

รายงานฉบับสมบูรณ์

สภาวะกดดันจากเกลือความเข้มข้นสูงต่อการสังเคราะห์ไขมันใน *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1

Salt Stress on Lipid Biosynthesis in *Spirulina platensis* strain C1

คณะผู้วิจัย

นางสาววิภาวรรณ เสียงดัง (หัวหน้าโครงการ)

นางสาวกัลยาณี ไพฑูรย์รังษฤษฎ์ (ผู้ร่วมโครงการ)

นางบุษยา บุนนาค (ที่ปรึกษาโครงการ)

วันเริ่มต้นโครงการ 1 ตุลาคม 2552

วันสิ้นสุดโครงการ 30 กันยายน 2553

ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2553

บทคัดย่อ

สไปรูลินา (*Spirulina*) จัดเป็นไซยาโนแบคทีเรียชนิดหนึ่ง ที่ถูกใช้บริโภคในรูปอาหารเสริมสุขภาพมนุษย์ และใช้เป็นส่วนผสมเสริมในอาหารสัตว์ การเพาะเลี้ยงโดยทั่วไปนิยมทำในบ่อเปิดกลางแจ้ง ซึ่งเป็นสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมอยู่ตลอดเวลาซึ่งการระเหยของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงในระหว่างวันทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารในบ่อเลี้ยงเพิ่มขึ้นโดยทำให้เกิดสภาวะความเข้มข้นเกลือสูงกระทบต่อการเจริญเติบโตและได้ผลผลิตชีวมวลต่ำและทั้งยังมีผลต่อองค์ประกอบทางชีวเคมีต่าง ๆ ในเซลล์อีกด้วย งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของสภาวะความเข้มข้นเกลือสูงที่มีต่อการเจริญเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ กิจกรรมการสังเคราะห์แสง ปริมาณลิพิด สัดส่วนของกรดไขมันในเซลล์และในลิพิดชนิดต่าง ๆ และการแสดงออกของยีนที่ถอดรหัสเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการเติมพันธะคู่ โดยเฉพาะเลี้ยง *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ในอาหารสูตร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และสูตรความเข้มข้นเกลือสูงที่ 0.5 M และ 0.75 M NaCl ซึ่งพบว่า *Spirulina* ที่เจริญเติบโตในอาหารความเข้มข้นเกลือสูงมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ลดลงเมื่อเทียบกับที่เจริญเติบโตในอาหารสูตร Zarrouk's ปกติ ($\mu = 0.025 \text{ hr}^{-1}$) โดยที่ 0.5 M และ 0.75 M NaCl มี μ เท่ากับ 0.016 hr^{-1} และ 0.11 hr^{-1} ตามลำดับ ปริมาณคลอโรฟิลล์ก็ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อ *Spirulina* เจริญเติบโตที่ 0.75 M ภายใน 24 hr ซึ่งผลของการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง ความเข้มข้นเกลือสูงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ monoglycerol diacylglycerol (MGDG) และ digalactosyl diacylglycerol (DGDG) ซึ่งเป็น glycerolipid หลักใน *Spirulina* โดยในระยะ stationary phase ปริมาณ MGDG จะลดลงเมื่อความเข้มข้นเกลือสูงขึ้นซึ่งตรงข้ามกับปริมาณ DGDG ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์มีอายุเพิ่มขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นเกลือสูงไม่มีผลต่อปริมาณ sulfoquinovosyl diacyl glycerol (SQDG) และ phosphoglycerol (PG) โดยพิจารณาจากรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่ไม่แน่นอนหรือเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าปริมาณลิพิดในทุกชนิดขึ้นอยู่กับอายุเซลล์มากกว่าความเข้มข้นของเกลือ และในสภาวะปกติ *Spirulina* ที่อยู่ในระยะ logarithmic phase จะมีสัดส่วนของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสูงกว่าที่อยู่ในระยะ stationary phase ซึ่งขัดแย้งกับในสภาวะเกลือสูงซึ่ง *Spirulina* มีปริมาณกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสูงเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์มีอายุเพิ่มขึ้น ทั้งนี้การศึกษาในระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมพันธะคู่ซึ่งได้แก่ ยีน *desC*, *desA* และ *desD* ที่ถอดรหัส $\Delta 9$, $\Delta 12$ และ $\Delta 6$ desaturases ตามลำดับ พบว่า การเพิ่มขึ้นของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวภายใต้ความเข้มข้นเกลือสูงไม่ได้ถูกควบคุมที่ระดับ transcription แต่อาจเป็นผลเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ desaturase ที่เพิ่มขึ้น

คำสำคัญ : *Spirulina*, กลีเซอโรลิพิด, กรดไขมัน, salt stress, desaturase

ABSTRACT

A cyanobacterium, *Spirulina* is used as human health food and animal feed supplement. The *Spirulina* biomass is extensively produced in the large open ponds. During the daytime, the evaporation of water from the cultivation causes the increased salt concentration of culture medium. The salinity stress is one of the major obstacles to impede biomass production and biological compositions of *Spirulina*. In this study, effects of high salt concentration on cell growth, photosynthesis, chlorophyll concentration, amounts of lipid in each classes and fatty acid profiles and expression of desaturase genes were investigated. *Spirulina platensis* strain C1 was grown in Zarrouk's medium containing different NaCl concentrations (0.017, 0.5 and 0.75M). Salt stress reduced specific growth rate of *Spirulina* to 0.016 hr^{-1} (0.5M NaCl) and 0.11 hr^{-1} (0.75M NaCl) compared to that of normal medium (0.017M NaCl, 0.025 hr^{-1}). There was a sharp decrease in chlorophyll content in the first 24 hour after exposing cells to the high salt concentration (0.75 M NaCl). Consequently, the photosynthetic activities were reduced. In the stationary phase, the effect of high salt concentrations on lipid levels was revealed by the proportional changes of two abundant glycerolipids, monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) and digalactosyl diacylglycerol (DGDG). The MGDG level decreased from 61.7 % glycerolipid (0.017M NaCl) to 34.5% and to 33.4 % glycerolipid at 0.5 and 0.75M NaCl, respectively. On the other hands, the accumulation of DGDG level arose from 25.6 % (0.017M NaCl) to 34.5% (0.5M NaCl) and to 33.4 (0.75M NaCl)). The sulfoquinovosyl diacyl glycerol (SQDG) and phosphoglycerol (PG) levels were independent of salt concentration, which was justified by the non-pattern and less change in the level with the salt concentration. Interestingly, lipid levels were much more influenced by cell ages than salt concentrations. The effect of high salt concentration on fatty acid profiles was revealed by the ratio of total amount of unsaturated fatty acid to the total amount of saturated fatty acid (unsat/sat). In control medium, the unsat/sat of logarithmic phase cell was higher than that of stationary phase cell which found in all lipid classes. On the contrary, at high salt concentration, the unsat/sat increased with the cell ages. In order to gain more insight into the molecular mechanisms responsible for the fatty acid desaturation under salt stress, the expression of *desC*, *desA* and *desD* encoding Δ^9 desaturase, Δ^{12} desaturase, Δ^6 desaturase were determined. All three genes were down-regulated by high salt concentration which indicated that the increased unsaturated fatty acids were not regulated at the transcription level. This suggested that the desaturase activity might be responsible.

Keywords: *Spirulina platensis*, glycerolipids, fatty acids, salt stress, desaturase

สารบัญ

บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
สารบัญ	iii
สารบัญรูปภาพ	iv
สารบัญตาราง	v
1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำงานวิจัย	1
2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
3 ขอบเขตงานวิจัย	2
4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	2
6 วิธีการดำเนินการวิจัย	8
7 ผลการทดลองและวิจารณ์	13
7.1 ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อการเจริญเติบโตของ <i>S. platensis</i> , C1	13
7.2 ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ใน <i>S. platensis</i> , C1	15
7.3 ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อการสังเคราะห์แสงและการหายใจของ <i>S. platensis</i> , C1	16
7.4 ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อปริมาณลิพิด ชนิดของลิพิด และองค์ประกอบของกรดไขมันใน <i>S. platensis</i> , C1	16
7.5 ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อชนิดของลิพิด (lipid class) และกรดไขมันใน lipid class ต่าง ๆ ใน <i>S. platensis</i> , C1	18
7.6 ผลของความเข้มข้นเกลือต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันของ <i>S. platensis</i> , C1	23
8 สรุปผลงานวิจัย	26
9 ปัญหาและอุปสรรค	26
10 ผลงานที่นำไปเผยแพร่	26
11 บรรณานุกรม	27
12 คณะผู้วิจัย	30

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1	วิธีการสังเคราะห์ glycerolipid ในไซยาโนแบคทีเรีย	3
รูปที่ 2	แสดงกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัว	5
รูปที่ 3	<i>Spirulina</i> สายพันธุ์ C1 (กำลังขยาย 200X)	8
รูปที่ 4	ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการวัดกิจกรรมการสังเคราะห์แสงและการหายใจของ <i>Spirulina</i>	10
รูปที่ 5	ลักษณะของ O ₂ electrode ที่จุ่มอยู่ใน double jacket thermo-regulated vessel	10
รูปที่ 6	แผนผังการทดลอง	13
รูปที่ 7	การเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (คำนวณจาก OD ₅₆₀) ของ <i>Spirulina platensis</i> , C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร สูตร Zarrouk ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.5 M และ 0.75 M NaCl	14
รูปที่ 8	ปริมาณ คลอโรฟิลล์-เอ ของ <i>Spirulina platensis</i> , C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.5 M และ 0.75 M NaCl	15
รูปที่ 9	แสดงสีของ <i>Spirulina</i> culture ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นปกติ (0.17 M NaCl) และความเข้มข้นเกลือสูง (0.5 M และ 0.75 M NaCl)	16
รูปที่ 10	ผลการแสดงออกของยีนสำหรับเอนไซม์ desaturase ใน <i>Spirulina</i> เมื่ออยู่ในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง 25	

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ , hr^{-1}) และ doubling time ของ <i>S. platensis</i> , C1 ที่เจริญเติบโตที่ NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°C ที่ความเข้มแสง 100 $\mu \text{ mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ อย่างต่อเนื่อง 24 hr	15
ตารางที่ 2 อัตราการสังเคราะห์แสงและอัตราการหายใจของ <i>S. platensis</i> , C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl)	17
ตารางที่ 3 สัดส่วนของกรดไขมันและปริมาณกรดไขมันทั้งหมดของ <i>Spirulina</i> (whole cell) ที่เจริญเติบโตที่ความเข้มข้นเกลือต่าง ๆ ที่อยู่ในระยะ exponential phase (day 4) และ stationary phase (day 7)	17
ตารางที่ 4 ปริมาณลิพิดแต่ละชนิดของ <i>S. platensis</i> , C1 ที่เจริญเติบโตในอาหารที่ความเข้มข้นเกลือต่างกัน	19
ตารางที่ 5 Fatty acid profile ในแต่ละ lipid class ของ <i>S. platensis</i> , C1 ที่เจริญเติบโตในอาหารสูตรปกติ (Zarrouk's + 0.017 M NaCl)	20
ตารางที่ 6 Fatty acid profile ในแต่ละ lipid class <i>S. platensis</i> , C1 ที่เจริญเติบโตในอาหารสูตรความเข้มข้นเกลือสูง (Zarrouk's + 0.5 M NaCl)	22
ตารางที่ 7 Fatty acid profile ในแต่ละ lipid class <i>S. platensis</i> , C1 ที่เจริญเติบโตในอาหารสูตรความเข้มข้นเกลือสูง (Zarrouk's + 0.75 M NaCl)	23

สภาวะกดดันจากเกลือความเข้มข้นสูงต่อการสังเคราะห์ลิพิดใน *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1

1 ความสำคัญและที่มา

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina*) ในเชิงพาณิชย์มีหลายประเทศทั่วโลกเพื่อนำมาใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพมนุษย์และเสริมในอาหารสัตว์ เนื่องจาก *Spirulina* มีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 50-70 ของน้ำหนักแห้งและมีปริมาณลิพิดร้อยละ 2 ถึง 9 ของน้ำหนักแห้ง โดยลิพิดของ *Spirulina* มีกรดไขมันจำเป็นชนิดกรดไขมันไม่อิ่มตัว คือ linoleic acid (C18:2 (Δ 9,12)) และ γ -linolenic acid (C18:3 (Δ 6,9,12)) ประมาณร้อยละ 1.0-1.5 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งร่างกายมนุษย์ใช้กรดไขมันไม่อิ่มตัวนี้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมนพอสตาแกลนดินซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมความดันโลหิต การสังเคราะห์คอเลสเตอรอล การอักเสบวม และการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารสำคัญอื่น ๆ เช่น ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) ซึ่งเป็นรงควัตถุสีฟ้า ซึ่งใช้ในเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมอาหาร โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) และซัลโฟลิพิด (sulfolipid) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านทานเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งที่ริมฝีปาก รวมทั้งแร่ธาตุ และ วิตามินต่าง ๆ โดยเฉพาะวิตามินบี 12 (B12) การเพาะเลี้ยง *Spirulina* นิยมทำในบ่อเปิดขนาดใหญ่กลางแจ้ง ซึ่งทำให้ต้องปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมตลอดเวลา โดยเฉพาะในประเทศไทยที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูงระหว่างวันตลอดปี ซึ่งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมเช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง และปริมาณสารอาหาร มีผลต่อผลผลิตชีวมวลและปริมาณสารเคมีมูลค่าสูงใน *Spirulina* ในการเพาะเลี้ยง *Spirulina* ในเชิงพาณิชย์นิยมเลี้ยงแบบบ่อเปิดกลางแจ้งซึ่งไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ เช่น ตอนกลางวันมีการระเหยของน้ำออกไปประมาณ 1-2 เซนติเมตรของระดับความสูงของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง จึงทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารในรูปเกลือเพิ่มขึ้น (Voshak and Richnomd, 1988) ซึ่งจะส่งผลต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น กระบวนการสังเคราะห์แสง และอื่น ๆ เป็นต้น และในที่สุดจะกระทบถึงการเจริญเติบโตของ *Spirulina* อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารในแง่ของความเข้มข้นเกลือต่อกระบวนการสังเคราะห์ลิพิด และกรดไขมัน รวมทั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันใน *Spirulina* ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาการสังเคราะห์ลิพิด และกรดไขมัน ภายใต้สภาวะความเข้มข้นเกลือสูง โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณลิพิด และองค์ประกอบของกรดไขมัน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเกลือ รวมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมพันธะคู่ของกรดไขมัน เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตสารมูลค่าสูงใน *Spirulina*

2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

- 1 เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการสังเคราะห์แสงของ *Spirulina*
- 2 เพื่อศึกษาการสังเคราะห์ลิพิดในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูงโดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดของลิพิด รวมทั้งองค์ประกอบของกรดไขมัน
- 3 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันในสภาวะการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเกลือให้สูงขึ้น

3 ขอบเขตวิจัย

- 1 ศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.75 M เทียบกับความเข้มข้นควบคุมในอาหารสูตร Zarrouk's medium (0.017 M NaCl) ต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แสงของ *Spirulina* สายพันธุ์ C1

2 ศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือต่อการสังเคราะห์ลิพิด โดยวิเคราะห์ปริมาณลิพิด ชนิดของลิพิด และองค์ประกอบของกรดไขมันใน *Spirulina* สายพันธุ์ C1

3 ศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันคือ *des C des A* และ *des D* ใน *Spirulina* สายพันธุ์ C1

4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การเพาะเลี้ยง *Spirulina* ในบ่อเปิดกลางแจ้งจะมีการระเหยของน้ำออกไปในระหว่างวันซึ่งอาจถึงปริมาณที่ทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารเปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะความเข้มข้นของเกลือในบ่อจะเพิ่มขึ้น (Voshak and Richmond 1988) ซึ่งส่งผลกระทบต่อ *Spirulina* ทั้งในแง่การเจริญเติบโตและการผลิตสารชีวเคมี ดังนั้นเซลล์จำเป็นต้องมีการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมใหม่ จากการศึกษาในไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ พบว่าเมื่อเซลล์อยู่ในความเข้มข้นเกลือสูงอัตราการสังเคราะห์แสงลดลง ซึ่งในทางตรงข้ามพบว่ามีความเข้มข้นลิพิดเพิ่มขึ้น (Huflejt et al. 1990; Molitor et al. 1990) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เพิ่มขึ้นมีส่วนช่วยกระบวนการสังเคราะห์แสงของเซลล์ให้ทนต่อสภาวะความเข้มข้นเกลือที่สูงของ cyanobacteria เช่น *Synechocystis* (Allakhverdiev et al. 2001; 2002; 2008) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือต่อปริมาณลิพิด ชนิดของลิพิด และกรดไขมันใน *Spirulina* ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จะมุ่งเน้นศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นเกลือที่เปลี่ยนไปต่อการผลิตลิพิดชนิดต่าง ๆ ใน *Spirulina* และศึกษากลไกการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง รวมทั้งการเจริญเติบโตของ *Spirulina* เพื่อจะได้เป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยง *Spirulina* และเพิ่มผลผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อไป

5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

สไปรูลินา (*Spirulina*)

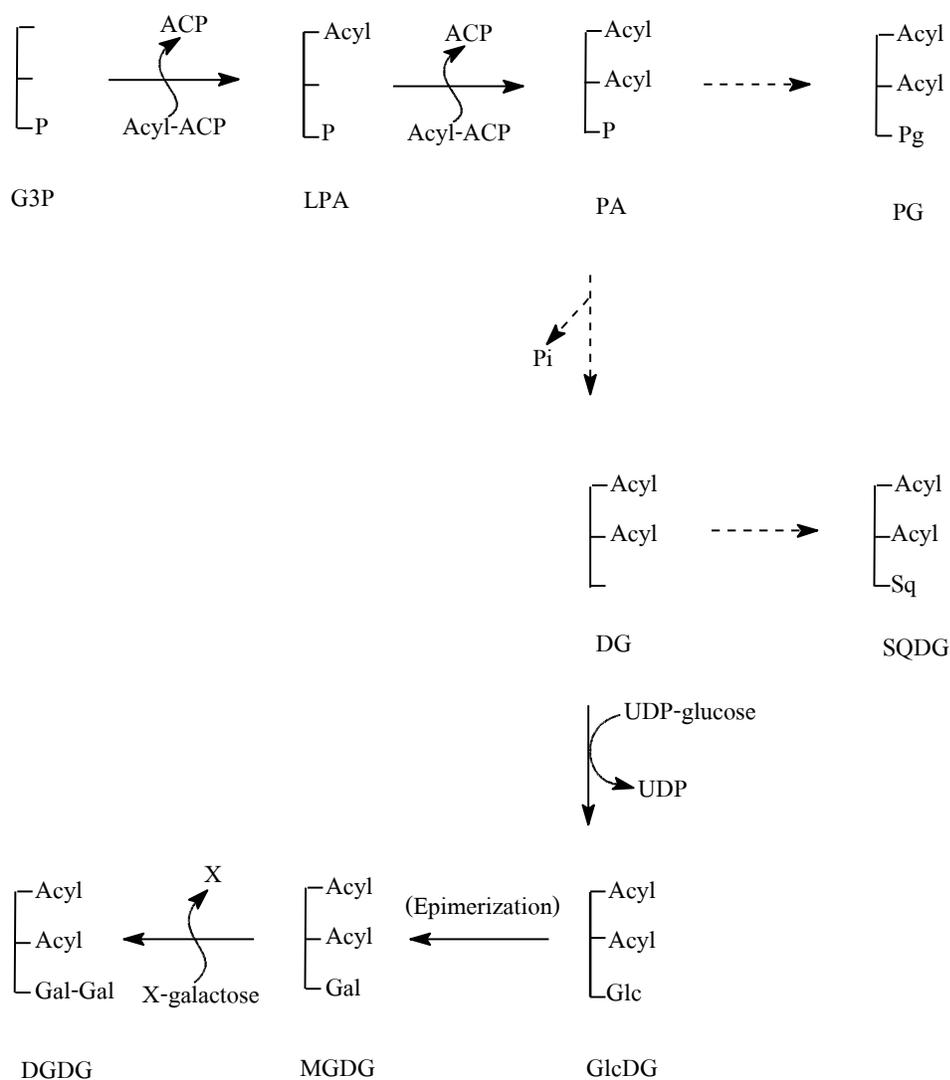
Spirulina เป็นไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว อยู่ใน Phylum Cyanophyta; ลักษณะโดยทั่วไปประกอบด้วยเซลล์เดี่ยวทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-12 ไมโครเมตร (μm) หลายเซลล์เรียงต่อกันเป็นสาย (filament) ไม่มีกิ่งก้าน และมักบิดเป็นเกลียวคล้ายสปริง (trichome) มีการแบ่งตัวเป็นแบบ binary fission ในปัจจุบันทั่วโลกพบว่ามี *Spirulina* ประมาณ 35 Species พบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำกร่อยเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่มีคุณสมบัติเป็นด่าง แต่ชนิดที่นิยมเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ได้แก่ *Spirulina platensis* และ *Spirulina maxima* *Spirulina* ดำรงชีวิตด้วยการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) รงควัตถุหลักที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง คือ คลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll a) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และไฟโคบิลลิโปรตีน (phycobilliprotein) ซึ่งประกอบด้วยไฟโคไซยานิน (phycocyanin, PC) และอัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin, APC) นอกจากนี้บางสายพันธุ์ยังมีถุงอากาศเล็ก ๆ (gas vacuole) อยู่ภายใน ทำให้สาหร่ายมีคุณสมบัติลอยตัวได้

การสังเคราะห์ลิพิดในไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียมีลิพิดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเมมเบรน (membrane) ซึ่งได้แก่ พลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) และไทลาคอยด์เมมเบรน (thylakoid membrane) ซึ่งลิพิดหลักที่พบโดยส่วนใหญ่คือ glycerolipid ซึ่งประกอบไปด้วย monogalactosyl diacylglycerol (MGDG), digalactosyl diacylglycerol (DGDG), sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) และ phosphatidyl glycerol (PG) และอาจมี monoglucosyl diacylglycerol (GlcDG) อยู่เล็กน้อย

(Murata et al 1987) โดยปริมาณ MGDG ที่พบมีประมาณครึ่งหนึ่งของ glycerolipid ทั้งหมด ส่วนที่เหลือจะเป็น glycerolipid อีก 3 ชนิดซึ่งจะมีปริมาณแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียและสภาวะที่ใช้ในการเจริญเติบโต และมี GlcDG ไม่เกินร้อยละ 1

สารตั้งต้นของการสังเคราะห์ลิปิดในไซยาโนแบคทีเรีย คือ phosphatidic acid โดยเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ 1,2-diacylglycerol (DG) และ phosphoglycerol (PG) จากนั้น DG เปลี่ยนไปเป็น sulfolipid และ GlcDG ต่อไป โดยแบบแผนการสังเคราะห์ glycerolipid ของไซยาโนแบคทีเรียแสดงได้ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 วิธีการสังเคราะห์ glycerolipid ในไซยาโนแบคทีเรีย (Murata และ Nishida, 1987)

G3P, glycerol-3-phosphate	LPA, lysophosphatidic acid,	PA, phosphatidic acid
DG, 1,2-diacylglycerol,	PG, phosphoglycerol	Sq, sulfoquinovos
Glc, glucose	Gal, galactose,	MGDG, monogalactosyl-
diacylglycerol	GlcDG, monoglucosyl diacylglycerol	
SQDG, sulfoquinovosyl diacylglycerol	DGDG, digalactosyl diacylglycerol	

การสังเคราะห์ลิพิด MGDG และ DGDG ในไซยาโนแบคทีเรีย พบว่า GlcDG เป็นสารตั้งต้น (Feige et al. 1980) โดยเอนไซม์เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ GlcDG คือ uridine diphosphate-glucose:diacylglycerol glucosyltransferase ทำหน้าที่ย้ายหมู่ glucose จาก uridine diphosphate-glucose ไปยัง diacylglycerol โดย GlcDG ถูกสังเคราะห์ทั้งที่ plasma และ thylakoid membrane (Omata and Murata 1986) จากนั้น GlcDG จะถูกเปลี่ยนไปเป็น MGDG ด้วยกระบวนการ epimerization จาก glucose ไปเป็น galactose (Murata et al. 1990) ในขณะที่ DGDG ถูกสร้างขึ้นโดยการย้าย galactose ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ไปยัง MGDG (เพิ่ม galactose ที่ MGDG) ส่วน SQDG ถูกสังเคราะห์ผ่าน DG ในขณะที่ PG ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยตรงจาก phosphatidic acid

การศึกษาใน *Anabeana variabilis* (Lem and Stumpf 1984b) พบว่าเอนไซม์ glycerol-3-phosphate acyltransferase และ 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์ glycerolipid และเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ใช้ acyl-[acyl carrier protein] (acyl-ACP) เป็นสารตั้งต้น

การสังเคราะห์กรดไขมันในไซยาโนแบคทีเรีย

กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในไซยาโนแบคทีเรีย มี 2 ขั้นตอนสำคัญได้แก่

1. กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัว

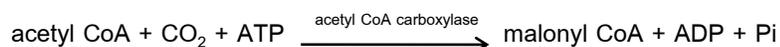
กระบวนการนี้เป็นการสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัวอยู่ในรูป acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) ร่วมกับปฏิกิริยา elongation โดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ palmitoyl-ACP (C16:0-ACP) และ steroyl-ACP (C18:0-ACP) กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน และ elongation เกิดขึ้นใน cytoplasm ของเซลล์ (Lem and Stumpf 1984a)

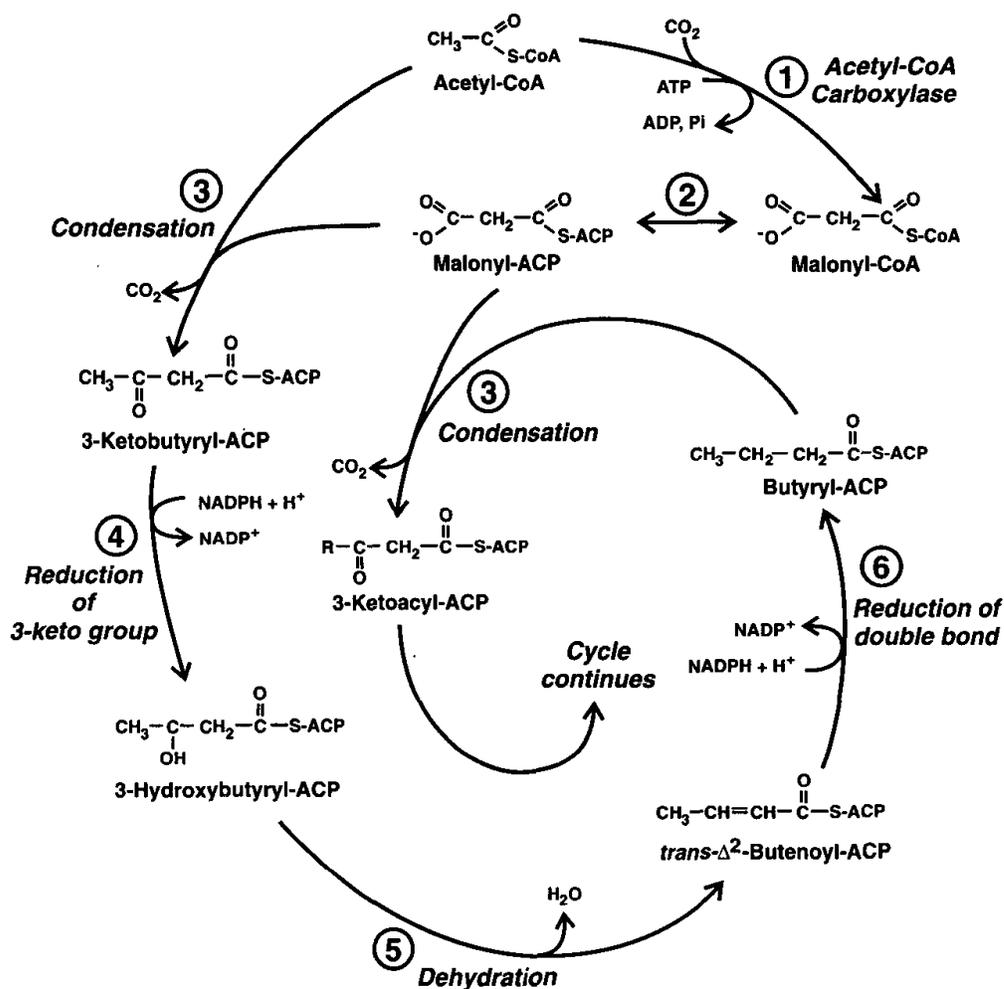
2. กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว

กระบวนการนี้เกิดขึ้นกับกรดไขมันที่ esterify อยู่ที่ glycerolipid ซึ่งเป็นโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน

กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว

การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวในไซยาโนแบคทีเรานั้น กรดไขมันที่ถูกสังเคราะห์จะอยู่ในรูปของ acyl-ACP ดังแสดงในรูปที่ 2 ในปฏิกิริยามีเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase ร่วมกับ fatty acid synthetase และต้องการ NADPH และ NADH เป็น coenzyme (Lem and Stumpf 1984a) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดไขมันเริ่มจาก acetyl CoA ถูกเปลี่ยนไปเป็น malonyl CoA ดังแสดงในสมการข้างล่าง



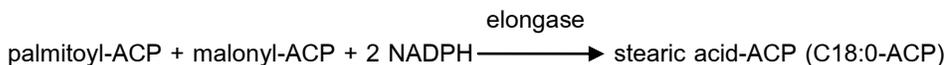


รูปที่ 2 แสดงกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัว (Ohirogge and Browse 1995)

Acetyl-CoA เป็น basic building block ของ fatty acid chain และ enters the pathway โดยทำหน้าที่เป็นทั้งสารตั้งต้นของเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase (ปฏิกิริยาที่ 1) และเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยา condensation (ปฏิกิริยาที่ 3) ปฏิกิริยาที่ 2 ถูก catalyzed โดย malonyl-CoA:ACP transacylase เปลี่ยน malonyl จากรูปแบบ malonyl-CoA ไปเป็น malonyl-ACP เพื่อใช้เป็น carbon donor สำหรับปฏิกิริยา elongation ต่อไป หลังจากปฏิกิริยา condensation ผลิตภัณฑ์ 3-ketoacyl-ACP จะถูก reduced (ปฏิกิริยา 4), dehydrated (ปฏิกิริยา 5), และ reduced อีกครั้งหนึ่ง (ปฏิกิริยา 6) โดยเอนไซม์ 3-ketoacyl-ACP reductase, 3-hydroxyacyl-ACP dehydrase และ enoyl-ACP reductase ตามลำดับ

จากนั้น acetyl CoA และ malonyl CoA จะทำปฏิกิริยากับ acyl carrier protein (ACP) ได้เป็น acetyl-ACP และ malonyl-ACP ซึ่งจะรวมตัวกันได้ acetoacetyl-ACP โดยการทำงานของเอนไซม์ -ketoacyl-ACP synthase ปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา คือ -ketoacyl-ACP reductase β -hydroxyacyl-ACP dehydrase และ enoyl-ACP reductase ได้ butyryl-ACP เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 2 จากนั้นปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นซ้ำเติมทั้งหมด โดยเติมคาร์บอนครั้งละ 2 อะตอม จนกระทั่งได้ myristic acid ($\text{C}_{14:0}$) และ palmitic acid ($\text{C}_{16:0}$) หลังจากนั้นมีการเพิ่มความยาวของสาย Hydrocarbon ไปเป็น stearyl-ACP โดยอาศัยปฏิกิริยาที่เรียกว่า chain

elongation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเติมคาร์บอน 2 อะตอมเข้าไปในโมเลกุลที่ปลายคาร์บอกซิลของกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยจากการศึกษาของ Stapleton และ Jaworski (1984) ใน *A. variabilis* พบว่าปฏิกิริยานี้ต้องการ ACP โดยมี NADPH เป็น coenzyme ไม่ใช่ CoA หรือ NADH โดยมีเอนไซม์ elongase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา กรดไขมันที่ทำปฏิกิริยาจะอยู่ในรูป fatty acid carrier protein



กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว

ปฏิกิริยาการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันในไซยาโนแบคทีเรียเกิดขึ้นเมื่อกรดไขมันไม่อิ่มตัว (C16:0, C18:0) ไป esterify กับ glycerol moiety ซึ่งต่างจากวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวในพืชชั้นสูง โดยในพืชชั้นสูงพันธะคู่แรกเกิดขึ้นเมื่อกรดไขมันอยู่ในรูป acyl-ACP หลังจากนั้นปฏิกิริยาการเติมพันธะคู่ลำดับต่อไปจะอยู่ในรูป lipid-bound เช่นเดียวกับไซยาโนแบคทีเรีย (Browse and Somerville 1991) ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ acyl-lipid desaturase พบที่ endoplasmic reticulum chloroplast membrane ในเซลล์พืช และ thylakoid membrane ของ cyanobacteria

เอนไซม์ acyl-lipid desaturase สามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มย่อย ๆ ได้ตามตัวให้อิเล็กตรอน คือกลุ่มที่ 1 พบใน endoplasmic reticulum ของเซลล์พืช ในกลุ่มนี้มี cytochrome b5 เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Kearns et al. 1991; Smith et al. 1990) กลุ่มที่ 2 พบใน chloroplasts ของเซลล์พืชและ cyanobacteria ในกลุ่มนี้มี ferredoxin เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Wada et al. 1993; Schmidt and Heinz 1990a; Schmidt and Heinz 1990b)

อาศัยการกระบวนการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันเป็นพื้นฐาน ทำให้สามารถแบ่งไซยาโนแบคทีเรีย ได้เป็น 4 กลุ่ม (Murata et al. 1992; Kenyons 1972; Kenyons et al. 1972)

- กลุ่มที่ 1 กระบวนการเติมพันธะคู่เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 9 ของกรดไขมันที่ sn-1 หรือ sn-2 ของ glycerol เท่านั้น
- กลุ่มที่ 2 กระบวนการเติมพันธะคู่เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 9, Δ_{12} และ 15 (Δ_3) ของกรดไขมัน C18 ที่ตำแหน่ง sn-1 และพันธะคู่ที่ 9 และ 12 ของกรดไขมัน C16 ตำแหน่ง sn-2
- กลุ่มที่ 3 กระบวนการเติมพันธะคู่เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 9, Δ_{12} และ 6 (Δ_6) ของกรดไขมัน C18 ที่ตำแหน่ง sn-1
- กลุ่มที่ 4 กระบวนการเติมพันธะคู่เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 9, Δ_{12} , Δ_6 และ 15 (Δ_3) ของกรดไขมัน C18 ที่ตำแหน่ง sn-1

จากการแบ่งกลุ่มของสาหร่ายด้วยวิธีนี้พบว่า *Spirulina* ถูกจัดอยู่ในไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว 6 ได้แก่ C18:2 (9, 12) และ C18:3 (6, 9, 12) โดย *Spirulina* มียีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมพันธะคู่ใน 3 ชนิดได้แก่ *desC* ถอดรหัสเป็น 9 acyl-lipid desaturase ทำหน้าที่ในการเติมพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 9, *desA* ถอดรหัสเป็น 12 acyl-lipid desaturase ทำหน้าที่ในการเติมพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 12 และ *desD* ถอดรหัสเป็น 6 acyl-lipid desaturase ทำหน้าที่ในการเติมพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 6 โดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการเติมพันธะคู่ของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด คือ C18:3 (6, 9, 12) หรือ GLA ในปัจจุบันยีนทั้ง 3 ได้มีการโคลนจาก *Spirulina* แล้ว (Deshnium et al. 2000)

การศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลิปิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเกลือเป็นปัจจัยแวดล้อมที่สำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโต กระบวนการสังเคราะห์แสง รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมัน และชนิดของลิปิด เนื่องจากลิปิดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์เมมเบรนทั้งในส่วน plasma membrane และ thylakoid membrane ที่เป็นแหล่งของกระบวนการสังเคราะห์

แสง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเกลือในสภาวะแวดล้อมอย่างฉับพลัน จะส่งผลต่อโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน ทำให้เซลล์มีการตอบสนองอย่างรวดเร็วด้วยการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันเพื่อเป็นการรักษาเสถียรสภาพของเมมเบรน และกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ให้คงสภาพอยู่ได้ภายใต้สภาวะกดดัน โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นการเปลี่ยนแปลงเพื่อให้เซลล์อยู่รอดในสิ่งแวดล้อมใหม่

เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือสูง เซลล์จะปรับขนาด cell volume ให้ลดลงรวมทั้งมีการผลิต compatible solutes เช่นการสังเคราะห์ glucosylglycerol ใน *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Hagemann et al 1987; Erdmann et al. 1992; Hagemann and Erdmann 1997) การสังเคราะห์ glycinebetaine ใน *Synechococcus* sp. PCC 7418 (Mackay et al. 1984; Reed et al. 1986; Hagemann and Erdmann, 1997) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่แสดงว่าลิปิดอาจมีส่วนในการปกป้องเซลล์จากความเข้มข้นเกลือสูง (Huflejt et al. 1990; Khamutov et al. 1990; Ritter and Yopp 1993) ถึงแม้ว่ากลไกการเพิ่มขึ้นของปริมาณลิปิดเมื่อเซลล์อยู่ในความเข้มข้นเกลือสูงจะยังไม่ชัดเจน แต่มีงานวิจัยที่พบว่าเมื่อสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ต้องอยู่ในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง จะเกิดปฏิกิริยากระบวนการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันในเมมเบรนของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ รายงานวิจัยที่ศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือต่อการเปลี่ยนแปลงลิปิด และองค์ประกอบของกรดไขมันในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. PCC 6311 (Huflejt et al. 1990; Khomutov et al. 1990; Molitor et al. 1990) พบว่าการที่ *Synechococcus* sp. PCC 6311 เจริญในสภาวะความเข้มข้นของ NaCl สูง เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันและลิปิด โดยเมื่อย้ายเซลล์จากอาหารที่มีความเข้มข้น NaCl 15 mM ไปในอาหารที่มีความเข้มข้น NaCl 500 mM องค์ประกอบของกรดไขมัน C16:1(9) ลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่มีการเพิ่มขึ้นของกรดไขมัน C18:1(9) และ C18:1(11) Huflejt et al. 1990) นอกจากนี้ความเข้มข้นเกลือมีผลต่อสัดส่วนของลิปิดชนิดต่าง ๆ โดยพบว่าเมื่อย้ายเซลล์ไปสู่ความเข้มข้นเกลือที่สูงขึ้น สัดส่วนของ MGDG ลดลงในขณะที่สัดส่วนของ DGDG และ PG เพิ่มขึ้น และการเปลี่ยนแปลงนี้พบทั้งใน plasma membrane และ thylakoid membrane Ritter และ Yopp (1993) ทำการศึกษาผลของเกลือต่อองค์ประกอบของลิปิดใน halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica* พบว่าการที่เซลล์สามารถเจริญได้ในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง อาจเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของลิปิด โดยสัดส่วนของ MGDG และ DGDG ใน plasma membrane ลดลงเมื่อความเข้มข้นเกลือสูงขึ้น ในขณะที่ PG มีสัดส่วนเพิ่มขึ้น ในขณะที่เดียวกันไม่พบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของ glycerolipid ใน thylakoid membrane เมื่อความเข้มข้นเกลือในอาหารเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มสัดส่วนของ anionic lipid คือ PG และ การลดลงของ MGDG อาจมีส่วนสำคัญต่อการปรับตัวของเซลล์ต่อสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง นอกจากนี้การศึกษาใน *Dunaliella tertiolecta* ATCC 30929 ซึ่งเป็น Marine Microalgae พบว่าปริมาณของลิปิดเพิ่มขึ้นจาก 60% ไปเป็น 67% เมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นจาก 0.5 M เป็น 1.0 M (Takagi et al. 2006)

6. วิธีการดำเนินการวิจัย

สายพันธุ์ *Spirulina*

Spirulina platensis สายพันธุ์ C1 (หรือ *Arthrospira* sp. PCC 9438) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type, WT) (รูปที่ 3) สามารถเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ (single colony) และเก็บรักษาไว้บนอาหารแข็ง (slant agar) สูตรมาตรฐาน Zarrouk's ภายใต้สภาวะความเข้มแสง $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$)



รูปที่ 3 *Spirulina* สายพันธุ์ C1 (กำลังขยาย 200X)

การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นและสภาวะการเพาะเลี้ยง

นำ *Spirulina* จาก slant agar จำนวน 1 loop มาเลี้ยงใน Erlenmeyer flask ขนาด 100 มิลลิลิตร (mL) ที่มีอาหารเหลว Zarrouk's ปริมาตร 25 mL มาเลี้ยงในตู้บ่มซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 35°C ความเข้มแสง $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อย่างต่อเนื่อง โดยเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที (rpm) หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ จึงทำการเพิ่มปริมาณ *Spirulina* โดยการเติมอาหารเหลวให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 mL ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 mL เพาะเลี้ยงที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 4-7 days แล้วทำการเปลี่ยนถ่ายอาหาร 2 รอบเพื่อให้เซลล์ปรับตัวก่อนนำไปใช้

สภาวะการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยง *Spirulina* ในอาหาร Zarrouk's ปริมาตร 700 mL ใน Erlenmeyer flask ขนาด 1000 mL วางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 35°C ความเข้มแสง $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อย่างต่อเนื่อง โดยการกวนผสมด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic bar) ที่ความเร็วประมาณ 130 rpm เพื่อให้เซลล์สัมผัสกับอาหารและได้รับแสงอย่างทั่วถึง เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ logarithmic phase (3-4 days) แล้วทำการเปลี่ยนถ่ายอาหาร 2 รอบเพื่อให้เซลล์ปรับตัวก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การวิเคราะห์

การวัดการเจริญเติบโต

- โดยการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (nm)
- โดยการหาค่าความเข้มข้นคลอโรฟิลล์ (chlorophyll-a concentration, Bennet and Bogorad, 1973)

เปิดตัวอย่าง *Spirulina* ปริมาตร 5 mL มาตรฐานผ่านกระดาษกรอง (Whatman, GF/C) จากนั้นเติมด้วยเมทานอล ปริมาตร 5 mL และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 min ทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3500 rpm เป็นเวลา 5 min นำส่วนใสมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 nm

$$\text{Chlorophyll a concentration (mg L}^{-1}\text{)} = \text{Absorbancy at 665 nm} \times 13.9^*$$

* absorption coefficient ของ *Spirulina*

คำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และ doubling time ดังนี้

$$\mu \text{ (day}^{-1}\text{)} = [(\ln(N_2) - \ln(N_1)) / (t_2 - t_1)]$$

โดยที่ N_1, N_2 = ค่า reading absorbance (OD_{560}) หรือ chlorophyll-a concentration mg L^{-1} ที่เวลา t_2 และ t_1 ตามลำดับ

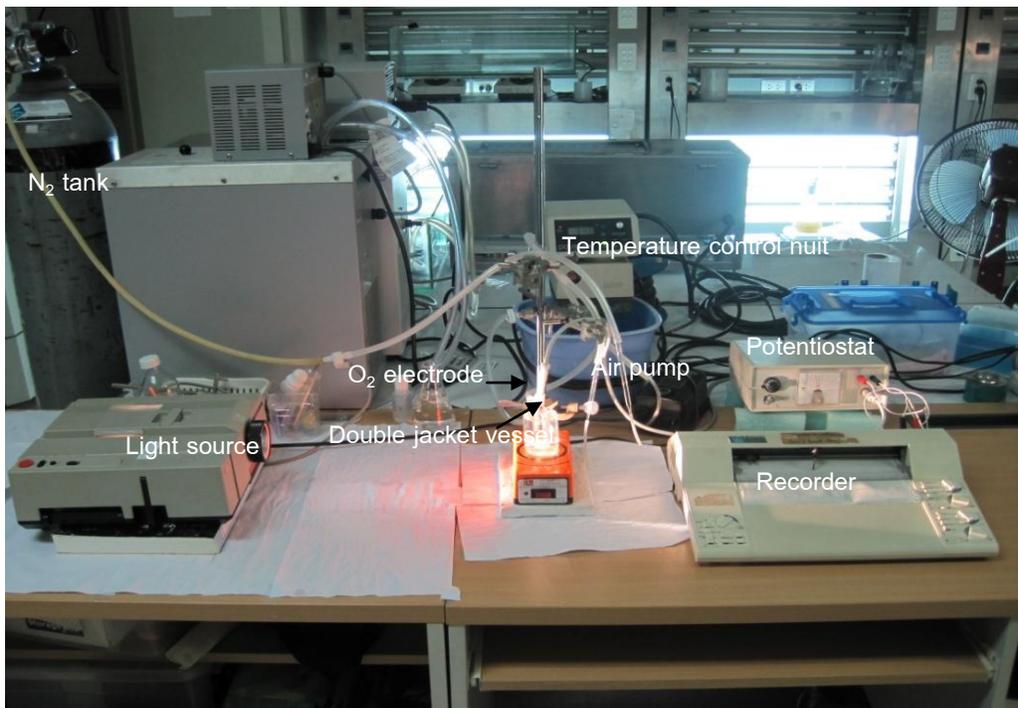
$$\text{Doubling time (day)} = 0.693 / \mu$$

การเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (Relative growth) ที่เวลา $t = N_t / N_0$

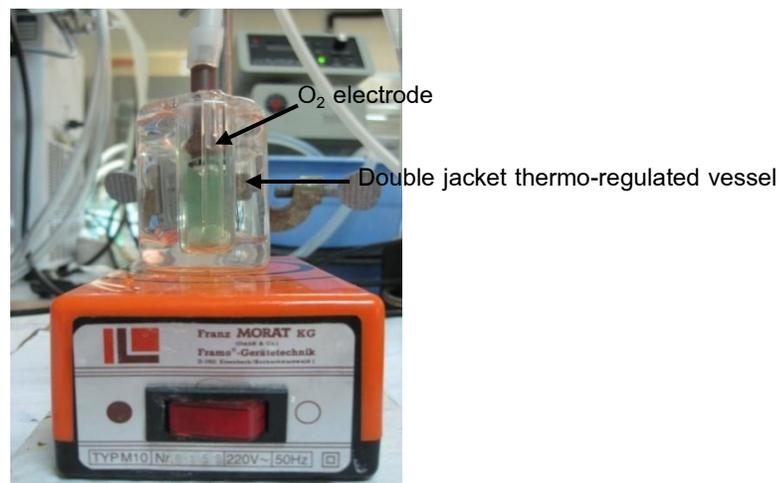
การวัดค่ากิจกรรมการสังเคราะห์แสง (Photosynthetic activity) และกิจกรรมการหายใจ (Respiration activity)

นำ *Spirulina* มาหาความเข้มข้น Chlorophyll-a โดยกรองเซลล์ผ่านกระดาษกรอง (Whatman, GF/C) และทำการปรับความเข้มข้น Chlorophyll-a ให้มีค่าเท่ากับ 2.5-3 mg Chl L^{-1} ด้วย fresh Zarrouk's medium จากนั้นนำตัวอย่าง *Spirulina* ที่ปรับความเข้มข้นแล้วปริมาตร 4 mL เติมนในภาชนะแก้วผนังสองชั้นที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้โดยน้ำหล่อ (double jacket thermo-regulated glass vessel) โดยควบคุมไว้ที่ 35 °C และการวัด Photosynthetic activity จะใช้หลักการการผลิต oxygen (O_2 - evolving photosynthetic activity) โดยจะวัดปริมาณ oxygen ที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen) ด้วย Clark-type O_2 -electrode (YSI 5331A) และให้แสงที่ความเข้ม 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ด้วย slide projector lamp นำสัญญาณที่อ่านได้จากเครื่องบันทึกมาคำนวณและวิเคราะห์ผลให้อยู่ในรูป $\mu\text{mol } O_2 \text{ evolved mg Chl}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ (รูปที่ 3 และ 4)

และการวัด Respiration activity โดยใช้หลักการการใช้ oxygen (O_2 - consuming respiration activity) โดยทำเช่นเดียวกับการวัด Photosynthetic activity แต่จะทำการวัดในที่มืดโดยจะใช้ผ้าสีดำคลุม vessel และวิเคราะห์ผลให้อยู่ในรูป $\mu\text{mol } O_2 \text{ uptake mg Chl}^{-1} \text{ hr}^{-1}$



รูปที่ 4 ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการวัดกิจกรรมการสังเคราะห์แสงและการหายใจของ *Spirulina*



รูปที่ 5 ลักษณะของ O₂ electrode ที่จุ่มอยู่ใน double jacket thermo-regulated vessel

6.7 การทำให้เซลล์แห้ง - ทำให้แห้งโดยวิธี lyophilization

6.8 การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดลิปิด/กรดไขมัน

6.8.1 การสกัดลิปิดรวมโดยดัดแปลงวิธีของ Bligh & Dyer (1959)

6.8.2 การแยกชั้นลิปิด (Lipid class) ชนิดลิปิดโดยวิธีของ Sato และ Murata (1988)

นำตัวอย่างลิปิดที่สกัดแล้วมา spot ลงบนแผ่น TLC (Silica gel 60 Aluminum sheets 20×20 cm, Merck) และใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ประกอบด้วย hexane, diethyl ether, acetic acid ในอัตราส่วน 70: 30: 1 (v/v) ตามลำดับ ซึ่งเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับแยกลิปิดกลุ่มไม่มีขี้ และการอ่านผลลิปิดตัวอย่างที่เคลื่อนที่ได้บนแผ่น TLC ด้วยการพ่น 0.01 % primuline สังเกตแถบลิปิดที่เรืองแสงภายใต้ UV หรือการใช้ไอของเกลือดีไอโอดีนที่ทำให้แถบลิปิดปรากฏสีน้ำตาล เปรียบเทียบค่า retention factor (Rf) ของแถบลิปิดที่ได้จากตัวอย่างกับลิปิดมาตรฐาน ในที่นี้ใช้ลิปิดมาตรฐาน ซึ่งประกอบไปด้วย Monoolein, 1,3-Diolein & 1,2-Dioleoyl-*rac*-glycerol และ Glycerol trioleate (Mono-, Di-, & Triglyceride Mix, Supelco), SQDG และ PG

6.8.2 การเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

นำเซลล์ *Spirulina* (whole cell), MGDG, DGDG, SQDG และ PG ที่แยกได้มาเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid methyl ester, FAME) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Lapage และ Roy (1984)

6.8.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของ FAME

โดยใช้ก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas chromatographic; GC-17A SHIMADZU) ด้วยคอลัมน์ BPX70 (70% of cyanopropyl, SGE forte, Analytical Science) ขนาด 60m x 0.25 mm I.D. ด้วยอุณหภูมิ column ที่ 205 °C อุณหภูมิ injector ที่ 250 °C และ อุณหภูมิ detector ที่ 260 °C โดย peak area ที่ได้จะนำมาวิเคราะห์เทียบกับ authentic standard fatty acid methyl ester mixtures

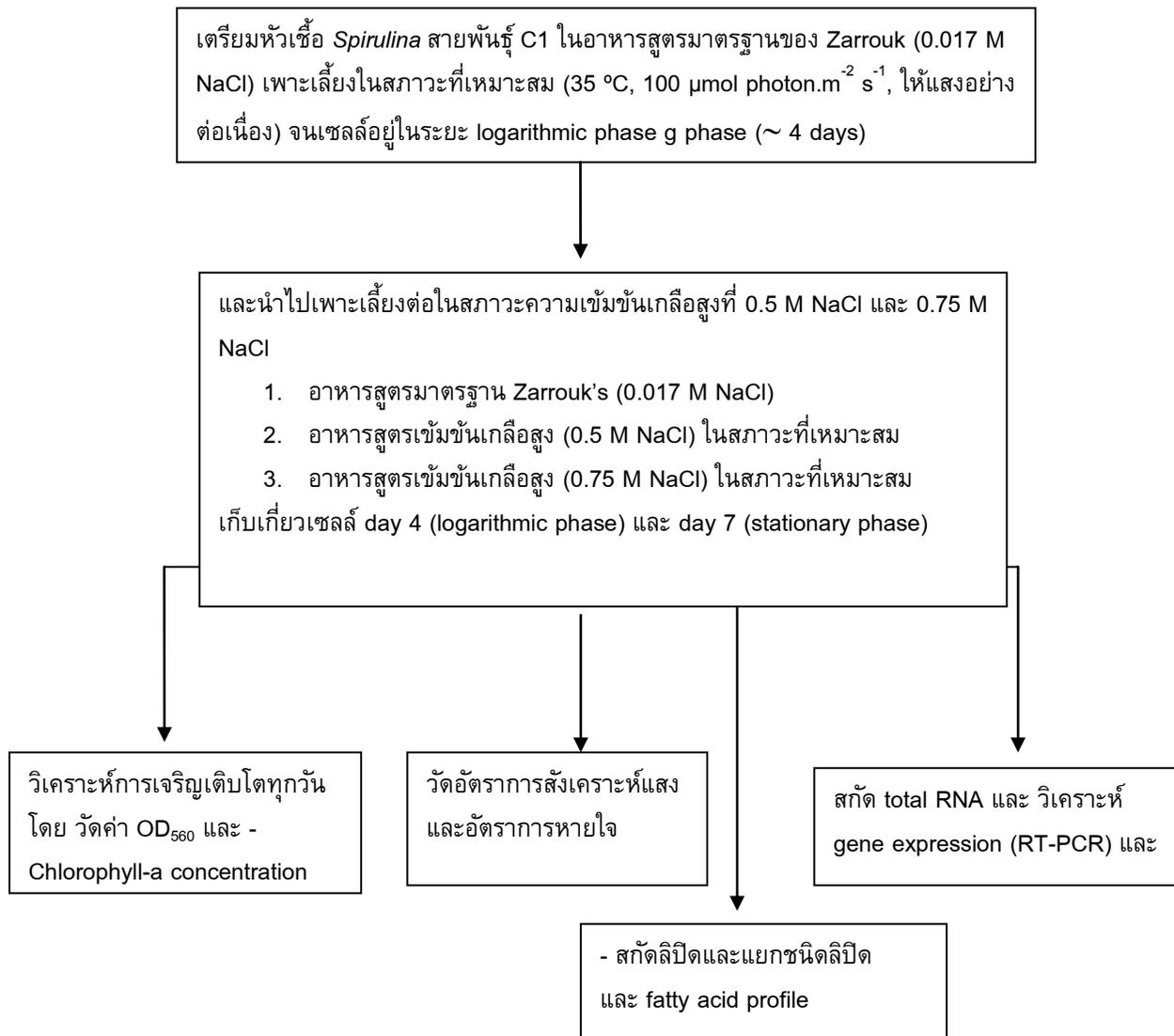
6.8.4 การสกัด RNA จากตัวอย่างเซลล์ของ *Spirulina*

- บดเซลล์สำหรับด้วยโกร่งที่แช่เย็น
- นำเซลล์สำหรับที่บดแล้วใส่ในหลอดที่มี Trizol reagent (บริษัท Invitrogen) อยู่ 1 mL และเติม chloroform ปริมาตร 0.2 mL เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 15 sec จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 min นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 12000 xg เป็นเวลา 15 min ที่อุณหภูมิ 4 °C
- นำส่วนใสชั้นบนประมาณ 0.6 mL ไปสู่หลอดใหม่ เติม isopropyl alcohol ปริมาตร 0.5 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 min นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 12000 xg เป็นเวลา 15 min ที่อุณหภูมิ 4 °C
- ล้างตะกอน RNA ที่ได้ด้วย 1 mL ของ 70% ethanol 2 ครั้ง และ 1 mL ของ absolute ethanol 1 ครั้ง โดยแต่ละครั้งนำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 12000 xg เป็นเวลา 5 min ที่อุณหภูมิ 4 °C ทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 °C
- ทำการกำจัด genomic DNA ที่อาจปนเปื้อน โดยการละลายตะกอน RNA ที่ได้ด้วย diethylpyrocarbonate (DEPC) treated water ปริมาตร 178 µL เติม 10X DNase I reaction buffer (บริษัท New England Biolabs) ปริมาตร 20 µL และ 2 units ของ DNase I (RNase free) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 min
- เติม phenol:chloroform: isoamyl อัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตร 200 µL เขย่าด้วย vortex ประมาณ 1 min นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 12000 xg เป็นเวลา 10 min ที่อุณหภูมิ 4 °C ย้ายส่วนใสชั้นบนสู่หลอดใหม่ แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

- ตกตะกอน RNA ที่ได้โดยการนำส่วนใสชั้นบนจากข้อ 6 ซึ่งมี RNA มาเติม 3M sodium acetate และ absolute ethanol ปริมาตร 0.1 และ 2.5 เท่าของปริมาตรส่วนใสตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ -30°C เป็นเวลา 1 hr นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 12000 xg เป็นเวลา 15 min

- ล้างตะกอน RNA ที่ได้ด้วย 1 mL ของ 70% ethanol 2 ครั้ง และ 1 mL ของ absolute ethanol 1 ครั้ง โดยแต่ละครั้งนำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 12000 xg เป็นเวลา 5 min ที่อุณหภูมิ 4°C ทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิ 37°C

- ละลายตะกอน RNA ที่ได้ด้วย DEPC treated water เก็บตัวอย่าง RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

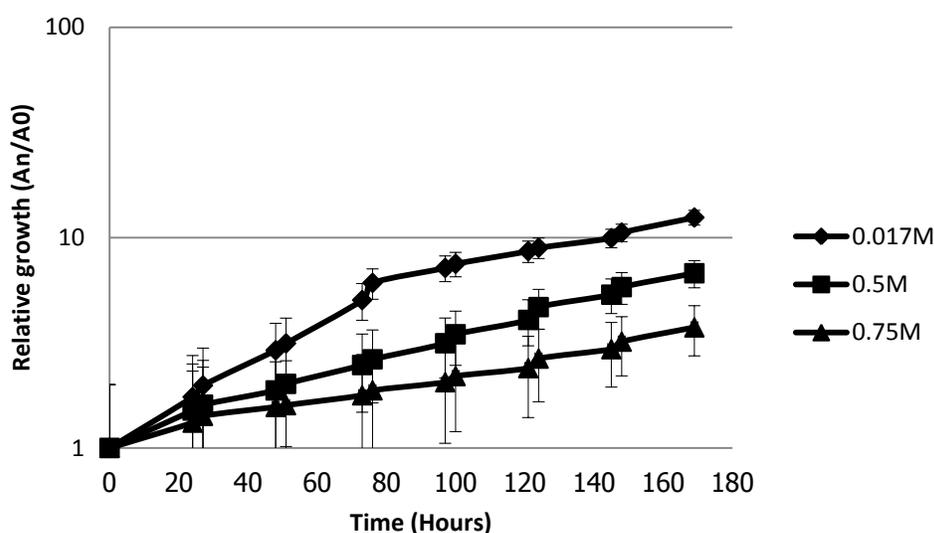


รูปที่ 6 แผนผังการทดลอง

7. ผลการทดลองและวิจารณ์

7.1 ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อการเจริญเติบโตของ *S. platensis*, C1

โดยทั่วไปสภาวะความเค็มสูงมีผลต่อพืชทั้งทางกายภาพและชีวภาพ ในขณะที่มี cyanobacteria หลายชนิดที่สามารถทนต่อสภาวะดังกล่าวได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันว่า *Spirulina* สามารถทนต่อความเค็มได้ในระดับหนึ่ง การศึกษานี้จึงเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Spirulina* ที่เจริญเติบโตด้วยอาหารสูตร Zarrouk's medium (Zarrouk, 1966) ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ต่างกันคือ 0.017 M NaCl (1 g L^{-1} , control), 0.5 M (19.6 g L^{-1}) และ 0.75 M NaCl (29.4 g L^{-1}) ซึ่งยังเป็นสภาวะที่เซลล์ยังเจริญเติบโตได้ (1 M NaCl เซลล์ตาย, KMUTT unpublished data) บันทึกการเจริญเติบโต ด้วยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ OD_{560} และความเข้มข้น Chlorophyll a และนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (specific growth rate, μ) และ เวลาของการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า (doubling time)



รูปที่ 7 การเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (คำนวณจาก OD_{560}) ของ *Spirulina platensis*, C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.5 M และ 0.75 M NaCl

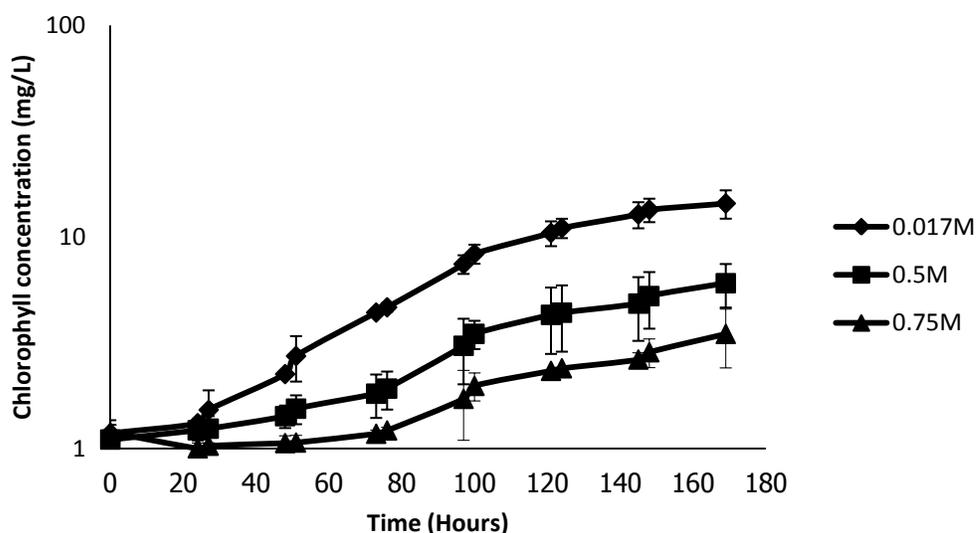
การเปลี่ยนแปลงของค่า OD_{560} (รูปที่ 7) พบว่าภายในระยะเวลา 24 hr (หรือ 1 day) เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารปกติมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้น 0.5 M และ 0.75 M NaCl โดยเซลล์ปกติมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ) ที่ 0.025 hr^{-1} หรือเทียบเท่า doubling time ที่ 27.7 hr ในขณะที่เซลล์ที่เจริญเติบโตในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือสูงกว่าปกติคือ 0.5 M NaCl มีการเจริญเติบโตลดลงโดยมีค่า μ ที่ 0.016 hr^{-1} หรือเทียบเท่า doubling time ที่ 43.3 hr และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือให้สูงถึง 0.75 M NaCl พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตช้ามากคือ มี μ ที่ 0.011 hr^{-1} หรือเทียบเท่า doubling time ที่ 43.3 hr (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามยังพบว่ารูปแบบของการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้ง 3 สภาวะจะมีความคล้ายคลึงกัน โดยที่ไม่พบว่าเซลล์ต้องการระยะปรับตัว (Lag phase) และเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้เรื่อย ๆ จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง (168 hr)

ตารางที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate (μ , hr^{-1})) และ doubling time ของ *Spirulina platensis* C1 ที่เจริญเติบโตที่ NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°C ที่ความเข้มแสง $100 \mu \text{ mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ อย่างต่อเนื่อง 24 hr

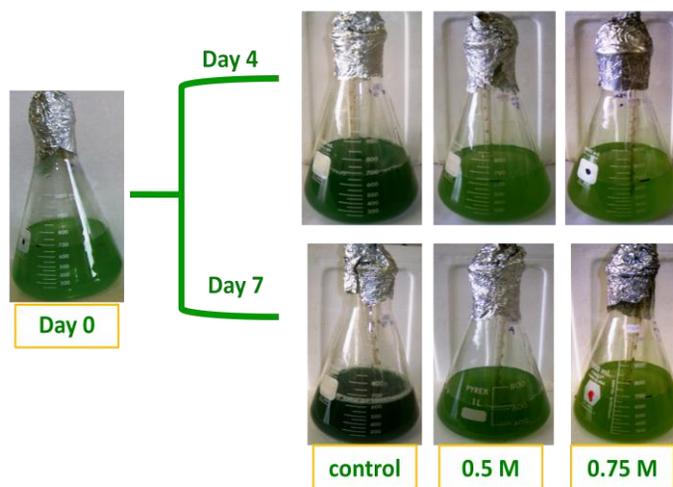
Treatments	Specific growth rate (μ , hr^{-1})	Doubling time (hr)
0.017 M NaCl (control)	0.025	27.72
0.5 M NaCl	0.016	43.30
0.75 M NaCl	0.011	63.00

การเปลี่ยนแปลงสภาวะการเจริญเติบโตของ *Spirulina* จากที่มีความเข้มข้นเกลือต่ำหรือปกติ (0.017 M NaCl) ไปสู่ที่มีความเข้มข้นเกลือสูง (0.75 M NaCl) พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ (เอ) โดยจากรูปที่ 8 แสดงเห็นว่าที่สภาวะเกลือความเข้มข้นสูงเซลล์จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำกว่าในสภาวะปกติประมาณ 2 เท่า ซึ่งผลของเกลือต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ นั้นอาจเป็นผลมาจากการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis) โดยทั่วไป (Hsiao 1983) ตลอดทั้งอาจไปกระตุ้นการสร้าง Specific stress protein (Hageman et al.1990) นอกจากนี้ จากการศึกษาผลของ NaCl ในพืชชั้นสูง โดย Stobart et al. (1985) พบว่า NaCl มีผลในการเพิ่มอัตรา Protein และ Chlorophyll degradation โดยที่กระตุ้น Protease activity และยับยั้ง Chlorophyll synthesis (การลดลงของ aminolevulinic acid (ALA) synthesis (Santos 2004) ทั้งนี้เนื่องจากคลอโรฟิลล์ ทำหน้าที่เป็น Light harvesting antenna ในกระบวนการ Photosynthesis ทั้งนี้การลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ น่าจะมีผลต่อกิจกรรมการสังเคราะห์แสง (Photosynthetic activity) ด้วย

7.2 ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ใน *S. platensis*, C1



รูปที่ 8 ปริมาณ คลอโรฟิลล์-เอ ของ *Spirulina platensis*, C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.5 M และ 0.75 M NaCl



รูปที่ 9 แสดงสีของ *Spirulina* culture ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นปกติ (0.17 M NaCl) และความเข้มข้นเกลือสูง (0.5 M และ 0.75 M NaCl)

7.3 ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อการสังเคราะห์แสงและการหายใจของ *S. platensis*, C1

ความเข้มข้นเกลือ NaCl ในอาหารเพาะเลี้ยงที่สูงกว่าปกติทำให้เซลล์มีปริมาณคลอโรฟิลล์-เอต่ำและอาจทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงที่ต่ำ ซึ่งในที่สุดทำให้การเจริญเติบโตลดลง ดังนั้นจึงทำการวัดอัตราการสังเคราะห์แสง โดยพิจารณาจาก ค่า O_2 evolution จากการวัดปริมาณ O_2 ที่ละลายน้ำในขณะที่ให้แสงสว่าง ผลการทดลองดังตารางที่ 2 ซึ่งพบว่า เซลล์ที่เจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือปกติ (0.017 M NaCl) ที่อยู่ในระยะ logarithmic phase (day 4) และ stationary phase (day 7) มีอัตราการสังเคราะห์แสงใกล้เคียงกันคือประมาณ 499 ± 55 และ $458 \pm 52 \mu\text{mol}O_2 \text{ mgChl}_a^{-1} \text{ hr}^{-1}$ ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการสังเคราะห์แสงของเซลล์ที่เจริญในอาหารที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.5 M ที่มีอายุ 4 และ 7 days มีค่าเพียง 277 ± 24 และ $307 \pm 15 \mu\text{mol}O_2 \text{ mgChl}_a^{-1} \text{ hr}^{-1}$ ตามลำดับหรือลดลงเหลือเพียงร้อยละ 55 และ 67 ตามลำดับ ซึ่งผลความเข้มข้นเกลือที่สูงต่อการสังเคราะห์แสงพบใน *Spirulina* และไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ เช่นกัน โดยอัตราการสังเคราะห์ที่ลดลงอาจเป็นผลจากความเข้มข้นเกลือที่สูงขึ้นยับยั้งการกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transfer) ใน Photosystem II

เมื่อพิจารณาอัตราการหายใจ (Respiration activity) จากเซลล์ที่มีอายุอยู่ในช่วง logarithmic phase (day 4) และ stationary phase (day 7) ซึ่งวัดจาก O_2 consumption โดยการวัดปริมาณ O_2 ที่ละลายน้ำในขณะที่ไม่ให้แสงสว่าง ผลการทดลองดังตารางที่ 2 พบว่าเซลล์ที่อยู่ในช่วง logarithmic phase (day 4) ที่เจริญเติบโตในสภาวะเกลือที่มีความเข้มข้นสูงกว่าปกติ มีอัตราการใช้ O_2 สูงกว่าเซลล์ที่เจริญเติบโตในสภาวะปกติและพบว่าอัตราการหายใจจะลดลงเมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วง stationary phase (day 7) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับ Molitor et al. (1986) ที่พบว่า อัตราการหายใจของ *Anacystis nidulans* เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในอาหารที่มี NaCl สูง ซึ่งเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของ cytochrome oxidase activity ที่อยู่บน PM โดยที่ Na^+ และ Cl^- จะไปกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ respiration electron transport ที่เกี่ยวข้องกับ respiratory system

ตารางที่ 2 อัตราการสังเคราะห์แสงและอัตราการหายใจของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl)

Time (day)	Photosynthesis activity ($\mu\text{molO}_2 \text{ mgChl-a}^{-1} \text{ hr}^{-1}$)		Respiration activity ($\mu\text{molO}_2 \text{ uptake mgChl-a}^{-1} \text{ hr}^{-1}$)	
	0.017M NaCl	0.5 M NaCl	0.017M NaCl	0.5 M NaCl
4	499 ± 55	277 ± 24	9 ± 5	53 ± 2
7	458 ± 52	307 ± 15	5 ± 4	25 ± 13

7.4 ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อปริมาณและชนิดของลิปิด และองค์ประกอบของกรดไขมันใน *S. platensis*, C1

เนื่องจากความเข้มข้นเกลือมีผลต่อกิจกรรมที่อยู่บน membrane ซึ่งมีกรดไขมันและลิปิดเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นเพื่อให้ทราบถึงผลที่มีต่อลิปิดนั้นจึง นำ *Spirulina* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือที่ 0.017 M, 0.5 M และ 0.75 M NaCl มาวิเคราะห์หาปริมาณลิปิดรวม (Bligh and Dyer, 1951) ชนิดของลิปิดด้วยวิธีดัดแปลงของ Sato และ Murata (1988) แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันด้วยการเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (transmethylation) โดยวิธีดัดแปลงจากวิธีของ Lapage และ Ray (1984) และทำการวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography

ตารางที่ 3 สัดส่วนของกรดไขมันและปริมาณกรดไขมันทั้งหมดของ *Spirulina* (whole cell) ที่เจริญเติบโตที่ความเข้มข้นเกลือต่าง ๆ ที่อยู่ในระยะ exponential phase (day 4) และ stationary phase (day 7)

NaCl (M)	Day	Fatty Acids (% total fatty acids, TFAs)						% TFA (DW)	Ratio of unsat/sat
		C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3		
0.017	0	46.1±1.5	5.9±2.3	1.1±0.4	7.4±1.4	24.2±1.9	15.1±2.0	2.1±1.1	1.11
	4	47.5±2.0	5.5±0.5	0.9±0.3	6.5±0.4	20.3±0.5	19.4±1.3	1.0±0.4	0.96
	7	47.2±1.7	5.1±0.2	0.8±0.3	8.0±0.3	24.9±1.2	14.0±1.9	2.3±1.3	1.08
0.50	4	43.6±0.8	5.7±0.3	1.2±0.3	7.8±1.2	21.3±0.2	20.6±3.0	2.0±0.8	1.24
	7	45.0±0.9	6.2±0.4	1.4±0.1	8.0±1.6	20.1±1.4	19.2±1.2	1.1±0.3	1.15
0.75	4	46.3±0.8	5.4±1.3	2.4±1.3	13.0±1.4	17.4±0.4	15.5±0.2	1.9±0.5	0.99
	7	44.0±1.2	5.9±0.6	2.2±0.6	12.2±2.0	18.9±1.0	16.6±2.1	1.4±0.6	1.16

Ratio of unsat/sat = total amount of unsaturated fatty acid/total amount of saturated fatty acid

ในสภาวะปกติเมื่อเซลล์ *Spirulina* มีอายุเพิ่มขึ้นจะมีการสะสมกรดไขมันทั้งหมด (Total fatty acids, TFAs) เพิ่มขึ้น กล่าวคือเซลล์ที่ day 4 (logarithmic phase) มีปริมาณ TFA 1.0±0.4 (% DW) และเมื่อปล่อยให้เซลล์เจริญเติบโตไปจนถึง day 7 (stationary phase) พบว่าเซลล์มีปริมาณ TFA เพิ่มขึ้นเป็น 2.3±1.3 (% DW) ซึ่งตรงข้ามกับการ

เปลี่ยนแปลงของ TFAs ของ *Spirulina* ที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือสูง (0.5 M และ 0.75 M NaCl) โดยจะลดลงเมื่อเซลล์มีอายุเพิ่มขึ้น

กรดไขมันหลักของ *Spirulina* ประกอบไปด้วย palmitic acid (C16:0), palmitoleic (C16:1), oleic acid (C18:1 Δ 9), linoleic acid (C18:2 Δ 9,12), และ γ -linolenic acid (C18:3 Δ 9,12,6, GLA) ซึ่งในสภาวะปกติชนิดที่มีมากที่สุดคือ C16:0 ซึ่งมีประมาณ 46-48% of TFA เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตขึ้นปริมาณ C16:0 มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ในขณะที่ปริมาณ GLA (% TFA) จะลดลงเมื่อเซลล์มีอายุเพิ่มขึ้น และที่สภาวะเกลือความเข้มข้นที่ 0.5 M NaCl ปริมาณ C16:0 มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (เช่นเดียวกับในสภาวะปกติ) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ GLA ของเซลล์ระยะ logarithmic phase ก็มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากเช่นกัน แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase กลับพบการเพิ่มขึ้นในเวลาที่ในสภาวะปกติปริมาณ GLA จะลดลงเรื่อย ๆ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือสูงขึ้น เป็น 0.75 M NaCl พบว่าปริมาณ GLA กลับมีค่าต่ำกว่าที่ 0.5 M NaCl อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือไปในระดับหนึ่ง *Spirulina* จะพยายามปรับตัวให้อยู่รอดโดยการเพิ่มปริมาณกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะ GLA แต่ในสภาพความเข้มข้นเกลือสูงมากขึ้นไป *Spirulina* ก็ไม่สามารถทนต่อสภาวะนี้ได้จึงเห็นว่า GLA มีปริมาณลดต่ำลงอีกครั้ง

7.5 ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อชนิดของลิพิด (lipid class) และกรดไขมันใน lipid class ต่าง ๆ ใน

S. platensis, C1

Spirulina มี glycerolipid ที่สำคัญ 4 ชนิด (lipid class) คือ Monogalactosyl Diacylglycerol (MGDG), Digalactosyl Diacylglycerol (DGDG), Sulphoquinovosyl Diacylglycerol (SQDG) และ Phosphoglycerol (PG) โดยผลของเกลือความเข้มข้นสูงแสดงดังตารางที่ 4 ซึ่งเห็นได้ว่า *Spirulina* ที่เจริญในสภาวะปกติ มีปริมาณ MGDG 37--61% และ DGDG 26-36% (of total glycerolipids) ในขณะที่มีปริมาณ SQDG 2-8% และ PG 4-20% (of total glycerolipids) และในสภาวะดังกล่าวเซลล์ระยะ logarithmic phase (day 4) มีปริมาณ MGDG มากกว่าเซลล์ระยะ stationary phase (day 7) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณ DGDG อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าปริมาณ SQDG และ PG จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเซลล์มีอายุเพิ่มขึ้น และในสภาวะเกลือความเข้มข้นสูง ปริมาณ MGDG มีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ ตามอายุเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ DGDG จะเพิ่มขึ้นที่ 0.5 M NaCl และจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือขึ้นไปอีก (0.75 M NaCl) ในขณะที่ปริมาณ SQDG และ PG ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นเกลือ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ lipid ชนิดต่าง ๆ ของ *Spirulina* ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นเกลือแต่จะขึ้นกับอายุเซลล์

ตารางที่ 4 ปริมาณลิพิดแต่ละชนิดของ *S. platensis*, C1 ที่เจริญเติบโตในอาหารที่ความเข้มข้นเกลือต่างกัน

NaCl concentration (M)	Day	% of Total Glycerolipids			
		MGDG	DGDG	SQDG	PG
0.017	0	61.7±0.3	25.6±0.6	3.6±0.3	9.1±0.3
	4	57.4±0.2	36.1±0.3	2.2±0.3	4.3±0.3
	7	37.1±0.2	35.4±0.2	7.8±0.2	19.6±0.2
0.50	4	43.4±0.3	45.1±0.6	2.9±0.1	8.6±0.4
	7	34.9±0.3	45.7±0.3	2.6±0.1	16.8±0.4
0.75	4	51.1±0.4	38.4±0.3	4.0±0.1	6.4±0.4
	7	33.4±1.2	41.5±1.4	7.0±0.5	18.2±1.2

Monogalactosyl Diacylglycerol (MGDG), Digalactosyl Diacylglycerol (DGDG), Sulphoquinovosyl Diacylglycerol (SQDG) และ Phosphoglycerol (PG)

ตารางที่ 5 Fatty acid profile ในแต่ละ lipid class ของ *S. platensis*, C1 ที่เจริญเติบโตในอาหารสูตรปกติ (Zarrouk's + 0.017 M NaCl)

Lipid class	Day	Fatty Acids (% total fatty acids)										Ratio of unsat/sat								
		C16:0		C16:1		C18:0		C18:1		C18:2			C18:3							
MGDG	0	49.9	+	3.4	7.3	+	0.4	0.3	+	0.0	4.5	+	0.4	18.0	+	1.7	20.0	+	1.0	0.99
	4	48.1	+	1.7	7.8	+	0.9	0.6	+	0.1	3.1	+	0.2	11.1	+	0.1	29.4	+	1.0	1.05
	7	51.8	+	9.7	5.1	+	0.8	0.5	+	0.0	3.9	+	0.7	24.7	+	5.3	14.1	+	3.0	0.91
DGDG	0	69.2	+	3.2	5.3	+	1.7	1.0	+	0.7	1.4	+	1.1	11.6	+	1.7	11.5	+	2.2	0.42
	4	53.6	+	5.0	5.6	+	2.4	7.1	+	3.6	7.5	+	4.2	14.6	+	3.6	11.7	+	5.2	0.65
	7	68.1	+	1.3	4.2	+	1.0	0.0	+	0.0	0.0	+	0.0	11.9	+	1.6	15.8	+	1.4	0.47
SQDG	0	83.0	+	2.1	0.0	+	0.0	3.9	+	2.6	6.6	+	2.2	6.5	+	2.7	0.0	+	0.0	0.15
	4	66.1	+	1.3	3.5	+	2.6	1.8	+	1.2	12.9	+	1.9	15.6	+	0.5	0.0	+	0.0	0.47
	7	70.6	+	0.6	1.6	+	0.3	4.6	+	0.2	11.4	+	1.9	11.8	+	2.2	0.0	+	0.0	0.33
PG	0	74.9	+	1.5	1.1	+	0.9	1.3	+	0.0	9.2	+	1.3	13.5	+	2.0	0.0	+	0.0	0.31
	4	58.6	+	3.2	2.5	+	1.3	2.9	+	0.8	12.0	+	2.0	22.5	+	2.7	1.5	+	0.7	0.63
	7	61.7	+	1.9	3.9	+	1.4	4.1	+	0.4	12.9	+	1.9	16.2	+	1.0	1.1	+	0.2	0.52

Ratio of unsat/sat = total amount of unsaturated fatty acid/total amount of saturated fatty acid

แต่ละ lipid class ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acids) และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) ซึ่งเป็นเมมเบรนลิพิด (membrane bond lipid) ในการทดลองนี้พิจารณาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดไขมันด้วย ratio ของ total unsaturated fatty acids ต่อ total saturated fatty acids (unsat/sat) ซึ่งพบว่าที่สภาวะปกติ (0.17 M NaCl) ในทุก lipid class (ตารางที่ 5) เซลล์ระยะ logarithmic phase (day 4) มีปริมาณ unsaturated fatty acids มากกว่า เซลล์ระยะ stationary phase (day 7) และที่สภาวะความเข้มข้นเกลือสูงทั้งที่ 0.5 M NaCl (ตารางที่ 6) และ 0.75 M NaCl (ตารางที่ 7) unsat/sat จะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุเซลล์ที่เพิ่มขึ้นหรือปริมาณ unsaturated fatty acids ลดลง

ในสภาวะปกติ (ตารางที่ 5) อัตราส่วนหรือปริมาณ C16 และ C18 ใน MGDG มีค่าใกล้เคียงกัน โดยที่ C16:0 เป็นกรดไขมันหลักของทุก lipid class และปริมาณ C16:0 ใน DGDG, SQDG และ PG อยู่ในช่วง 60 - 80% (TFAs) เช่นเดียวกับที่วิเคราะห์จากเซลล์โดยตรง (whole cell) ใน MGDG พบว่าเมื่ออายุเซลล์เพิ่มขึ้นปริมาณ C18:2 จะเพิ่มขึ้นในขณะที่ปริมาณ C18:3 จะลดลง และใน DGDG กลับพบในทางตรงกันข้ามคือ C18:2 จะลดลงแต่ C18:3 กลับเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามใน SQDG และ PG ซึ่งไม่มี C18:3 หรือมีน้อยมากก็พบการลดลงของ C18:2

ผลการทดลองดังตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า ที่ความเข้มข้นเกลือ 0.5 M NaCl *Spirulina* มีปริมาณ C18:2 ใน SQDG และ PG จะเพิ่มขึ้นตามอายุเซลล์แต่ใน DGDG ปริมาณ C18:2 จะค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง ในขณะที่ C18:3 ใน DGDG จะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะปกติและจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามอายุเซลล์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือให้สูงเพิ่มขึ้น (0.75 M NaCl) ผลการทดลองดังตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณ C16:0 และ C18:1 ใน SQDG และ PG จะลดลงเมื่ออายุเซลล์เพิ่มขึ้น ยกเว้นใน PG เมื่อเซลล์อยู่ในระยะ stationary phase มี C18:1 ปริมาณลดลงเล็กน้อยคือจาก 19.9% (day 4) เป็น 13.4% TFA (d7) ในขณะที่ C18:2 มีการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนใน SQDG คือจาก 9.4% (day 4) เป็น 17.4% TFA (d7) และ PG คือจาก 13.3% (day 4) เป็น 20.5% TFA (d7) เมื่อเซลล์มีอายุเพิ่มขึ้น ในขณะที่ C18:3 ที่มีใน MGDG และ DGDG มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก

การเพิ่มขึ้นของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (PUFA) ในลิพิดชนิดต่าง ๆ นั้น่าจะเป็นกลไกการป้องกันตัวจากเกลือ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Singh และ คณะ (2002) และ Allakhverdiev และคณะ (2011) ซึ่งรายงานว่าความเค็มจะไปทำลายเซลล์และเซลล์จะมีกลไกการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันโดยเอนไซม์ desaturase ซึ่ง desaturases มีหน้าที่สำคัญในการต่อต้านสภาวะเครียด (Wada and Murata 1990) ซึ่ง MGDG และ PG มีความจำเป็นต่อการรักษาสุขภาพ ของ PSII electron transport activity (Siegenthaler et al. 1989; Rawlyer and Siegenthaler 1989) และเซลล์ที่โดนทำลายด้วยเกลือความเข้มข้นสูง จะพบกิจกรรมของ desaturase ที่อยู่บน MGDG และ PG ที่เพิ่มขึ้นเพื่อสร้าง unsaturated fatty acids

นอกจากนี้ยังพบว่า MGDG และ DGDG มีองค์ประกอบของ PUFA สูงกว่าใน SQDG และ PG การเพิ่มปริมาณหรือสัดส่วนของ unsaturated fatty acids บน membrane อาจเป็นการกระตุ้น การทำงานของ Na^+/H^+ antiporter system ซึ่งเป็นการเพิ่ม fluidity ของเมมเบรนโดยจะส่งผลในการป้องกัน PS II activities (Kates et al. 1984; Kamada et al. 1995) รวมถึงการสังเคราะห์ Na^+/H^+ antiporter(s) and/or H^+ ATPase(s) ซึ่งการเพิ่มปริมาณ/ความหนาแน่น/จำนวนของ antiporter อาจทำให้ปริมาณ Na^+ ions ใน cytosol ลดลง ซึ่งจะเป็นการป้องกัน PSII และ PSI ซึ่งเป็นการช่วย recovery ของ PSI และ PSII activity (Allakhverdiev et al. 2001) นอกจากนี้ Sakurai และคณะ (2003) สรุปว่า การลดลงของ PG จะทำให้ปริมาณ Chlorophyll ลดลงไปด้วย ซึ่งพบใน mutant และทำให้เซลล์ดังกล่าวเกิด photo-bleaching ได้และจะส่งผลให้สูญเสีย photosynthetic pigments และเซลล์จะตายในที่สุด

ตารางที่ 6 Fatty acid profile ในแต่ละ lipid class *S. platensis*, C1 ที่เจริญเติบโตในอาหารสูตรความเข้มข้นเกลือสูง (Zarrouk's + 0.5 M NaCl)

Lipid class	Day	Fatty Acids (% total fatty acids)										Ratio of unsat/sat		
		C16:0		C16:1		C18:0		C18:1		C18:2			C18:3	
MGDG	0	49.9	+ 3.4	7.3	+ 0.4	0.3	+ 0.0	4.5	+ 0.4	18.0	+ 1.7	20.0	+ 1.0	0.99
	4	44.9	+ 1.6	7.9	+ 0.8	0.6	+ 0.3	6.1	+ 0.6	8.1	+ 0.6	32.5	+ 2.6	1.2
	7	47.9	+ 1.5	8.5	+ 0.7	0.7	+ 0.2	5.1	+ 0.2	8.8	+ 0.1	29.0	+ 1.5	1.06
DGDG	0	69.2	+ 3.2	5.3	+ 1.7	1.0	+ 0.7	1.4	+ 1.1	11.6	+ 1.7	11.5	+ 2.2	0.42
	4	55.8	+ 5.2	9.7	+ 1.7	2.5	+ 1.8	3.6	+ 1.6	10.7	+ 1.9	17.6	+ 1.0	0.71
	7	54.0	+ 0.5	10.3	+ 0.3	0.8	+ 0.2	1.9	+ 0.2	9.9	+ 0.5	23.2	+ 0.3	0.83
SQDG	0	83.0	+ 2.1	0.0	+ 0.0	3.9	+ 2.6	6.6	+ 2.2	6.5	+ 2.7	0.0	+ 0.0	0.15
	4	66.4	+ 1.2	4.9	+ 3.3	1.7	+ 1.6	14.4	+ 1.7	12.7	+ 2.6	0.0	+ 0.0	0.47
	7	63.1	+ 3.6	3.7	+ 1.5	3.3	+ 1.5	10.7	+ 1.6	16.1	+ 2.5	3.1	+ 1.9	0.51
PG	0	74.9	+ 1.5	1.1	+ 0.9	1.3	+ 0.0	9.2	+ 1.3	13.5	+ 2.0	0.0	+ 0.0	0.31
	4	62.7	+ 4.8	3.4	+ 0.8	3.1	+ 1.1	13.0	+ 2.2	17.3	+ 3.5	0.5	+ 0.4	0.52
	7	60.2	+ 1.0	2.4	+ 0.6	2.7	+ 1.0	12.6	+ 0.7	21.5	+ 1.5	0.6	+ 0.0	0.59

Ratio of unsat/sat = total amount of unsaturated fatty acid/total amount of saturated fatty acid

ตารางที่ 7 Fatty acid profile ในแต่ละ lipid class *S. platensis*, C1 ที่เจริญเติบโตในอาหารสูตรความเข้มข้นเกลือสูง (Zarrouk's + 0.75 M NaCl)

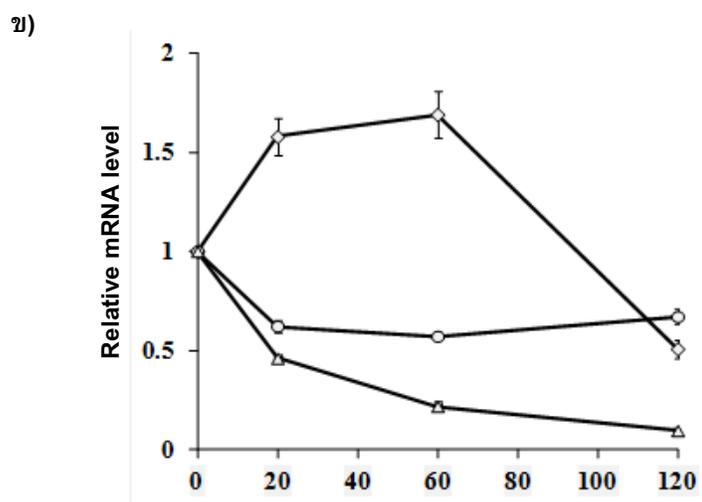
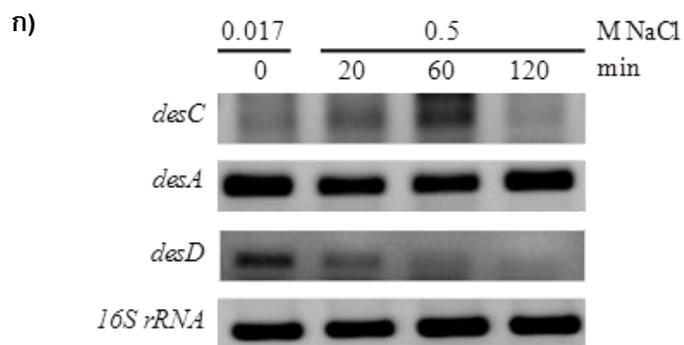
Lipid class	Day	Fatty Acids (% total fatty acids)						Ratio of unsat/sat						
		C16:0		C16:1		C18:0			C18:1		C18:2		C18:3	
MGDG	0	49.9	+ 3.4	7.3	+ 0.4	0.3	+ 0.0	4.5	+ 0.4	18.0	+ 1.7	20.0	+ 1.0	0.99
	4	48.6	+ 4.3	8.7	+ 1.8	1.2	+ 0.6	6.6	+ 1.2	6.8	+ 1.8	28.1	+ 1.8	1.01
	7	43.5	+ 1.9	8.5	+ 0.7	0.7	+ 0.2	6.0	+ 0.8	6.0	+ 1.5	29.0	+ 1.5	1.12
DGDG	0	69.2	+ 3.2	5.3	+ 1.7	1.0	+ 0.7	1.4	+ 1.1	11.6	+ 1.7	11.5	+ 2.2	0.42
	4	56.3	+ 2.5	9.0	+ 0.9	2.3	+ 1.8	3.3	+ 1.2	9.8	+ 1.6	19.3	+ 1.5	0.71
	7	57.2	+ 2.5	9.2	+ 0.3	0.7	+ 0.5	2.3	+ 0.5	9.0	+ 1.5	21.6	+ 1.3	0.73
SQDG	0	83.0	+ 2.1	0.0	+ 0.0	3.9	+ 2.6	1.4	+ 1.1	6.5	+ 2.7	0.0	+ 0.0	0.15
	4	74.0	+ 5.5	0.0	+ 0.0	4.1	+ 0.4	8.1	+ 0.6	9.4	+ 1.5	4.4	+ 3.8	0.28
	7	62.8	+ 1.8	1.5	+ 0.8	4.2	+ 1.0	14.1	+ 1.7	17.4	+ 0.4	0.0	+ 0.0	0.49
PG	0	74.9	+ 1.5	1.1	+ 0.9	1.3	+ 0.0	9.2	+ 1.3	13.5	+ 2.0	0.0	+ 0.0	0.31
	4	62.4	+ 2.4	2.5	+ 0.8	2.0	+ 0.4	19.9	+ 3.8	13.3	+ 0.2	0.0	+ 0.0	0.55
	7	56.4	+ 1.2	3.5	+ 1.1	5.5	+ 2.9	13.4	+ 2.0	20.5	+ 1.1	0.6	+ 0.3	0.61

Ratio of unsat/sat = total amount of unsaturated fatty acid/total amount of saturated fatty acid

7.6 ผลของความเข้มข้นเกลือต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันของ *S. platensis*, C1

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวมีบทบาทต่อความทนของเซลล์ต่อสภาวะที่ความเข้มข้นของ NaCl สูง ดังนั้นในงานทดลองนี้จึงได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมพันธะคู่ของกรดไขมัน ซึ่งได้แก่ยีน *desC*, *desA* และ *desD* ซึ่งเป็นยีนที่ถูกถอดรหัสไปเป็น Δ^9 desaturase, Δ^{12} desaturase และ Δ^6 desaturase ซึ่งทำหน้าที่ในการเติมพันธะคู่ให้กับ C18:0 ไปเป็น C18:1 (9), C18:2 (9,12) และ C18:3 (6,9,12) ตามลำดับ เมื่อเซลล์ถูกย้ายจากที่ความเข้มข้น 0.017 M NaCl ไปที่ 0.5 M NaCl เป็นระยะเวลา 0, 20, 60 และ 120 min ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยตัวอย่างเซลล์สำหรับที่ระยะเวลาต่าง ๆ ถูกนำมาสกัด total RNA ด้วย Trizol reagent® และทำการกำจัด genomic DNA ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างด้วยเอนไซม์ DNaseI แล้วนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *desC*, *desA* และ *desD* ด้วย RT-PCR โดยใช้ AccessQuick™ RT-PCR System (Promega, USA) และทำการวิเคราะห์ปริมาณความเข้ม band ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของแต่ละยีนที่ได้ด้วย Image Quant TL program (GE Healthcare Biosciences) แล้วทำการ normalization ด้วยความเข้ม band ของ 16S rRNA

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนสำหรับเอนไซม์ desaturase ทั้ง 3 ยีนใน *Spirulina* ด้วยเทคนิค RT-PCR ดังแสดงในรูปที่ 10 พบว่าการแสดงออกของยีน *desC* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นภายใน 20 min หลังจากความเข้มข้นเกลือในอาหารมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา 0 min และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนไปถึงเวลา 60 min แต่หลังจากนั้นพบว่าการแสดงออกของยีน *desC* ลดต่ำลง ในขณะที่การแสดงออกของยีน *desA* ลดลงภายใน 20 min แล้วคงที่ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา ส่วนการแสดงออกของยีน *desD* นั้น ลดลงอย่างต่อเนื่องภายในระยะเวลา 120 min ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นเกลือที่เพิ่มขึ้นมีผลในการยับยั้งการ transcription ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมพันธะคู่ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันภายในเซลล์เมื่ออาหารมีความเข้มข้นเกลือเพิ่มขึ้นพบว่าเซลล์มีส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงขึ้น จึงเป็นการแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวภายในเซลล์ *Spirulina* ภายใต้ความเข้มข้นเกลือสูงไม่ได้ถูกควบคุมที่ระดับ transcription แต่อาจเป็นผลเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ desaturase ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งกิจกรรมของเอนไซม์ desaturase ที่อยู่ในแต่ละชนิดของ membrane ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาต่อไปในอนาคต



รูปที่ 10 ผลการแสดงผลของยีนสำหรับเอนไซม์ desaturase ใน *Spirulina* เมื่ออยู่ในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง (ก) ผลการวิเคราะห์การแสดงผลของยีน *desC* *desA* และ *desD* ใน *Spirulina* เมื่อย้ายเซลล์จากอาหารที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.017 M ไปสู่ 0.5 M ที่ระยะเวลา 0, 20, 60 และ 120 min ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ความเข้ม band ของ 16s RNA เป็นตัวชี้วัดปริมาณ mRNA ที่ใช้ในตัวอย่าง (ข) ผลการวิเคราะห์หาปริมาณความสัมพันธ์ของ mRNA ของแต่ละยีนเมื่อเวลาผ่านไปเทียบกับที่เวลา 0 min (การแสดงผลของยีน *desC* , *desA*, *desD* ถูกแทนด้วย ◇, ○ และ △ ตามลำดับ)

8 สรุปผลงานวิจัย

Spirulina platensis C1 เป็นสายพันธุ์ที่มีรายละเอียดทางด้าน genome เกือบสมบูรณ์แล้ว (Cheevadhanarak et al. 2012) ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่า *S. platensis* C1 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่สูง (0.75 M NaCl) กว่าความเข้มข้นมาตรฐาน (0.017 M NaCl) ถึง 44 เท่า แม้ว่าอัตราการเจริญเติบโตจะต่ำกว่าที่สภาวะปกติถึง 2.3 เท่า (เปรียบเทียบจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ) ภายใน 24 hr เมื่อย้ายเซลล์จากสภาวะปกติไปที่ความเข้มข้นเกลือสูงพบว่า เซลล์มีสีเขียวเหลืองโดยมีปริมาณคลอโรฟิลล์-เอ ลดลง และยังไม่ยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์แสงแต่ส่งเสริมการหายใจ เมื่อพิจารณาถึงสัดส่วนของกรดไขมันของเซลล์พบว่าปริมาณ C18:2 และ C18:3 ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ทั้งในระยะ logarithmic และ stationary phases นอกจากนี้ความเข้มข้นเกลือสูงยังมีผลทำให้ปริมาณ MGDG และ PG ลดลง ในขณะที่ปริมาณ DGDG เพิ่มขึ้นเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าปริมาณ glycerolipids ทุกชนิดขึ้นอยู่กับอายุเซลล์มากกว่าความเข้มข้นของเกลือ และเมื่อพิจารณาการแสดงออกของยีน *des C*, *des A* และ *des D* พบว่าการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวของ *S. platensis* C1 ภายใต้ความเข้มข้นเกลือสูงไม่ได้ถูกควบคุมที่ระดับ transcription

9 ปัญหาและอุปสรรค – เครื่องมือวัดปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเพื่อใช้วัดกิจกรรมการสังเคราะห์แสงและการหายใจขาดเสียจึงต้องใช้เวลาในการซ่อมแซมเนื่องจากประกอบด้วยอุปกรณ์หลายชนิด

10 ผลงานที่เผยแพร่

Poster Presentation:

- Handayani, MLW, Siangdung W, Paithoonrangsarid K, Bunnag B, Ruengjitchachawalya M, Kittiratarina K. (2009) Response of lipid class pattern in *Spirulina platensis* strain C1 to salinity stress. Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON), January 13-16, Naraesuan University, Phitsanulok, Thailand
- Handayani, MLW, Siangdung W, Paithoonrangsarid K, Bunnag B, Ruengjitchachawalya M, Kittiratarina K. (2009) Lipid characteristics of high salt-adapted *Spirulina platensis* strain C. The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology; A Solution to the Global Economic Crisis, September 24-25, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand
- Paithoonrangsarid K, Siangdung W, Handayani MLW, Bunnag B, Ruengjitchachawalya M, Kittiratanaphiboon K. (2010). The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “TSB2010: Biotechnology for Healthy Living” October 20-22, Prince of Songkla University, Trang Campus, Trang Province, Thailand

ลงชื่อ

(.....)

(นางสาววิภาวรรณ เสียงตั้ง)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 30 เมษายน 2555

11 บรรณานุกรม

- Allakhverdiev SI, Kinoshita M, Inaba M, Suzuki I, Murata N (2001) Unsaturated fatty acids in membrane lipids protect the photosynthetic machinery against salt-induced damage in *Synechococcus*. *Plant Physiol* 125: 1842-1853
- Allakhverdiev SI, Kinoshita M, Inaba M, Suzuki I, Murata N (2011) Unsaturated Fatty Acids in Membrane Lipids Protect the Photosynthetic Machinery against Salt-Induced Damage in *Synechococcus*. *Plant Physiol* 125: 1559-1571
- Allakhverdiev SI, Murata M (2008) Salt stress inhibits photosystem II and I in cyanobacteria. *Photosyn Res* 98:529-539
- Allakhverdiev SI, Nishiyama Y, Miyairi S, Yamamoto H, Inagaki N, Kanesaki Y, Murata N (2002) Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem II by suppressing the transcription and translation of *psbA* genes in *Synechocystis*. *Plant Physiol* 130:1443-1453
- Browse J, Somerville O (1991) Glycerolipid synthesis, biochemistry and regulation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 467-506
- Cheevadhanarak S et al. (2012) Draft genome sequence of *Arthrospira platensis* C1 (PCC9438) *Stand Genomic Sci* 6:1 [doi:10.4056/sigs.2525955]
- Cohen Z (1986) Products from Microalgae, in *Handbook of Microalgal Mass Culture*, Edited by Richmond, A., Florida, CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 421-454.
- Deshnium P, Paithoonrangsarid K, Suphatrakul A, Meesapyodsuk D, Tanticharoen M, Cheevadhanarak S (2000) Temperature-independent and -dependent expression of desaturase genes in filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438). *FEMS Microbiol Lett* 184: 207-213
- Erdmann N, Fulda S, Hagemann M (1992) Glucosylglycerol accumulation during salt acclimation of two unicellular cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 138: 363–368
- Feige GB, Heinz E, Wrage K, Cochems N and Ponzelar E (1980) In *Biogenesis and Function of Plant Lipid*. Edited by Mazliak P, Benveniste P, Coster C and Douce R. Amsterdam, Elsevier/North-Holland. pp.135-140
- Hagemann M and Erdmann N (1997) Environmental stresses. In *Cyanobacterial Nitrogen Metabolism and Environmental Biotechnology*. Edited by Rai AK. New Delhi, Narosa Publishing House. pp. 156–221
- Hagemann M, Erdmann N, Wittenburg E (1987) Synthesis of glucosylglycerol in salt-stressed cells of the cyanobacterium *Microcystis firma*. *Arch Microbiol*, 148: 275–279
- Huflejt ME, Tremolieres A, Pineau B, Laun JK, Hatheway J, Packer L (1990) Changes in membrane lipid composition during saline growth of the freshwater cyanobacterium *Synechococcus* 6311. *Plant Physiol*. 94: 1512-1521
- Kates M, Pugh EL, Ferrante G (1984) Regulation of membrane fluidity by lipids desaturases. *Biomembranes* 12: 379-395

- Kearns EV, Hugly S and Somerville CR (1991) The role of cytochrome b_5 in Δ^{12} desaturation of oleic acid by microsomes of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Arch Biochem Biophys 284: 431-436
- Kenyons CN (1972) Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae. J Bacteriol 109: 827-834
- Kenyons CN, Rippka R, Stanier, RY (1972) Fatty acid composition and physiological of some filamentous blue-green algae. Arch Microb 83: 216-236
- Khomutov G, Fry IV, Huflejt ME, Packer L (1990) Membrane lipid composition, fluidity, and surface charge changes in response to growth of the freshwater cyanobacterium *Synechococcus* 6311 under high salinity. Arch Biochem Biophys 277: 263-267
- Lapage G, Roy CC (1984) Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. J Lipid Res 25: 1391-1396
- Lem NW and Stumpf PK (1984a) In vitro fatty acid synthesis and complex lipid metabolism the cyanobacterium, *Anabaena variabilis* I some characteristic of fatty acid synthesis. Plant Physiol 74: 134-138
- Lem NW and Stumpf PK (1984b) In vitro fatty acid synthesis and complex lipid metabolism the cyanobacterium, *Anabaena variabilis* II Acyl transfer and complex lipid formation. Plant Physiology 75: 700-704
- Mackay MA, Horton RS and Borowitzka LJ (1984) Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria. J Gen Microbiol 130: 2177-2191
- Molitor V, Trnka M, Erber W, Steffan I, Riviere ME, Arrio B, Springer-Lederer H and Peschek GA (1990) Impact of salt adaptation on esterified fatty acids and cytochrome oxidase in plasma and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Ancystis nidulans*. Arch Microbiol 154: 112-119
- Murata N and Nishida I (1987) Lipids of blue-green algae (cyanobacteria). In Lipid: Structure and Function. The Biochemistry of Plants. Edited by Stumpf PK. Florida, Academic Press. pp. 315-347
- Murata N and Wada H (1995) Acyl-lipid desaturase and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. Biochem J 308:1-8
- Murata N, Higashi SI and Fujimura Y (1990) Glycerolipid in various preparations of photosystemII from Spinach chloroplast. Biochim Biophys Acta 1019: 261-268
- Murata N, Higashi SI, Fujimura Y (1990) Glycerolipid in various preparations of photosystem II from Spinach chloroplast. Biochim Biophys Acta 1019: 261-268
- Murata N, Ono T and Sato N (1979) Low teperature stress in crop plants. In The Role of the Membrane. Edited by Lyons JM, Graham D and Raison JK. New York, Academic Press. pp. 337-345
- Murata N, Wada H and Gombos Z (1992) Modes of fatty acid desaturation in cyanobacteria. Plant Cell Physiol 33: 933-941
- Ohirogge J, Browse J (1995) Lipid biosynthesis. Plant Cell 7: 957-970
- Omata T, Murata N (1986) Glucolipid synthesis activities in cytoplasmic and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Plant Cell Physiol 27: 485-490

- Rawlyer A, Siegenthaler PA (1989) Change in the molecular organization of monogalactosyldiacylglycerol between resting and functioning thylakoid membranes: Involvement of the CF₀/CF₁-ATP synthetase. *Biochim Biophys Acta* 975: 283–292
- Reed RH, Borowitzka LJ, Mackay MA, Chudek JA, Foster R, Warr SRC, Moore DJ, Stewart WDP (1986) Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 39: 51–56
- Ritter D, Yopp JH (1993) Plasma membrane lipid composition of the halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Arch Microbiol* 159: 435-439
- Sakurai I, Hagio M, Gombos Z, Tyystjärvi T, Paakkarinen V, Aro EM, Wada H (2003) Requirement of phosphatidylglycerol for maintenance of photosynthetic machinery. *Plant Physiol* 133: 1376
- Sato N, Murata, N (1988) Membrane lipid. *Methods Enzymol* 167: 251-259
- Schmidt H, Heinz E (1990a) Involvement of ferredoxin in desaturation of lipid-bound oleate in chloroplasts. *Plant Physiol.* 94: 214-220
- Schmidt H, Heinz E (1990b) Desaturation of oleoyl groups in envelop membranes from spinach chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9477-9480
- Siegenthaler PA, Rawlyer A, Smutny J (1989) The phospholipid population which sustains the uncoupled non-cyclic electron flow activity is localized in the inner monolayer of the thylakoid membrane. *Biochim Biophys Acta* 975: 104–111
- Smith MA, Cross AR, Jones OTG, Griffiths WT, Stymen S, Stobart K. (1990) Electron-transport components of the 1-acyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine Δ^{12} -desaturase (Δ^{12} -desaturase) in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius L.*) cotyledons. *Biochem J* 272: 23-29.
- Stapleton SR, Joworski JG (1984) Characterization of fatty acid biosynthesis in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Biochim Biophys Acta* 794: 249-255
- Takagi M, Karseno and Yoshida T (2006) Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J Biosci Bioeng* 101: 223-226
- Vonshak A and Richmond A (1988) Mass production of the bluegreen alga *Spirulina*: an overview. *Biomass* 15: 233–247
- Wada H, Murata N (1990) Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol* 92: 1062-1069
- Wada H, Schmidt H, Heinz E and Murata N (1993) In vitro ferredoxin-dependent desaturation of fatty acids in cyanobacteria thylakoid membranes. *J Bacteriol* 175: 544-547
- Zarrouk C (1966) Contribution a l' Etude d'une cyanophycee. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur las Crosissance et la Photosynthese de *Spirulina maxima*. Docter of Philosophy. University of Paris, France

12 คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ: นางสาววิภาวรรณ เสียงตั้ง

หน่วยงานต้นสังกัด: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
สถานที่ติดต่อ : สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. บางขุนเทียน
 49 ซอยเทียนทะเล 25 ถนนบางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม
 เขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร 10150
โทรศัพท์: 02-470-7486
โทรสาร: 02-452-3455
E-mail: wipawan@pdti.kmutt.ac.th

ชื่อผู้ร่วมโครงการ

นางสาวกัลยาณี ไพฑูรย์รังษะดี

ตำแหน่งทางวิชาการ -

หน่วยงานต้นสังกัด: หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาวิศวกรรมชีวเคมีและโรงงานต้นแบบ
 ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
สถานที่ติดต่อ: หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาวิศวกรรมชีวเคมีและโรงงาน ต้นแบบ มหาวิทยาลัย
 เทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
 49 ซอยเทียนทะเล 25 ถนนบางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม
 เขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร 10150
โทรศัพท์: 02-470-7482
โทรสาร: 02-452-3455
E-mail: okalarid@biotd.or.th

นางบุษยา บุนนาค

ตำแหน่งทางวิชาการ: รองศาสตราจารย์
หน่วยงานต้นสังกัด: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
สถานที่ติดต่อ : สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. บางขุนเทียน
 49 ซอยเทียนทะเล 25 ถนนบางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม
 เขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร 10150
โทรศัพท์: 02-470-7355
โทรสาร: 02-452-3455
E-mail: boosya.bun@kmutt.ac.th