



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไมโคสปอรีน-2-ไกลซีน ใน *Halothece* sp. PCC7418
Effect of pH in the medium for mycosporine-2-glycine production in *Halothece* sp. PCC7418

ชื่อนิสิต นางสาวรัมพร บัวแก้ว เลขประจำตัว 5932349623

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ ผลของค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไมโคสปอริน-2-ไกลซีน
ใน *Halothece* sp. PCC7418
โดย นางสาวรัมพร บัวแก้ว รหัสนสิต 5932349623
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรีธธา
ปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้แนบโครงการฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรีธธา)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพิงคะ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัสวลาสกุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุขาดา จันทรประทีป นภาพร)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ชื่อโครงการ

ผลของค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนใน *Halotheca* sp. PCC7418

Effect of pH in the medium for mycosporine-2-glycine production in *Halotheca* sp. PCC7418

นิสิตในโครงการ
นางสาววรัมพร บัวแก้ว
รหัสประจำตัวนิสิต 5932349623

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	ผลของค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไมโคสปอรีน-2-ไกลซีนใน <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 Effect of pH in the medium for mycosporine-2-glycine production in <i>Halotheca</i> sp. PCC7418
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
ชื่อนิติและผู้เสนอโครงการ	นางสาวรัมพร บัวแก้ว รหัสประจำตัวนิสิต 5932349623
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันผู้บริโภคตระหนักและเล็งเห็นความสำคัญของการป้องกันอันตรายจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) เนื่องจากการได้รับรังสียูวีเป็นเวลานานจะทำให้ร่างกายสร้างสารอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้คอลลาเจนในชั้นผิวหนังถูกทำลายและมีโอกาสเสี่ยงเป็นมะเร็งผิวหนังได้ ซึ่ง Mycosporine like amino acid (MAAs) เป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติคัดกรองรังสียูวีและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีความสามารถในการดูดซับรังสียูวีในช่วงความยาวคลื่น 310-365 nm. MAAs สามารถสังเคราะห์ได้จากสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด โดยชนิดของ MAAs ที่พบบ่อยที่สุดคือ Shinorine และ Porphyrin-334 แต่ MAAs ที่พบมากที่สุด ใน halotolerant microorganism คือ Mycosporine-2-Glycine (M2G) ซึ่งพบว่า M2G มีศักยภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า MAAs ชนิดอื่น สำหรับไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ *Halotheca* sp. PCC7418 ซึ่งเป็นเอ็กซ์ทรีโมไฟล์ที่คัดแยกได้จากทะเลเดดซี (Dead sea) สามารถดำรงอยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือสูง (Salt stress) ซึ่งเป็นหนึ่งในภาวะเครียดที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง Reactive Oxygen Species (ROS) ขึ้นมา จนเกิดเป็น Oxidative stress ได้ นำไปสู่การเพิ่มการสะสม M2G ได้ เนื่องจาก M2G สามารถทำหน้าที่เป็น Osmoprotectant ได้ดีพอกันกับการทำหน้าที่เป็น Photoprotectant ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาผลของค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต M2G ในไซยาโนแบคทีเรียชนิด *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะเครียดจากการดัดและต่าง ผลการทดลองพบว่าสาร M2G ที่สกัดได้มีปริมาณมากที่สุดเมื่อถูกเหนี่ยวนำภายใต้สภาวะเครียดที่ pH9 แสดงให้เห็นว่านอกจาก M2G จะมีคุณสมบัติเป็นสารคัดกรองรังสียูวีและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้วยังสามารถช่วยรักษาสมดุลภายในเซลล์ของ halotolerant microorganism เพื่อให้สามารถดำรงอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ทั้งนี้จากผลการทดลองมีศักยภาพในการใช้เพื่อพัฒนาต่อยอดสำหรับการผลิตสาร M2G ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการผลิตปริมาณมากรวมทั้งการใช้เป็นองค์ประกอบในเวชสำอางต่อไป

Project title Effect of pH in the medium for mycosporine-2-glycine production in
Halothece sp. PCC7418

Investigator Miss Waramporn Buakaew Student ID : 5932349623

Project advisor Associate Professor Rungaroon Waditee-Sirisattha, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Nowadays, the application of sunscreen has gained much attention to reduce the harmful effects of Ultraviolet (UV) irradiation on skin because prolonged exposure to UV radiation can cause photoaging of the skin, destroy collagen structure and induce skin cancer risk. Mycosporine-like amino acids (MAAs) are a group of secondary metabolite, alternative natural UV-absorbing compounds that can absorb UV radiation in the range of 310 to 365 nm. The most common found MAAs are shinorine and porphyra-334; however, mycosporine-2-glycine (M2G) is the most found in halotolerant microorganism. M2G has potential in antioxidant activity and its activity is superior than others. In the present study, we investigated M2G production in *Halothece* sp. PCC7418, the extremophilic cyanobacterium isolated from Dead sea. This cyanobacterium can grow under salt stress condition and accumulate high M2G. Here, the effect of pH on M2G production was examined. It was clearly observed that at alkaline pH stress (pH9) induced the highest M2G production. The results revealed that M2G has potential to protect cells from extreme environment by absorbance UV and antioxidant activity. In addition, using these bacterial compounds in commercial sunscreens or pharmaceutical industry should be performed in the future.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดีถิ สิริศรีธธา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้ให้คำแนะนำและคำปรึกษา ทั้งในด้านการวางแผนการทดลอง, การดำเนินการทดลอง การอภิปรายและสรุปผลการทดลอง รวมถึงการ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ อันเป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยตลอดทั้งโครงการ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ในรายวิชาต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ บุคลากรภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการใช้ เครื่องมือต่างๆ และให้ความช่วยเหลือทั้งด้านการศึกษาและการทำวิจัย

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ ฝ่ายวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆในห้องวิจัย 1904/17 ทุกท่านและพี่ๆ ห้องวิจัยอื่นๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยาโดยเฉพาะ พี่มุก พี่บ๋ม พี่คริส รวมถึงกวางและโบ๊ท เพื่อนร่วมอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการในระดับปริญญาศึกษา ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และคำแนะนำที่มีประโยชน์ต่อการวิจัยและการเขียนโครงการเล่มนี้ตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ นิสิตภาควิชาจุลชีววิทยา รุ่น 43 และพี่ๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาระหว่างการทำวิจัยตลอดทั้งโครงการ

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจตลอดการทำวิจัยครั้งนี้จนสามารถสำเร็จและผ่านไปได้ด้วยดี

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง	10
3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการเพาะเลี้ยง	10
3.1.1 อาหารและภาวะในการเลี้ยง <i>Halotheca</i> sp. PCC7418	10
3.1.2 การเก็บตัวอย่างเซลล์	10
3.2 การเลี้ยงเอ็กซ์ทริโมไฟล์ <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ในสภาวะเครียดจากกรดต่าง	10
3.2.1 อาหารและภาวะในการเลี้ยง <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ในภาวะ เครียดจากกรดและต่าง	10
3.2.2 การเก็บตัวอย่างเซลล์	10
3.3 การวัดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไป	11
3.4 การศึกษาสัณฐานวิทยาและวัดขนาดเซลล์ <i>Halotheca</i> sp. PCC7418	11
3.5 การสกัด Mycosporine-2-glycine	11
3.5.1 สกัดสารด้วยเมทานอล	11
3.5.2 การเก็บ Supernatant (Methanolic phase)	11
3.5.3 สกัด Supernatant ด้วย Chloroform	11
3.5.4 การเก็บเฟสที่ละลายน้ำ (Aqueous phase)	12
3.5.5 การกรอง Supernatant ด้วย Ultrafiltration	12
3.5.6 DPPH assay	12
3.5.7 ABTS assay	12

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง	15
4.1 การเจริญเติบโตของ <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะเครียดจากกรดและด่าง	15
4.2 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของ <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	16
4.3 ผลการวัดขนาดเซลล์ <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ด้วยโปรแกรม ImageJ และ MicrobeJ	18
4.4 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชก่อนและหลังของการบ่ม <i>Halotheca</i> sp. PCC7418	20
4.5 ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 325-800 nm. ของสารสกัด M2G	21
4.6 ผลการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วย DPPF assay	23
4.7 ผลการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วย DPPF assay	23
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	24
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก ก	29
- สูตรอาหาร BG-11+Turk solution สำหรับเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะปกติ	29
- สูตรอาหาร BG-11+Turk solution สำหรับเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ และความเป็นกรดต่าง	30
ภาคผนวก ข	31
1. ผลการวัดสเปกตรัมของสารสกัดในส่วน Methanolic phase	31
2. ผลการวัดสเปกตรัมของสารสกัดในส่วน Aqueous phase	32
3. ผลการวัดสเปกตรัมของสารสกัด M2G	33

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย	2
ภาพที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของสาร Mycosporine-like amino acid (MAAs) ; mycosporine-glycine, shinorine, porphyra-334, mycosporine-2-glycine, palythine, และ eupalthece-362	3
ภาพที่ 1.3 วิถีชีวสังเคราะห์ของ MAAs ใน cyanobacteria – Shikimate pathway และ Pentose phosphate pathway	4
ภาพที่ 3.1 แผนผังการดำเนินการทดลอง	13
ภาพที่ 3.2 แผนภาพการกำหนดสถานะของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยง <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ในสถานะเครียดจากกรดและต่าง	14
ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD ₇₃₀ เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของ <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ภายใต้สถานะเครียดจากกรดและต่าง	16
ภาพที่ 4.2 สัณฐานวิทยาของเซลล์ <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ภายใต้สถานะกรดต่างๆ	17
ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่า pH ก่อนและหลังการบ่ม <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ภายใต้สถานะเครียดจากกรดและต่าง	20
ภาพที่ 4.4 แสดงผลเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารสกัดจาก methanolic phase ภายใต้สถานะกรดต่างๆ	22
ภาพที่ 4.5 แสดงผลเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารสกัด M2G จากเซลล์ <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ภายใต้สถานะกรดต่างๆ	22

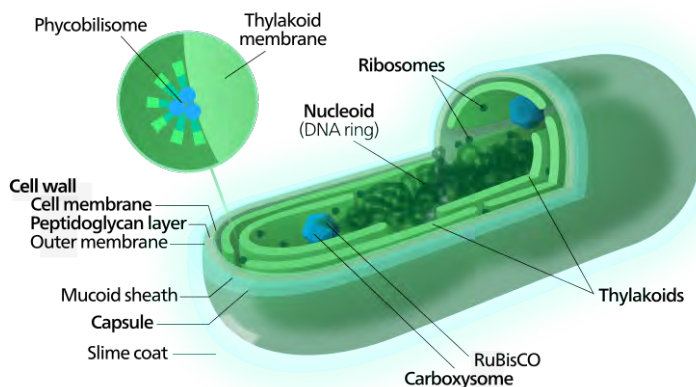
สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1.1 แสดงค่า IC ₅₀ ต่อการต่อต้านสาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2-2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), และ oxygen radical absorption capacity (ORAC) ของ mono-, di-substituted MAAs และ glycosylated MAAs	6
ตารางที่ 4.1 แสดงผลการวัดขนาดเซลล์ <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ด้วยโปรแกรม ImageJ และ MicrobeJ	18

บทที่ 1

บทนำ

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้เหมือนพืชชั้นสูง ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และมีวิวัฒนาการอย่างยาวนานจากหลักฐานฟอสซิล ลักษณะเป็นเซลล์โพรคาริโอต (Prokaryote) (Sainia และคณะ, 2018) กล่าวคือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีสารพันธุกรรมที่มีลักษณะเป็นวงแหวน (Circular DNA) และมีผนังเซลล์ที่เกิดจากสารประกอบเปปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) (Nguyen และ Hoang, 2016) สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งมีบางสกุลที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (Zehr, 2011) ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียจึงมีบทบาทที่สำคัญในวัฏจักรไนโตรเจน และวัฏจักรคาร์บอนบนโลก (Karl และคณะ, 2002) องค์ประกอบภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียคล้ายแบคทีเรียทุกประการ แต่แตกต่างที่ไซยาโนแบคทีเรียมีรงควัตถุ (Pigment) หลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ, คลอโรฟิลล์ บี, แคโรทีนอยด์, ไฟโคไซยานิน, อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริทริน (Tomitani และคณะ, 1999) ซึ่งรงควัตถุที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงคือ คลอโรฟิลล์ เอ (Tanaka และ Tanaka, 2011) อีกทั้งรงควัตถุเหล่านี้ก็ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะที่แตกต่างกันไป โดยเฉพาะการรวมกันของ ไฟโคบิลิน และ คลอโรฟิลล์ เอ ทำให้เกิดเป็นสีเขียวแกมน้ำเงินจึงเป็นลักษณะเฉพาะของไซยาโนแบคทีเรีย (Vincent, 2009) แต่อย่างไรก็ตามไซยาโนแบคทีเรียหลายสกุลก็มีลักษณะเป็นสีอื่นๆ เช่น เหลือง น้ำตาล ดำ และแดง เป็นต้น โดยในไซยาโนแบคทีเรียไม่มีออร์แกเนลล์ที่ใช้บรรจุรงควัตถุเหล่านี้เหมือนคลอโรพลาสต์หรือพลาสติดในพืชหรือจุลสาหร่ายอื่นๆ แต่รงควัตถุทั้งหลายจะถูกสะสมอยู่ที่เยื่อหุ้มไทลาคอยด์ (Douglas, 1994) ดังแสดงในภาพที่ 1.1 ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงได้ ซึ่งถือเป็นผู้ผลิตที่สำคัญในห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศ (Bryant, 2003) ไซยาโนแบคทีเรียมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียแกรมลบ เพราะมีไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มชั้นนอก (Outer membrane) (Durai และคณะ, 2015; Hoiczky และ Hansel, 2000) อีกทั้งไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะทั้งแบบที่ไม่เป็นเส้นสาย (Non-filamentous form) และแบบเป็นเส้นสาย (Filamentous form) ซึ่งกลุ่มที่ไม่เป็นเส้นสาย ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นทรงกลม (Cocoid form) พบทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยว และอยู่กันเป็นกลุ่ม ส่วนกลุ่มที่เป็นเส้นสาย โดยเซลล์จะเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย (Chorus และ Bartram, 1999) สำหรับแหล่งที่อยู่ของไซยาโนแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรียสามารถอยู่ได้เกือบทุกสภาวะบนโลกทั้ง น้ำจืด น้ำทะเล บนบก รวมทั้งภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต (Extreme environment) (Paerl และคณะ, 2000)

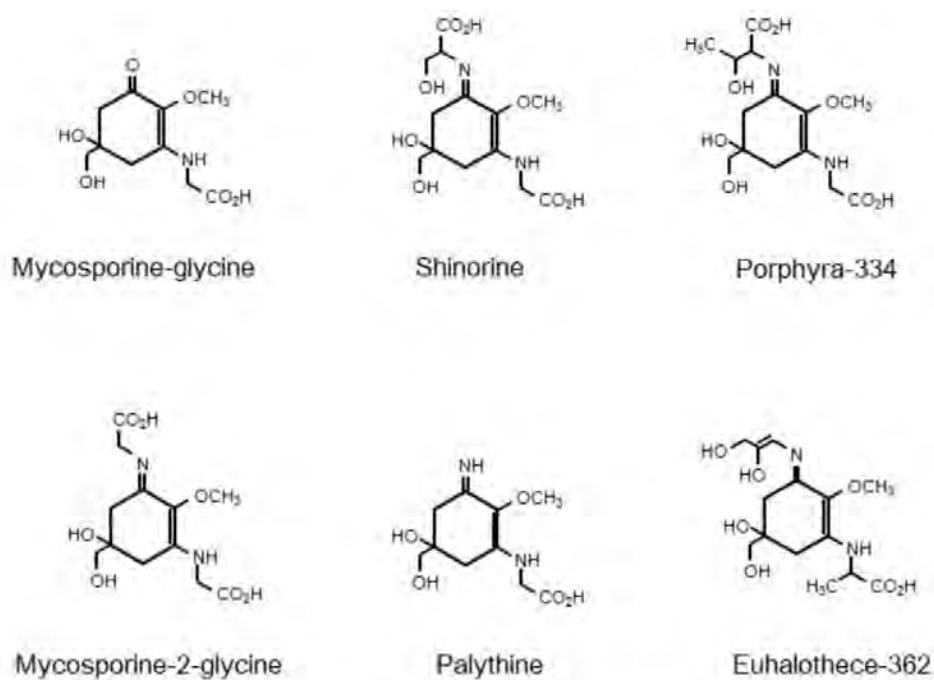


ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย

(ที่มา: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cyanobacteria> เข้าถึงข้อมูลวันที่ 25 เมษายน 2563)

ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด จัดเป็นเอ็กซ์ตรีโมไฟล์ (Extremophile) ซึ่งมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตหรือก่อให้เกิดความเครียดต่อเซลล์ได้ โดยการสังเคราะห์เมแทบอลิต์ทุติยภูมิ, เอนไซม์ หรือการปรับตัวเชิงโครงสร้างเพื่อตอบสนองภาวะเครียดดังกล่าว เช่น บริเวณที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง จะพบกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่ชอบความเค็ม (Halophilic cyanobacteria) ซึ่งชอบอาศัยในพื้นที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ตั้งแต่ 2.5-5.2 โมลาร์ (Ali และคณะ, 2016), บริเวณที่มีอุณหภูมิสูง ไซยาโนแบคทีเรียที่ชอบความร้อน (Thermophilic cyanobacteria) กลุ่มนี้จะเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียส (Castenholz, 1988) เป็นต้น ที่น่าสนใจคือสามารถพบไซยาโนแบคทีเรียในสภาวะแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยมลพิษสูง ไม่ว่าจะเป็น โลหะหนัก, สารเคมีที่มีความเป็นพิษสูง ซึ่งมีโลหะทรานซิชัน (Transition metal) บางชนิดที่เป็นที่ต้องการของไซยาโนแบคทีเรียโดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์ด้วยแสงภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจน และการตรึงไนโตรเจน (Divya และคณะ, 2018) แต่อย่างไรก็ตามสารมลพิษเหล่านี้จะทำให้เซลล์เกิดความเครียด อีกทั้งยังทำให้เซลล์เกิดความเครียดตามมา (Baptista และ Vasconcelos, 2006) แต่ไม่ใช่แค่สารมลพิษที่ทำให้เซลล์เกิดความเครียด ความเค็ม (Salinity) และภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (Oxidative) ก็สามารถทำให้เซลล์เกิดความเครียดได้เช่นกัน โดยถ้าความเค็มมีค่าสูงเกินที่ไซยาโนแบคทีเรียจะรับได้ จะเกิดภาวะเครียดจากเกลือ (Salt stress) (Hossain และ Dietz, 2016) อีกทั้งยังเกิดความเครียดที่เกิดจากภาวะไม่สมดุลของอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Oxidative stress) (Latifi และคณะ, 2009) ซึ่งความเครียดเหล่านี้จะส่งผลให้เซลล์เกิดอะพอพโทซิส (Apoptosis) ที่เป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์แบบที่มีการโปรแกรมไว้แล้ว (Programmed cell death) (Rastogi และ Madamwar, 2015) แต่อย่างไรก็ตามไซยาโนแบคทีเรียหลากหลายชนิดก็สามารถอยู่รอดภายใต้ภาวะเหล่านี้ได้ โดยมีกลไกและกระบวนการที่ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียเกิดการปรับตัวภายใต้ภาวะเหล่านี้ได้ ซึ่งกลไกและกระบวนการเหล่านี้จะช่วยกำจัดสารพิษภายในเซลล์ กำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากเซลล์ หรือลดระดับความเป็นพิษภายในเซลล์ให้เซลล์สามารถอยู่รอดในภาวะเครียดนั้นได้ (Latifi และคณะ, 2009)

Mycosporine like amino acid (MAAs) ถูกค้นพบครั้งแรกในสิ่งมีชีวิตจำพวกฟังไจ เกี่ยวข้องกับกระบวนการ light-stimulation sporulation จากนั้นได้มีการนำมาศึกษาเพิ่มเติมพบว่า MAAs มีความสามารถในการป้องกันโฟตอน (photon) ที่มาในไซโตพลาสซึมของไซยาโนแบคทีเรีย (Kageyama และ Waditee-Sirisattha, 2019) ทำให้ MAAs เป็นที่รู้จักในนามของ “สารคัดกรองรังสียูวี” MAAs เป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ ลักษณะโครงสร้างเป็นวง cyclohexanone หรือ cyclohexenimine แกนของวง chromophore ประกอบด้วยกรดอะมิโนหรืออิมิโนแอลกอฮอล์ (Kageyama และ Waditee-Sirisattha, 2019) ดังแสดงในภาพที่ 1.2 มีความสามารถในการละลายน้ำเนื่องจากคุณสมบัติ zwitterionic ของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ มีมวลโมเลกุลต่ำและมีคุณสมบัติคัดกรองรังสียูวีและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Cheewinhamrongrod และคณะ, 2016) มีความสามารถในการดูดซับรังสียูวีในช่วงความยาวคลื่น 310-365 nm. มีประสิทธิภาพในการดูดกลืนรังสี UV-A ได้ดีที่สุดใน (Carreto และคณะ, 2011) MAAs สามารถสังเคราะห์ได้จากสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด เช่น ไซยาโนแบคทีเรีย, ยูคาริโอตในกลุ่มสาหร่ายสีแดง, ปะการังและไลเคน เป็นต้น (Wada และคณะ, 2015) ในปัจจุบันสามารถจัดจำแนก MAAs ได้มากกว่า 30 ชนิด โดยชนิดที่พบบ่อยที่สุดคือ Shinorine และ Porphyrin-334 แต่ MAAs ที่พบมากที่สุดคือใน halotolerant microorganism คือ Mycosporine-2-Glycine (M2G) (Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014) ซึ่งพบว่า M2G มีศักยภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า MAAs ชนิดอื่น (Cheewinhamrongrod และคณะ, 2016; Ngoennet และคณะ, 2018) เนื่องจากศักยภาพในการดูดกลืนรังสียูวีได้ทำให้ MAAs ได้รับความนิยมนำมาศึกษาเพื่อนำมาสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมยาและครีมกันแดด

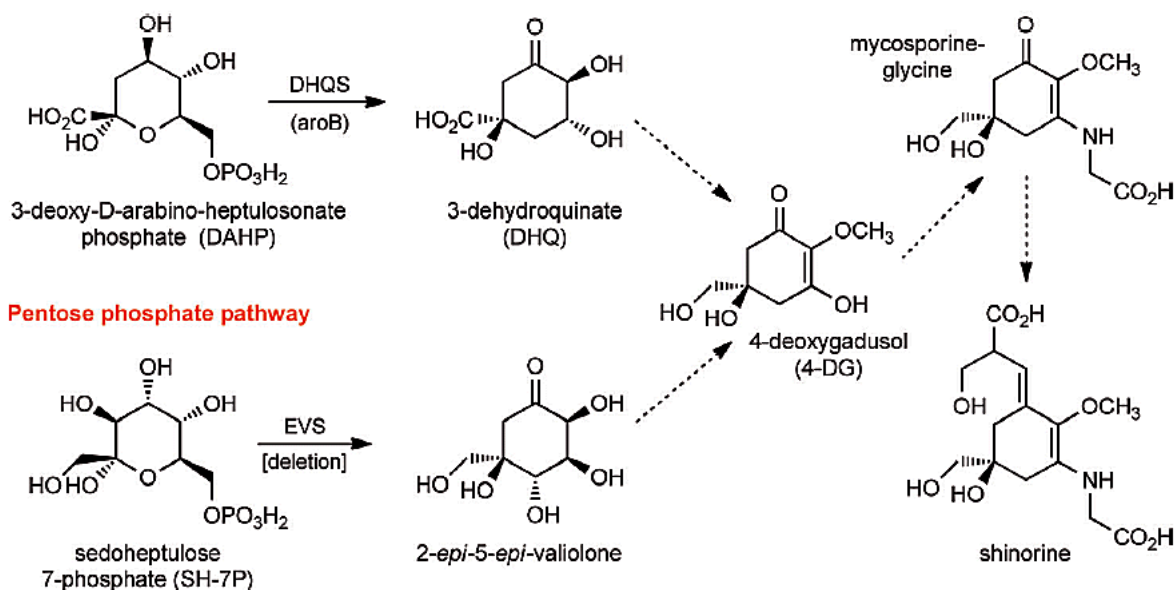


ภาพที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของสาร Mycosporine-like amino acid (MAAs) – mycosporine-glycine, shinorine, porphyrin-334, mycosporine-2-glycine, palythine, และ euhalothecine-362

(ที่มา: Kageyama และ Waditee-Sirisattha, 2019)

วิถีชีวสังเคราะห์ของ MAAs ใน cyanobacteria เกิดขึ้นได้ผ่าน 2 กระบวนการ ได้แก่ Shikimate pathway และ กระบวนการ Pentose phosphate pathway (Orfanoudaki และคณะ, 2019) ดังแสดงในภาพที่ 1.3 ในการสังเคราะห์ MAAs จะประกอบด้วย 4 กลุ่มยีน ดังเช่นใน *Nostoc punctiform* ประกอบด้วยยีน NpR5600 ถึง NpF5597 และใน *Aphanothece halophytica* ประกอบด้วยยีน Ap3858 ถึง Ap3855 จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *A. halophytica* สามารถผลิต M2G ได้มากที่สุด ซึ่งสองยีนแรกคือ Ap3855 และ Ap3856 จะแปลรหัสให้เอนไซม์ DHQ synthase (DHQS) และ O-methyltransferase (O-MT) โพรตีนเหล่านี้จะสังเคราะห์ 4-deoxygadusol (4-DG) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ MAAs โดยสังเคราะห์ 4-DG ได้จาก 3-dehydroquininate (DHQ) ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ในวิถี Shikimate หรือสังเคราะห์จาก sedoheptulose-7 phosphate (SHP) ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ในวิถี Pentose phosphate สำหรับยีน Ap3857 จะแปลรหัสให้เอนไซม์ adenosine triphosphate (ATP) grasp enzyme ซึ่งจะไปจับกับพันธะไอโมน์ของ 4-DG ด้วย glycine เพื่อสังเคราะห์ Mycosporine-glycine (MG) ซึ่งเป็น mono-substituted MAAs และยีน Ap3858 จะแปลรหัสให้เอนไซม์ non-ribosomal peptide synthase (NRPS)-like protein หรือ D-Ala-D-Ala ligase จะทำหน้าที่ ต่อกรดอะมิโนเพื่อสังเคราะห์ให้ได้ di-substituted MAAs (Kageyama และ Waditee-Sirisattha, 2019)

Shikimate pathway



ภาพที่ 1.3 วิถีชีวสังเคราะห์ของ MAAs ใน cyanobacteria – Shikimate pathway และ Pentose phosphate pathway (ที่มา: Spence และคณะ, 2012)

การสังเคราะห์ MAAs จะเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับรังสียูวีหรือมีความเครียดอื่นๆ เช่น ความเครียดจากเกลือ, อุณหภูมิหรือการขาดสารอาหาร ตัวอย่างเช่น ความเครียดจากเกลือเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ M2G และเพิ่มการสังเคราะห์ M2G ใน *A. halophytica* นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยศึกษาพบว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดด้วยรังสี UV-B ควบคู่ไปกับความเครียดจากเกลือ จะเพิ่มการสังเคราะห์ M2G ได้มากกว่าการเหนี่ยวนำด้วยรังสี UV-B เพียงอย่างเดียว (Wditee-Siristtha และคณะ, 2014)

นอกจากศักยภาพในการเป็นสารดักจับรังสียูวีและสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว MAAs ยังมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันโครงสร้าง DNA, ต้านอาการอักเสบ, ยับยั้งเอนไซม์ collagenase, ยับยั้งการพัฒนาของ Advanced Glycation End-products (AGEs), รักษาสมดุลภายในเซลล์หรือ osmotic equilibrium และเกี่ยวข้องกับการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์

สารป้องกันการทำลายโครงสร้าง DNA

โครงสร้างของสารพันธุกรรมสามารถถูกทำลายได้โดยตรงด้วยรังสี UV-B และถูกทำลายโดยอ้อมด้วยรังสี UV-A ผ่านการเกิด H_2O_2 ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระหรือ reactive oxygen species (ROS) มีรายงานว่า MAAs มีศักยภาพในการป้องกันทำลายโครงสร้าง DNA จากการถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 (Kageyama และ Waditee-Sirisattha, 2019)

สารต้านอนุมูลอิสระ

ในกระบวนการทางชีวภาพ ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) มีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างพลังงาน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิต ROS โดย ROS จะทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณให้กับเซลล์และกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในด้านต่างๆ เช่น การแบ่งเซลล์, การอักเสบ, การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและการตอบสนองต่อสภาวะเครียด การได้รับรังสียูวีจะก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิด ROS ขึ้นและไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนใน signaling pathway อาจก่อให้เกิดผลกระทบกับลักษณะทางกายภาพ

เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยา photo-oxidation และกำจัด ROS ต้องอาศัยสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ดังเช่น MAAs ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจำพวก ROS, hydrogen radical, singlet oxygen และ superoxide anion จากการวิเคราะห์ด้วย DPPH assay เพื่อตรวจสอบดูค่า IC50 พบว่า M2G มีคุณสมบัติในการดักจับ oxygen radical หรือต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือ MG, Shinorine และ Porphyrin-334 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1.1 สำหรับการนำสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติไปใช้เป็นส่วนผสมในครีมกันแดดได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์เนื่องจากปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ เช่น Scytonemins ที่สกัดได้จาก *Nostoc commune*, Astaxanthin เป็นสารสีกลุ่ม carotenoid ที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด และ Palythine เป็น MAAs อีกชนิดหนึ่งที่สามารถป้องกันผิวหนังของมนุษย์จากการถูกทำลายจากรังสียูวีใน HaCaT keratinocytes แตกต่างจาก M2G ที่จะป้องกันเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในผิวหนัง

Mycosporine-like Amino Acids (MAAs)	IC50	References
<i>Mono-Substituted MAAs</i>		
Mycosporine-glycine	3 μM ^a at pH 8.5	[14,52]
	43 μM ^b	[54]
Mycosporine- γ -aminobutyric acid	0.6 mM ^a	[14]
<i>Di-Substituted MAAs</i>		
Mycosporine-2-glycine	45 μM ^a	[54]
	22 μM ^b	[71]
Palythine	21.3 μM ^b	[67]
	714 μM ^c	[67]
Porphyra-334	133 μM ^a	[60]
	185.2 μM ^b	[70]
Shinorine	94 μM ^a	[60]
	399 μM ^b	[70]
<i>Glycosylated MAAs</i>		
Hexose-bound-P334	58 mM ^a	[69]
7-O-(β -arabinopyranosyl)-P334	9.5 mM ^a	[69]
13-O- β -galactosyl-porphyra-334	17 mM ^a	[69]
<i>Standard antioxidants</i>		
Trolox	10 μM ^b	[60]
Ascorbic acid	21.3 μM ^b	[67]
α -Tocopherol	11.1 μM ^b	[67]

^a Radical scavenging activity measured using ABTS as the organic radical source. ^b Radical scavenging activity measured using DPPH as the organic radical source. ^c Radical scavenging activity measured using the ORAC antioxidant assay kit.

ตารางที่ 1.1 แสดงค่า IC50 ต่อการต่อต้านสาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), และ oxygen radical absorption capacity (ORAC) ของ mono-, di-substituted MAAs และ glycosylated MAAs

(ที่มา: Kageyama และ Waditee-Sirisattha, 2019)

สารต้านการอักเสบ

การอักเสบเป็นการกระบวนกำบังกำบังการถูกทำลายทางกายภาพของเซลล์ที่ตอบสนองต่อ oxidative stress, irradiation, infection และ endotoxin ซึ่ง oxidative stress สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบได้โดยตรงผ่านวิถี canonical pathway ทั้งนี้ M2G จะยับยั้งการผลิตสารตัวกลางในกระบวนการอักเสบโดยกวดการแสดงออกของวิถี NF- κ B M2G จะยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 ในกระบวนการกระตุ้นการทำงานของ macrophage เพื่อป้องกันการอักเสบ (Kageyama และ Waditee-Sirisattha, 2019)

สารต้านกระบวนการไกลเคชันของโปรตีน

กระบวนการไกลเคชันของโปรตีน (Protein glycation) ก่อให้เกิดการพัฒนาของ Advanced Glycation End-products (AGEs) ซึ่งเกี่ยวข้องกับคุณภาพ ซึ่งกระบวนการไกลเคชัน คือ การเกิดการเชื่อมข้ามสายโมเลกุล (cross-linking) ของเอนไซม์ Hem Egg White Lysozyme (HEWL) เกิดเป็น

สารประกอบตัวใหม่ที่แข็งแรงกว่าเดิม มีความยืดหยุ่นน้อย และมีแนวโน้มจะแตกเปราะได้ง่าย เป็นผลให้โครงสร้างคอลลาเจนถูกทำลาย กลายเป็นผิวที่ไม่สามารถยืดหยุ่นได้เหมือนเดิม และเกิดรอยเหี่ยวย่น จากการศึกษาพบว่า M2G มีคุณสมบัติในการยับยั้งการพัฒนาของ AGEs ได้ (Kageyama และ Waditee-Sirisattha, 2019)

สารยับยั้งเอนไซม์ collagenase

เอนไซม์ collagenase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมจัดอยู่ในกลุ่ม Matrix metalloproteinase (MMP) มีความสำคัญต่อการคงรูปและรักษาสมดุลของเซลล์ผิวหนัง ซึ่งเอนไซม์ collagenase จะทำลายโครงสร้างของ extracellular matrix protein (ECM) จะทำให้เซลล์คอลลาเจนที่มีอยู่เกิดการเปราะหัก ขัดขวางการสร้างคอลลาเจนใหม่และทำให้ผิวหนังเหี่ยวย่น เกิดริ้วรอยได้ ในทางกลับกันเอนไซม์ collagenase ของแบคทีเรียสามารถทำลายโครงสร้างภายนอกเซลล์โดยการทำลาย collagen helix พบในเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Clostridium* ทั้งนี้พบว่า Shinorine, Porphyrin-334, Palythine และ M2G สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ collagenase ของ *Clostridium histolyticum* ได้ M2G จึงมีฤทธิ์คีเลชันโลหะ (Metal chelating activity) สามารถนำ iron (II) chloride และ calcium ions ไปใช้ได้ ดังนั้น MAAs จึงมีคุณสมบัติในการกำจัดโลหะ (Iron chelator) ซึ่ง collagenase ก็จัดเป็น metalloprotease ที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบ (Tharasantisuk และคณะ, 2019)

เอนไซม์จำพวก protease อีกชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการทำลายโครงสร้าง ECM คือ เอนไซม์ elastase จัดอยู่ในกลุ่ม chymotrypsin-type serine protease สามารถทำลายโครงสร้างโปรตีนอีลาสตินซึ่งจะส่งผลให้ผิวหนังขาดความยืดหยุ่นและเกิดเป็นริ้วรอยได้ (Kageyama และ Waditee-Sirisattha, 2019)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการชีวสังเคราะห์สาร Mycosporine-2-glycine จาก เอ็กซ์ทริโมไฟล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะเครียดจากกรดและด่าง

บทที่ 2

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องแก้ว บริษัท Pyrex (USA)
2. เครื่องชั่ง (Balance) รุ่น PG2002-S บริษัท Metler Toledo (Thailand)
3. เครื่องอบฆ่าเชื้อไอน้ำ (Autoclave) รุ่น ES-215 บริษัท Meditop (Thailand)
4. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) บริษัท Contherm Scientific Limited (New Zealand)
5. หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent lamp) บริษัท Lamton (Thailand)
6. เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Rotary shaker) บริษัท Hercuvan Lab-system (USA)
7. เครื่องปั่นแยกสารชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น KUBOTA 6500 บริษัท KUBOTA (Japan)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated microcentrifuge) รุ่น Centrifuge 5418R บริษัท Eppendorf (Germany)
9. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie 2 บริษัท Scientific industries (USA)
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร (Spectrophotometer) รุ่น genesys 20 และ Biomate 35 บริษัท Thermo scientific (Thailand)
11. ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina flow) รุ่น Microtech บริษัท Labmicro (Thailand)
12. ตู้แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส (Refrigerator) บริษัท MITSUBISHI (Japan)
13. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Deep freezer) บริษัท Thermoelectron Corporation (USA)
14. ตู้แช่แข็ง -40 องศาเซลเซียส (Deep freezer) บริษัท Haier (China)
15. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Deep freezer) บริษัท SANYO (Japan)
16. เครื่องกำเนิดคลื่นความถี่สูง (Sonicator) รุ่น Sonics Vibra cell™ บริษัท Sonics & Materials (USA)
17. ปิเปตอัตโนมัติ (Autonomic pipette) รุ่น Proline Plus บริษัท Sarorius BioHit (Germany)
18. หลอดเซนติฟิวจ์ขนาดเล็ก (Microcentrifuge tube)
19. หลอดเซนติฟิวจ์ขนาดใหญ่ (Centrifuge tube)
20. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) บริษัท Olympus (Japan)
21. คิวเวทท์ (Cuvette) รุ่น Spectronic 401 บริษัท Milton Roy (USA)
22. เครื่องตรวจวัดสารด้วยการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer) รุ่น UV-240 บริษัท Shimadzu (Japan)
23. หลอดเซนติฟิวจ์ขนาดเล็กชนิดมีแผ่นกรอง (Amicon Ultr-4 Ultracel-3k Centrifuge filter)
24. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) บริษัท Entech Cybermatics (USA)

25. เครื่องสั่นสะเทือนคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic homogenizer sonicator) รุ่น VCX130 บริษัท Sonic & Materials Inc. (USA)

2.2 เคมีภัณฑ์

1. เอทานอล (Ethanol) บริษัท Ensure (Germany)
2. โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) บริษัท Emsure (Germany)
3. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Emsure (Germany)
4. แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Emsure (Germany)
5. แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Emsure (Germany)
6. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) บริษัท Emsure (Germany)
7. ไดโซเดียม เอทิลีนไดอามีนเตตราอะเซติก ไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Amresco (USA)
8. กรดซิตริก (Citric acid) บริษัท Emsure (Germany)
9. แอมโมเนียม ไอรอน (III) ซิเตรต (Ammonium iron (III) citrate) บริษัท Ajax Finechem (New Zealand)
10. กรดบอริก (H_3BO_3) บริษัท Emsure (Germany)
11. แมงกานีส (II) คลอไรด์ เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Univar (New Zealand)
12. ซิงค์ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Univar (New Zealand)
13. แอมโมเนียมโมลิบเดต เตตระไฮเดรต ($(\text{Na}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Emsure (Germany)
14. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต เพตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Emsure (Germany)
15. โคบอลต์ (III) ไนเตรต เฮกซะไฮเดรต ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Univar (Germany)
16. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck Ag Dramstadt (Germany)
17. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck Ag Dramstadt (Germany)
18. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) บริษัท RCL labscan (Thailand)
19. เมทานอล (Methanol) บริษัท Ensure (Germany)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการเพาะเลี้ยง

3.1.1) อาหารและสภาวะในการเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418

เลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ในอาหาร Blue Green medium (BG11) + Turk Solution (Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ดังแสดงในภาคผนวก ก ภายใต้ความเข้มแสง 950-1,000 lux จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นการให้แสงตลอดเวลา บนเครื่องเขย่า ที่ 25°C จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (OD_{730}) เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งได้ค่าดูดกลืนแสงในช่วง 0.8-1.0 จึงทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ต่อไป

3.1.2) การเก็บตัวอย่างเซลล์

เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเก็บตะกอนเซลล์ไว้สำหรับจะถูกเลี้ยงในอาหารที่สร้างภาวะเครียดให้กับเซลล์ต่อไป

3.2 การเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะเครียดจากกรดและด่าง

3.2.1) อาหารและสภาวะในการเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ในสภาวะเครียดจากกรดและด่าง

เลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ในอาหาร Blue Green medium (BG11) + Turk Solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ โดยสร้างสภาวะเครียดจากกรดและด่างโดยการปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3, 5, 7 และ 9 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1M และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1M ซึ่งมีสภาวะที่เลี้ยงใน BG11 + Turk solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ มีค่า pH 6.8 เป็นชุดควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 3.2 เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 950-1,000 lux จากหลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นการให้แสงตลอดเวลา บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (OD_{730}) เลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 2 วัน จึงทำการเก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.2.2) การเก็บตัวอย่างเซลล์

เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บตะกอนเซลล์ไว้สำหรับการสกัด M2G ต่อไปที่ -40 องศาเซลเซียส

3.3 การวัดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการเพาะเลี้ยง

หลังจากการเลี้ยงเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ในอาหาร BG11 + Turk Solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ภายใต้สภาวะเครียดจากกรดและต่างเป็นระยะเวลาครบ 2 วัน จึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาวัดค่าพีเอชหลังการบ่มด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ เพื่อนำข้อมูลค่าพีเอชหลังการบ่มที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าพีเอชก่อนการบ่ม

3.4 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์และวัดขนาดเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418

นำตัวอย่างเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเครียดจากกรดและต่างและสภาวะควบคุมมาสถานะละ 1 มิลลิลิตร นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จากนั้นนำภาพที่ได้ไปวัดขนาดเซลล์ด้วยโปรแกรม ImageJ และ MicrobeJ (สืบค้นจาก <https://imagej.nih.gov/ij/download.html> และ <https://www.microbej.com/download-2/>)

3.5 การสกัด Mycosporine-2-glycine ทำการสกัดแยกสารเป้าหมาย คือ M2G ตามที่ระบุไว้โดย Ngoennet และคณะ (Ngoennet และคณะ, 2018) ซึ่งมีรายละเอียดโดยสังเขปดังต่อไปนี้

3.5.1) สกัดสารด้วยเมทานอล

ทำการ Resuspend ตะกอนเซลล์ด้วยเมทานอล โดยปริมาตรเมทานอลที่ใช้ คำนวณได้จากสูตร ปริมาตรเมทานอล (mL) = น้ำหนักเซลล์เปียก (g) × 8 จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยโกร่งบดหรือใช้ เครื่องสั่นสะเทือนคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic homogenizer sonicator) รุ่น VCX130

3.5.2) การเก็บ Supernatant (Methanolic phase)

เก็บ Supernatant โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ศึกษาสีของ Supernatant และ นำไปวิเคราะห์ผล Spectrometric analysis ที่ความยาวคลื่น 325-800 นาโนเมตร ต่อไป

3.5.3) สกัด Supernatant ด้วย Chloroform

นำ Supernatant ไประเหยตัวทำละลายออกและทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารด้วยการปั่นเหวี่ยง (Centrivap concentrator) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปละลายด้วยน้ำ 1 mL นำไป Vortex และเติม Chloroform ลงไป 2-3 หยด ในขั้นตอนนี้รังควัตถุจะเคลื่อนไปอยู่ใน Chloroform phase

3.5.4) การเก็บเฟสที่ละลายในน้ำ (Aqueous phase)

เก็บ Supernatant โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บ Supernatant นำไปวิเคราะห์ผล Spectrometric analysis ที่ความยาวคลื่น 325-800 นาโนเมตร

3.5.5) การกรอง Supernatant ด้วย Ultrafiltration

ถ่ายเฟสที่ละลายในน้ำ (Aqueous phase) ไปยังหลอด Eppendorf ที่มีแผ่นกรอง Amicon Ultra-4 Ultracel-3K Centrifugal Filter จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 เป็นเวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง ในขั้นตอนนี้จะเป็นการกำจัดสารที่มีมวลโมเลกุลสูงออกไป และเก็บ Supernatant นำไปวิเคราะห์ผล Spectrometric analysis ที่ความยาวคลื่น 325-800 นาโนเมตร

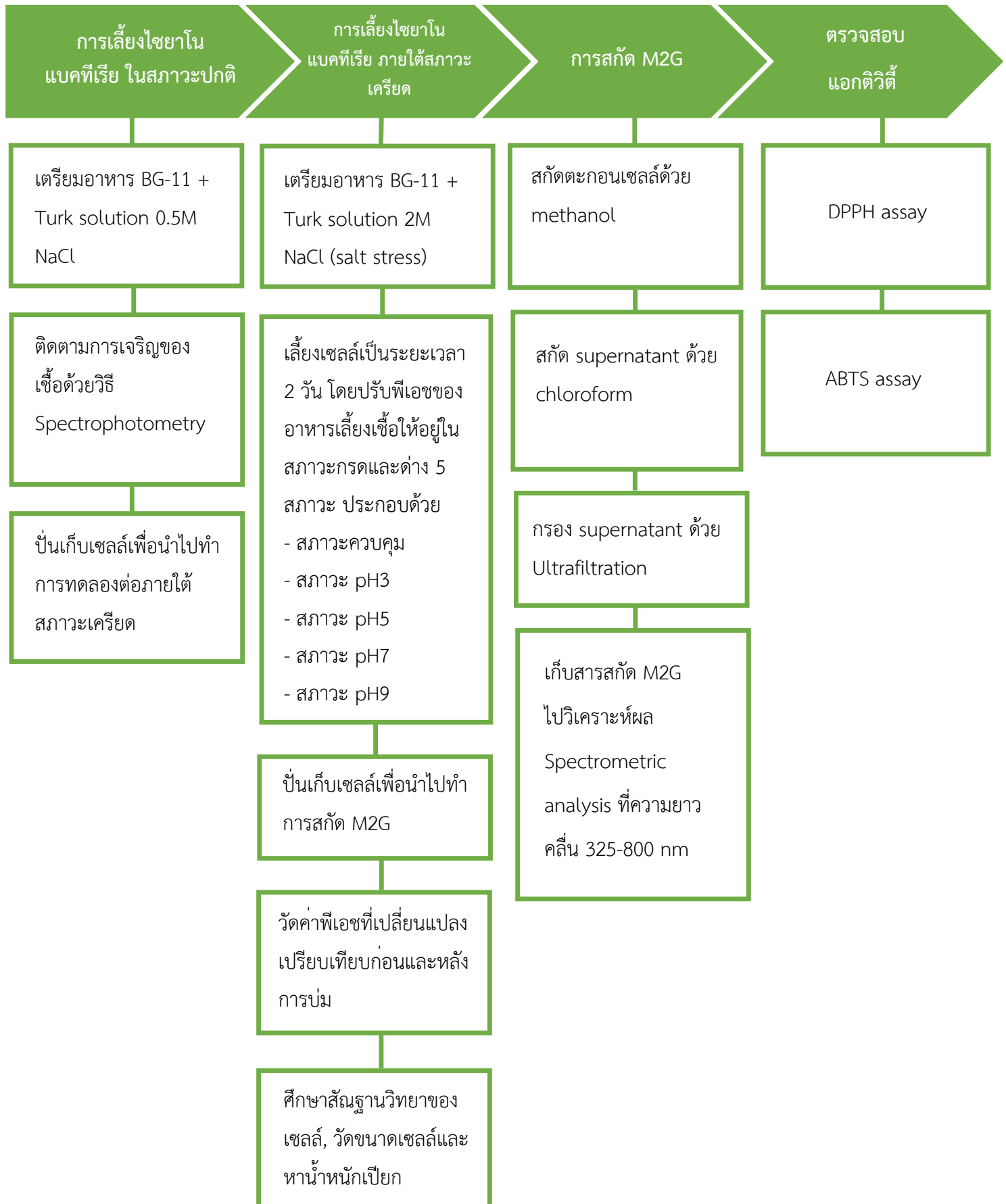
3.6 DPPH assay

นำสารสกัด M2G มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (1,1 diphenyl 2, picrylhydrazyl) ตามวิธีของ Cheewinthamrongrod และคณะ (Cheewinthamrongrod และคณะ, 2016) โดยใช้หลักการของ DPPH* ในรูปอนุมูลอิสระ ทำได้โดยการเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM ที่เตรียมโดยการละลายด้วยเอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 200 μ L ลงในสารสกัด M2G ปริมาตร 50 μ L ที่สกัดได้จากในแต่ละสภาวะ ซึ่งเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิกชนิด L บ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 571 นาโนเมตร การลดลงของอนุมูลอิสระดังกล่าวจะสามารถสังเกตได้จากการจางลงของสีม่วงในสารละลาย

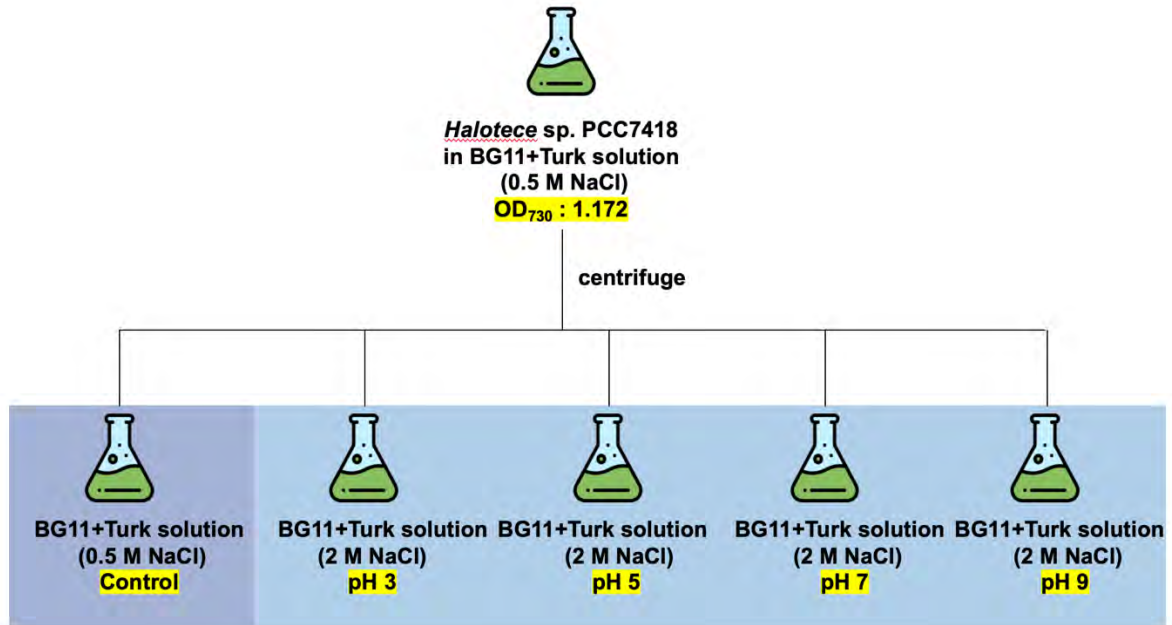
3.7 ABTS assay

นำสารสกัด M2G มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS [2,2' azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)] ตามวิธีของ Ngoennet และคณะ (Ngoennet และคณะ, 2018) โดยเตรียม ABTS ความเข้มข้น 7 mM ไปผสมกับ potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 mM ละลายด้วยน้ำ บ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ในที่มืด ก็จะเกิด ABTS*⁺ เป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวก จากนั้นทำการเจือจางด้วยเอทานอล และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 413 นาโนเมตรให้มีค่าประมาณ 0.7 จึงนำสารละลาย ABTS*⁺ ปริมาตร 18 μ L ไปผสมกับสารสกัด M2G ในแต่ละสภาวะ โดยใช้ Trolox เป็น positive control บ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 413 นาโนเมตร วิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

ภาพที่ 3.1 แผนผังการดำเนินการทดลอง



ภาพที่ 3.2 แผนภาพการกำหนดสถานะของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ในสถานะเครียดจากกรดและด่าง

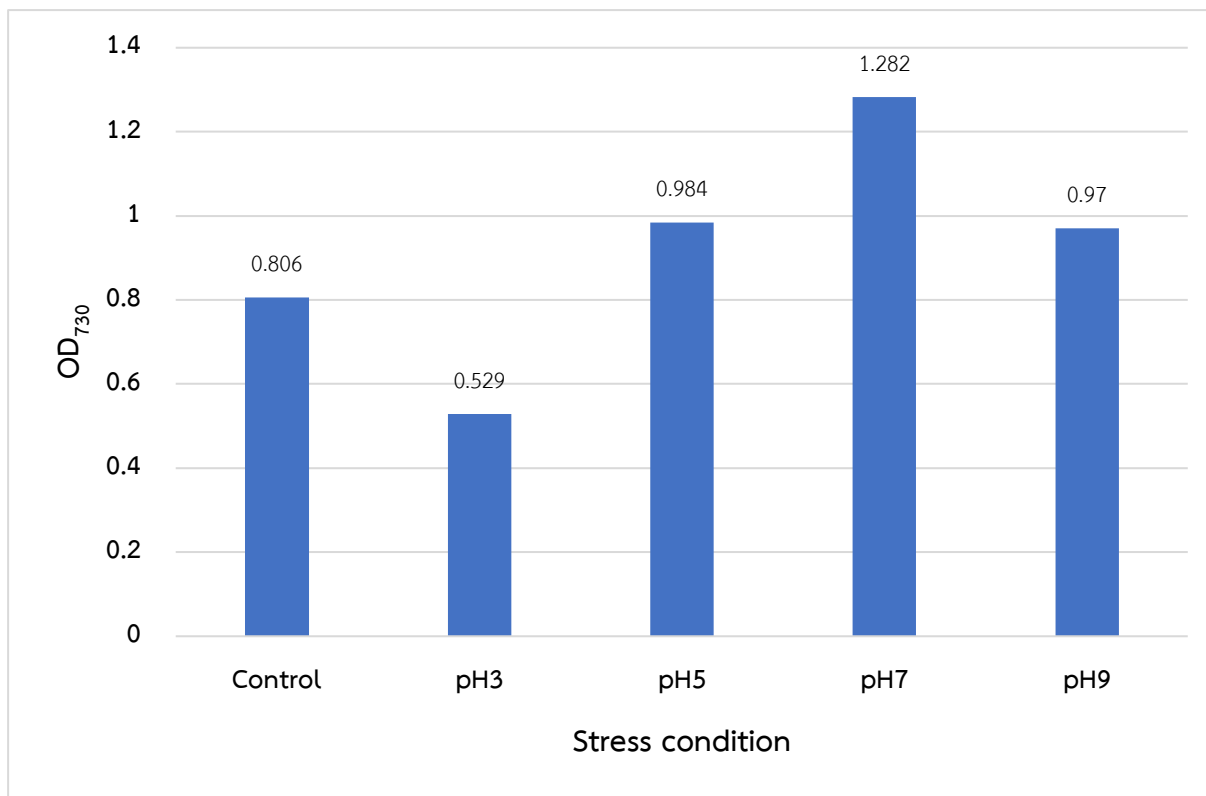


บทที่ 4

ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การเจริญเติบโตของ *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะเครียดจากกรดและด่าง

จากการเลี้ยงเอ็กซ์ทรีโมไฟล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ในอาหาร Blue Green medium (BG11) + Turk Solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 ภายใต้ความเข้มแสง 950-1,000 lux จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ตลอดเวลาบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง และติดตามการเจริญของเซลล์ โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (OD_{730}) เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งได้ค่าดูดกลืนแสงในช่วง 0.8-1.0 จึงทำการเก็บเซลล์ไปเลี้ยงต่อภายใต้สภาวะเครียดในอาหาร Blue Green medium (BG11) + Turk solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และสร้างสภาวะเครียดร่วมจากกรดและด่างโดยการปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5 สภาวะ ได้แก่ pH3, pH5, pH7, pH9 และมีสภาวะที่เลี้ยงใน BG11 + Turk solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 เป็นชุดควบคุม เลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (OD_{730}) ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.1 พบว่าภายใต้สภาวะความเครียดที่ pH7 มีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม มีค่า OD_{730} เท่ากับ 1.282 และภายใต้สภาวะความเครียดที่ pH3 มีความหนาแน่นของเซลล์ต่ำที่สุด มีค่า OD_{730} เท่ากับ 0.529 ทั้งนี้การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยการวัดจากสเปกโตรโฟโตมิเตอร์อย่างเดียวอาจมีข้อจำกัด หากเป็นไปได้ควรต้องใช้วิธีวิเคราะห์อื่นร่วมด้วย เช่น การหาน้ำหนักเซลล์เปียกหรือการวัดค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เป็นต้น เนื่องจากการวัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีเพียงวิธีเดียวอาจมีความคลาดเคลื่อนที่เป็นผลมาจากขั้นตอนการทำ dilution ก่อนนำมาวัดค่า OD_{730} ที่ต้องใช้ความแม่นยำของเครื่องมือ อาทิเช่น ปิเปตเพื่อให้ได้ปริมาตรที่ถูกต้อง และอาจเป็นความคลาดเคลื่อนของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์หรือความผิดพลาดจากผู้ทดลองเอง นอกจากนี้คาดว่าอาจเป็นผลมาจาก suspension ที่ดูตามัวมีก้อนตะกอนเซลล์หรือตะกอนของอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เครื่องอ่านค่าได้ผิดพลาดได้



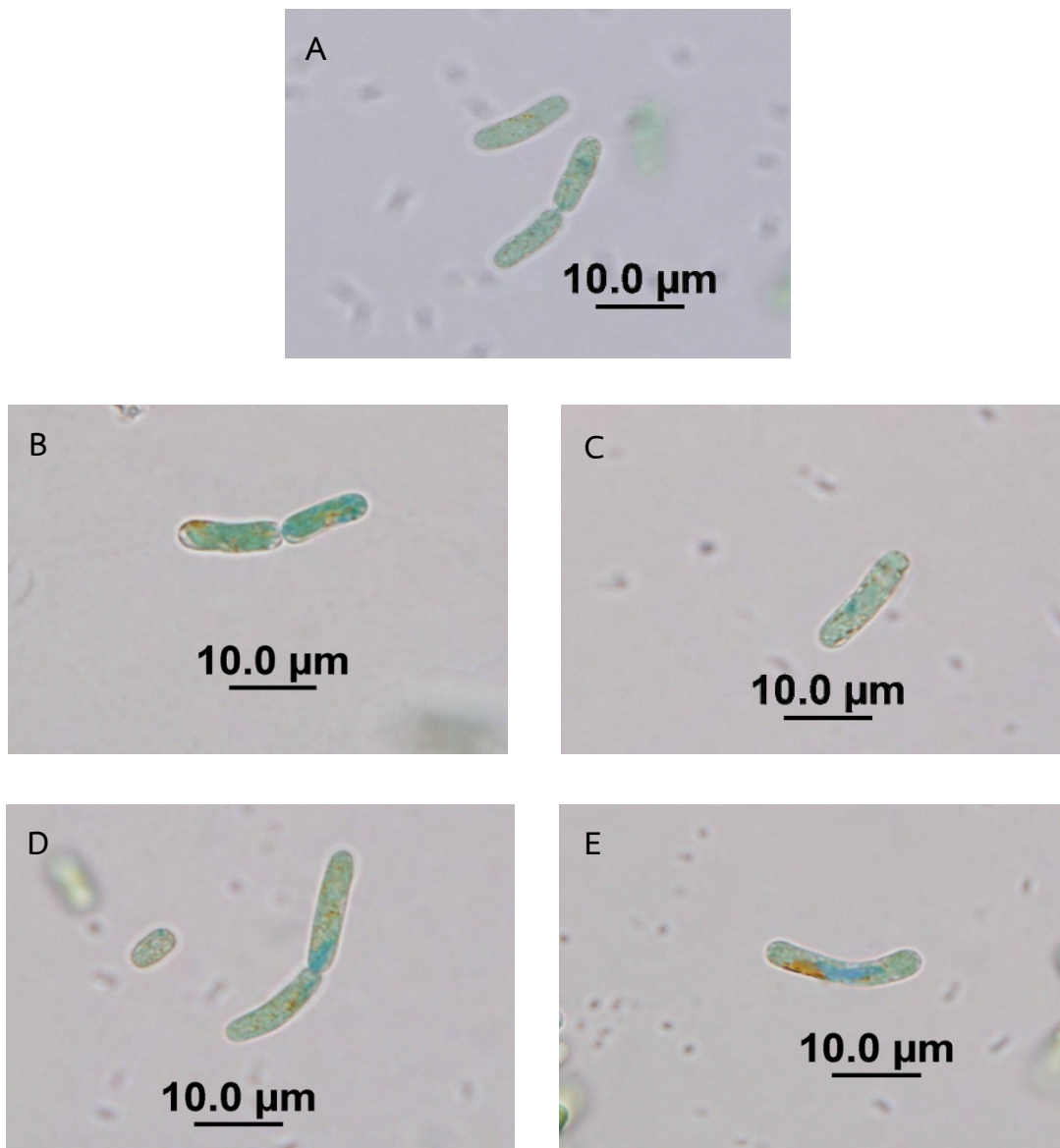
ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD₇₃₀ เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของ *Halothece* sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะเครียดจากกรดและด่าง

4.2 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของ *Halothece* sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะเครียดจากกรดและด่างด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

หลังจากการนำไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 มาเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือร่วมกับสภาวะเครียดจากกรดและด่าง เป็นเวลา 2 วัน จึงเก็บตัวอย่างเซลล์สภาวะละ 1 มิลลิลิตร ไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1000 เท่า เปรียบเทียบกับสัณฐานวิทยาที่เลี้ยงในสภาวะควบคุม พบว่า เซลล์ที่ได้รับความเครียดส่วนใหญ่มีขนาดไม่แตกต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะควบคุมมากนัก แต่จะเห็นว่าเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือร่วมกับสภาวะเครียดจากกรดและด่างจะมีการสะสมรงควัตถุ (Pigment) เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4.2 คาดว่าน่าจะเป็นการสะสมสารคลอโรฟิลล์และไฟโคไซยานิน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rym (Rym และ B.D., 2012) ที่ทำการเลี้ยง *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) ภายใต้เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีการสะสมของแคโรทีนอยด์และไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสรุปได้ว่าการที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นกว่าปกติ สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการสะสมสารกลุ่มไฟโคบิลินมากขึ้น ทำให้เกิดการดูดซับแสงที่ไฟโคบิลิโชมแล้วส่งต่อให้คลอโรฟิลล์ เอ ซึ่งเป็นศูนย์กลางปฏิกิริยาทำให้ที่กิจกรรมของ photosystem II เพิ่มขึ้น (Rym, 2012) โดยเฉพาะภายใต้สภาวะ pH3 และ pH9 มีการสะสมรงควัตถุมากอย่างเห็นได้ชัดและที่สภาวะ pH9 มีขนาดของเซลล์ที่ยาวขึ้นด้วยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ทั้งนี้ผลที่ได้เป็นเพียงการวัดปริมาณการ

สะสมรงควัตถุด้วยตาเปล่า และเป็นการสุ่มเลือกมาเพียงบริเวณใดบริเวณหนึ่งของภาพซึ่งอาจทำให้ไม่ได้เห็นเซลล์ทั้งหมด หากต้องการข้อมูลที่ชัดเจนและแม่นยำจำเป็นต้องนำไปวิเคราะห์ต่อและวัดผล spectrometric analysis

นอกจากการเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยการเพิ่มการสะสมรงควัตถุเหล่านี้แล้ว ไซยาโนแบคทีเรียยังมีกลไกปรับตัวอื่นๆหลากหลายรูปแบบเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียด กลไกปรับตัวเหล่านี้จะทำงานร่วมกัน เพื่อทดแทนการทำงานบางส่วนที่สูญเสียไป หรือเพื่อรักษาสภาพเซลล์ให้ทนต่อสภาวะเครียด และสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้แม้ดำรงอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม (Demetriou และคณะ, 2007)

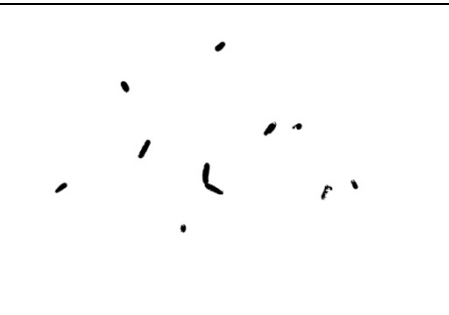





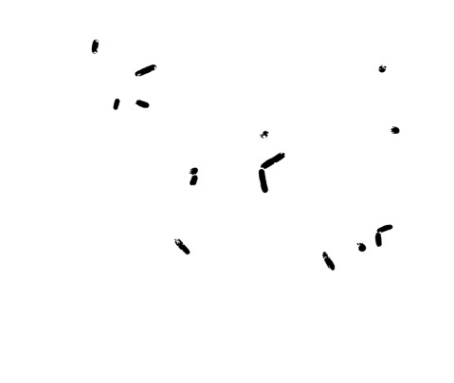
ภาพที่ 4.2 สัณฐานวิทยาของเซลล์ *Halotheca sp.* PCC7418 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่ความเป็นกรดต่างๆ
A) สภาวะควบคุม B) pH3 C) pH5 D) pH7 และ E) pH9

4.3 ผลการวัดขนาดเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ด้วยโปรแกรม ImageJ และ MicrobeJ

จากการนำตัวอย่างเซลล์ทั้ง 5 สภาวะไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแล้วจึงนำภาพที่ได้ไปวัดขนาดเซลล์ด้วยโปรแกรม ImageJ และ MicrobeJ โดยมีการวัดค่าเฉลี่ยของพื้นที่, ความยาว, เส้นรอบรูปและความกว้างของเซลล์ที่เลี้ยงในแต่ละสภาวะ แสดงผลดังตารางที่ 4.1 พบว่าภายใต้สภาวะ pH9 เซลล์มีค่าเฉลี่ยของความยาว พื้นที่ และเส้นรอบรูปมากที่สุด มีค่าเป็น $4.77 \pm 0.89 \mu\text{m}$, $194.56 \pm 16.39 \mu\text{m}$ และ $16.21 \pm 1.23 \mu\text{m}$ ตามลำดับ ทั้งนี้ผลที่วัดได้เป็นเพียงการสุ่มเลือกมาเพียงบริเวณใดบริเวณหนึ่งของภาพซึ่งอาจทำให้ไม่ได้เห็นเซลล์ทั้งหมด หากต้องการข้อมูลที่แม่นยำจำเป็นต้องนำไปทดลองซ้ำและเฉลี่ยค่าที่วัดได้ในแต่ละสภาวะ

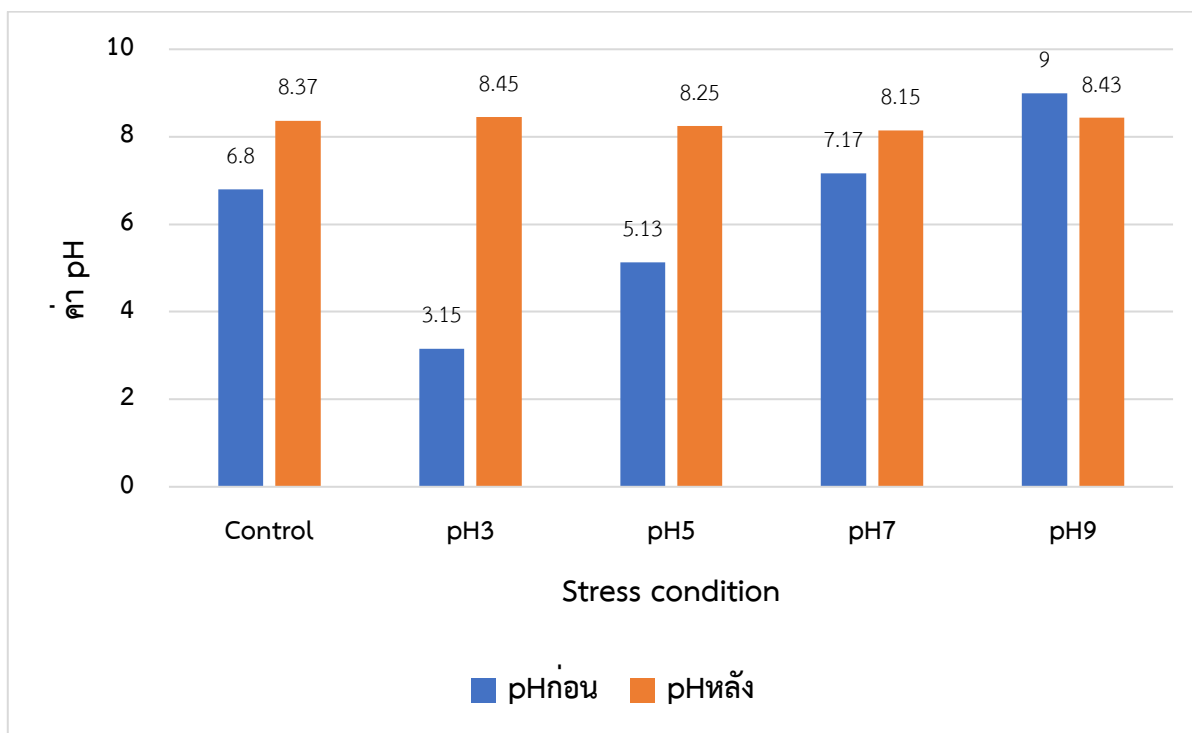
ตารางที่ 4.1 แสดงผลการวัดขนาดเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ด้วยโปรแกรม ImageJ และ MicrobeJ

Stress condition	n	Average shaped (μm)				Picture
		Length	Width	Area	Perimeter	
Control	10	5.33 ± 0.75	1.55 ± 0.06	174.04 ± 21.19	12.28 ± 1.26	
pH3	10	4.62 ± 0.97	1.16 ± 0.19	189.98 ± 25.09	17.44 ± 3.06	
pH5	10	4.43 ± 0.91	1.37 ± 0.16	192.33 ± 36.79	14.51 ± 2.72	

Stress condition	n	Average shaped (μm)				Picture
		Length	Width	Area	Perimeter	
pH7	10	4.28 ± 0.70	1.42 ± 0.16	185.43 ± 27.24	13.01 ± 1.89	
pH9	10	4.77 ± 0.89	1.14 ± 0.18	194.56 ± 16.39	16.21 ± 1.23	

4.4 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชก่อนและหลังของการบ่ม *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะเครียดจากกรดและด่าง

หลังจากการเลี้ยงเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ในอาหาร BG11 + Turk Solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ภายใต้สภาวะเครียดจากกรดและด่างเป็นระยะเวลาครบ 2 วัน จึงนำมาวัดค่าพีเอชหลังการบ่มด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ เพื่อนำข้อมูลค่าพีเอชหลังการบ่มที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าพีเอชก่อนการบ่ม แสดงผลดังภาพที่ 4.7 พบว่า ค่าพีเอชหลังการบ่มในแต่ละสภาวะจะมีการปรับให้อยู่ในช่วง 8.15 – 8.45 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไซยาโนแบคทีเรียมีการปรับตัวโดยการผลิตสารทุติยภูมิที่สามารถช่วยรักษาสมดุลของเซลล์ในสภาวะเครียดจากกรดและด่างเพิ่มขึ้น เนื่องจาก M2G เป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ ลักษณะโครงสร้างเป็นวง cyclohexanone หรือ cyclohexenimine แกนของวง chromophore ประกอบด้วยกรดอะมิโนหรืออิมิโนแอลกอฮอล์ (Kageyama และ Waditee-Sirisattha, 2019) มีความสามารถในการละลายน้ำเนื่องด้วยคุณสมบัติ zwitterionic ของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ (Cheewinathamrongrod และคณะ, 2016) ในสภาวะที่เป็นกรดจะเกิด protonation ของอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวในอะตอมไนโตรเจนเพื่อป้องกันการเกิด resonance delocalization ของโมเลกุล ซึ่งการเกิด delocalization จะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ แต่ในสภาวะที่เป็นด่างไม่มีผลต่อการเกิด resonance delocalization ของโมเลกุล (Zhang และคณะ, 2005) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า โครงสร้าง aminocyclohexene ของสาร M2G มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระภายใต้ oxidative stress (Wada และคณะ, 2013)



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่า pH ก่อนและหลังการบ่ม *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะเครียดจากกรดและด่าง

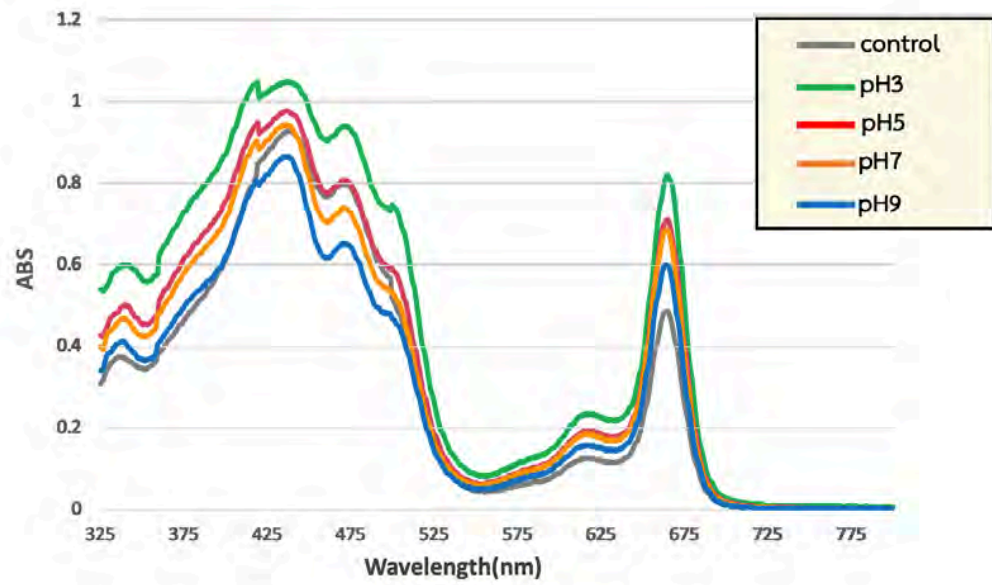
4.5 ผลการวัดสเปกตรัมที่ความยาวคลื่น 325-800 nm. ของสารสกัด M2G ที่สกัดได้จาก *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะเครียดจากกรดและต่าง

ขั้นตอนของการสกัด M2G จาก *Halotheca* sp. PCC7418 เริ่มต้นด้วยการ resuspend ตะกอนเซลล์ที่ปั่นเก็บไว้ด้วยเมทานอล จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยโกร่งบดหรือใช้ Sonicator และเก็บ Supernatant โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะได้ supernatant สีเหลืองใส จากนั้นนำ methanolic phase ไปวิเคราะห์ผล Spectrometric analysis ที่ความยาวคลื่น 325-800 nm ต่อไปดังแสดงผลในภาพที่ 4.4 พบว่ามีช่วงของยอดคลื่นที่หลากหลายแสดงให้เห็นว่าไซยาโนแบคทีเรียมีการสร้างรงควัตถุต่างๆมาตอบสนองต่อสภาวะเครียด ซึ่งมีแนวโน้มแบบเดียวกันในทุกสภาวะ ดังแสดงในภาพที่ 4.24

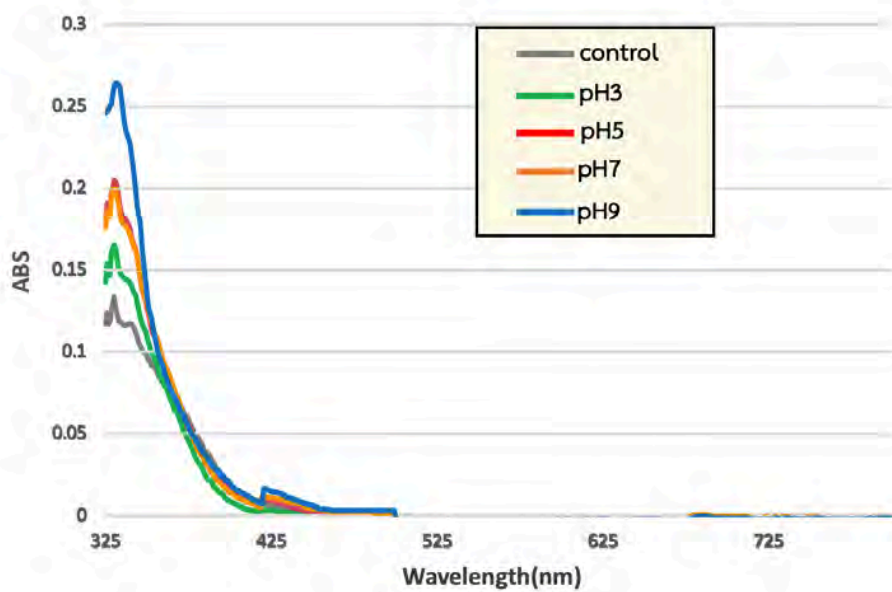
ตัวอย่างรงควัตถุที่พบและช่วงการดูดกลืนแสง ได้แก่ Chlorophyll a มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 430-662 nm, Chlorophyll b มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 453-642 nm, Carotenoid มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 442-472 nm, Phycoerythrin มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 525-570 nm และ Phycocyanin มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 605 nm นอกจากนี้ยังมีสารทุติยภูมิที่ไซยาโนแบคทีเรียสังเคราะห์ได้นั้นคือ MAAs ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 310-365 nm

หลังจากนั้นสกัด supernatant ด้วย Chloroform โดยนำ methanolic phase ไประเหยตัวทำละลายออกและทำให้แห้งด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และนำไปละลายด้วยน้ำ 1 mL จากนั้นนำไป Vortex และเติม Chloroform ลงไป 2-3 หยด ในขั้นตอนนี้รงควัตถุจะเคลื่อนไปอยู่ใน chloroform phase ซึ่งเป็นส่วนที่มี M2G ที่เราต้องการอยู่ ทำการเก็บ Supernatant โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บ supernatant ไปวิเคราะห์ผล Spectrometric analysis ที่ความยาวคลื่น 325-800 nm พบว่า สารสกัดจาก aqueous phase มีค่าดูดกลืนแสงลดลงในแต่ละช่วงความยาวคลื่นเมื่อเทียบกับผลของ methanolic phase ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีปริมาณรงควัตถุลดลงจาก methanolic phase ทั้งนี้มีแนวโน้มแบบเดียวกันในทุกสภาวะความเครียด

ขั้นตอนสุดท้ายของการสกัด M2G ทำได้โดยการถ่าย supernatant (aqueous phase) ไปยังหลอด Eppendorf ที่มีแผ่นกรอง Amicon Ultra-4 Ultracel-3K Centrifugal Filter จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง ในขั้นตอนนี้จะเป็นการกำจัดสารที่มีมวลโมเลกุลสูงออกไป และเก็บ supernatant นำไปวิเคราะห์ผล Spectrometric analysis ที่ความยาวคลื่น 325-800 nm แสดงผลสรุปรวมดังภาพที่ 4.5 พบว่าสารสกัดที่ได้มีค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 310-365 nm ซึ่งเป็นค่าดูดกลืนแสงของ MAAs และมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ความยาวคลื่น 330 nm ซึ่งเป็นค่าดูดกลืนแสงของ M2G นั่นเอง จึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดที่ได้จากเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 คือ M2G ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดเมื่อถูกเหนี่ยวนำภายใต้สภาวะเครียดที่ pH9 ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ส่วนรายละเอียดของสเปกตรัมแต่ละค่า pH แสดงไว้ในภาคผนวก ข



ภาพที่ 4.4 แสดงผลเปรียบเทียบสเปกตรัมจาก methanolic phase ของเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ในแต่ละสถานะความเครียด



ภาพที่ 4.5 แสดงผลเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารสกัด M2G จากเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ในแต่ละสถานะความเครียด

4.6 ผลการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay (ไม่ได้ทำการทดลอง)

การนำสารสกัด M2G มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 571 นาโนเมตร โดยใช้กรดแอสคอร์บิก ซึ่งมีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเป็นตัวเปรียบเทียบ คาดว่าที่สภาวะ pH9 จะมามีค่าการดูดกลืนแสงน้อยที่สุดซึ่งแสดงถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด

4.7 ผลการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay (ไม่ได้ทำการทดลอง)

การนำสารสกัด M2G มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 413 นาโนเมตร คาดว่าจากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การยับยั้งพบว่าที่สภาวะ pH9 จะมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเมื่อใช้ Trolox เป็น positive control ซึ่งแสดงถึงความสามารถของสารสกัด M2G ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาการเจริญของ *Halotheca sp.* PCC7418 ภายใต้สภาวะเครียดจากความเป็นกรด และต่างด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₇₃₀ พบว่า ในสภาวะที่ภายใต้ pH7 มีความหนาแน่นของเซลล์มากที่สุด เนื่องจากมีค่า pH ที่ใกล้เคียงกับสภาวะควบคุมที่ใช้เลี้ยงเซลล์ปกติ

จากผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของ *Halotheca sp.* PCC7418 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์ที่ได้รับความเครียดส่วนใหญ่มีขนาดไม่แตกต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะควบคุมมากนัก แต่จะเห็นได้ว่าเซลล์จะมีการสะสมรงควัตถุเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นหนึ่งในผลของการปรับตัวของเซลล์เพื่อให้อยู่รอดและสามารถเจริญต่อไปได้ ภายใต้สภาวะเครียดนั้น จากนั้นทำการวัดขนาดของเซลล์ด้วยโปรแกรม ImageJ และ MicrobeJ พบว่า ภายใต้ pH9 เซลล์จะมีค่าเฉลี่ยของพื้นที่มากที่สุด ส่งผลให้ปริมาณน้ำหนักรวมมากขึ้นด้วย แสดงให้เห็นว่า ภายใต้สภาวะเครียดจากกรดและต่างเหนี่ยวนำให้เซลล์เพิ่มปริมาณชีวมวลเพื่อตอบสนองต่อกลไกการปรับตัว และป้องกันตัวเองในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

จากผลการวัดค่าพีเอชหลังการบ่ม พบว่า ในแต่ละสภาวะจะมีการปรับค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 8.15 – 8.45 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไซยาโนแบคทีเรียมีการปรับตัวโดยการผลิตสารทุติยภูมิที่มีความสามารถในการรักษาสมดุลของเซลล์เพิ่มขึ้น เพื่อปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือสภาวะแวดล้อมให้มีค่าใกล้เคียงกับสภาวะควบคุมก่อนที่จะได้รับความเครียดได้

ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่สกัดได้จาก *Halotheca sp.* PCC7418 ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือร่วมกับสภาวะเครียดจากกรดและต่าง พบว่า สารที่สกัดได้มีการดูดแสงอยู่ในช่วง 310-365 nm ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ นั่นคือ Mycosporine-like amino acid (MAAs) และมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ความยาวคลื่น 330 nm ซึ่งเป็นค่าดูดกลืนแสงของ M2G นั่นเอง

ผลการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ผลการนำสารสกัด M2G มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ วิธี DBTS ประเมินว่าที่สภาวะ pH9 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดที่ได้จากเซลล์ *Halotheca sp.* PCC7418 ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือร่วมกับสภาวะเครียดจากกรดและต่างคือ M2G ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดเมื่อถูกเหนี่ยวนำภายใต้สภาวะเครียดที่ pH9 เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้เป็น alkaninophile จึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ถ้าอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดอาจทำให้สูญเสียพลังงานมากในการรักษาสภาพเซลล์ และแสดงให้เห็นว่านอกจาก M2G จะมีคุณสมบัติเป็นสารคัดกรองรังสียูวีและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังสามารถช่วยรักษาสมดุลภายในเซลล์ของ halotolerant microorganism เพื่อให้สามารถดำรงอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ เป็นเพียงข้อมูลพื้นฐานที่จะช่วยแสดงให้เห็นถึงกลไกการปรับตัวของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้สภาวะเครียดจากกรดและต่าง ทั้งนี้การศึกษากลไกการปรับตัวอื่นๆและบทบาทของการผลิต M2G ในสภาวะต่างๆ ควรได้รับการทดลองและการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Ali, I., Prasongsuk, S., and Akbar, A. (2016). Hypersaline habitats and halophilic microorganisms. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 10(03): 330-345.
2. Baptista, M. S., and Vasconcelos, M. T. (2006). Cyanobacteria Metal Interactions: Requirements, Toxicity, and Ecological Implications. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(3): 127-137.
3. Bryant, D. A. (2003). The beauty in small things revealed. *Proc Nat. Acad Sci U. S. A.*, 100, 9647-9649.
4. Carreto, J. I., and M. O. Carignan (2011). "Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects." *Mar Drugs*, 9(3): 387-446.
5. Castenholz, R. W. (1988). Thermophilic Cyanobacteria: Special Problems. *Methods in enzymology*, 167.
6. Cheewinthamrongrod, V., Kageyama, H., Palaga, T., Takabe, T., and Wadaitee-Sirisattha, R. (2016). DNA damage protecting and free radical scavenging properties of mycosporine-2-glycine from the Dead Sea cyanobacteria in A375 human melanoma cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B Biol*, 164, 289-295
7. Chorus, I., and Bartram, J. (1999). A guide to their public health consequences, monitoring and management. *Toxic cyanobacteria in water*, 3(4): 323-347.
8. Demetriou, G., Neonaki, C., Navakoudis E., and Kotzabasis K. (2007). "Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus the protective role of polyamines." *Biochim Biophys Acta*, 1767(4): 272-280.

9. Divya, T. V., Chandwadkar, P., and Acharya, C., (2018). NmtA, a novel metallothionein of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 imparts protection against cadmium stress but not oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 199, 152-161.
10. Douglas, S.E. (1994). Chloroplast origins and evolution. In: D.A. Bryant [Ed.] *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 91-118.
11. Durai, P., Batool, M., and Choi, S. (2015). Structure and Effects of Cyanobacterial Lipopolysaccharides. *Marine drugs*, 13, 4217-4230.
12. Hoiczky, E., and Hansel, A. (2000). Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope. *Journal of Bacteriology*, 1191–1199.
13. Hossain, M. S., and Dietz, K-J. (2016). Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress. *Front Plant Sci*, 7:548.
14. Kageyama, H., and Waditee-Sirisattha, R. (2019). "Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Anti-Aging Properties of Mycosporine-Like Amino Acids: Molecular and Cellular Mechanisms in the Protection of Skin-Aging." *Mar Drugs*, 17(4): 222.
15. Karl, D., Michaels, A., Bergman, B., *et al.* (2002). Dinitrogen fixation in the world's oceans. *Biogeochemistry*, 87(88), 47–98.
16. Latifi, A., Ruiz, M., and Zhang, C.C. (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 33, 258–278.
17. Ngoennet, S., Nishikawa, Y., Hibino, T., Waditee-Sirisattha R., and Kageyama, H. (2018). "A Method for the Isolation and Characterization of Mycosporine-Like Amino Acids from Cyanobacteria." *Methods Protoc*, 1(4): 46.

18. Nguyen, M. A., and Hoang, A. L. (2016). A review on microalgae and cyanobacteria in biofuel production. *Economies and Finances*, 278: 424-434.
19. Orfanoudaki, M., et al. (2019). "Absolute Configuration of Mycosporine-Like Amino Acids, Their Wound Healing Properties and In Vitro Anti-Aging Effects." *Mar Drugs*, 18(1): 35.
20. Orfanoudaki, M., et al. (2019). "Chemical profiling of mycosporine-like amino acids in twenty-three red algal species." *J Phycol*, 55(2): 393-403.
21. Paerl, H. W., Pinckney, J. L., and Steppe T. F. (2000). Cyanobacteria bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environmental Microbiology*, 2(1): 11-26.
22. Rastogi, R. P., and Madamwar, D. (2015). UV-Induced Oxidative Stress in Cyanobacteria: How Life is able to Survive?." *Biochem Anal Biochem*, 4:2.
23. Rym, B. D. (2012). "Photosynthetic behavior of microalgae in response to environmental factors." *Applied Photosynthesis*, 10, 5772-5775
24. Sainia, D. K., Pabbib, S., and Shukla, P. (2018). Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 616-624.
25. Tanaka, R., and Tanaka, A. (2011). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 968-976.
26. Tarasuntisuk, S., Palaga, T., Kageyama, H., and Waditee-Sirisattha, R. (2019). Mycosporine-2-glycine exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Arch Biochem Biophys*, 662, 33-39

27. Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Matthijsk, H. C. P., Ohno, T., and Tanaka, A. (1999). Chlorophyll b and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts. *Nature*, 400.
28. Vincent, W.F. (2009). Cyanobacteria. In: Encyclopedia of Inland Waters (ed. Likens, G.E.). Elsevier Inc., Oxford, pp. 226–232.
29. Wada, N., Sakamoto, T., and Matsugo, S. (2013). Multiple role of photosynthetic and sunscreen pigment in cyanobacteria focusing on the oxidative stress. *Metabolites*, 3, 463-483.
30. Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., Sopun, W., Tanaka, Y., and Takabe, T. (2014). Mycosporine-2-glycine under salt stress in halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Appl Environ Microbiol*, 80(5), 1763-1769.
31. Zhang, Z., Tashiro, Y., Matsukuwa, S., and Ogawa, H. (2005). Influence of pH and temperature on the ultraviolet-absorbing properties of porphyra-334. *Fisheries Science*, 71, 1382-1384
32. Zehr, J. P. (2011). Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. *Trends in Microbiology*, 19(4), 162–173.
33. Download imageJ bundled with Java 1.8.0_172. Available from Internet, <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>, Accessed 25 April, 2020.
34. How to installed MicrobeJ. Available from Internet, <https://www.microbej.com/download-2/>, Accessed 25 April, 2020.

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียมอาหาร

สูตรอาหาร BG11 ที่มีการเติมสารละลาย Turk solution สำหรับเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418
ภายใต้ภาวะปกติ (0.5M NaCl) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย BG11

NaNO ₃	1.500	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.040	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036	กรัม
Na ₂ CO ₃	0.020	กรัม
EDTA·2Na	0.001	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.006	กรัม

สารละลายแร่ธาตุ

H ₃ BO ₃	2.830	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.810	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.220	กรัม
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.390	กรัม
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079	กรัม
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.049	กรัม

สารละลาย Turk

NaCl	28.17	กรัม
KCl	0.67	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.92	กรัม
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.50	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.47	กรัม

สูตรอาหาร BG11 ที่มีการเติมสารละลาย Turk solution สำหรับเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418
ภายใต้ภาวะปกติ (2M NaCl) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

สารละลาย BG11

NaNO ₃	0.750 กรัม
K ₂ HPO ₄	0.002 กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.0375 กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.018 กรัม
Na ₂ CO ₃	0.010 กรัม
EDTA·2Na	0.0005 กรัม
Citric acid	0.003 กรัม
Ferric ammonium citrate	0.003 กรัม

สารละลายแร่ธาตุ

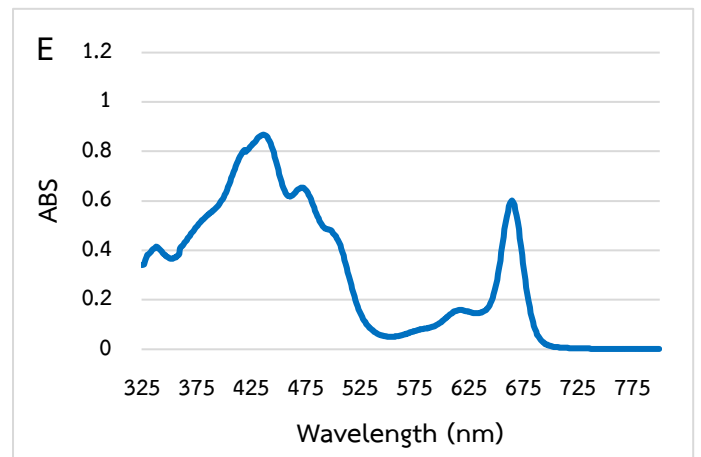
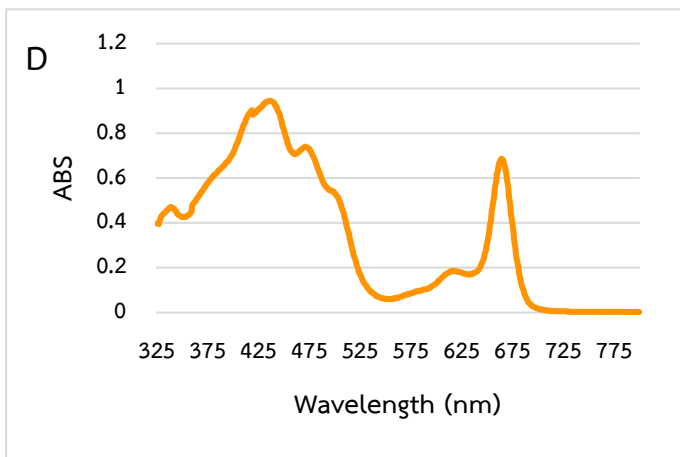
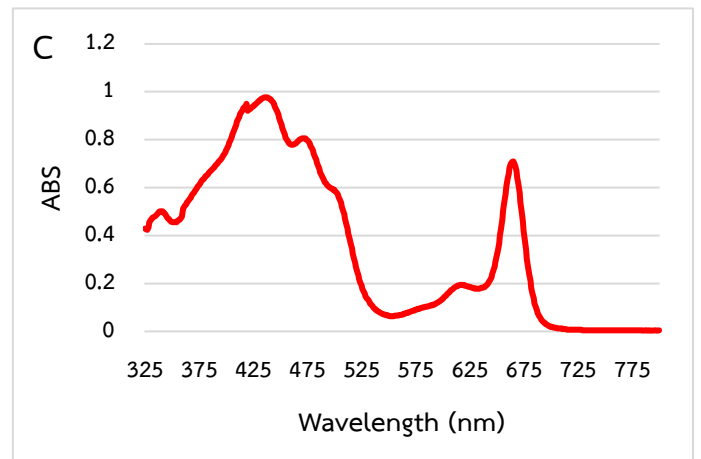
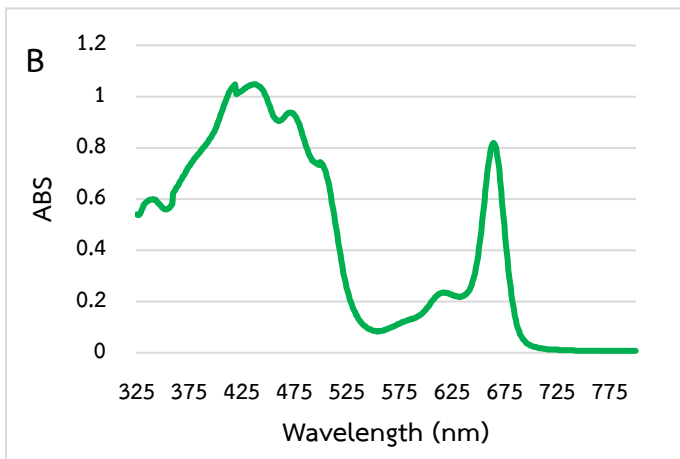
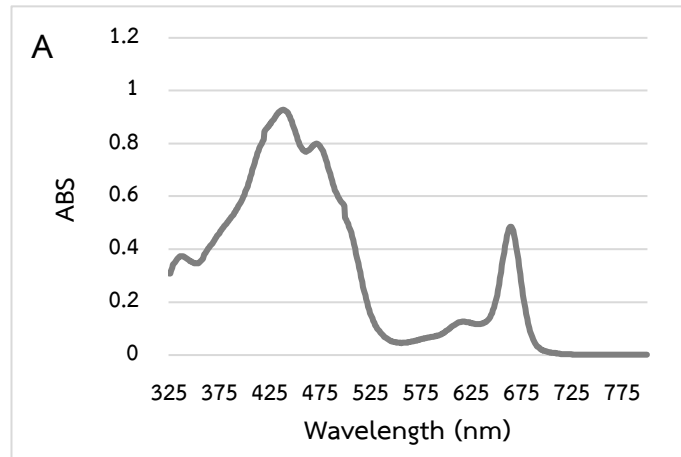
H ₃ BO ₃	1.415 กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.905 กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.110 กรัม
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.195 กรัม
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0395 กรัม
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.0245 กรัม

สารละลาย Turk

NaCl	58.44 กรัม
KCl	0.335 กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.46 กรัม
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.75 กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.735 กรัม

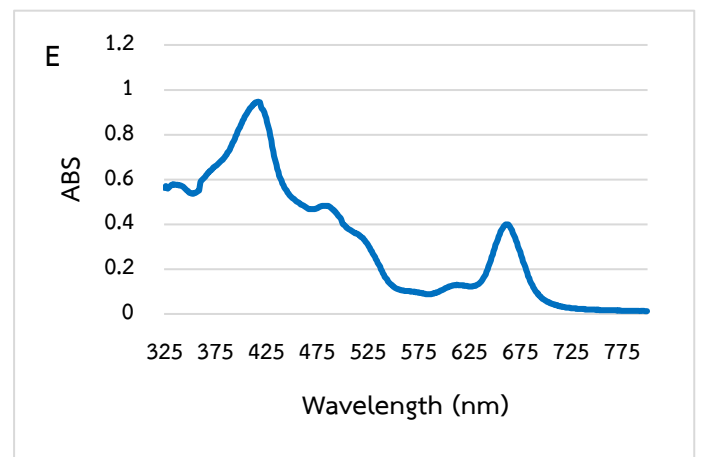
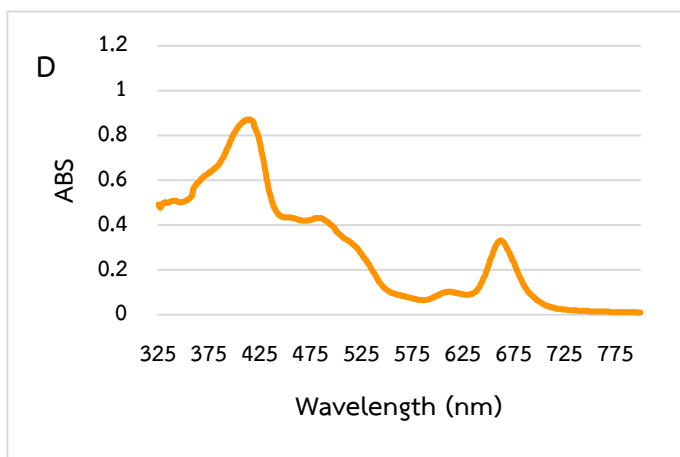
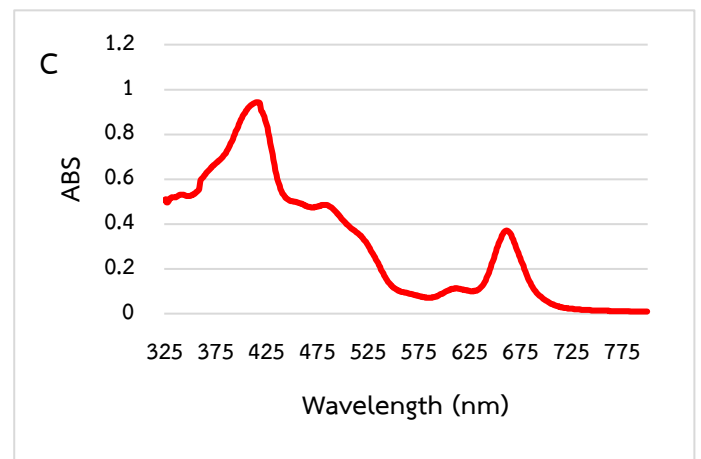
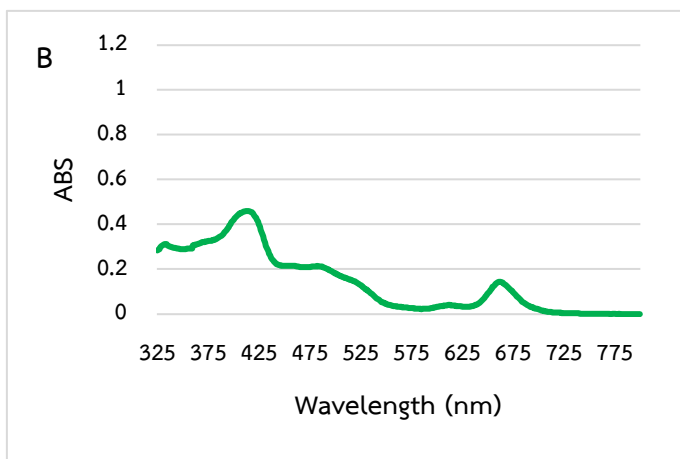
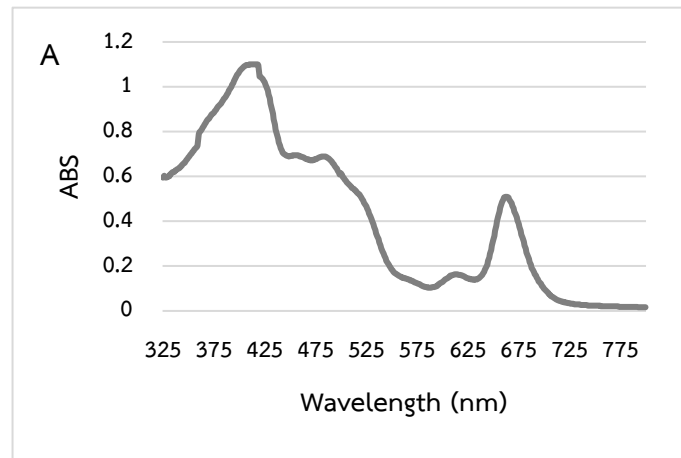
ภาคผนวก ข

1. ผลการวัดสเปกตรัมของสารสกัดในส่วน Methanolic phase



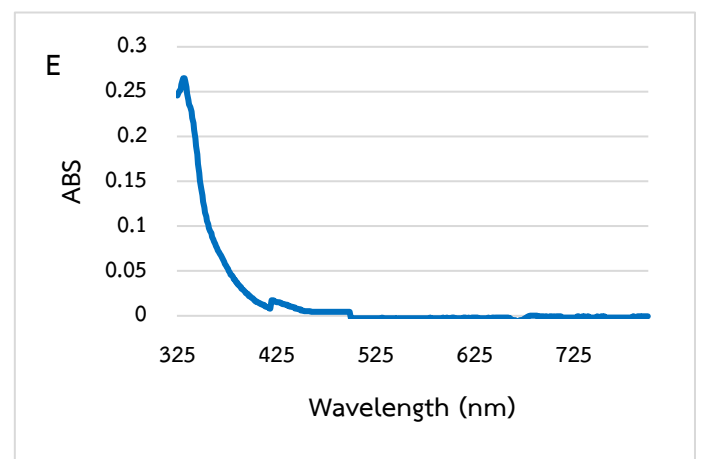
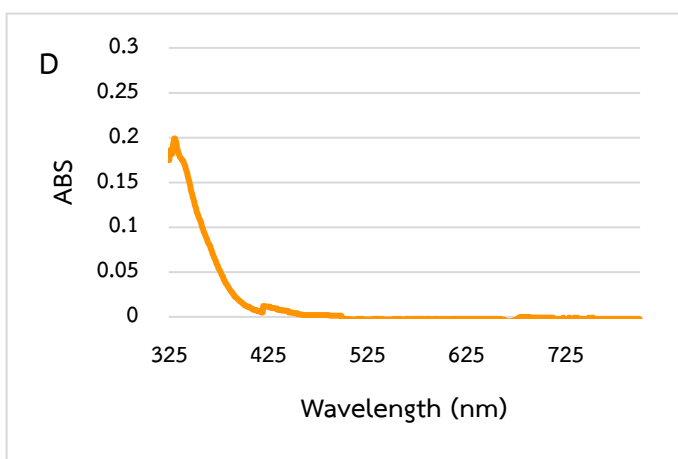
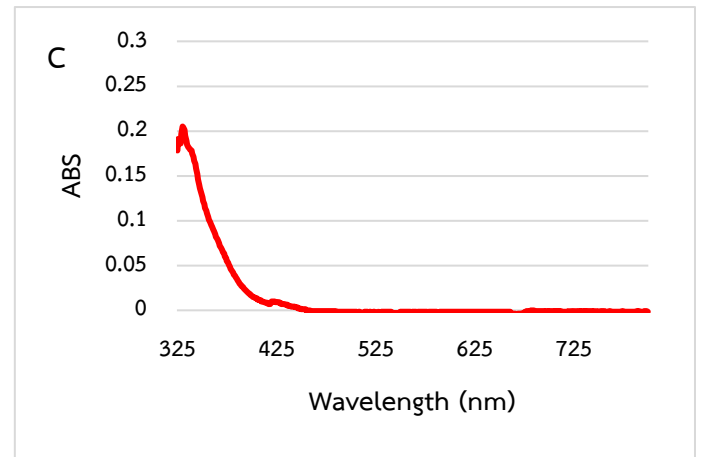
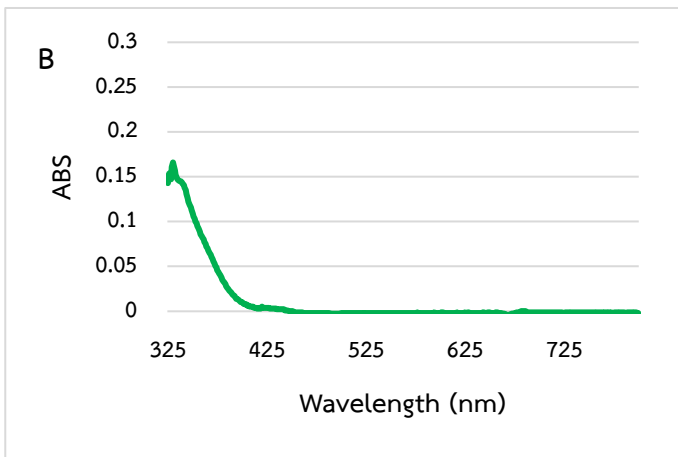
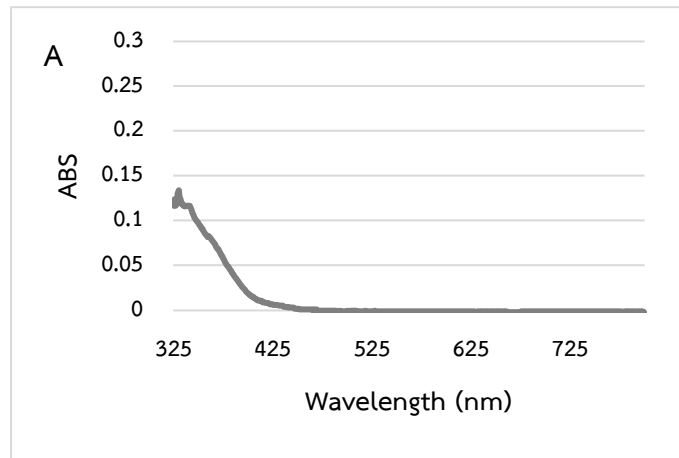
ภาพที่ 1 สเปกตรัมของสารสกัดในส่วน methanolic phase ของเซลล์ *Halothece* sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะกรดต่าง ๆ A) สภาวะควบคุม B) pH3 C) pH5 D) pH7 และ E) pH9

2. ผลการวัดสเปกตรัมของสารสกัดในส่ว Aqueous phase



ภาพที่ 2 สเปกตรัมของสารสกัดในส่ว aqueous phase ของเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะกรดต่างต่างๆ A) สภาวะควบคุม B) pH3 C) pH5 D) pH7 และ E) pH9

3. ผลการวัดสเปกตรัมของสารสกัด M2G



ภาพที่ 3 สเปกตรัมของสารสกัด M2G จากเซลล์ *Halothece* sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะกรดต่างๆ A) สภาวะควบคุม B) pH3 C) pH5 D) pH7 และ E) pH9