมธาตุอาหารแอมโมเนียมหมดเร็วกว่าชุดการทดลองอื่น ส่วนชุดการทดลองที่ให้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นที่ 0.01 M อาจทำให้เป็นพิษต่อ *S. platensis* จึงทำให้ *S. platensis* มีการเจริญเติบโตที่ไม่ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Chasoy et al. (2022) พบว่าโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดเท่ากับ 0.80 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้เอ็นไซม์ไนเตรตรีดักเตสทำงานได้อย่างเต็มที่ ขณะที่แอมโมเนียมซัลเฟตให้อัตราการเจริญเติบโตที่ไม่ดีเนื่องจาก *S. platensis* เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างที่ pH อยู่ในช่วง 9 - 11 (El-Sheekh et al., 2021) ขณะที่แอมโมเนียมซัลเฟตสามารถแตกตัวที่ pH 5 - 6 (Mirhosseini et al., 2021b) เมื่อแอมโมเนียมอยู่ในสภาวะที่เป็นด่างจะทำให้เป็นพิษต่อเซลล์และยับยั้งเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตสที่ทำหน้าที่ดูดซึมแอมโมเนียมเพื่อใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึม

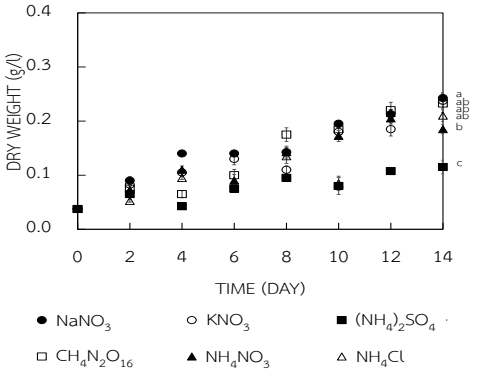

Figure 1 Biomass of *S. platensis* cultivated under different nitrogen sources. Different small letters on the lines indicate a significant difference (p<0.05). Error bars represent ± S.D. of four replicates.

2. แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อรงควัตถุของสาหร่าย *Spirulina platensis*

2.1 คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

ที่สิ้นสุดการทดลองชุดการทดลองที่ให้แอมโมเนียมซัลเฟตมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงที่สุด คือ 4.58 ± 0.48 มิลลิกรัมต่อกรัมสาหร่าย (Figure 2A) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่ให้ยูเรียและแอมโมเนียมคลอไรด์ ไนเตรตไอออนมีความสามารถในการละลายได้ง่ายที่ pH 9.5 - 10 (Mirhosseini et al., 2021a) *S. platensis* จึงสามารถดูดซึมได้อย่างรวดเร็วส่งผลให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น (Uddin et al., 2020) ต่างกับการศึกษาของ Danesi et al. (2011) พบว่าชุดการทดลองที่ให้โพแทสเซียมไนเตรตมีค่าคลอโรฟิลล์สูง 12.30 มิลลิกรัมต่อกรัมเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ให้ยูเรียทุกระดับความเข้มข้น 10.00 - 11.70 มิลลิกรัมต่อกรัม

ชุดการทดลองที่ให้แอมโมเนียมซัลเฟตมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงที่สุดในวันที่ 10 และที่สิ้นสุดของการเพาะเลี้ยง คือ 0.0049 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 0.0015 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ (Figure 2B) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่ให้โพแทสเซียมไนเตรต ยูเรียและแอมโมเนียมคลอไรด์ เมื่อสาหร่ายเจริญเติบโตได้ไม่ดีส่งผลให้สาหร่ายเกิดความเครียดและสะสมแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นเพื่อป้องกันเซลล์เสื่อมสภาพในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สอดคล้องกับการศึกษาของ Santos et al. (2019) ซึ่งศึกษารูปแบบไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อ *S. platensis* พบว่าชุดการทดลองที่จำกัดไนโตรเจนให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่าชุดควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ 3.6 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ รูปแบบไนโตรเจนที่ไม่เหมาะสมต่อ *S. platensis* ทำให้กระบวนการเมทาบอลิซึมเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สมดุลกัน รวมถึงส่งผลให้มีการผลิตแคโรทีนอยด์ลดลง ส่วนการศึกษาของ Ajayan et al. (2012) พบว่าชุดการทดลองที่ให้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงเมื่อ

เทียบกับชุดการทดลองที่ให้โพแทสเซียมไนเตรต 3.12 ± 0.01 และ 2.90 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ โดยแคโรทีนอยด์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สามารถขับออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยวและอนุมูลเปอร์ออกซิลในร่างกายมนุษย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และพบว่ามีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าปริมาณฟีนอล หรือฟลาโวนอยด์จากสารสกัด และสามารถเพิ่มการตอบสนองของภูมิคุ้มกันและป้องกันโรคต่างๆ เช่น มะเร็ง ซึ่ง *S. platensis* มีเบต้าแคโรทีนสูงมากกว่าแครอทถึง 10 เท่า เป็นหนึ่งในสารที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง (Asghari et al., 2016) เหมาะต่อการใช้เป็นส่วนผสมในโปรตีนบาร์ซึ่งต้องการสารต้านอนุมูลอิสระสูง

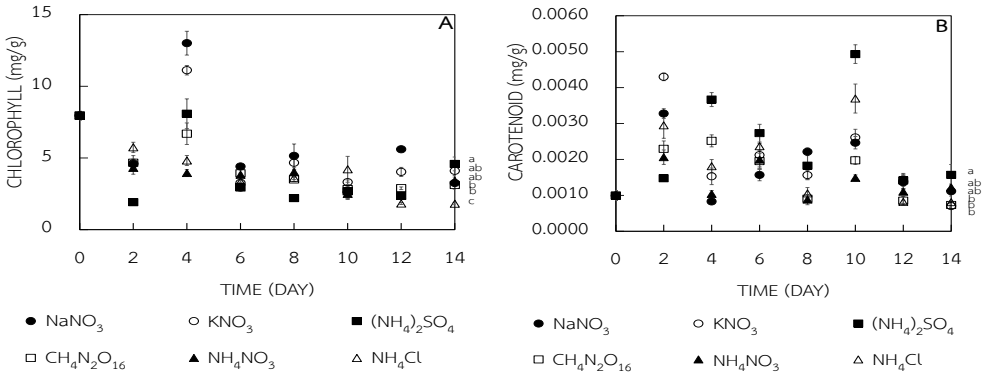

Figure 2 Chlorophyll (A) and Carotenoid (B) content of *S. platensis* cultivated under different nitrogen sources. Different small letters on the lines indicate a significant difference (p<0.05). Error bars represent ± S.D. of four replicates.

2.2 ไฟโคไซยานินและไฟโคอิริธริน

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง *S. platensis* ที่ได้รับโซเดียมไนเตรตมีปริมาณไฟโคไซยานินสูงที่สุดเท่ากับ 198.74 ± 11.11 มิลลิกรัมต่อกรัมสาหร่าย (Figure 3A) โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองอื่น ส่วน Mirhosseini et al. (2021a) ศึกษาเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อ *Arthrospira maxima* พบว่าชุดการทดลองที่ให้โซเดียมไนเตรตมีปริมาณไฟโคไซยานินสูงที่สุดเท่ากับ 0.074 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ชุดการทดลองที่ให้แอมโมเนียมซัลเฟตส่งผลให้ปริมาณไฟโคไซยานินลดลงอย่างรวดเร็ว โดยไฟโคไซยานินจะแปรผันตามแหล่งไนโตรเจน ซึ่ง *S. platensis* มีความสามารถในการเก็บสะสมธาตุอาหารและถ่ายโอนเป็นอะโลไฟโคไซยานินภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Ajayan et al., 2012) ซึ่งไฟโคบิลิโปรตีนเป็นชีวโมเลกุลประเภทโปรตีน โดยมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ (Ruangsomboon, 2020)

ที่สิ้นสุดการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่ให้โซเดียมไนเตรตมีปริมาณไฟโคอิริธรินสูงที่สุดคือ 155.46 ± 9.81 มิลลิกรัมต่อกรัมสาหร่าย (Figure 3B) โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองอื่น เมื่อความหนาแน่นของการเพาะเลี้ยง หรือการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสูงขึ้นจะส่งผลให้สาหร่ายสังเคราะห์กลุ่มรงควัตถุไฟโคบิลิโปรตีน (ไฟโคไซยานินและไฟโคอิริธริน) ที่ทำหน้าที่ในการรับแสงจะเพิ่มขึ้น (Ajayan et al., 2012) โดยรงควัตถุในกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มภูมิคุ้มกันและมีหน้าที่ในการปกป้องเซลล์จากความเครียดที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งไฟโคไซยานินมีความสามารถในการต้านการอักเสบของเซลล์ สามารถกำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลและอนุมูลอิสระออกซิเจนได้ จากการศึกษาของ Hirata et al. (2000) รายงานว่าไฟโคบิลิโปรตีนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ α-tocopherol และ caffeic acid ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบ โดยไฟโคบิลิโปรตีนสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้ทราบว่าสามารถใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยง *S. platensis* เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารพลังงานที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูงสำหรับนักกีฬา (โปรตีนบาร์)

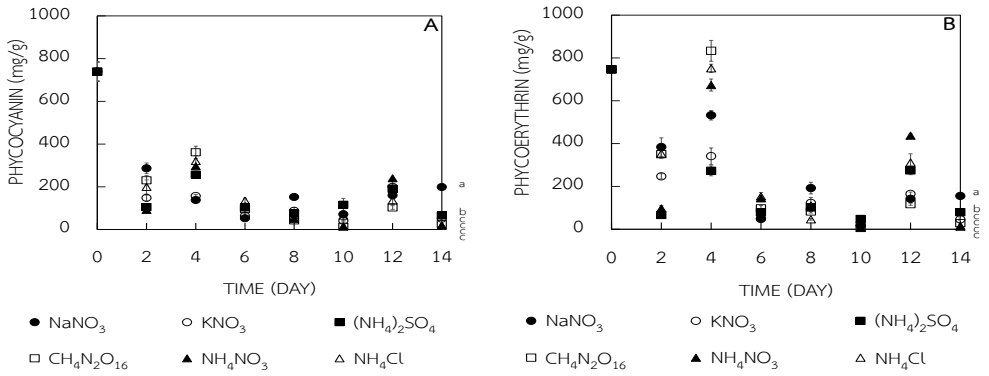

Figure 3 Phycocyanin (A) and Phycoerythrin (B) content of *S. platensis* cultivated under different nitrogen sources. Different small letters on the lines indicate a significant difference (p<0.05). Error bars represent ± S.D. of four replicates.

3. ผลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันของสาหร่าย *Spirulina platensis*

3.1 โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง *S. platensis* ที่ได้รับโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลผลิตโปรตีนสูงที่สุด คือ 68.10 ± 2.92 % ต่อน้ำหนักสาหร่าย (Figure 4A) โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่ให้โพแทสเซียมไนเตรต ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมคลอไรด์ โดยไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนและมีบทบาทในการสังเคราะห์กรดอะมิโนซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีน *S. platensis* อาจดูดซึมโซเดียมไนเตรตเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสังเคราะห์โปรตีนได้ง่ายและโซเดียมไนเตรตมีส่วนช่วยในการทำงานของเอ็นไซม์รีดักเตส (Costa et al., 2018) ซึ่งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีความต้องการโซเดียมมากกว่าชนิดอื่นๆ (Ruangsomboon, 2020) ในส่วนของการศึกษาของ Madkour et al. (2012) ทำการผันแปรแหล่งไนโตรเจน โดยมีโซเดียมไนเตรต แอมโมเนียมไนเตรตและยูเรียพบว่าโซเดียมไนเตรตให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่น คือ 52.62 % โดยโปรตีนเป็นแหล่งพลังงานที่สามารถเทียบเท่าคาร์โบไฮเดรต ซึ่งใน 1 กรัม ให้พลังงานโดยประมาณ 4 กิโลแคลอรี และโปรตีนทำหน้าที่ในการซ่อมแซมและเสริมสร้างส่วนที่สึกหรอของร่างกาย เนื่องจากโปรตีนในร่างกายมีการย่อยสลายและสร้างใหม่อยู่ตลอด ร่างกายมนุษย์จึงต้องการกรดอะมิโนเพื่อใช้ในการผลิตโปรตีน การบริโภคโปรตีนจากพืช หรือสาหร่ายขนาดเล็กเป็นหนึ่งในการควบคุมการได้รับพลังงานจากไขมันส่วนเกินจากเนื้อสัตว์และยังได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายอีกด้วย ซึ่งนักกีฬาต้องการโปรตีน 1.7 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม การเสริมโปรตีนเพื่อเร่งการฟื้นตัวของนักกีฬาจากการออกกำลังกาย หรือร่างกายจากสภาวะเหนื่อยล้าจึงเป็นวิธีที่เหมาะสม นอกจากนี้โปรตีนยังมีหน้าที่ในการผลิตสารแอนติบอดี หรือภูมิคุ้มกันในร่างกาย (Anonymous, 2020) การใช้ *S. platensis* ที่มีโปรตีนสูงผสมในโปรตีนบาร์จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสม

สาหร่าย *S. platensis* ที่ได้รับโพแทสเซียมไนเตรตมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุดที่สิ้นสุดการทดลอง คือ 16.26 ± 1.87 % (Figure 4B) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ให้แอมโมเนียมไนเตรต โดยคาร์โบไฮเดรตจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน พบว่าชุดการทดลองที่ให้โพแทสเซียมไนเตรตมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและไขมันสูง ขณะที่โปรตีนมีค่าต่ำ เนื่องจากธาตุอาหารอาจไม่เพียงพอ *S. platensis* จึงสร้างสารประกอบคาร์บอนขึ้นมาทดแทน ซึ่งจะทำให้เซลล์มีการสะสมแป้งและไขมันมากกว่าปกติ โดยต่างกับการศึกษาของ Madkour et al. (2012) เมื่อผันแปรแหล่งไนโตรเจนระหว่างโซเดียมไนเตรต แอมโมเนียมไนเตรตและยูเรียพบว่าชุดการทดลองที่ให้แอมโมเนียมไนเตรตมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าชุดการทดลองอื่นในทุกระดับความเข้มข้นไนโตรเจนเท่ากับ 16.30 - 24.50 % ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษานี้

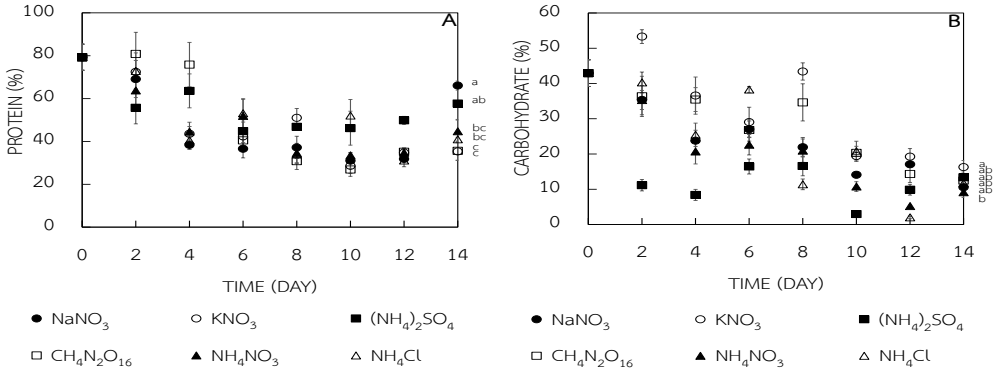

Figure 4 Protein content (A) and Carbohydrate content (B) of *S. platensis* cultivated under different nitrogen sources. Different small letters on the lines indicate a significant difference ($p<0.05$). Error bars represent ± S.D. of four replicates.

3.2 ไขมัน

จากการศึกษาพบว่าโซเดียมไนเตรต โพแทสเซียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรตและแอมโมเนียมคลอไรด์ให้ปริมาณไขมันเท่ากับ 25.39 ± 0.84, 34.65 ± 1.78, 26.30 ± 1.71, 26.22 ± 1.27, 22.95 ± 0.55 และ 27.47 ± 0.93 % ตามลำดับ โดยชุดการทดลองที่ให้โพแทสเซียมไนเตรตมีปริมาณไขมันสูงที่สุด โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลอง ซึ่งสัมพันธ์กับผลของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต เมื่อโปรตีนมีค่าต่ำจะส่งผลให้ *S. platensis* มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและไขมันเพิ่มขึ้น เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนที่มีธาตุอาหารไม่เพียงพอ หรือในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย สาหร่ายมักจะสะสมลิพิดในสภาวะเหล่านี้ (Ruangsomboon, 2020) ขณะที่การศึกษาของ Madkour et al. (2012) พบว่าชุดการทดลองที่ให้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณไขมันสูงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น คือ 15.39 ± 1.31 %

ตารางที่ 1 (Table 1) แสดงการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารชีวโมเลกุลแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับการศึกษาที่มีรายงานก่อนนี้ พบว่าค่าโปรตีนและไขมันในการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูงกว่าการทดลองอื่นๆ ในส่วนของคาร์โบไฮเดรตพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับการทดลองของ Madkour et al. (2012) ขณะที่ผลผลิตชีวมวล คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์และไฟโคไซยานินมีค่าต่ำกว่าการทดลองอื่นๆ

Table 1 Comparison of biomass and biochemical composition of *S. platensis* (*A. platensis*) and A. *maxima* cultivated under different nitrogen sources.

	Maximum Productivity	References
Biomass (g/l)	0.24 ± 0.01 and 0.24 ± 0.01 ($NaNO_3$ and KNO_3)	This study
	0.80 ($NaNO_3$)	Chasoy et al. (2022)
Chlorophyll (mg/g)	4.58 ± 0.48 ($(NH_4)_2SO_4$)	This study
	12.30 (KNO_3)	Danesi et al. (2011)
Carotenoid (mg/g)	0.0015 ± 0.00 ($(NH_4)_2SO_4$)	This study
	2.5 ($NaNO_3$)	Santos et al. (2019)

Table 1 (continued)

	Maximum Productivity	References
	3.12 ± 0.01 (Urea)	Ajayan et al. (2012)
	2.90 ± 0.01 (KNO_3)	Ajayan et al. (2012)
Phycocyanin (mg/ml)	47.93 ± 1.64 ($NaNO_3$)	This study
	A. maxima - 74 ($NaNO_3$)	Mirhosseini et al. (2021)
Phycoerythrin (mg/ml)	37.44 ± 1.40 ($NaNO_3$)	This study
Protein (%)	68.10 ± 2.92 ($NaNO_3$)	This study
	52.62 ($NaNO_3$)	Madkour et al. (2012)
Carbohydrate (%)	16.26 ± 1.87 (KNO_3)	This study
	16.30 (NH_4NO_3)	Madkour et al. (2012)
Lipid (%)	34.65 ± 1.78 (KNO_3)	This study
	15.39 ± 1.31 (Urea)	Madkour et al. (2012)

4. ผลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อชนิดกรดไขมันของสาหร่าย *Spirulina platensis*

จากการศึกษาพบว่า *S. platensis* ที่ได้รับแหล่งไนโตรเจนทุกรูปแบบมีกรดไขมัน C16:0 เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีค่าอยู่ในช่วง 24.08 - 74.64 % (Table 2) กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) มีค่าอยู่ในช่วง 48.90 - 81.71 % โดยค่าต่ำสุดและสูงสุดพบใน *S. platensis* ที่ได้รับแอมโมเนียมไนเตรตและโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) มีค่าอยู่ในช่วง 18.29 - 51.10 % โดยแบ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดียว (Monounsaturated fatty acid) อยู่ในช่วง 1.16 - 13.67 % และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid) 15.13 - 37.43 % โดยกรดไขมันชนิดที่พบมากที่สุดใน *S. platensis* คือ C16:0 หรือ Palmitic acid และพบว่าชุดการทดลองที่ให้แอมโมเนียมไนเตรตมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์สูงที่สุด ซึ่งพบว่าเป็นชนิดที่อยู่ในกลุ่มโอไมก้า-6 สูงที่สุด คือ C18:2n6c หรือ Linoleic acid (LA) และ C18:3n6 หรือ **γ**-linolenic acid (GLA) มีค่า 3.42 และ 22.09 % ตามลำดับ ขณะที่ชุดการทดลองที่ให้แอมโมเนียมซัลเฟตมีกรดไขมันชนิด C18:1n9c หรือ Oleic acid สูงที่สุด คือ 2.46 % และชุดการทดลองที่ให้โซเดียมไนเตรตพบกรดไขมันชนิด C18:3n3 หรือ Linolenic acid สูงที่สุด ซึ่งอยู่ในกลุ่มโอไมก้า-3 คือ 2.22 %

Table 2 Fatty acid profiles (% of dry weight basis) of *S. platensis* cultivated under different nitrogen Sources (data shown only C16-C18).

Fatty acid	$NaNO_3$	KNO_3	$(NH_4)_2SO_4$	$CH_4N_2O_{16}$	NH_4NO_3	NH_4Cl
C16:0	72.35	37.77	74.64	40.05	24.08	39.48
C18:1n9t	0.06	0.00	0.07	0.24	0.01	0.00
C18:1n9c	2.10	0.93	2.46	0.87	1.69	1.07
C18:2n6c	2.58	2.14	2.42	1.53	3.42	2.06
C18:3n3	2.22	0.00	1.78	0.00	1.33	0.00
C18:3n6	1.05	19.34	6.57	19.46	22.09	19.47

Table 2 (continued)

Fatty acid	$NaNO_3$	KNO_3	$(NH_4)_2SO_4$	$CH_4N_2O_{16}$	NH_4NO_3	NH_4Cl
SFA	81.71	73.06	79.83	74.81	48.90	74.11
UFA	18.29	26.94	20.17	25.19	51.10	25.89
MUFA	3.16	3.36	3.51	3.66	13.67	1.16
PUFA	15.13	23.58	16.66	21.53	37.43	24.74

SFA-Saturated fatty acid, UFA-Unsaturated fatty acid, MUFA-Monounsaturated fatty acid, PUFA-Polyunsaturated fatty acid, TFA-Total fatty acid.

สรุปผลการศึกษา

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* สายพันธุ์ KMITL คือโซเดียมไนเตรต เนื่องจากให้ผลผลิตชีวมวล โปรตีน ไฟโคไซยานินและไฟโคอิริธรินสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.24 ± 0.01 กรัมต่อลิตร, 68.10 ± 2.92 เปอร์เซ็นต์, 198.74 ± 11.11 มิลลิกรัมต่อกรัม, 155.46 ± 9.81 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 68.10 ± 2.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งโซเดียมไนเตรตให้แคโรทีนอยด์สูงเช่นเดียวกัน 0.0011 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งแคโรทีนอยด์ ไฟโคไซยานินและไฟโคอิริธรินเป็นรงควัตถุที่สำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง จึงเหมาะสมในการใช้เป็นวัตถุดิบผลิตโปรตีนบาร์อาหารเพื่อสุขภาพต่อมนุษย์

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากโครงการวิจัยโรงไฟฟ้าบางปะกง และจากครอบครัว

เอกสารอ้างอิง

Ajayan, K. V., Selvaraju, M., & K. Thirugnanamoorthy. (2012). Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An in-vitro study. **Biomass and Bioenergy** 47, 436-441.

Asghari, A., Fazilati, M., Latifi, A. Salavati, M. H., & A. Choopani. (2016). A review on antioxidant properties of *Spirulina*. **Journal of Applied Biotechnology Reports** 3, 345-351.

Becker, E. W. (1994) **Microalgae Biotechnology and Microbiology**. Great Britain: Cambridge University Press.

Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology.** 37, 911-917.

Chasoy, G. R., Jasso, R. M. R., Aguilar, C. N., Buitron, G., Chairez, I., & Ruiz, H. A. (2022). Growth kinetics and quantification of carbohydrate, protein, lipids, and chlorophyll of *Spirulina platensis* under aqueous conditions using different carbon and nitrogen sources. **Bioresource Technology.** 346, 1-6.

Costa, J. A. V., Cozza, K. L. Oliveira, L., & G. Magagnin. (2001). Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 17, 439-442.

Costa, S. S., Miranda, A. L., Andrade, B. B., Assis, D. J., Souza, C. O., Morais, M. G., Costa, J. A. V., & Druzian J. I. (2018). Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. **International Journal of Biological Macromolecules.** 116, 552-562

Danesi, E. D. G., Yagui, C. O. R., Sato, S., & Carvalho, J. C. M. (2011). Growth and content of *Spirulina platensis* biomass chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen sources. **Brazilian Journal of Microbiology**. 42, 362-373.

El-Sheekh, M. M., Hassan, L. H. S., & H. H. Morsi. (2021). Growth enhancement of *Spirulina platensis* through Optimization of media and nitrogen sources. **Egyptian Journal of Botany.** 61(1), 61-69.

Hirata, T., Tanaka, M. Ooike, T., & Sakaguchi, M. (2000). Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology** 12, 435-439.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry.** 193(1), 265-275.

Madkour, F. F., Kamil, A. E., & H. S. Nasr. (2012). Production and nutritive value or *Spirulina platensis* in reduced cost media. **Egyptian Journal of Aquatic Research.** 38, 51-57.

Mirhosseini, N., Davarnejad, R., Hallajisani, A., Europa, E. C., Tavakoli, O., Franco, M. C., & Valdivia, V. B. (2021a). Cultivations of *Arthrospira maxima* (Spirulina) using ammonium sulfate and sodium nitrate as an alternative nitrogen sources. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**. 20(2), 475.489.

Mirhosseini, N., Davarnejad, R., Hallajisani, A., Tavakoli, O., & Europa, E. C. (2021b). Nitrogen Starvation effect versus its excess on the performance of *Arthrospira maxima* in Zarrouk's medium. **International Journal of Engineering.** 34(7), 1557-1568.

Ruangsomboon, S. (2020). **Microalgae Cultivation and Utilizations**. Bangkok: Department of Fisheries Science, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. (in Thai).

Santos, R. R., Correa, P. S., Dantas, F. M. L., & Teixeira, C. M. L. (2019). Evaluation of the co-production of total carotenoids, C-phycocyanin and polyhydroxyalkanoates by *Arthrospira platensis*. **Bioresource Technology Reports.** 7, 1-9.

Shanti, G., Premalatha, M., & Anantharaman, N. (2018). Effects of l-amino acids as organic nitrogen source on the growth rate, biochemical composition and polyphenol content of *Spirulina platensis*. **Algal Research.** 35, 471-478.

Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J. C. M., & Converti, A. (2005). Batch and fed batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulfate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture.** 243, 217-224.

Sudhakar, K. & Premalatha, M. (2012). Micro-algal technology for sustainable energy production: State of the art. **Journal of Sustainable Energy & Environment.** 3, 59-62.

Uddin, A. J., Ifaz, M. I., Husna, M. A., Sakib, I., & Rakibuzzaman, M. (2020). Comparative growth analysis of *Spirulina platensis* using urea as a nitrogen substitute for $NaNO_3$. **International Journal of Business, Social and Scientific Research.** 8, 76-80.

Zarrouk, C. (1966). **Contribution to the study of a cyanophycea. Influence of various physical and chemical factors on the growth and photosynthesis of *Spirulina maxima***. Paris: University of Paris.

วันรับบทความ (Received date) : 30 พ.ค. 65
วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 28 ต.ค. 65
วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 10 พ.ย. 65