รายงานฉบับสมบูรณ์

คุณลักษณะของกรดไขมันในลิปิดเมมเบรนของสไปรูลิน่าที่ปรับตัวในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง

Characteristic of fatty acid composition in membrane lipid of salt adapted *Spirulina* cells

รหัสโครงการ

SCH-NR-2009-20-02

นางสาววิภาวรรณ เสียงดัง (หัวหน้าโครงการ)
นางสาวกัลยาณี ไพฑูรย์รังสฤษดิ์ (ผู้ร่วมโครงการ)
นางบุษยา บุนนาค (ที่ปรึกษาโครงการ)

19 มิถุนายน 2555

รายงานฉบับสมบูรณ์

คุณลักษณะของกรดไขมันในลิปิดเมมเบรนของสไปรูลิน่าที่ปรับตัวในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง

Characteristic of fatty acid composition in membrane lipid of salt adapted *Spirulina* cells

รหัสโครงการ

SCH-NR-2009-20-02

รายนามคณะผู้วิจัย

1. นางสาววิภาวรรณ เสียงดัง
   สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
   มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. บางขุน เทียน
2. นางสาวกัลยาณี ไพฑูรย์รังสฤษดิ์
   หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาวิศวกรรมชีวเคมีและโรงงานต้นแบบ
   ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
   สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
3. นางบุษยา บุนนาค
   สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
   มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. บางขุน เทียน

วันเริ่มต้นโครงการ 1 กุมภาพันธ์ 2553

วันสิ้นสุดโครงการ 15 มีนาคม 2554

(นางสาววิภาวรรณ เสียงดัง /ตรวจสอบเนื้อหาแล้ว)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

ศูนย์ประสานงานนักเรียนทุนรัฐบาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ปี พ.ศ. ที่ได้รับทุน 2553

บทคัดย่อ

สไปรูลิน่า (*Spirulina*) ถูกนำมาบริโภคในรูปอาหารเสริมมนุษย์ และใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ การเพาะเลี้ยงโดยทั่วไปนิยมทำในบ่อเปิดกลางแจ้ง ซึ่งเป็นสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมอยู่ตลอดเวลา เช่น การระเหยของน้ำซึ่งทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารในบ่อเลี้ยงเพิ่มขึ้นในระหว่างวัน ซึ่งเป็นปัญหาอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและส่งผลให้ได้ผลผลิตชีวมวลต่ำและยังมีผลต่อองค์ประกอบทางชีวเคมีต่าง ๆ ในเซลล์อีกด้วย ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการปรับตัวของ *Spirulina* ที่ต้องอยู่ในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของสภาวะความเข้มข้นเกลือสูงที่มีต่อการเจริญเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ กิจกรรมการสังเคราะห์แสงและการหายใจ รวมถึงองค์ประกอบของกรดไขมันในเมมเบรน โดยได้ทำการเพาะเลี้ยง *Spirulina* สายพันธุ์ C1 ในอาหารสูตร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และ สูตรความเข้มข้นเกลือสูง (0.5 M NaCl) โดยวัดการเจริญเติบโต วิเคราะห์อัตราเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด, (μ) อัตราการสังเคราะห์แสง, และอัตราการหายใจและองค์ประกอบของกรดไขมันในพลาสมาเมมเบรน (Plasma membrane, PM) และไธลาคอยด์เมมเบรน (Thylakoid membrane, TM) ของเซลล์ที่อยู่ในระยะ exponential phase (วันที่ 4) และ stationary phase (วันที่ 7) ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรความเข้มข้นเกลือสูงมีการเจริญเติบโตต่ำกว่า (μ = 0.016 hr^{-1}) เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรปกติ (μ = 0.025 hr^{-1}) อีกทั้งความเข้มข้นเกลือสูงมีผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงด้วย ในส่วนของกิจกรรมการสังเคราะห์แสงนั้น พบว่า ความเข้มข้นเกลือสูงส่งผลในการยับยั้งอัตราการสังเคราะห์แสงประมาณ 55% และ 67% ในเซลล์ที่มีอายุ 4 และ 7 วันที่ ตามลำดับ และเมื่อศึกษาผลอย่างฉับพลันของเกลือความเข้มข้นสูงที่มีต่ออัตราการสังเคราะห์แสงและหายใจนั้น พบว่าเซลล์ที่อยู่ในสภาวะ 0.5 M NaCl ในระยะเวลาเพียง 30 นาที มีอัตราการสังเคราะห์แสงลดลงถึง 50% เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่อยู่ในสภาวะปกติ อย่างไรก็ตาม กลับพบว่าเซลล์ที่อยู่ในสภาวะปกติและที่อยู่ในสภาวะ 0.5 M NaCl มีอัตราการหายใจใกล้เคียงกันในช่วงระยะ 30 นาทีแรก แต่ในเวลาต่อมาอัตราการหายใจของเซลล์ที่อยู่ในสภาวะ 0.5 M NaCl จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วถึง 4-5 เท่า สำหรับผลของเกลือความเข้มข้นสูงที่มีต่อองค์ประกอบของกรดไขมันบนเมมเบรน พบว่า สัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเมมเบรนของเซลล์ที่เจริญเติบโตในอาหารที่มี 0.5 M NaCl จะสูงกว่าเซลล์ที่เจริญในอาหารปกติ และเป็นที่น่าสนใจคือเซลล์ที่เจริญในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูงนี้จะมีสัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวในส่วนของพลาสมาเมมเบรนค่อนข้างสูง ซึ่งพบในเซลล์ที่อยู่ในระยะ exponential phase ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวมีบทบาทในการรักษาเสถียรสภาพของเมมเบรนให้คงสภาพอยู่ได้ภายใต้สภาวะเครียดจากความเค็มเพื่อให้เซลล์อยู่รอดในสิ่งแวดล้อมใหม่

คำสำคัญ : สไปรูลิน่า กรดไขมัน พลาสมาเมมเบรน ไธลาคอยด์เมมเบรน การสังเคราะห์แสง การหายใจ สภาวะเครียดจากเกลือ

Abstract

Spirulina has been extensively used for health food and animal feed, especially for aquaculture feed. Typically, large scale cultivation is conducted in the open pond that has to encounter the fluctuated environmental conditions. For outdoor cultivation, the water evaporation during day time increases the salt concentration in culture medium. The salinity stress is one of the major obstacles to impede production of biomass and biological compositions of *Spirulina*. Therefore, to understand insight into the acclimation of *Spirulina* to high salinity, the effect of high salt concentration on cell growth, chlorophyll concentration, photosynthetic activity, respiration and fatty acids composition of membrane lipids in *Spirulina platensis* strain C1 were investigated. We found that the inhibition of growth and the reduction of chlorophyll concentration of *Spirulina* were detected under high salt medium (0.5 M NaCl). Cells grown in 0.5 M NaCl containing medium had lower specific growth rate ($\mu = 0.016\ hr^{-1}$) than that of normal medium grown cells ($\mu = 0.025\ hr^{-1}$). The photosynthetic activity of 0.5 M NaCl grown cells was reduced by 55% and 67% of 4 and 7 day-old, respectively. Moreover, the rapid reduction of photosynthetic activity (50%) was insisted by exposure the normal grown cells to 0.5 M NaCl within 30 min. Nevertheless, the response of respiration was delayed until the first 30 min and after that a 4-5 –fold increase in respiration rate was detected. The analysis of fatty acid composition of membrane lipids revealed that high salt concentration influenced the fatty acid composition of membrane lipids. The proportion of unsaturated fatty acids in membranes of high salt grown cells was slightly higher than that of normal grown cells. Surprisingly, the ratio of total unsaturated to total saturated fatty acids in plasma membrane was significantly enhanced after exposure to 0.5 M NaCl for exponential cells. The result indicated that change of fatty acid composition of membrane lipids especially; unsaturated fatty acids might be involved the adaptation of *S. platensis* strain C1 to cope with the salt stress.

Keywords: *Spirulina*, fatty acid, plasma membrane, thylakoid membrane, photosynthetic activity, respiration, salt stress

สารบัญ

บทคัดย่อ i

Abstract ii

สารบัญ iii

สารบัญรูปภาพ iv

สารบัญตาราง v

บทนำ 1

วัตถุประสงค์ของโครงการ 2

การทบทวนวรรณกรรม 2

การออกแบบการวิจัย 5

ขอบเขตการวิจัย 6

ระเบียบวิธีวิจัย 6

สายพันธุ์ *Spirulina* 6

การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นและสภาวะการเพาะเลี้ยง 7

สภาวะการเพาะเลี้ยง 7

การวิเคราะห์ 7

การวัดการเจริญเติบโต 7

การหาค่าความเข้มข้นคลอโรฟิลล์ เอ 7

การวัดค่ากิจกรรรมการสังเคราะห์แสงและกิจกรรมการหายใจ 8

การแยกชนิดของเมมเบรน 9

การเตรียมเมทธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน 9

การวิเคราะห์องค์ประกอบของเมทธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน 9

ผลการทดลองและวิจารณ์ 10

ผลของความเข้มข้นเกลือที่สูงต่อการเจริญเติบโตของ *Spirulina* 10

ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อการสังเคราะห์แสงและการหายใจของ *Spirulina* 12

ผลของความเข้มข้นเกลือสูงอย่างฉับพลันต่ออัตราการสังเคราะห์แสงและการหายใจ 14

ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อองค์ประกอบของกรดไขมันใน *Spirulina* 15

ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อองค์ประกอบของกรดไขมันของลิปิดเมมเบรน ใน *Spirulina* 16

สรุปผลงานวิจัย 20

ปัญหาและอุปสรรค 20

บรรณานุกรม 21

ประวัติผู้วิจัย 25

สารบัญรูป

รูปที่ 1 ภาพแสดงขั้นตอนการทดลอง 5

รูปที่ 2 แสดงลักษณะของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 6

รูปที่ 3 ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการวัดกิจกรรมการสังเคราะห์แสงและการหายใจของ *Spirulina* 8

รูปที่ 4 ลักษณะของ O_2 electrode ที่จุ่มอยู่ใน double jacket thermo-regulated vessel 9

รูปที่ 5 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl) ที่แสดงด้วยค่าความขุ่นที่ OD560 10

รูปที่ 6 ความเข้มข้น Chlorophyll-a ของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl) 12

รูปที่ 7 ลักษณะของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl) ที่อายุเซลล์ 4 วัน 12

รูปที่ 8 รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงอัตราการสังเคราะห์แสง (A) และการหายใจ (B) ของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 เมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นจาก 0.017 M ไปเป็น 0.5 M 15

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate (μ, hr^{-1})) และ doubling time ของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl) เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°C ที่ความเข้มแสง 100 μ mol photon m^{-2} s^{-1} อย่างต่อเนื่อง 24 hr ที่คำนวณจากค่าความขุ่นที่ OD_{560} 11

ตารางที่ 2 อัตราการสังเคราะห์แสงและอัตราการหายใจของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl) 13

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 (whole cell) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl) 16

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของกรดไขมันใน plasma และ thylakoid membranes ของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl) 19

บทนำ

สไปรูลิน่า (*Spirulina platensis*) เป็นไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ที่มีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 50-70 ของน้ำหนักแห้ง มีปริมาณลิปิดร้อยละ 2 ถึง 9 ของน้ำหนักแห้ง และ มีกรดไขมันจำเป็นชนิดไม่อิ่มตัว ได้แก่ กรดลิโนลินิค (linoleic acid, (C18:2 (Δ 9,12)) และ กรดแกมม่าลิโนลินิค (γ-linolenic acid, (C18:3 (Δ 6,9,12), GLA) ประมาณร้อยละ 40 ของกรดไขมันทั้งหมด หรือ ประมาณร้อยละ 1.0-1.5 ของน้ำหนักแห้ง ทั้งนี้ยังประกอบด้วย โพลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) รวมทั้ง แร่ธาตุ และ วิตามินต่างๆ โดยเฉพาะวิตามินบี 12 (B12) จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นประกอบกับยังไม่มีรายงานที่บ่งถึงความเป็นพิษของ *Spirulina* จึงทำให้มีอุตสาหกรรมหลายประเภทที่ใช้ *Spirulina* เป็นวัตถุดิบ เช่น อาหารเสริมสุขภาพในมนุษย์ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมอาหาร สำหรับตลาดชีวมวล (biomass) ของสาหร่ายขนาดเล็กมีขนาดประมาณ 5,000 ตันต่อปี คิดเป็นมูลค่าประมาณ 1.25×10^9 $US ต่อปี โดย *Spirulina* มีสัดส่วนการผลิตมากที่สุดประมาณ 3,000 ตันต่อปี (Pulz & Gross, 2004) ซึ่ง BioNat.net ได้ประมาณการผลผลิตโลกของ *Spirulina* ในปี 2020 ไว้ว่าจะสูงถึง 220,000 ตันต่อปี

ปัจจุบัน (2010) *Spirulina* เกรดอาหารสัตว์ที่นำเข้าจากประเทศจีนสามารถจำหน่ายได้ในราคาเพียง 200-400 บาทต่อกิโลกรัมแห้งผลิต ในขณะที่ *Spirulina* ที่ผลิตและจำหน่ายในประเทศไทยมีราคาไม่ต่ำกว่า 400 บาทต่อกิโลกรัมแห้งซึ่งเป็นผลมาจากต้นทุนสารเคมีที่ใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงที่มีราคาสูงและยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ โดยเฉพาะโซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate, $NaHCO_3$) ซึ่งเป็นใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักและต้องใช้ในปริมาณสูง (8-16.8 g L^{-1}) โดยมีราคาประมาณ 15 บาทต่อกิโลกรัมแห้ง การผลิต *Spirulina* ในเชิงพาณิชย์นิยมเพาะเลี้ยงในบ่อเปิดขนาดใหญ่กลางแจ้งซึ่งเป็นสภาวะที่เซลล์ต้องพบกับการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิในบ่อและอุณหภูมิอากาศรวมทั้งความเข้มแสงในระหว่างวันตลอดเวลา โดยเฉพาะในประเทศไทยในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายนเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิและความเข้มแสงค่อนข้างสูง พบว่าตอนกลางวันจะมีการระเหยของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงจึงเป็นทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารในรูปเกลือเพิ่มขึ้น (Voshak และ Richnomd, 1988) ประกอบกับผู้สนใจเพาะเลี้ยง *Spirulina* ต้องการลดต้นทุนการผลิตด้วยการใช้น้ำจากแหล่งธรรมชาติโดยเฉพาะน้ำกร่อยหรือน้ำทะเลมาทดแทนการใช้น้ำจืดซึ่งในบางพื้นที่มีความขาดแคลนและมีราคาสูง ซึ่งปัจจัยดังกล่าวนี้มีผลโดยตรงต่อเซลล์ที่จะต้องมีกลไกในการปรับตัวเพื่อให้สามารถเจริญเติบโตหรือดำรงชีวิตต่อไป ทั้งนี้มีรายงานว่าความเข้มข้นสูงของเกลือมีผลยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์แสงใน *Spirulina* และส่งเสริมอัตราการหายใจใน *Spirulina* สายพันธุ์ M2 ซึ่งเติบโตได้ดีในอาหารที่มี $NaHCO_3$ ที่ความเข้มข้น 200 mM (Vonshak และคณะ, 1996) และใน *Spirulina* สายพันธุ์น้ำเค็มมีรายงานว่าความสามารถในการทนเค็มจะเพิ่มขึ้นตามอัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้น (Gabbay-Azaria และคณะ, 1992) เนื่องจากลิปิดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ใน cyanobacteria ทั้งในส่วน พลาสมาเมมเบรน (plasma membrane, PM) และ ไธ

ลาคอยด์เมมเบรน (thylakoid membrane, TM) ซึ่งเป็นแหล่งดำเนินกิจกรรมกระบวนการสังเคราะห์แสงและกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาการตอบสนองของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 (ซึ่งมีรายละเอียดทางด้าน genome เกือบสมบูรณ์แล้ว, (2010, BIOTEC, unpublished data) ในด้านการเปลี่ยนแปลงทางด้านสัดส่วนขององค์ประกอบของกรดไขมันใน PM และ TM ซึ่งเป็นการรักษาเสถียรสภาพของ membrane ให้คงสภาพอยู่ได้ภายใต้สภาวะความเข้มข้นเกลือสูงเพื่อทำให้เซลล์อยู่รอดในสิ่งแวดล้อมใหม่ งานวิจัยนี้จะสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตชีวมวลและ GLA ซึ่งเป็นสารมูลค่าสูงใน *Spirulina* ได้เมื่อต้องเพาะเลี้ยงในบริเวณที่มีความเค็มของน้ำสูง

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1 เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือที่สูงต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการสังเคราะห์แสงของ *Spirulina* สายพันธุ์ C1

2 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของกรดไขมันใน plasma membrane และ thylakoid membrane ของ *Spirulina* สายพันธุ์ C1ในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง

การทบทวนวรรณกรรม

สไปรูลิน่า (*Spirulina platensis*) เป็นไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ซึ่งจัดอยู่ในแฟมมิลี่ Oscillatoriaceae ประกอบด้วยเซลล์หลาย ๆ เซลล์ (multicellular) ที่มีลักษณะเป็นทรงกระบอก (cylindrical) เรียงต่อกันเป็นสาย (filament) และบิดเป็นเกลียวคล้ายเกลียวของลวดสปริง เรียกเกลียวนี้ว่าไตรโคม (trichome) ดำรงชีพด้วยการสังเคราะห์แสง (Autotrophic microoraganism) โดยรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) คือ คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และไฟโคบิลิโซม (phycobilisome) ที่ประกอบด้วยไฟโคไซยานิน (phycocyanin) และอัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) ซึ่งรงควัตถุเหล่านี้พบอยู่บริเวณไธลาคอยด์ เมมเบรน (thylakoid membrane, PM) นอกจากนี้ลิปิดส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรน

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเกลือในบ่อเพาะเลี้ยง *Spirulina* เป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการสังเคราะห์แสงของเซลล์ ภายใต้สภาวะความเข้มข้นเกลือสูง (Vonshak และคณะ, 1996; Vonshak และคณะ, 1988; Lu และ Vonshak, 2002) ทั้งนี้ทำให้ *Spirulina* มีอัตราการเจริญเติบโตลดต่ำลง ซึ่งส่งผลทำให้ผลผลิตชีวมวลลดลงด้วย นอกจากนี้ความเข้มข้นเกลือสูงทำให้กิจกรรมของการสังเคราะห์แสงระบบที่ 2 (Photosystem II) ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ความเข้มข้นเกลือสูงไปยับยั้งการส่งถ่ายอิเลคตรอน (electron transfer) ทั้งที่เป็นตัวรับและตัวให้ของระบบ Photosystem II แล้วไปทำลาย Phycobilisome และเปลี่ยนการกระจายพลังงานที่ถูกกระตุ้นของกิจกรรมของศูนย์กลางปฏิกิริยาที่ 1 (Photsystem I) ทั้งนี้อัตราการเจริญเติบโตที่ลดลงอันเนื่องมาจากความเข้มข้นเกลือที่สูงสามารถพบได้เช่นเดียวกันในไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Anacystis* (Vonshak

และ Richmond, 1981) และ *Nostoc* (Blumwald และ Tel-Or, 1982) แต่จากการศึกษาของ Dhiab และคณะ (2007) พบว่าภายใต้อุณหภูมิ 25°C ที่ความเข้มแสง 20 μmol photons m^{-2} s^{-1} อัตราการเจริญเติบโตของ *Spirulina* สายพันธุ์ Compere no 1968/3786 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.5 M และ 0.25 M จะสูงกว่าในอาหารสูตรมาตรฐาน Zarrouk's ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.017 M รวมทั้งกิจกรรมของกระบวนการสังเคราะห์แสงก็สูงขึ้นด้วย

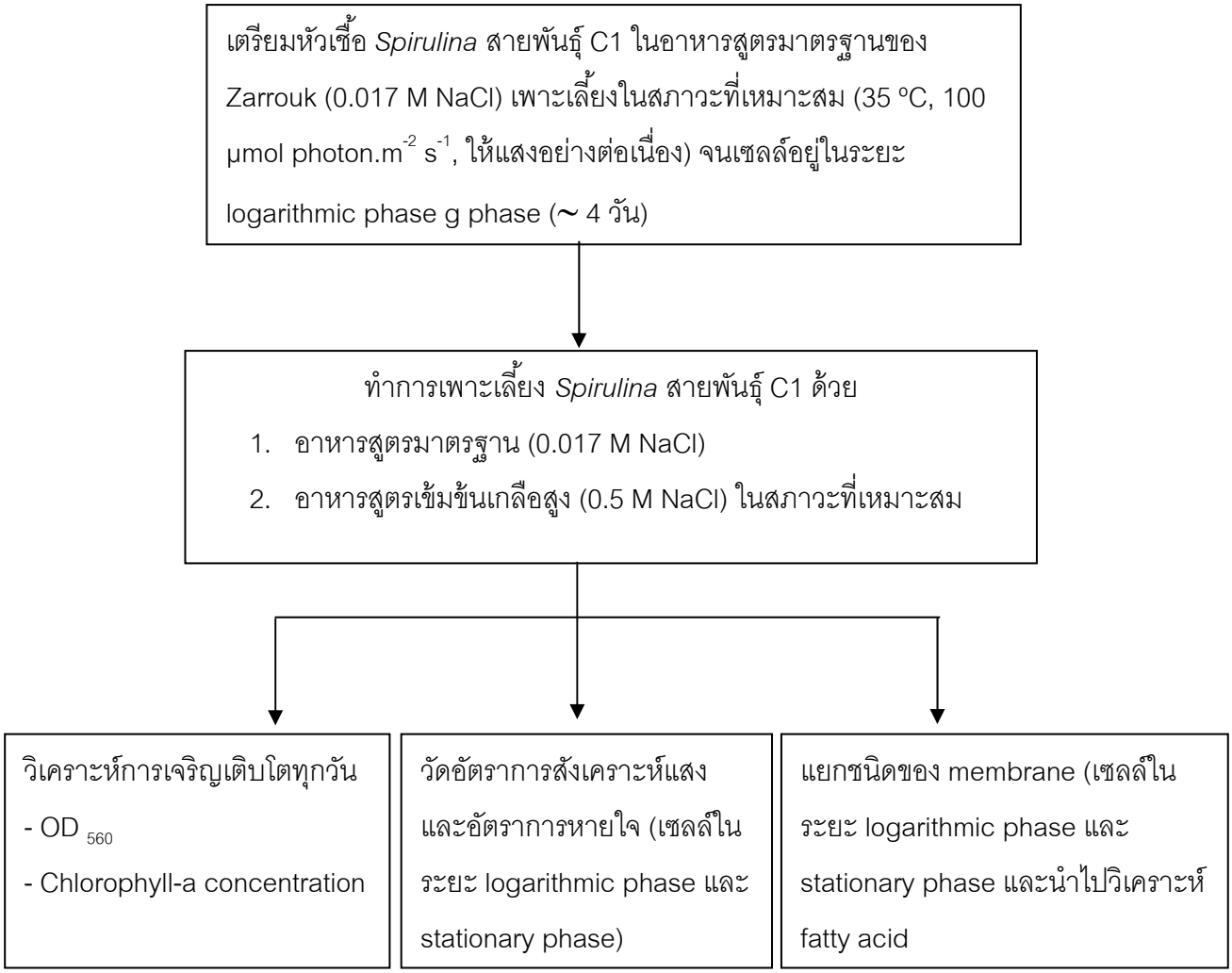
เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือสูง เซลล์จะปรับขนาด cell volume ให้ลดลงรวมทั้งมีการผลิต compatible solutes เช่น การสังเคราะห์ glucosylglycerol ใน *Synechocysits* sp. PCC 6803 (Hagemann และคณะ, 1987; Erdmann และคณะ, 1992; Hagemann และ Erdmann, 1997) การสังเคราะห์ glycinebetaine ใน *Synechococcus* sp. PCC 7418 (Mackay และคณะ, 1984; Reed และคณะ, 1986; Hagemann และ Erdmann, 1997) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่แสดงว่าลิปิดอาจมีส่วนในการปกป้องเซลล์จากความเข้มข้นเกลือสูง (Huflejt และคณะ, 1990: Khomutov และคณะ, 1990; Ritter และ Yopp, 1993) อย่างไรก็ตามแม้ว่ากลไกการเพิ่มขึ้นของปริมาณลิปิดเมื่อเซลล์อยู่ในความเข้มข้นเกลือสูงจะยังไม่ชัดเจน แต่ก็มีงานวิจัยที่พบว่าเมื่อสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ต้องอยู่ในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง จะเกิดปฏิกิริยากระบวนการเติมพันธะคู่ของกรดไขมัน (desaturation) ในmembrane ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ รายงานวิจัยที่ศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือต่อการเปลี่ยนแปลงลิปิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. PCC 6311 (Huflejt และคณะ, 1990; Khomutov และคณะ, 1990; Molitor และคณะ, 1990) พบว่าการที่เซลล์เจริญเติบโตได้ในสภาวะความเข้มข้นของ NaCl สูง เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมัน และ ลิปิด โดยเมื่อย้ายเซลล์จากอาหารที่มีความเข้มข้น NaCl ที่ 0.15 M ไปในอาหารที่มีความเข้มข้น NaCl ที่ 0.5 M พบการลดลงอย่างรวดเร็วของกรดไขมัน C16:1(Δ9) ในขณะที่มีการเพิ่มขึ้นของ กรดไขมัน C18:1(Δ9) และ C18:1(Δ11) (Huflejt และคณะ, 1990) นอกจากนี้ความเข้มข้นเกลือยังมีผลต่อสัดส่วนของลิปิดชนิดต่าง ๆ โดยพบว่าเมื่อย้ายเซลล์ไปสู่ความเข้มข้นเกลือที่สูงขึ้น สัดส่วนของลิปิดกลุ่ม monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) ลดลงในขณะที่สัดส่วนของลิปิดกลุ่ม digalactosyl-diacylglycerol (DGDG) และ phosphoglycerolipid (PG) เพิ่มขึ้น และการเปลี่ยนแปลงนี้พบทั้งใน PM และ TM

Ritter และ Yopp (1993) ทำการศึกษาผลของเกลือต่อองค์ประกอบของลิปิดใน halophilic cyanobacterium ชนิด *Aphanothece halophytica* พบว่าการที่เซลล์สามารถเจริญได้ในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง อาจเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของลิปิด โดยสัดส่วนของ MGDG และ DGDG ใน PM ลดลงเมื่อความเข้มข้นเกลือสูงขึ้น ในขณะที่ PG มีสัดส่วนเพิ่มขึ้น ในขณะเดียวกันไม่พบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของ glycerolipid ใน TM 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 และ คณะ, 2006)

จากข้อมูลในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพสาหร่าย มจธ. (2009, unpublished data) พบว่า *Spirulina* สายพันธุ์ C1 มีการปรับตัวเพื่อให้ในการเจริญเติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือสูงที่ 0.5M และ 0.75M ด้วยการเพิ่มขึ้นของสัดส่วน γ-linolenic acid (GLA) ต่อสัดส่วนของกรดไขมันทั้งหมด และเมื่อเซลล์มีอายุเพิ่มขึ้นสัดส่วนของ GLA ก็ยังคงมากกว่าเซลล์ที่เจริญในอาหารปกติ

การออกแบบการวิจัย



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดลอง

ขอบเขตการวิจัย

1 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและอัตราการสังเคราะห์แสงและอัตราการหายใจของ *Spirulina* สายพันธุ์ C1 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน Zarrouk's (Zarrouk, 1966) ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.017M (1 g L^{-1}) และที่ความเข้มข้น NaCl สูงคือ 0.5 M (29.4 g L^{-1}) ซึ่งเทียบเท่าความเค็มของน้ำทะเลคือ 30 ppt

2 นำเซลล์จากข้อ 1 มาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันจากเซลล์ (whole cell) และแยกชนิด membrane และนำ plasma membrane และ thylakoid membrane ที่แยกได้ไปวิเคราะห์กรดไขมันเพื่อศึกษาผลของเกลือความเค็มสูงต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในส่วนของ membrane lipid

ระเบียบวิธีวิจัย

สายพันธุ์ *Spirulina*

Spirulina platensis สายพันธุ์ C1 (หรือ *Arthrospira* sp. PCC 9438) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type, WT) (รูปที่ 2) สามารถเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ (single colony) และเก็บรักษาไว้บนอาหารแข็ง (slant agar) สูตรมาตรฐาน Zarrouk's ภายใต้สภาวะความเข้มแสง 20 µmol photon m^{-2} s^{-1} ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ºC)

รูปที่ 2 แสดงลักษณะของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1

การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นและสภาวะการเพาะเลี้ยง

นำ *Spirulina* จาก slant agar จำนวน 1 loop มาเลี้ยงใน Elrenmeyer flask ขนาด 100 มิลลิลิตร (mL) ที่มีอาหารเหลว Zarrouk's ปริมาตร 25 mL มาเลี้ยงในตู้บ่มเพาะซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 35 ºC ความเข้มแสง 50 µmol photon m^{-2} s^{-1} อย่างต่อเนื่อง โดยเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที (rpm) หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ จึงทำการเพิ่มปริมาณ *Spirulina* โดยการเติมอาหารเหลวให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 mL ใน Elrenmeyer flask ขนาด 250 mL เพาะเลี้ยงที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 4 วันแล้วทำการเปลี่ยนถ่ายอาหาร 2 รอบเพื่อให้เซลล์ปรับตัวก่อนนำไปใช้

การเพิ่มปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น

เพาะเลี้ยง *Spirulina* ในอาหาร Zarrouk's ปริมาตร 1500 mL ใน Elrenmeyer flask ขนาด 2000 mL วางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 35 ºC ความเข้มแสง 100 µmol photon m^{-2} s^{-1} อย่างต่อเนื่อง โดยการกวนผสมด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic bar) ที่ความเร็วประมาณ 130 rpm เพื่อให้เซลล์สัมผัสกับอาหารและได้รับแสงอย่างทั่วถึง เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ logarithmic phase (3-4 days) แล้วทำการเปลี่ยนถ่ายอาหาร 2 รอบเพื่อให้เซลล์ปรับตัวก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การวิเคราะห์

การวัดการเจริญเติบโต

วัดการเจริญเติบโตโดยการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (nm) และการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์-เอ (Chlorophyll-a)

การหาค่า chlorophyll-a concentration (Bennet and Bogorad, 1973)

ปิเปตตัวอย่าง *Spirulina* ปริมาตร 5 mL มากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman, GF/C) จากนั้นเติมด้วย เมทธานอล ปริมาตร 5 mL. และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 min ทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3500 rpm เป็นเวลา 5 min นำส่วนใสมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 nm

การคำนวณ

Chlorophyll a concentration (mg L^{-1}) = Absorbancy at 665 nm x 13.9*

* Absorption coefficient ของ *Spirulina*

คำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (µ) และ doubling time ดังนี้

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

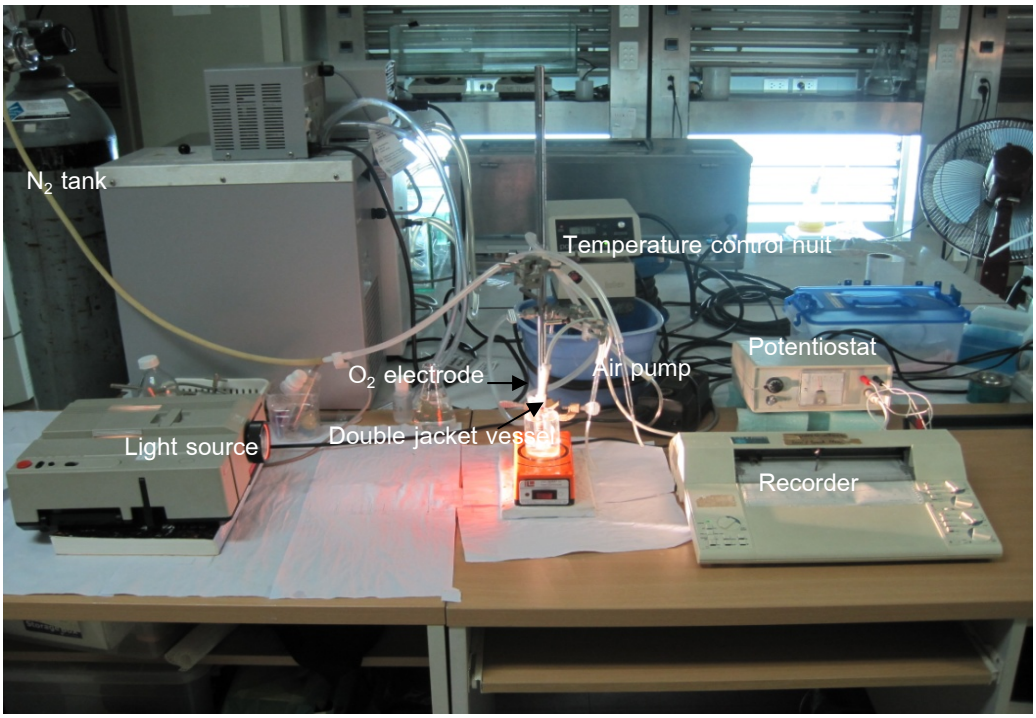
โดยที่ N1, N2 = ค่า reading absorbance (OD_{560}) หรือ chlorophyll-a concentration mg L^{-1} ที่เวลา t_2 และ t_1 ตามลำดับ

Doubling time (day) = 0.693/µ

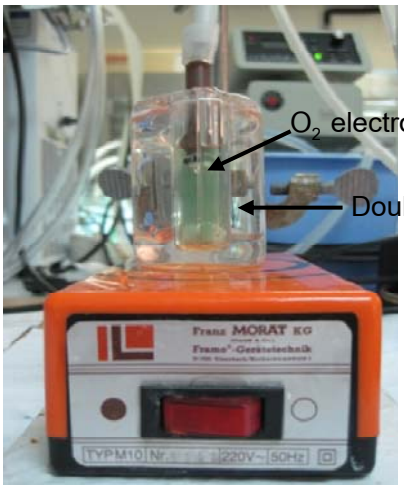
การวัดค่ากิจกรรรมการสังเคราะห์แสง (Photosynthetic activity) **และกิจกรรมการหายใจ** (Respiration activity)

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 จากนั้นนำ ตัวอย่าง *Spirulina* ที่ปรับความเข้มข้นแล้วปริมาตร 4 mL เติมในภาชนะแก้วผนังสองชั้นที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้โดยน้ำหล่อ (double jacket thermo-regulated glass vessel) โดยควบคุมไว้ที่ 35 ºC และการวัด Photosynthetic activity จะใช้หลักการการผลิต oxygen (O_2- evolving photosynthetic activity) โดยจะวัดปริมาณ oxygen ที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen) ด้วย Clak-type O_2-electrode (YSI 5331A) และให้แสงที่ความเข้ม 160 µ mol photon m^{-2} s^{-1} ด้วย slide projector lamp นำสัญญาณที่อ่านได้จากเครื่องบันทึกมาคำนวณและวิเคราะห์ผลให้อยู่ในรูป µmol O_2 evolved mg Chl^{-1} hr^{-1} (รูปที่ 3 และ 4)

และการวัด Respiration activity ใช้หลักการการใช้ oxygen (O_2- consuming respiration activity) โดยทำเช่นเดียวกับการวัด Photosynthetic activity แต่จะทำการวัดในที่มืดโดยจะใช้ผ้าสีดำคลุม vessel และวิเคราะห์ผลให้อยู่ในรูป µmol O_2 uptake mg Chl^{-1} hr^{-1}



รูปที่ 3 ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการวัดกิจกรรมการสังเคราะห์แสงและการหายใจของ *Spirulina*



รูปที่ 4 ลักษณะของ O_2 electrode ที่จุ่มอยู่ใน double jacket thermo-regulated vessel

การแยกชนิดของเมมเบรน

นำเซลล์ pellet ที่ได้จากการกรองหรือการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนมาทำให้แตกและนำไปแยกชนิด ซึ่งจะได้ PM และ TM โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Murata และ Omata (1988) โดย PM ซึ่งมีสีส้มอมเหลืองจะอยู่ในชั้น 30% sucrose TM อยู่ในชั้นรอยต่อระหว่างความเข้มข้นของ sucrose 39% และ 50% แล้วเจือจางด้วย 10 mM HEPES buffer pH 7.0 ซึ่งมี 10 mM NaCl นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน membrane ที่ 300,000 *x g* นาน 1 hr ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บ membraneไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การเตรียมเมทธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

นำเซลล์ *Spirulin*a (whole cell), PM และ TM ที่แยกได้มาเตรียมเมทธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid methylester, FAME) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Lapage และ Roy (1984)

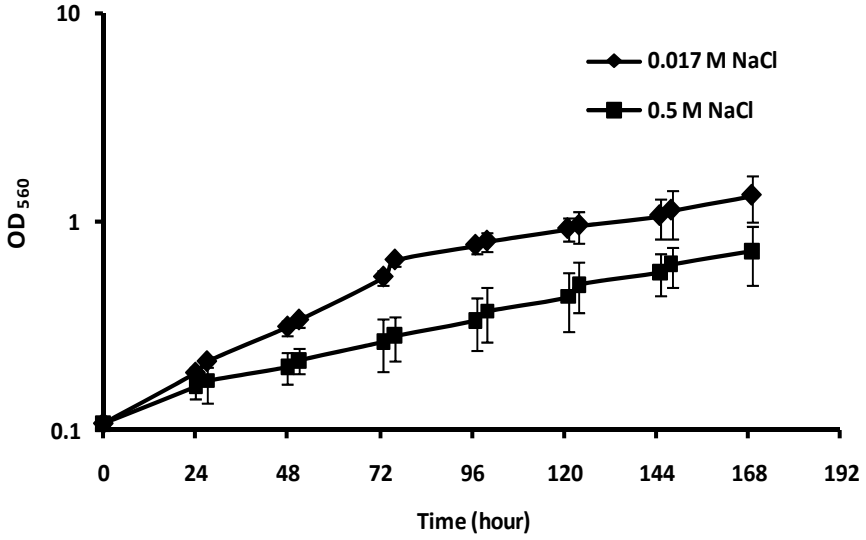
การวิเคราะห์องค์ประกอบของ FAME

โดยใช้ก๊าซโครมาโตกราฟฟี (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

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อการเจริญเติบโตของ *Spirulina*

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Spirulina* ที่เจริญเติบโตด้วยอาหารสูตร Zarrouk's medium (Zarrouk, 1966) ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.017 M และ 0.5 M NaCl โดยยังเป็นสภาวะที่เซลล์เจริญเติบโตได้ บันทึกการเจริญเติบโตทุกวันเป็นเวลา 7 วัน ด้วยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ OD_{560} และความเข้มข้นคลอโรฟิลล์- เอ (Chlorophyll-a) และนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (specific growth rate, μ) และค่าของเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า (doubling time, dt)



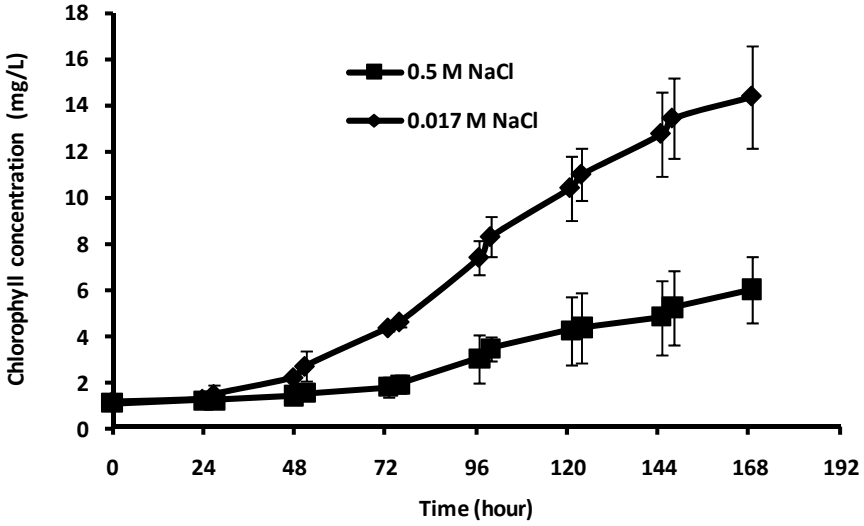
รูปที่ 5 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl) ที่แสดงด้วยค่าความขุ่นที่ OD_{560}

จากการเปลี่ยนแปลงของค่า OD_{560} (รูปที่ 5) พบว่า ภายในระยะเวลา 24 hr (หรือ 1 day) เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Zarrouk's ปกติมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้น 0.5 M NaCl โดยที่เซลล์ปกติมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ) ที่ 0.025 hr^{-1} หรือเทียบเท่า doubling time ที่ 27.7 hr ในขณะที่เซลล์ที่เจริญเติบโตในสภาพที่มีเกลือสูงกว่าปกติจะมี μ ที่ 0.016 hr^{-1} หรือเทียบเท่า doubling time ที่ 43.3 hr (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตาม ยังพบว่ารูปแบบของการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้ง 2 สภาวะมีความคล้ายคลึงกันคือเซลล์ไม่มีระยะการปรับตัว (Lag phase) และเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้เรื่อย ๆ จนถึง 168 hr ก่อนที่จะเก็บเกี่ยวเซลล์

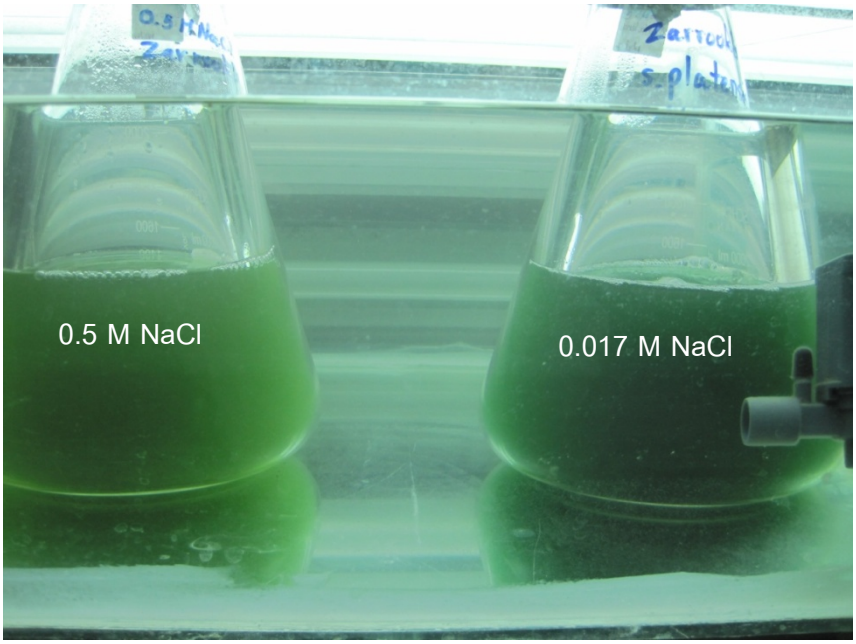
ตารางที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate (μ, hr^{-1})) และ doubling time (dt, hr) ของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl) เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°C ที่ความเข้มแสง 100 μmol photon m^{-2} s^{-1} อย่างต่อเนื่อง 24 hr ที่คำนวณจากค่าความขุ่นที่ OD_{560}

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

เมื่อพิจารณาผลของเกลือความเข้มข้นสูงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยความเข้มข้น Chlorophyll-a พบว่าเซลล์ที่เจริญเติบโตในอาหาร Zarrouk's ปกติและในสภาวะที่มีเกลือสูงมีระยะการปรับตัวประมาณ 24 และ 48 hr ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าที่สภาวะเกลือความเข้มข้นสูงนั้นเซลล์จะมีความเข้มข้น Chlorophyll-a ต่ำกว่าในสภาวะปกติประมาณ 2 เท่า (รูปที่ 6) ตัวอย่างเช่น ที่ 96 hr ในสภาวะอาหาร Zarrouk's ปกติ culture มีความเข้มข้น Chlorophyll-a ที่ 7 mg L^{-1} ขณะที่ในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง culture มีความเข้มข้น Chlorophyll-a ที่ 3 mg L^{-1} (รูปที่ 7) ซึ่งผลของเกลือต่อความเข้มข้น Chlorophyll-a นั้นอาจเป็นผลมาจากการยับยั้ง Protein synthesis โดยทั่วไป (Hsiao, 1973) ตลอดทั้งไปกระตุ้นการสร้าง Specific stress protein (Hagemann และคณะ, 1990) นอกจากนี้ จากการศึกษาผลของ NaCl ในพืชชั้นสูง โดย Stobart และคณะ (1985) พบว่า NaCl มีผลในการเพิ่มอัตรา Protein และ Chlorophyll degradation โดยที่กระตุ้น Protease activity และยับยั้ง Chlorophyll synthesis (โดยเฉพาะการลดลงของ aminolevulinic acid synthesis (ALA), Santos (2004) เนื่องจาก Chlorophyll-a ทำหน้าที่เป็น Light harvesting antenna ในกระบวนการ Photosynthesis ดังนั้นการลดลงของปริมาณความเข้มข้น Chlorophyll-a จึงมีผลต่อ Photosynthetic activity ด้วย



รูปที่ 6 ความเข้มข้น Chlorophyll-a ของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl)



รูปที่ 7 ลักษณะของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl) ที่อายุเซลล์ 4 วัน

ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อการสังเคราะห์แสงและการหายใจของ *Spirulina*

การเจริญเติบโตที่ต่ำลงอันเนื่องมาจากความเข้มข้นของ NaCl ที่สูงขึ้นกว่าปกติ ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ต่ำลง จึงทำการศึกษาอัตราการสังเคราะห์แสงและการหายใจ

ของเซลล์ที่เจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือปกติและอาหารที่มี 0.5 M NaCl โดยการวัดปริมาณ oxygen ที่ละลายน้ำ

เมื่อวิเคราะห์การสังเคราะห์แสงโดยพิจารณาจากค่า O_2 evolution ของเซลล์ที่เจริญในอาหารที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.017 M เป็นเวลา 4 และ 7 day ดังตารางที่ 2 พบว่าเซลล์มีอัตราการสังเคราะห์แสงใกล้เคียงกันคือประมาณ 499±55 และ 458±52 $\mu molO_2$ $mgChl\text{-}a^{-1}$ hr^{-1} ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการสังเคราะห์ของเซลล์ที่เจริญในอาหารที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.5 M เป็นเวลา 4 และ 7 day พบว่าเซลล์ที่เจริญที่ความเข้มข้นเกลือสูงมีกิจกรรมการสังเคราะห์แสงลดลง เหลือเพียงประมาณร้อยละ 55 และ 67 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับของเซลล์ที่เจริญในอาหารที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.017 M ผลความเข้มข้นเกลือที่สูงต่อการสังเคราะห์แสงพบใน *Spirulina* และไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ เช่นกัน โดยอัตราการสังเคราะห์ที่ลดลงอาจเป็นผลจากความเข้มข้นเกลือที่สูงขึ้นยับยั้งการกระบวนการถ่ายทอดอิเลคตรอน (electron transfer) ใน Photosystem II

เมื่อพิจารณาอัตราการหายใจ (Respiration activity) จากเซลล์ที่มีอายุอยู่ในช่วง logarithmic phase (day 4) และ stationary phase (day 7) ซึ่งวัดจากอัตราการใช้ O_2 โดยการวัดปริมาณ O_2 ที่ละลายน้ำในขณะที่ไม่ให้แสงสว่าง ดังตารางที่ 2 เมื่อพิจารณากิจกรรมของเซลล์ที่อยู่ในช่วง Logarithmic phase (day 4) พบว่าเซลล์ที่เจริญเติบโตในสภาวะเกลือที่ความเข้มข้นสูงกว่าปกติ มีอัตราการใช้ O_2 สูงกว่าเซลล์ที่เจริญเติบโตในสภาวะปกติและพบว่าอัตราการหายใจจะลดลงเมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วง Stationary phase (day 7) อย่างไรก็ตาม Molitor และคณะ (1990) พบว่า ในอัตราการหายใจของ *Anacystis nidulans* จะเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในอาหารที่มี 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)

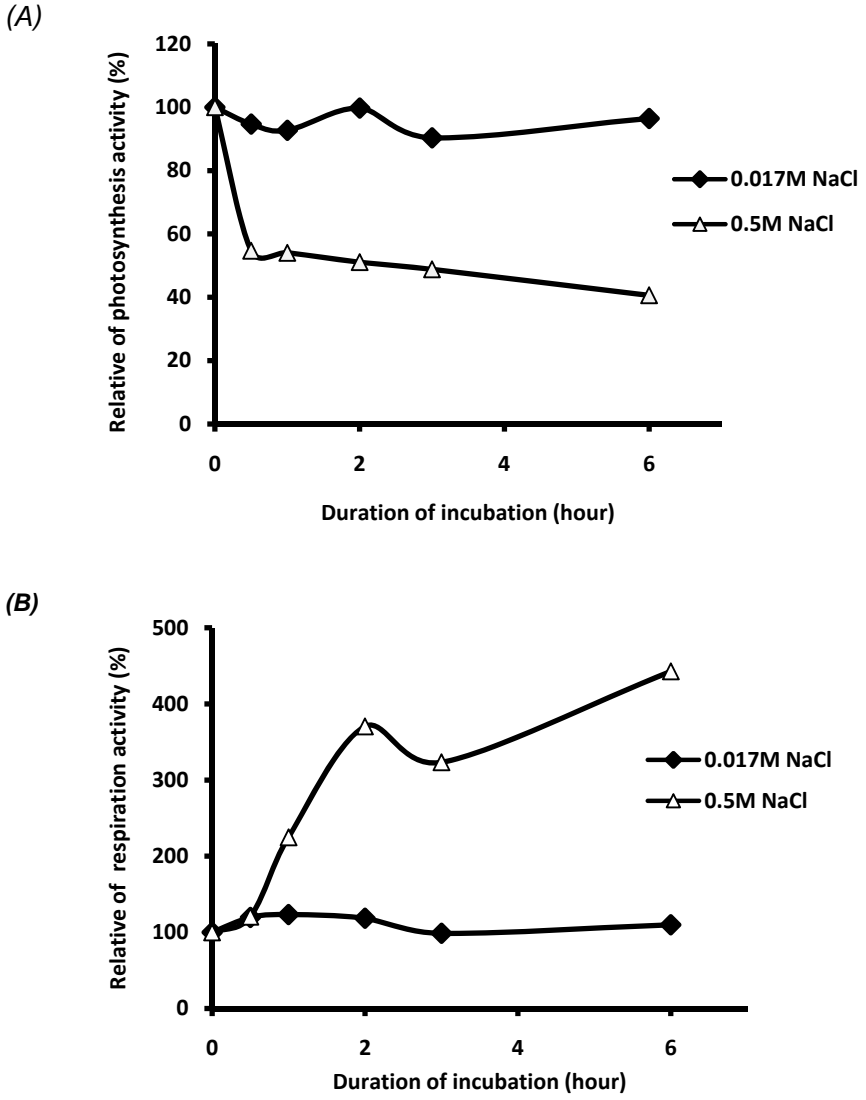
Time (day)	Photosynthesis activity ($\mu molO_2$ $mgChl\text{-}a^{-1}$ hr^{-1})		Respiration activity ($\mu molO_2$ uptake $mgChl\text{-}a^{-1}$ hr^{-1})	
	0.017M NaCl	0.5 M NaCl	0.017M NaCl	0.5 M NaCl
4	499 ± 55	277 ± 24	9 ± 5	53 ± 2
7	458 ± 52	307 ± 15	5 ± 4	25 ± 13

ผลของความเข้มข้นเกลือสูงอย่างฉับพลันต่ออัตราการสังเคราะห์แสงและการหายใจ

เนื่องจากการที่เซลล์เจริญเติบโตในสภาวะใด ๆ เป็นระยะเวลาหนึ่ง อาจทำให้เซลล์สามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาวะนั้น ๆ ได้ ดังนั้นการศึกษาต่อมาจึงมุ่งเน้นไปถึงการตอบสนองของเซลล์ *Spirulina* เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นเกลืออย่างเฉียบพลัน โดยการทดลองนี้กำหนดความหนาแน่นของเซลล์ให้ค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าความขุ่นของเซลล์ที่ OD_{560} ประมาณ 0.75 ± 0.05 (เซลล์อยู่ในช่วง logarithmic phase) จากนั้นทำการศึกษาโดยเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl อย่างฉับพลัน จาก 0.017 M ไปเป็น 0.5 M แล้วจึงเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์หาอัตราการสังเคราะห์แสง และการหายใจของเซลล์

จากการศึกษา พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นอย่างฉับพลันจาก 0.017 M ไปเป็น 0.5 M ส่งผลให้กิจกรรมการสังเคราะห์แสงของ *Spirulina* ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยเริ่มต้นเซลล์มีอัตราการสังเคราะห์แสงประมาณ 482 μmol O_2 mgChl-a^{-1} hr^{-1} และเมื่อเวลาผ่านไป 30 min กิจกรรมการสังเคราะห์แสงลดลงไปประมาณ 50% เมื่อเปรียบเทียบกับ *Spirulina* ที่ยังคงเจริญในอาหารปกติ และการเปลี่ยนแปลงนี้มีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 8A แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นเกลือที่สูงมีผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงของ *Spirulina* สายพันธุ์ C1 ลดลง เช่นเดียวกันกับที่พบในสายพันธุ์อื่น ๆ เช่น *Spirulina* สายพันธุ์ M2 (Vonshak และคณะ, 1996) และ *Spirulina* สายพันธุ์ Moyse (Sudhir และคณะ, 2005) จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาการลดลงของกิจกรรมการสังเคราะห์แสงของ *Spirulina* อาจเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบ PSII ลดลง (Lu และคณะ, 1999; Lu & Vonshak, 2002) ความเข้มข้นของ NaCl ที่สูงขึ้นส่งผลยับยั้งการกระตุ้นการส่งถ่ายพลังงานจากไฟโคไซยานินไปยัง PSII (Zhang และคณะ, 2010) และมีผลยับยั้งกิจกรรมของกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ตำแหน่ง reaction centers ในระบบ PSII ของ *Spirulina* (Lu และคณะ, 1999; Lu & Vonshak, 2002) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเนื่องมาจากโปรตีน D1 อยู่ที่ใน reaction centers มีปริมาณลดลง (Sudhir และคณะ, 2005) จากการศึกษาในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* พบว่าเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียดอันเนื่องมาจากเกลือร่วมกับแสง ส่งผลให้มีการยับยั้งการสร้างโปรตีนใหม่โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน D1 ของ PSII (Allakhverdiev และคณะ, 2002)

ในทางตรงกันข้ามความเข้มข้นเกลือที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้อัตราการหายใจของเซลล์เพิ่มขึ้น จากรูปที่ 8B พบว่า ภายใน 30 นาทีหลังจากเพิ่มความเข้มข้นเกลืออัตราการหายใจของเซลล์จะยังไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เจริญในอาหารปกติ แต่หลังจากนั้นอัตราการหายใจของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยอัตราการหายใจของเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 4-5 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เจริญในอาหารปกติ การลดลงของอัตราการสังเคราะห์แสง การเพิ่มอัตราการหายใจของไซยาโนแบคทีเรีย อาจเกี่ยวข้องกับความต้องการพลังงานเพิ่มเติมสำหรับส่งผ่าน Na ions ระหว่าง Na^+/H^+ antiporters ซึ่งมีอยู่ภายในเซลล์ (Inaba และคณะ, 2001) หรือผ่าน Na pump โดยตรงเช่นเดียวกับที่พบใน *Escherichia coli* (Steuber และคณะ, 2000)



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงอัตราการสังเคราะห์แสง (A) และการหายใจ (B) ของ *Spirulina* เมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นจาก 0.017 M ไปเป็น 0.5 M โดยอัตราการสังเคราะห์แสงที่เทียบเท่า 100% คือ 482±38 μmol O_2 mg Chl-a^{-1} hr^{-1} และอัตราการหายใจที่เทียบเท่า 100% คือ 18±9 μmol O_2 uptake.mg Chl-a^{-1} hr^{-1}

ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อองค์ประกอบของกรดไขมันใน *Spirulina*

Spirulina ประกอบด้วยกรดไขมัน 2 ชนิดคือ กรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) ซึ่งได้แก่ C16:0 และ C18:0 และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ซึ่งได้แก่ C16:1, C18:1 C18:2 และ C18:3 โดยเมื่อพิจารณาปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดจากเซลล์ (whole cell) ที่เจริญเติบโตในอาหาร Zarrouk's ปกติแล้ว พบว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะ logarithmic phase (day 4) มีปริมาณกรดไขมันชนิดอิ่มตัว คือ C16:0 ประมาณ 45.9% total fatty acid (TFA) และ C18:0 ประมาณ 0.8% TFA และมีปริมาณกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว คือ C16:1, C18:1, C18:2 และ C18:3 ในปริมาณเฉลี่ยที่ 4.4, 6.8, 22.5 และ19.5%TFA ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ stationary

phase (day 7) ปริมาณของ C16:0, 16:1, C18:0 และ C18:1 ค่อนข้างคงที่ ในขณะที่ปริมาณของ C18:3 ลดลงเหลือ 15.4% TFA ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของ C18:2 โดยมีค่า 26.3% TFA และเมื่อพิจารณาผลของเกลือความเข้มข้นสูงต่อองค์ประกอบของกรดไขมันพบว่า ปริมาณ C18:2 และ C18:3 ของเซลล์ที่อยู่ในระยะ logarithmic phase และ stationary phase ค่อนข้างคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย กล่าวคือ ในระยะ logarithmic phase เซลล์มีปริมาณ C18:2 และ C18:3 ที่ 22.5% และ 17.8% TFA ตามลำดับ และในระยะ stationary phase เซลล์มีปริมาณของ C18:2 และ C18:3 ที่ 22.8% และ 18.2% TFA ตามลำดับ ทั้งนี้การที่สัดส่วน (ปริมาณ) ของกรดไขมันของเซลล์ที่เจริญเติบโตในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูงมีค่าเปลี่ยนแปลงค่อนข้างต่ำอาจเนื่องมาจากเซลล์มีการปรับตัวให้ membrane มีคุณลักษณะที่เหมาะสมหรือใกล้เคียงกับสภาวะปกติเพื่อให้กระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหายใจดำเนินต่อไปและเมื่อพิจารณาการปรับตัวทางด้านชนิดของกรดไขมันโดยทั่วไปจะเห็นได้ว่า ในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูงเซลล์จะมีอัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัว (unsat/sat) จะสูงกว่าในสภาพปกติทั้งนี้เนื่องมาจากการสร้างไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้นจะทำให้เซลล์สามารถอยู่รอดได้

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 (whole cell) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl)

Day	NaCl concentration (M)	Fatty acid composition (% total fatty acid, TFA)						Ratio of unsat/sat
		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	
0	0.017	47.4±0.84	4.1±0.14	0.9±0.12	6.3±0.36	26.2±1.11	15.0±1.58	1.07±0.04
4	0.017	45.9±0.88	4.4±0.51	0.8±0.09	6.8±0.18	22.5±0.82	19.5±0.94	1.14±0.04
	0.5	44.5±1.19	4.8±0.70	1.3±0.29	9.1±2.54	22.5±1.03	17.8±4.25	1.20±0.09
7	0.017	46.3±0.97	4.2±0.29	0.9±0.06	7.0±0.12	26.3±1.05	15.4±1.66	1.12±0.04
	0.5	43.8±0.73	5.5±0.94	1.4±0.36	8.3±1.48	22.8±2.19	18.2±3.36	1.21±0.05

ผลของความเข้มข้นเกลือสูงต่อองค์ประกอบของกรดไขมันของลิปิดเมมเบรน ใน *Spirulina*

เนื่องจากลิปิดที่พบในไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งรวมทั้ง *Spirulina* ส่วนใหญ่อยู่ที่ membrane (Murata and Nishida,1987) การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันอาจส่งผลต่อหน้าที่ของ membrane ทั้ง TM และ PM ด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันของ TM และ PM ใน *Spirulina* ที่เจริญในอาหารที่ NaCl มีความเข้มข้น 0.017 M และ 0.5 M ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยเซลล์ที่เจริญในอาหารปกติ รูปแบบสัดส่วนการกระจายตัวของกรดไขมันแต่ละชนิดบน TM

เปรียบเทียบกับใน whole cell (ตารางที่ 3) จะมีความคล้ายคลึงกัน ในขณะที่รูปแบบสัดส่วนการกระจายตัวของกรดไขมันแต่ละชนิดบน PM มีความแตกต่างจาก whole cell และ TM คือมีปริมาณ C16:0 และ 18:0 สูงในขณะที่มีปริมาณ C16:1, 18:2 และ 18:3 ต่ำกว่าปริมาณที่พบใน whole cell และ TM และเห็นได้ชัดเจนว่า ปริมาณ C18:3 ใน PM จะต่ำ เมื่อพิจารณาอัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวที่พบใน membrane พบว่า อัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัว (unsat/sat) ที่พบใน TM สูงกว่าใน PM ประมาณ 1.5-2 เท่า นอกจากนี้องค์ประกอบของกรดไขมันใน TM และ PM มีการเปลี่ยนแปลงเมื่ออายุเซลล์เพิ่มขึ้น โดยที่ใน TM พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 7 วัน สัดส่วนของกรดไขมันกลุ่ม C18 มีการเปลี่ยนแปลง โดยสัดส่วนของ C18:3 ลดลงจาก 19.7 ไปเป็น 15.9 %TFA ในขณะที่มีการสะสม C18:2 เพิ่มขึ้นจาก 22.8 ไปเป็น 27.3 %TFA เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วัน เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของกรดไขมันใน PM พบว่าสัดส่วนของ C18:3 ลดลงเช่นกันเมื่อเลี้ยงเซลล์นาน 7 วัน รวมทั้งมีการสะสมกรดไขมัน C16:0 เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์มีอายุเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาผลของเกลือที่มีต่อปริมาณของกรดไขมันที่อยู่บน membrane แต่ละชนิด พบว่าเซลล์จะมีการสะสมปริมาณ C18:0 และ C18:1 สูงขึ้นทั้งบน TM และ PM ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยเฉพาะปริมาณการสะสมของ C18:0 ใน PM จะเพิ่มสูงขึ้นตามอายุของเซลล์ จากการศึกษานี้ยังพบอีกด้วยว่า ปริมาณ C18:3 ทั้งบน TM และ PM ของเซลล์เจริญที่ความเข้มข้นเกลือสูงมีสัดส่วนที่สูงกว่าของเซลล์ที่เจริญในอาหารปกติ โดยเซลล์เจริญที่ความเข้มข้นเกลือสูงเป็นเวลา 7 วันยังคงมีสัดส่วนของ C18:3 บน TM และ PM ในสัดส่วนที่สูงกว่าของเซลล์ที่เจริญในอาหารปกติ นอกจากนี้อัตราส่วนของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัว (unsat/sat) ใน PM ของเซลล์ที่เจริญเติบโตในอาหารที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.5 M สูงกว่าใน PM ของเซลล์ที่เจริญในอาหารปกติ

การที่สัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวใน membrane ของเซลล์ที่เจริญเติบโตในอาหารที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.5 M สูงกว่าเซลล์ที่เจริญในอาหารปกติ แสดงให้เห็นถึงบทบาทของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อความทนของเซลล์ที่ความเข้มข้นเกลือที่สูง จากการศึกษาใน *Synechocystis* PCC6803 แสดงให้เห็นว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวมีส่วนช่วยในปกป้องกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยเฉพาะในระบบที่ 2 ในสภาวะที่มีเกลือสูง (Allakverdiev และคณะ, 1999) นอกจากนี้การเปลี่ยน fluidity ของ membrane อาจช่วยกระตุ้นการทำงานของ Na^+/H^+ antiporter (Allakverdiev และคณะ, 1999; Allakverdiev and Murata, 2008) ด้วยเหตุนี้การที่มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสูงใน membrane ของ *Spirulina* ที่เจริญในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูง อาจมีส่วนช่วยให้ระบบการส่งถ่าย Na^+/H^+ ทำงานได้ดี จึงทำให้เซลล์พยายามรักษา fluidity ของ membrane ด้วยการสร้างกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ให้สูงขึ้นและจากการศึกษาใน *Spirulina platnesis* I22 สายพันธุ์กลาย (mutant) ที่สร้าง polyunsaturated fatty acid (c18:3) ได้ไม่ถึง 60% ของที่มีอยู่ในสายพันธุ์ดั้งเดิม (สายพันธุ์ C1) มี oxygen-evolving photosynthetic activity ต่ำกว่าในสายพันธุ์ C1 (wild type) ถึง 58% (Ruengjitchatchawalya และคณะ, 2002) polyunsaturated fatty acid มีบทบาทต่อการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้ใน

Synechocystis sp. PCC 6803 สายพันธุ์กลาย (mutant) ที่ไม่สามารถสร้าง polyunsaturated fatty acid ได้ พบว่า ในสภาวะมืดเซลล์ที่อยู่ในที่มี 0.5 M NaCl จะมีการสูญเสีย oxygen-evolving photosystem II activity ได้อย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับเซลล์ของสายพันธุ์ wild type (Allakverdiev และคณะ, 1999)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของกรดไขมันใน plasma และ thylakoid membranes ของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk's ปกติ (0.017 M NaCl) และอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (0.5 M NaCl)

Cell fraction	Day	NaCl concentration (M)	Fatty acid composition (% total fatty acid, TFA)						Ratio of unsat/sat
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	
Thylakoid membrane	0	0.017	46.0±0.95	4.6±0.57	1.6±0.87	7.3±1.53	22.3±2.75	18.1±1.86	1.10±0.01
	4	0.017	44.7±1.43	4.5±0.25	0.8±0.16	7.5±0.59	22.8±1.65	19.7±1.74	1.20±0.06
		0.5	44.3±1.09	4.8±0.74	2.3±1.38	9.9±1.62	20.5±2.68	18.1±2.85	1.14±0.05
	7	0.017	44.5±0.40	4.3±0.10	0.6±0.06	7.5±0.16	27.3±1.87	15.9±1.58	1.22±0.02
		0.5	43.9±0.68	4.9±0.08	3.9±1.12	10.0±0.71	20.2±0.41	17.0±1.39	1.09±0.08
Plasma membrane	0	0.017	52.2±1.79	1.8±3.4	8.0±3.47	5.4±0.94	16.7±2.32	14.3±2.57	0.66±0.05
	4	0.017	59.3±1.25	1.3±2.2	3.2±0.09	6.6±0.10	15.6±0.81	13.2±0.51	0.60±0.03
		0.5	49.4±1.58	1.6±3.7	4.2±2.09	9.1±1.13	18.2±4.26	15.4±1.88	0.87±0.12
	7	0.017	64.5±0.61	0.6±3.4	2.8±0.69	5.2±0.18	15.3±0.41	8.9±0.89	0.49±0
		0.5	49.5±6.70	6.7±3.6	14.9±6.59	7.3±0.27	13.3±0.84	11.6±0.97	0.55±0.01

หมายเหตุ – unsat = unsaturated fatty acid และ sat = saturated fatty acid

สรุปผลงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตอบสนองของ *Spirulina platensis* ต่อสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นเกลือสูง โดยพิจารณาถึงการเจริญเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ อัตราการสังเคราะห์แสงและอัตราการหายใจ และที่สำคัญคือ สัดส่วนขององค์ประกอบของกรดไขมันใน PM และ TM โดยเฉพาะ membrane ดังกล่าวมีบทบาทที่สำคัญในการักษาสภาพของเซลล์และเป็นบริเวณที่เกิดกิจกรรมการสังเคราะห์แสงและการหายใจ ในการศึกษานี้ได้เลือกใช้ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีรายละเอียดทางด้าน genome เกือบสมบูรณ์แล้ว (2010, BIOTEC, unpublished data) โดยผลวิจัยที่ได้ทางสรีรวิทยา (Physiology) นี้สามารถนำไปประมวลกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องได้ต่อไป

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ซึ่งทำให้ทราบได้ว่า *Spirulina* C1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์น้ำจืดสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่สูงกว่าความเข้มข้นมาตรฐานถึง 30 เท่านั้น แม้ว่าอัตราการเจริญเติบโตจะต่ำกว่าที่สภาวะปกติประมาณ 1.5 เท่า (เปรียบเทียบจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ) ซึ่งงานวิจัยนี้ยังพบว่าการที่เซลล์มีการเจริญเติบโตช้าเป็นผลมาจากสภาวะความเข้มข้นเกลือสูงไปยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์แสงและส่งเสริมการหายใจและเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งการที่สัดส่วนของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวในส่วนของ PM ที่เพิ่มสูงขึ้นในสภาวะความเข้มข้นเกลือสูงนั้นเป็นผลมาจากการที่เซลล์พยายามรักษาสภาพของเมมเบรน (membrane fluidity) โดยผ่านกระบวนการเติมพันธะคู่ (desaturation) เพื่อให้เซลล์สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ซึ่งผลที่ได้นี้อาจใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มปริมาณ GLA ในกรณีที่ต้องเพาะเลี้ยงในบริเวณแหล่งน้ำกร่อยหรือน้ำเค็ม

ผลงานที่ได้บางส่วนได้นำไปเผยแพร่ในรูปแบบ Poster เรื่อง Alteration of Membrane Fatty Acid Composition in Salt Adapted-Cyanobacterium; *Spirulina platensis* strain C1
ในงาน The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “TSB2010: Biotechnology for Healthy Living” October 20-22, 2010, Prince of Songkla University, Trang Campus, Trang Province, Thailand.

ปัญหาและอุปสรรค

งานเกิดการล่าช้าเนื่องจาก เครื่องมือในการวัด ออกซิเจนละลายน้ำรุ่น Chlorolab 2 (Hansatech) มีการชำรุดเสียหายต้องส่งซ่อมที่ประเทศอังกฤษผ่านบริษัทตัวแทนในประเทศไทย ซึ่งในขั้นตอนทั้งหมดนี้ใช้เวลามากกว่า 5 เดือน ดังนั้นจึงต้องเปลี่ยนเครื่องมือการวิเคราะห์โดยมีการประยุกต์อื่น ๆ ร่วมด้วยและต้องมีการสั่งซื้อ Oxygen electrode (YSI 5331A) จากประเทศสหรัฐอเมริกาผ่านบริษัทตัวแทนในประเทศไทย ซึ่งต้องใช้เวลาประมาณ 2 เดือน

บรรณานุกรม

Allakhverdiev, S.I. and Murata, M. (2008) Salt stress inhibits photosystem II and I in cyanobacteria. Photosynthesis Research. 98:529-539.

Allakhverdiev, S.I., Nishiyama, Y., Miyairi, S., Yamamoto, H., Inagaki, N., Kanesaki, Y. and Murata, N. (2002) Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem II by suppressing the transcription and translation of psbA genes in *Synechocystis*. 130:1443-1453.

Allakhverdiev, S.I., Nishiyama, Y., Suzuki, I., Tasaka, Y. and Murata, M. (1999) Genetic engineering of the unsaturation of fatty acids in membrane lipids alters the tolerance of Syhechocystis to salt stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96:5862-5867.

Bennet, J. and Bogorad, L. (1973) Complemetary chromatic adaptation in filamemtous blue-green alga. Journal of Cell Biology. 58:419-438.

Blumwald, E. and Tel-Or, E. (1982) Structural aspects of the adaptation of *Nostoc muscorum* to salt. Archives of Microbiology. 132:163-167.

Dhiab, R.B., Ouada, H.B., Boussetta, H., Franck, F., Elabed, A. and Brouers, M. (2007) Growth, fluorescence, photosynthetic O_2 production and pigment content of salt adapted cultures of *Atthrospira (Spirulina) platensis*. Journal of Applied Phycology. 19:293-301.

Erdmann, N., Fulda, S. and Hagemann, M. (1992) Glucosylglycerol accumulation during salt acclimation of two unicellular cyanobacteria. Journal of General Microbiology. 138:363–368.

Gabbay-Azaria, R., Shonfeld, M., Messinger, R. and Tel-Or, E. (1992) Respiratory activity in the marine cyanobacterium *Spirulina subsalsa* and its role in salt tolerance. Archives of Microbiology. 157:183-190.

Hagemann, M. and Erdmann, N. (1997) Environmental stress, in Cyanobacterial Nitrogen Metabolism and Environmental Biotechnology. Rai, A.K., ed. Norasa Publishing house. New delhi. 183-189.

Hagemann, M., Erdmann, N. and Wittenburg, E. (1987) Synthesis of glucosylglycerol in salt-stressed cells of the cyanobacterium *Microcystis firma*. Archives of Microbiology. 148:275–279.

Hagemann, M., Wölfel, L. and Krüger, B. (1990) Alterations of protein synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 after a salt shock. Journal of General Microbiology. 136:1393-1399.

Hsiao, T.C. (1973) Plant responses to water stress. Annual Review of Plant Physiology. 24:519-570.

Huflejt, M.E., Tremolieres, A., Pineau, B., Laun, J.K., Hatheway, J. and Packer, L. (1990) Changes in membrane lipid composition during saline growth of the freshwater cyanobacterium *Synechococcus* 6311. Plant Physiology. 94:1512-1521.

Inaba, M., Sakamoto, A. and Murata, N. (2001) Functional expression in *Escherichia coli* of low-affinity and high-affinity Na+(Li+)/H+ antiporters of *Synechocystis*. Journal of Bacteriology. 183:1376-1384.

Khomutov, G., Fry, I.V., Huflejt, M.E. and Packer, L. (1990) Membrane lipid composition, fluidity, and surface charge changes in response to growth of the freshwater cyanobacteium *Synechococcus* 6311 under high salinity. Archives of Biochemistry and Biophysics. 277:263-267.

Lapage, G. and Roy, C.C. (1984) Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. Journal of Lipid Research. 25:1391-1396.

Lu, C. and Vonshak, A. (2002) Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. Plant Physiology. 114:405-413.

Lu, C. Torzilo, G., Vonshak, A. (1999) Kinetic response of photosystem II photochemistry in cyanobacterium *Spirulina platensis* to high salinity in characterized by two distinct phases. Australian Journal of Plant Physiology. 26:283-292.

Mackay M.A., Horton R.S., Borowitzka L.J. (1984) Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria. Journal of General Microbiology. 130:2177-2191.

Molitor, V., Trnka, M., Erber, W., Steffan, I., Riviere, M.E., Arrio, B., Springer-Lederer, H. and Peschek, G.A. (1990) Impact of salt adaptation on esterified fatty acids and cytochrome oxidase in plasma and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Ancystis nidulans*. Archives of Microbiology. 154:112-119.

Murata, N. and Nishida, I. (1987) Lipids of blue-green algae (cyanobacteria), in Lipid: Structure and Function. The Biochemitry of Plants. Stumpf, Florida, P.K., ed. Academic Press. 315-347.

Murata, N. and Omata, T. (1988) Isolation of cyanobacterial plasma membranes. Methods Enzymol. 167:245-251.

Pulz, O., Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology. 65(6):635-48.

Reed, R.H., Borowitzka, L.J., Mackay, M.A., Chudek, J.A., Foster, R., Warr, S.R.C., Moore, D.J., Stewart, W.D.P. (1986) Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. FEMS Microbiology Reviews. 39:51–56.

Richmond, A. (1986) Microalgae of economic potential, in Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond, A., ed. CRC Press Inc. Boca Raton. 199-244.

Ritter, D. and Yopp, J.H. (1993) Plasma membrane lipid composition of the halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. Archives of Microbiology. 159:435-439.

Ruengjitchatchawalya, M., Chirasuwan, N., Chaiklahan, R., Bunnag, B., Deshnium, P. and Tanticharoen, M. (2002) Photosynthetic characteristic of a mutant *Spirulina platensis*. Journal of Applied Phycology. 14:71-76.

Santos, C. (2004) Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. Scientia Horticulturae. 103:93-99.

Steuber, J., Schmid, C., Ru¢bach, M. and Dimroth, P. (2000) Na translocation by complex I (NADH:quinone oxidoreductase) of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology. 35:428-434.

Stobart, A.K., Griffiths, W.T., Ameen-Bukhari, I., Sherwood, R.P. (1985) The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. Physiologia Plantarum . 63:293–298.

Sudhir, P.R., Pogoryelov, D., Kovacs, L., Garab, G., Murthy, S.D. (2005) The effects of salt stress on photosynthetic electron transport and thylakoid membrane proteins in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 38:481-485.

Takagi, M., Karseno, Yoshida, T. (2006) Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae Dunaliella cells. Journal of Bioscience and Bioengineering. 101(3):223-226.

Vonshak, A. and Richmond, A. (1981) Photosynthetic and respiratory activity in *Anacystis nidulans* adapted to osmotic stress. Plant Physiology. 68:504-505.

Vonshak, A. and Richmond, A. (1988) Mass production of the bluegreen alga Spirulina: an overview. Biomass. 15:233–247.

Vonshak, A., (1986) Laboratory techniques for the cultivation of microalgae, in Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond, A. ed. CRC Press Inc. Boca Raton.117-146.

Vonshak, A., Guy, R. and Guy, M. (1988) The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. Archives of Microbiology. 150:417–420.

Vonshak, A., Kancharaksa, N., Bunnag, B. and Tanticharoen, M. (1996) Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress. Journal of Applied Phycology. 8:119–124.

Zarrouk, C. (1966) Contribution a 1' 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.

Zhang, T., Gong, H., Wen, X. and Lu, C. (2010) Salt stress induces a decrease in excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but an increase to photosystem I in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. Journal of Plant Physiology. 167:951-958.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)	**นางสาว วิภาวรรณ เสียงดัง**
(ภาษาอังกฤษ)	Miss Wipawan Siangdung
ตำแหน่งปัจจุบัน	นักวิจัย
หน่วยงานที่สังกัด	สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน 49 ซอยเทียนทะเล 25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์	0 2470 7486
โทรสาร	0 2452 3455
e-mail	wipawan@pdti.kmutt.ac.th หรือ wipawan.sia@kmutt.ac.th
สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ	*Spirulina* mass cultivation, Lipid analysis, Physiology of microalgae

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา	สาขาเอก	ชื่อสถาบัน
2531	ปริญญาตรี	วทบ.	เกษตรศาสตร์-พืชไร่นา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2535	ปริญญาโท	วทม.	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
2548	ปริญญาเอก	Ph.D.	Plant Physiology	University of Kentucky, USA

ผลงานวิจัยที่เผยแพร่

Cohen Z, Reungjitchachawali M, Siangdung W, Tanticharoen M, Heimer Y-M (1993) Herbicide-resistant lines of microalgae: Growth and fatty acid composition. Phytochemistry 34: 973-978

Cohen, Z., Ruengjitchatchawalya, M., Siangdung, W., and Tanticharoen, M. (1993) Production and partial purification of μ-linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*. J. Appl. Phycol. 5: 109-115.

Siangdung, W., Tanticharoen, M. and Bunnag, B. (1993) Effect of Sandoz 9785 on Gamma linolenic acid in *Spirulina* Z 19/2. Proceeding of the Algal Biotechnology in the Asia Pacific Region, Phang, S.M. et.al. (eds), University of Malaya.

Siangdung, W., Tanticharoen, M., and Bunnag, B. (1993) Selection of *Spirulina platensis* strains resisted to Sandoz 9785 for a high-gamma linolenic acid producer. Sixth International Conference on Applied Algology, Progress in Biotechnology of Photoautotrophic Microorganisms, Ceske Budejovice. Czech Republic. Sept.6-1, 1993.

Siangdung, W., Tanticharoen, M. and Bunnag, B. (1993) Effect of Sandoz 9785 on growth, photosynthesis and fatty acid composition in *Spirulina platensis*. Sixth International Conference on Applied Algology, Progress in Biotechnology of Photoautotrophic Microorganisms, Ceske Budejovice. Czech Republic. Sept.6-1, 1993.

Siangdung, W., Chanawongse, L., Bunnag, B. and Tanticharoen, M. (1994) Selection of *Spirulina* strains for a higher biomass productivity under outdoor cultivation. Second Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology, Trends and Opportunities, April 25-27, Singapore.

Siangdung, W., Chanawongse, L., Bunnag, B. and Tanticharoen, M. (1994) Selection of *Spirulina* strains for a higher biomass productivity under outdoor cultivation. Second Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology, Trends and Opportunities, April 25-27, 1994 Singapore

Siangdung, W., Tanticharoen, M. and Bunnag, B. (1994) Optimization of phycocyanin and GLA production in *Spirulina platensis*" การประชุมครั้งที่ 6 ของสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย เรื่อง Biotechnology for Economy and pollution control, October 12-15. จ.ขอนแก่น:

Siangdung, W., Bunnag, B. and Tanticharoen, M. (1995) International Conference on Biotechnology Research and Application for Sustainable Development (BRASD), August 7-10, Bangkok, Thailand

Siangdung, W., Bunnag, B. and Tanticharoen, M. (1996) Effect of Temperature and NAD on *12 desaturase of Spirulina platensis. Paper presented at the 1st European Phycological Congress. August 11-18, 1996. Cologne Germany.

Paithoonrangsarid, K., Siangdung, W., Bunnag, B. and Tanticharoen, M. (1997) Effect of Temperature on Fatty Acid Composition of Plasma and Thylakoid Membranes in *Spirulina*

platensis. Paper presented at the 2nd Asia-Pacific marine Biotechnology Conference and 3rd Asia-Pacific Conference Algal Biotechnology, May 7-10. Phuket, Thailand.

Bunnag, B., Musikgearanant, R., Siangdung, W. and Tanticharoen, M. (1997) Productivity of *Spirulina* strains under outdoor conditions. Paper presented at the 3rd Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology, May 7-10. Phuket, Thailand.

Siangdung, W., Fugushike, H.and Hildebrand, D. (2002). Efficient leaf aldehyde production. The 93th AOCS Annual Meeting & Expo, May 5-8, Montréal, Québec,Canada.

Siangdung, W., Fugushike, H. and Hildebrand, D. (2003). Hydroperoxide lyase and leaf aldehyde formation can be greatly increased in leaves. In Murata, N. et al. (eds), Advanced Research on Plant Lipids, The 15th International Symposium on Plant Lipids. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/ Boston/ London: 299-302.

Siangdung, W., Fugushike, H.and Hildebrand, D. (2004). Efficient leaf aldehyde production", The 2nd Annual Kentucky Innovation and Enterprise Conference, March 3, Louisville, Kentucky, USA

Siangdung, W., Fugushike, H.and Hildebrand, D. (2004). Expression of different hydroperoxide lyase genes in *E. coli*. The 95th AOCS Annual Meeting & Expo, May 9-12, Cincinnati, OH, USA.

Fukushige, H., Siangdung, W. and Hildebrand, D. (2005). Watermelon (Citrullus lanatus) hydroperoxide lyase greatly increases C6 aldehyde formation in transgenic leaves. The Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists: Plant Biology, July 16-20, Seattle, Washington, USA

Sintupisut, N., Ruengjitchatchawalya, M., Ruenglertpanyakul, W., Siangdung, W. and Nukoolkit, C. (2007) Development of similarity indices for cyanobacteria. The 3rd National Conference on Algae and Plankton, March 21-23, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Siangdung, W., Chaiklanhan, R., Chirasuwan, N., Paithoonransarit, K., Ruengjitchatchawalya, M. and Boosya, B. (2007) Selection of *Spirulina* strains for biomass production based on

seasonal preference. Paper presented at the 19th Thailand Biotechnology Society , October 9-12, 2007 , Thammarsart Univeristy, Pathumthani, Thailand

Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Siangdung, W. and Bunnag, B. 2007 "Growth and fatty acid composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* C1 in relative to photoperiodicity and light intensity." Poster presentation at the 2nd Asian Symposium on Plant Lipids, November 30-December 2, 2007, Tokyo, Japan.

Somchartgraingai, S., Bunnag, B. and Siangdung, W. (2008) Characterization of the growth and fatty acid composition of the diatom, *Thalassiosira sp*., Thailand strain BIMS-PP0014, and commercial specie, strain C. The 4th Naresuan Environment, May 26-27, Naraesuan University, Payoa, Thailand

Wahyu Handayani, Lestari, M., Paithoonrangsarid, K., Ruengjitchatchawalya, M. Bunnag, B., Kittiratanapaiboon, K. and Siangdung, W. (2009) Response of lipid class pattern in *Spirulina platnesis* strain C1 to salinity stress. Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON), January 13-16 , Naraesuan University, Phitsanulok, Thailand

Handayani, M.L.W., W. Siangdung, K. Paithoonrangsarid, B. Bunnag, M. Ruengjitchatchawalya and K. Kittiratarina, 2009 "Lipid characteristics of high salt-adapted *Spirulina platensis* strain C" poster presentation at 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.

Chaiklahan,R., Chirasuwan, N., Siangdung, W.,Paithoonrangsarid, K.,Bunnag, B. (2010) Cultivation of *Spirulina platensis* using pig wastewater in a semi-continuous process, Journal of Microbiology and Biotechnology 20: 609-614

Kiatmetha P., W. Siangdung, B. Bunnag, S. Senapin and B. Withyachumnarnkul, 2010, Enhancement of survival and metamorphisis rates of *Penaeus monodon* larvae by feeding with the diatom *Thalassiosira weissflogii*. Aquaculture International. DOI 10.1007/s10499-010-9375-7.

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)	**นางสาว กัลยาณี ไพฑูรย์รังสฤษดิ์**
(ภาษาอังกฤษ)	Miss Kalyanee Paithoonrangsarid
ตำแหน่งปัจจุบัน	นักวิจัย
หน่วยงานที่สังกัด	หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาวิศวกรรมชีวเคมี และโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน 49 ซอยเทียนทะเล 25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์	0 2470 7482
โทรสาร	0 2452 3455
e-mail	okalarid@kmutt.ac.th และ okalarid@biotec.or.th

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ *Spirulina* mass cultivation, Lipid analysis, Gene regulation in Cyanobacteria และ DNA microarray

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา	สาขาเอก	ชื่อสถาบัน
2536	ปริญญาตรี	วทบ.	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2541	ปริญญาโท	วทม.	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
2548	ปริญญาเอก	Ph.D.	Molecular Biomechanics	The Graduate University for Advanced Studies

อบรมสัมมนาภายในและภายนอกประเทศ

1997 (4 months) Short course training on “Physiology of fatty acid desaturation in Cyanobacteria”, Microalgal Biotechnology Laboratory, Jacob Blastein Institute for Desert Research, Ben-Gurion University of Negev, Sede-Boqer Campus, Israel.

2002 (1 month) Cooperative Researcher, the National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่

Deshnium, P., Paithoonrangsarid, K., Suphatrakul, A., Meesapyodsuk, D., Tanticharoen, M., and Cheevadhanarak, S. (2000) Temperature-independent and -dependent expression of desaturase genes in filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* strain C1 (Arthrospira sp. PCC 9438). FEMS Microbiology Letters 184: 207-213.

Hongsthong, A., Deshnium, P., Paithoonrangsarid, K., Cheevadhanarak, S. and Tanticharoen, M. (2003) Differential responses of three acyl-lipid desaturases to immediate temperature reduction occurring in two lipid membranes of Spirulina platensis strain C1. Journal of Bioscience and Bioengineering 96: 519-524.

Hongsthong, A., Paithoonrangsarid, K., Prapugrangkul, P., Deshnium, P.; Sirijuntarut, M.; Subhudhi; S., Cheevadhanarak, S. and Tanticharoen, M. (2004) The expression of three desaturase genes of Spirulina platensis in Escherichia coli DH5 – Heterologous expression of *Spirulina*-desaturase genes. Molecular Biology Reports 31: 177-189.

Paithoonrangsarid, K., Shoumskaya, M.A., Kanesaki, Y., Satoh, S., Tabata, S., Los, D.A., Zinchenko, V.V., Hayashi, H., Tanticharoen, M., Suzuki, I. and Murata, N. (2005) Five histidine kinases perceive osmotic stress and regulate distinct sets of genes *Synechocystis*. The Journal of Biological Chemistry 279: 53078-53086.

Shoumskaya, M. A., Paithoonrangsarid, K., Kanesaki, Y., Los, D. A., Zinchenko, V. V., Tanticharoen, M., Suzuki, I., Murata, N. (2005). Identical Hik-Rre Systems Are Involved in Perception and Transduction of Salt Signals and Hyperosmotic Signals but Regulate the Expression of Individual Genes to Different Extents in *Synechocystis.* The Journal of Biological Chemistry 280: 21531-21538.

Kanesaki, Y., Yamamoto, H., Paithoonrangsarid, K., Shoumskaya, M. A., Suzuki, I, Hayashi, H. and Murata, N. (2007) Histidine kinases play important roles in the perception and signal transduction of hydrogen peroxide in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803, The Plant Journal 49:313-324.

Chaiklahan,R., Chirasuwan, N., Siangdung, W., Paithoonrangsarid, K., Bunnag, B. (2010) Cultivation of *Spirulina platensis* using pig wastewater in a semi-continuous process, Journal of Microbiology and Biotechnology 20: 609-614

ที่ปรึกษาโครงการ

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)	นางบุษยา บุนนาค
(ภาษาอังกฤษ)	Mrs. Boosya Bunnag
ตำแหน่งปัจจุบัน	ผู้อำนวยการสถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
ตำแหน่งทางวิชาการ	รองศาสตราจารย์
หน่วยงานที่สังกัด	สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน 49 ซอยเทียนทะเล 25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์	0 2470 7355
โทรสาร	0 2452 3455
e-mail	boosya.bun@kmutt.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา	สาขาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2520	ปริญญาตรี	วทบ.	Microbiology	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2523	ปริญญาโท	M.Sc.	Food Science & Technology	Texas A&M University	สหรัฐอเมริกา

ผลงานวิจัย/ผลงานวิชาการ

บทความวิชาการระดับนานาชาติ

1. Tanticharoen, M., **Bunnag, B.** and Vonshak, A. (1993) Cultivation of *Spirulina* using secondary treated starch wastewater. Australasian Biotech. 3:223-226.
2. Soponronnarit, S., Nuimeem, M. and **Bunnag, B.** (1993) Maintaining qualities, minimizing time and energy consumption in pineapple glace drying. RERIC International Energy Journal, Vol.15, No. 1, 33-48

3.Chanawongse, L., Lee, Y.K., **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (1994) Productivity of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. J. appli. Phycology 6:295-300.

4.Tanticharoen, M., Ruengjitchatchawalya, M., **Bunnag, B.**, Vongktaveesuk, P., Vonshak, A. and Cohen, Z. (1994) Optimization of γ-linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis*. J. Appl. Phycol. 6:295-300.

5.Vonshak, A., Chanawongse, L., **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (1995) Physiological characterization of *Spirulina platensis* isolates : Response to light and salinity. Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 14:161-166

6.Vonshak, A., Kancharaksa, N., **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (1996) Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress. J. Appl. Phycol. 8:119-124.

7.Vonshak, A., Chanawongse, L. **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (1996) Light acclimation and photoinhibition in three *Spirulina platensis* (cyanobacteria) isolates. J. Appl. Phycol. 8; 35-40.

8.Ruengjitchatchawalya, M., Chirasuwan, N., Chaiklahan, R., **Bunnag, B.**, Deshnium, P. and Tanticharoen, M. (2002) "Photosynthetic characteristics of a mutant of *Spirulina plantensis*." *J. Appl. Phycol.* 14:71-76

9. Hongsthong, A., Sirijuntarut, M., Prommeenate, P., Thammathorn, S., **Bunnag, B.**, Cheevadhanarak, S. and Tanticharoen, M. 2007 "Revealing differentially expressed proteins in two morphological forms of *Spirulina platensis* by proteomic analysis" Molecular Biotechnology 36 (2):123-130.

10. Raungsomboon, S., Chidthaisong, A., **Bunnag, B.**, Inthorn, D., and Harvey, NW., 2008 "Removal of lead (Pb2+) by the Cyanobacterium Gloeocapsa sp" *Bioresource Technol*,99 (13), September, pp. 5650-5568.

11. Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V. and **Bunnag, B.**, 2008 "Lipid and fatty acids extraction from the cyanobacterium *Spirulina*" *ScienceAsia* 34: 299-305.

12. Chirasuwan N., Chaiklahan R., Kittakoop P., Chanasattru W., Ruengjitchatchawalya M., Tanticharoen M. and **Bunnag B.**, 2009 "Anti HSV-1 activity of sulphoquinovosyl diacylglycerol isolated from *Spirulina platensis*" *ScienceAsia* 35 (2): 137-141.

13. Chaiklahan R., Chirasuwan N., Siangdung W., Paithoonrangsarid K. and **Bunnag B.**, 2010 “Cultivation of *Spirulina platensis* using pig wastewater in a semi-continuous process” *J. Microbiol. Biotechnol,* 20(3), 609-614.

บทความวิชาการระดับชาติ

1. Khunsook, J., Ruengjitchatchawalya, M., Chaiklahan R., Hongsthong, A., **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (2004) “Effect of berberine on fatty acid composition in plasma and thylakoid membrane in *Spirulina* sp.” Journal of Scientific Research Chulalongkorn University (section T), April, 279-286.
2. Chaiklahan, R., Khonsarn, N., Chirasuwan, N., Ruengjitchatchawalya, M. **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (2007) “Response of *Spirulina platensis* C1 to High Temperature and High Light Intensity” *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 41:123-127.
3. Chirasuwan, N., Chaiklahan, R., Ruengjitchatchawalya, M., **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (2007) “Anti HSV-1 Activity of *Spirulina platensis* Polysaccharide” *Kasetsart J.* (Nat. Sci.) 41(2): 311-318.

หนังสือ

1. สาหร่ายสไปรูลิน่า (อาร์โธรสไปร่า) 2550 ISBN 978-974-456-680-5; 51 หน้า ผู้เรียบเรียง รัตนา ชัยกล้าหาญ, ณัฐยาภรณ์ ชิระสุวรรณ และ รศ.บุษยา บุนนาค
2. Hongsthong A.* and B. Bunnag, Overview of *Spirulina:* Biotechnological, Biochemical and Molecular Biological Aspects, Chapter in: Handbook on Cyanobacteria Biochemistry, Biotechnology and Applications, Nova Science Publishers Inc., New York, USA. (A chapter in a text book on cyanobacteria on invitation)

อนุสิทธิบัตร

ชื่อผลงาน: กรรมวิธีการผลิตไฟโคไซยานินเกรดอาหารและเครื่องสำอาง

ผู้ประดิษฐ์: นายวีระโลหะ, นางบุษยา บุนนาค, นส. รัตนา ชัยกล้าหาญ*, นส. ณัฐยาภรณ์ ชิระสุวรรณ

ยื่นจดในประเทศไทย เมื่อ 19 มกราคม 2553

การประชุมวิชาการ

1. Siangdung, W., Tanticharoen, M. and **Bunnag, B.** (1993) Effect of Sandoz 9785 on Gamma linolenic acid in *Spirulina* Z 19/2. Proceeding of the Algal Biotechnology in the Asia Pacific Region, Phang, S.M. et.al. (eds), University of Malaya.

2. Siangdung, W., Tanticharoen, M. and **Bunnag, B.** (1993) Effect of Sandoz 9785 on growth, photosynthesis and fatty acid composition in *Spirulina platensis.* Sixth International Conference on Applied Algology, Progress in Biotechnology of Photoautotrophic Microorganisms, Ceske Budejovice. Czech Republic. Sept.6-1, 1993.
3. Siangdung, W., Chanawongse, L., **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (1994) Selection of *Spirulina* strains for a higher biomass productivity under outdoor cultivation. Second Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology, Trends and Opportunities, April 25-27, 1994 Singapore.
4. Amornmongkol, M., Tonglek, S., **Bunnag, B.**, Tanticharoen, M. and Bhumiratana, S. (1996) A Mathematical model for *Spirulina platensis* production in tubular photobioreactor. Poster presentation 1st European Phycological Congress, Cologne, August 11-18, 1996.
5. Siangdung, W., **Bunnag, B**. and Tanticharoen, M. (1996) Effect of Temperature and NAD on Δ12 desaturase of *Spirulina platensis*. Paper presented at the 1st European Phycological Congress. August 11-18, 1996. Cologne Germany.
6. Pansoomboon, P., Catawatcharakul, N., Ruengjitchatchawalya, M., **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (1996) Hydrogen production from pineapple peel juice by photosynthetic bacteria. The 22nd Congress on Science and Technology of Thailand. October 16-18, 1996, Bangkok, Thailand.
7. Pansoomboon, P., Catawatcharakul, N., Ruengjitchatchawalya, M., **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (1997) Effect of nitrogen source on hydrogen evolution by *Rhodopseudomonas sphaeroides* 3701. The 23th Congress on Science and Technology of Thailand. 20-22 October, Chiangmai, Thailand.
8. Thonglek, S., **Bunnag, B.**, Tanticharoen, M. and Bhumiratana, S. (1997) The Effect of flashing light on productivity of *Spirulina platensis.* The Second Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC'97) and the Third Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology (APCAB'97), Arcadia Hotel and Resort, Phuket, may 7-11.
9. Paithoonrangsarid, K., Siangdung, W., **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (1997) Effect of Temperature on Fatty Acid Composition of Plasma and Thylakoid Membranes in *Spirulina platensis.* Paper presented at the 2nd Asia-Pacific marine Biotechnology Conference and 3rd Asia-Pacific Conference Algal Biotechnology, May 7-10, 1997, Phuket Arcadia Hotel & Resort, Karon Beach, Phuket, Thailand.

10. **Bunnag, B.**, Musikgearanant, R., Siangdung, W. and Tanticharoen, M. (1997) Productivity of *Spirulina* strains under outdoor conditions. Paper presented at the 3rd Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology, May 7-10, 1997. Phuket, Thailand.
11. Chaiklahan, R., Ruengjitchatchawalya, M., **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (1997) Mutagenesis and Isolation of PUFA Producing Mutant of a Cyanobacterium, *Spirulina platensis*. Paper presented at the 2nd Asia-Pacific marine Biotechnology Conference and 3rd Asia-Pacific Conference Algal Biotechnology, May 7-10, 1997, Phuket Arcadia Hotel & Resort, Karon Beach, Phuket, Thailand.
12. พุทธชาติ แผนสมบุญ, นิรมล คทาวัชรกุล, มารศรี เรืองจิตชัชวาลย์, **บุษยา บุนนาค** และ มรกต ตันติเจริญ (2540) ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดย *Rhodopseudomonas sphaeroides* 3701. โปสเตอร์เสนอใน “การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 23” เชียงใหม่, ประเทศไทย.
13. Chaiklahan, R., Ruengjitchatchawalya, M., Chirasuwan, N., **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (1998) *Spirulina plantensis* strain I22, a cyanobacterium mutant defective in fatty acid desaturation and photosynthesis process. The 10th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, “Biotechnology for a self-sufficient economy”, 25-27 November, Bangkok, Thailand.
14. Chirasuwan, N., Ruengjitchatchawalya, M., Chaiklahan, R., Deshnium, P., **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (1999) Characterization of *Spirulina plantensis* mutant defective in photosynthesis. The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conferences 1999 and The 11th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, “New Era of Biochemical Engineering and Biotechnology”, 15-18 November, Phuket, Thailand.
15. สุดารัตน์ ตรีเพชรกุล, **บุษยา บุนนาค** และ ทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล “ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนจุลินทรีย์กับการเปลี่ยนแปลงในระดับเค็มของดินในพื้นที่อำเภอบรบือ” บทความเสนอในที่ประชุมเชิงวิชาการ เรื่อง การวิจัยและพัฒนาพื้นที่ดินเค็มบริเวณอ่างเก็บน้ำหนองบ่อ, ณ ห้องประชุมโครงการส่งน้ำและบำรุงรักษาลุ่มน้ำเสียวใหญ่ อ.บรบือ จ.มหาสารคาม, 21 มกราคม 2543
16. Chirasuwan, N., Ruengjitchatch walya, M., **Bunnag, B.**, Deshnium, P. and Tanticharoen, M. (2000) Photosynthetic characterization of a mutant of *Spirulina platehsis*. The 4th Asia-pacific Conference on Algal Biotechnology, 3-6 July 2000, Hong Kong.
17. Choothai, R., **Bunnag,B.** Hongsthong, A., Cheevadhanarak, S., Ruengjitchawalaya, M. and Tanticharoen, M. (2000) Response of *Spirulina platensis* to High Temperature. Poster

presentation at the 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, November 1-3, 2000. Kanchanaburi, Thailand.

18. พรพิมล ศรีทองคำ **บุษยา บุนนาค** มรกต ตันติเจริญ และกฤษณพงศ์ กีรติกร "Modifiled Electrode for The Detection of Glutamate" เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ NECTEC ประจำปี 2543 ผลงานวิจัยที่ดำเนินการและสนับสนุนโดย NECTEC
19. Chaiklahan R., Chirasuwan N., Ruengjitchatchawalya, M. and **Bunnag, B**. (2004) "Effect of High Light Intensity on Photosynthesis and Composition of *Spirulina platensis*" The 16th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, 12-15 December, Phitsanulok, Thailand.
20. Chirasuwan N., Chaiklahan R., Ruengjitchatchawalya, M. , **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. (2004) "Anti HSV-1 activity of the hot water extract of *Spirulina platensis*" The 16th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, 12-15 December, Phitsanulok, Thailand.
21. Chaiklahan, R., Khonsarn, N., Chirasuwan, N., Ruengjitchatchawalya, M. **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. 2005 "Response of *Spirulina platensis* C1 to High Temperature and High Light Intensity" Oral presentation at the 2nd National conference on Algae and Plankton, March 23rd -25th , Chiang Mai, Thailand.
22. Chirasuwan, N., Chaiklahan, R., Ruengjitchatchawalya, M., **Bunnag, B.** and Tanticharoen, M. 2005 "Anti HSV-1 Activity of *Spirulina platensis* Polysaccharide" Oral presentation at the 2nd National conference on Algae and Plankton, March 23rd -25th , Chiang Mai, Thailand.
23. Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V. and **Bunnag, B**. 2006 "Effect of Extraction Temperature on Total Fatty Acid from *Spirulina*" The 6th Asia-pacific Conference on Algal Biotechnology, October 12-15, Makati City, Philippines.
24. Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V. and **Bunnag, B**. 2006"Optimum Conditions for Lipid Extraction from *Spirulina platensis*" The 17th International Symposium on Plant lipids, July 16-21, East Lansing, Michigan, USA.
25. Chirasuwan, N., **Bunnag, B.**, Chaiklahan, R., Chanasattru, W., Ruengjitchatchawalya, M., Kittakoop, P. and Tanticharoen, M. 2006 "Inhibition of HSV-1 by Lipid Extract of *Spirulina platensis*" The 17th International Symposium on Plant lipids, July 16-21, East Lansing, Michigan, USA.

26. Siangdung, W., Chaiklanhan, R., Chirasuwan, N., Paithoonransarit, K., Ruengjitchatchawalya, M. and **Bunnag, B.** (2007) Selection of *Spirulina* strains for biomass production based on seasonal preference. Paper presented at the 19th Thailand Biotechnology Society , October 9-12, 2007 , Thammarsart Univeristy, Pathumthani, Thailand.
27. Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Siangdung, W. and **Bunnag, B.** 2007 "Growth and fatty acid composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* C1 in relative to photoperiodicity and light intensity." Poster presentation at the 2nd Asian Symposium on Plant Lipids, November 30-December 2, 2007, Tokyo, Japan.
28. Somchartgraingai, S., Bunnag, B. and Siangdung, W. 2008. Characterization of the growth and fatty acid composition of the diatom, *Thalassiosira spp*., isolated tropical strain BIM-PP0014, and commercial strain (C). The proceedings of 4th Naresuan Environmental Annual Conference. Naresuan University, Phayao. 447:457
29. Chaiklahan R., Chirasuwan N. and **Bunnag B.**, 2009 "Bioactive compounds from *Spirulina platensis*" poster presentation at 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.
30. Chirasuwan N., Chaiklahan R., Kittakoop P., Chanasattru W., Ruengjitchatchawalya M., Tanticharoen M. and **Bunnag B.**, 2009 "Anti Herpes Simplex Virus Type 1 Activity of Sulfoquinovosyl Diacylglycerol Isolated from *Spirulina platensis*" poster presentation at 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.
31. Wahyu Handayani, Lestari, M., Paithoonrangsarid, K., Ruengjitchatchawalya, M. **Bunnag, B.**, Kittiratanapaiboon, K. and Siangdung, W. (2009) Response of lipid class pattern in Spirulina platnesis strain C1 to salinity stress. Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON), January 13-16 , Naraesuan University, Phitsanulok, Thailand.
32. Chaiklahan R., Chirasuwan N., Siangdung W., Paithoonrangsarid K. and **Bunnag B.**, 2010, Cultivation of *Spirulina platensis* using pig wastewater in a semi-continuous process, *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(3), 609-614.

33. Kiatmetha P., W. Siangdung, **B. Bunnag**, S. Senapin and B. Withyachumnarnkul, 2010, Enhancement of survival and metamorphisis rates of *Penaeus monodo*n larvae by feeding with the diatom *Thalassiosira weissflogii*. Aquaculture International. DOI 10.1007/s10499-010-9375-7.