



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาวงจรชีวิตจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*
โดยการผนวกรวมการทดลองและแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อมุ่ง
ไปสู่การเพิ่มผลผลิต *astaxanthin* จากการหาค่าที่เหมาะสมที่สุดบน
พื้นฐานจากแบบจำลอง

โดย อ.ดร. ชลเทพ อูสาคุ และคณะ

มีนาคม 2563

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาวงจรชีวิตจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*
โดยการผนวกรวมการทดลองและแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อ
มุ่งไปสู่การเพิ่มผลผลิต astaxanthin จากการหาค่าที่เหมาะสมที่สุด
บนพื้นฐานจากแบบจำลอง

คณะผู้วิจัย สังกัด

อ.ดร. ชลเทพ อูสาคุ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ
วิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ซึ่งได้แก่ ความเข้มข้นของไนเตรตและความเข้มแสง ต่อการดำเนินวงจรชีวิตของเซลล์จุลสาหร่าย การใช้สารอาหารและการสะสมสารต้านอนุมูลอิสระแอสตาแซนทิน โดยการทำการทดลองและการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่ออธิบายผลการทดลองนั้น การศึกษาผลกระทบจากความเข้มแสงทำได้โดย การเพิ่มความเข้มแสงในระหว่างที่เซลล์กำลังเจริญเติบโต ทั้งหมด 4 ระดับความเข้มแสง ในขณะที่ผลกระทบจากความเข้มข้นของไนเตรตได้จากการลดความเข้มข้นของไนเตรตลงสู่ 3 ระดับความเข้มข้นไนเตรตในระหว่างที่เซลล์อยู่ในระยะการเจริญเติบโตและเติมไนเตรตกลับเข้าไปสู่ค่าความเข้มข้นเริ่มต้น แบบจำลองทางคณิตศาสตร์สร้างขึ้นจากสมการพื้นฐานที่อธิบายการจลพลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ และสอบเทียบกับผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาผลกระทบของความเข้มแสง ผลการทดลองที่ได้พบว่า การใช้ความเข้มแสงที่ $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ กระตุ้นให้เกิดเซลล์ที่มีการสะสมแอสตาแซนทินมากที่สุดและดังนั้นก็ได้อัตราการสะสมสูงสุด แต่เมื่อใช้ความเข้มแสงสูงกว่านี้จะไม่ทำให้ได้อัตราการสะสมที่สูงขึ้นแม้จะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่สะสมแอสตาแซนทินเร็วขึ้นก็ตาม การลดปริมาณไนเตรตในระหว่างการเติบโตของเซลล์ลงที่ 40 mg L^{-1} ทำให้เซลล์สะสมแอสตาแซนทินสูงที่สุดและเร็วที่สุด และเมื่อเติมไนเตรตกลับจะทำให้เซลล์ที่มีแอสตาแซนทินเกิดการแบ่งตัวกลายเป็นเซลล์เคลื่อนที่ที่มีสารดังกล่าวสะสมอยู่ ซึ่งเป็นชนิดของเซลล์ที่น่าจะให้ประสิทธิภาพในการสกัดสารแอสตาแซนทินดีเนื่องจากมีผนังเซลล์ที่บางกว่า สำหรับแบบจำลองที่ได้ประกอบไปด้วย 14 สมการเท่านั้น แต่สามารถอธิบายผลของความเข้มแสงต่อการดำเนินวงจรชีวิตของสาหร่าย การใช้สารอาหารไนเตรตและการสะสมสารแอสตาแซนทินได้ดี ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการจำลองผลของความเข้มแสงต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์และการสะสมแอสตาแซนทิน ดังนั้น ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จึงมีส่วนสำคัญที่จะช่วยเพิ่มผลผลิตสารแอสตาแซนทินจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ได้

คำสำคัญ: วงจรชีวิตของจุลสาหร่าย *H. pluvialis*; ผลกระทบของความเข้มแสง; ผลกระทบของไนเตรต; จลพลศาสตร์; แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

Abstract

The aim of this research project is to investigate effects of culturing conditions, including light intensity and nitrate concentration, on *Haematococcus pluvialis* life cycle progression, metabolism and astaxanthin accumulation through an integrated experimental and mathematical modelling approach. To evaluate the effects of light intensity and nitrate concentration, the concentrations of cells for each cell type (motile or X_1 , non-motile vegetative or X_2 , cyst or aplanospores or X_3), nutrients and astaxanthin were measured before and after the light intensity was shifted to 4 different levels (21.9, 87.6, 175.2, and 262.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and before and after the nitrate concentration was reduced to 3 different levels (40, 80, and 120 mg L^{-1}) and re-added to its original value (750 mg L^{-1}). A mathematical model describing the light intensity effects was constructed based on what observed during the experiments using first-principles and cell growth kinetics. At the light intensity condition with shift to 175.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the highest concentration of X_3 cells and the corresponding highest astaxanthin concentration were obtained. It was also found that shifts to higher light intensities could not always lead to higher astaxanthin concentrations as cell death would result. Reducing the nitrate concentration to 40 mg L^{-1} during the growth phase of the life cycle enabled cell transformation to X_3 cells. Similar results were obtained with the shift to 80 mg L^{-1} but the transformation back to X_1 cells still containing astaxanthin was only seen when re-added nitrate to the culture with reducing nitrate concentration to 40 mg L^{-1} . The mathematical model contains only 14 simple equations but it can capture well all the profiles of cell concentration in each cell type, nitrate and astaxanthin concentrations under shifts to 3 different levels of light intensity. It can therefore be further used for simulate effects of light intensity as well as suggest conditions where astaxanthin can be more produced. From the results obtained, this work can be the basis for finding strategies to increase astaxanthin extractability and yield from the culture of *H. pluvialis*.

Keywords: Life cycle of *Haematococcus pluvialis*; Light Intensity Effect, Nitrate Concentration Effect, Kinetics, Mathematical Modelling

Executive Summary

Background: *Haematococcus pluvialis* cultivation is currently a desirable platform for production of astaxanthin, a super antioxidant of great importance with steadily growing global demand. The major limitation of this platform is a high operational cost of astaxanthin extraction as the microalga has a thick 3-layered cell wall which is the important characteristic of the cell type where astaxanthin is accumulated inside. To relieve this problem, cell transformation during the microalga life cycle, among cell types, can be regulated through change in culturing condition(s), making it possible for us to control changes between growth and astaxanthin production phases, and increase astaxanthin extractability. To this end, understanding of the microalga life cycle kinetics with respect to change in culturing condition(s) is extremely crucial.

Methods: Herein, the culturing conditions of interest included light intensity and nitrate concentration. To see their effects on kinetics of life cycle progression, metabolism and astaxanthin accumulation, light intensity and nitrate concentration were changed at the growth phase of the microalga life cycle. The concentrations of cell types in the life cycle, including motile cells (X_1), non-motile vegetative cells (X_2) and aplanospores or cyst cells (X_3), nitrate, phosphate, pH, and astaxanthin were measured before and after the culturing condition was changed. A mathematical model describing the effect of light intensity was constructed based on first principles and cell growth kinetics in order for us to further use to suggest/predict/control the progression of the life cycle under different levels of light intensity.

Results: As the light intensity was changed from 21.9 to 175.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the 120 hr of the culture, X_1 and X_2 cells were suddenly transformed into X_3 cells. It was also found that at this condition, the rate of transformation to X_3 was not the fastest but this condition provided the highest number of X_3 cells at the end of the culture. This was in agreement with the concentration of astaxanthin which was the highest compared to those obtained from other conditions. For the nitrate concentration, after the 96 hr of the culture as the nitrate concentration was reduced to the low level of 40 mg L^{-1} , both the concentrations of X_1 and X_2 were suddenly reduced, while at the same time there was a corresponding increase in X_3 concentration. Similar results were seen with the condition where the nitrate concentration was reduced to 80 mg L^{-1} . However, after nitrate was re-added into the culture at the 216

hour, only for the condition of reducing to 40 mg L⁻¹ nitrate, there existed X₁ cells with astaxanthin inside, which was the desirable form of cell type that could enhance astaxanthin extractability due to its thin cell wall. Based on the results obtained from the experiment of light intensity effects, a mathematical model was constructed from first principles and cell growth kinetics equations, including Monod, Haldane and Hill. The model consists only 14 main equations with 48 parameters but it can successfully reproduce the experimental data of the culture under the light intensity shift to 21.9, 87.6, and 175.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Conclusions: The light intensity applied to induce intracellular astaxanthin accumulation needs to be at an optimal value, or cell death as well as the reduced number of X₃ where astaxanthin is accumulated inside would be obtained. Reduced nitrate concentrations provide milder stress to the microalga cells, and therefore lower amounts of astaxanthin obtained. X₁ cells with astaxanthin inside could be obtained when applying an astaxanthin induction condition and re-applying a growth induction condition as demonstrated by our results. Based on only simple mathematical equations, our constructed model can capture well scenarios under light intensity shifts, which can be further used for simulations of light intensity effects and suggesting optimal profiles of light intensity towards increasing astaxanthin production.

เนื้อหางานวิจัย

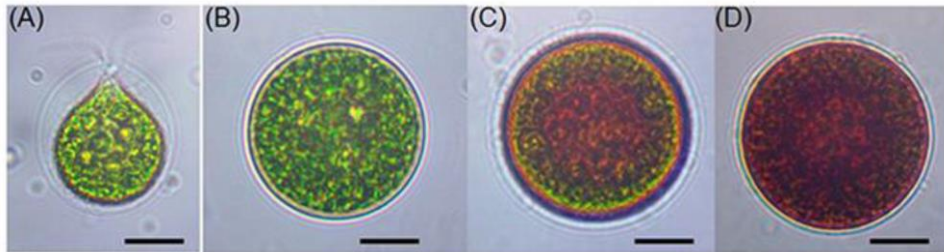
1. ความสำคัญของงานวิจัย

ในปัจจุบัน แอสตาแซนทิน (Astaxanthin, 3,3'-dihydroxy- β -carotene-4,4'-dione) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่กำลังได้รับความสนใจนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสุขภาพต่างๆ เช่น อาหารเสริม เครื่องสำอางค์ และยา เป็นต้น งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแอสตาแซนทินสูงกว่าเบต้าแคโรทีน 54 เท่า สูงกว่าวิตามินซี 65 เท่าและสูงกว่าอัลฟาโทโคฟีรอล 100 เท่า [1–3] ดังนั้นจึงมีความต้องการแอสตาแซนทินในตลาดสูงมาก โดยในปี พ.ศ. 2557 มีความต้องการแอสตาแซนทิน 280 ตันและมีมูลค่าตลาดเท่ากับ 447 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ซึ่งมีประมาณการว่าภายในปี พ.ศ. 2563 (ค.ศ. 2020) จะมีความต้องการแอสตาแซนทินสูงถึง 670 ตันด้วยมูลค่าตลาดสูงถึง 1.10 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ แสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของตลาดแอสตาแซนทิน [4]

โดยทั่วไป สามารถผลิตแอสตาแซนทินจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งประมาณร้อยละ 95 ของแอสตาแซนทินในตลาดมาจากกระบวนการผลิตลักษณะนี้ [2] อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการรับรองอย่างเป็นทางการในสหรัฐอเมริกาว่าแอสตาแซนทินที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีสามารถบริโภคได้ [3] นอกจากนี้ กระบวนการสังเคราะห์แอสตาแซนทินทางเคมีมักจะได้ สเตอริโอไอโซเมอร์ของแอสตาแซนทินที่มีฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระสูงในสัดส่วนที่น้อย ดังนั้น แอสตาแซนทินที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ ซึ่งเป็นอีกทางหนึ่งในการผลิตแอสตาแซนทิน จึงเป็นที่ต้องการมากกว่า เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อการบริโภคและมีฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระสูงซึ่งมาจากสัดส่วนที่สูงของไอโซเมอร์แอสตาแซนทินที่มีฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระสูง [5, 6] จึงทำให้แอสตาแซนทินจากกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ หรือที่เรียกว่า แอสตาแซนทินธรรมชาติ (natural astaxanthin) มีความต้องการในตลาดสูงมาก และทำให้ราคาในตลาดสูงถึง 7,000 ดอลลาร์สหรัฐต่อหนึ่งกิโลกรัม [2, 7]

แหล่งแอสตาแซนทินตามธรรมชาติ ได้แก่ ฟีช จูลินทรีย์ ยีสต์ และจุลสาหร่าย ชนิดหรือสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารแคโรทีนอยด์ทุกชนิดได้ โดยพบว่าจุลสาหร่ายน้ำจืด *Haematococcus pluvialis* มีปริมาณแอสตาแซนทินสูงที่สุด ซึ่งสามารถสะสมแอสตาแซนทินได้สูงสุดถึงร้อยละ 7 โดยน้ำหนักแห้ง [8] ทำให้ในปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* จึงเป็นกระบวนการหลักในการผลิตแอสตาแซนทินธรรมชาติในระดับอุตสาหกรรม [3] ในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายดังกล่าวมี 3 รูปแบบต่างกัน ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ 1) Photo-autotrophic หรือ การเพาะเลี้ยงที่มีสังเคราะห์แสงของจุลคาร์บอนด้วยตัวเอง ซึ่งในรูปแบบนี้จะมีการให้แสงและแหล่งไนโตรเจนเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์แสงของจุลสาหร่ายและสร้างแหล่งคาร์บอนใช้ในเมตาบอลิซึม 2) Heterotrophic หรือ การเพาะเลี้ยงที่การให้แหล่งอาหารทั้งไนโตรเจนและคาร์บอน และ 3) Mixotrophic หรือ การเพาะเลี้ยงที่ผสมรูปแบบทั้งสองรูปแบบ

ข้างต้น [9–11] อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* แบบ photo-autotrophic ยังเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการผลิตแอสตาแซนทินระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากมีต้นทุนต่ำและมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นต่ำกว่ารูปแบบอื่นๆ [3]

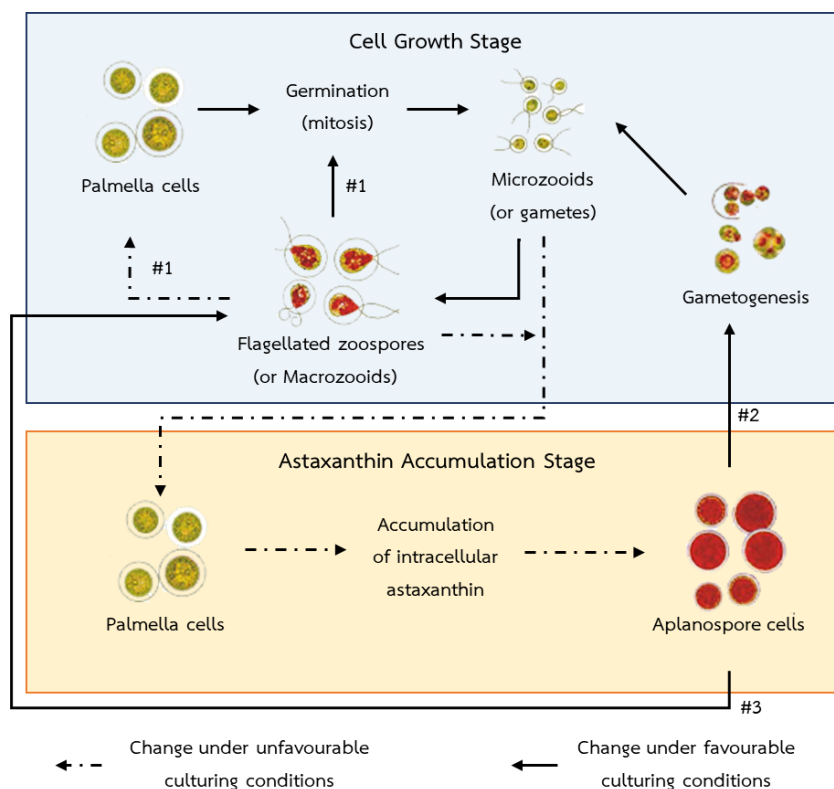


รูปที่ 1 ชนิดเซลล์แบ่งตามระยะในวงจรชีวิตของจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* (A) zoospore (หรือ macrozooid) และ microzooid; (B) early stage palmella cell; (C) late stage palmella cell (เริ่มจะมีการสร้างแอสตาแซนทิน); (D) aplanospore cell. เส้นดำ เท่ากับ 10 ไมโครเมตร [3]

กระบวนการสังเคราะห์แอสตาแซนทินเกิดขึ้นภายในเซลล์จุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ซึ่งขึ้นอยู่กับวงจรชีวิตและสภาวะการเพาะเลี้ยง จุลสาหร่ายชนิดนี้จะเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เช่น ปริมาณความเข้มแสง อาหาร แร่ธาตุ อุณหภูมิ ที่เหมาะสม โดยจะเรียกว่า สภาวะ vegetative stage ซึ่งเซลล์จุลสาหร่ายจะมีลักษณะเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 1 (A) เรียกว่า microzooid หรือ zoospore ตามลำดับ เซลล์ทั้งสองชนิดนี้ จะไม่มีการสร้างแอสตาแซนทินแต่จะมีการแบ่งตัวที่รวดเร็ว และสามารถเคลื่อนที่ได้จากแฟลกเจลลา เมื่อเซลล์เหล่านี้อยู่ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ก่อให้เกิดความเครียดแก่เซลล์ เช่น ความเข้มแสงสูงเกินไป อาหารน้อยเกินไป เป็นต้น เซลล์ใน สภาวะ vegetative stage จะเริ่มเปลี่ยนแปลง เป็น early stage palmella cell (รูปที่ 1 (B)) หากสภาวะความเครียดยังคงอยู่ เซลล์จะพัฒนาต่อไปเป็น late stage palmella และ aplanospore cell ดังแสดงในรูปที่ 1 (C) และ (D) ซึ่งจะมีการสร้างแอสตาแซนทินภายในเซลล์ขึ้น [12, 13] จากวงจรชีวิตของของจุลสาหร่ายซึ่งสรุปในรูปที่ 2 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายดังกล่าวจึงต้องมี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell growth stage) และขั้นตอนการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน (astaxanthin accumulation stage) และเป็นแนวทางที่ใช้ในการผลิตแอสตาแซนทินในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจะเห็นว่าการเปลี่ยนจากสภาวะ (ขั้นตอน) แรกสู่สภาวะ (ขั้นตอน) ที่สอง ขึ้นอยู่กับสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ให้

จากปริมาณความต้องการแอสตาแซนทินที่สูงขึ้น การพัฒนาการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายดังกล่าวเพื่อให้ได้แนวทางในการเพิ่มปริมาณการผลิตแอสตาแซนทิน ลดต้นทุนการผลิตของการเพาะเลี้ยงและการทำบริสุทธิ์ จึงเป็นโจทย์ที่สำคัญสำหรับผู้ทำงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมชีวภาพ หนึ่งในข้อจำกัดที่เกิดขึ้น คือ ได้ผลผลิตแอสตาแซนทินต่ำ เนื่องจากเซลล์จุลสาหร่ายมีอัตราการเติบโตที่ต่ำ และอ่อนไหวต่อสภาวะการ

เพาะเลี้ยง ซึ่งกำหนดอัตราการสังเคราะห์ภายในเซลล์ นอกจากนี้ ต้นทุนการทำบริสุทธิ์มีราคาสูง เนื่องจากเซลล์ในสภาวะสังเคราะห์แอสตาแซนทิน มีผนังเซลล์ที่หนาถึง 3 ชั้น ทำให้การทำแห้งและการสกัดทำได้ยาก งานวิจัยที่ผ่านมาโดย Sun และคณะ (2016) เสนอว่าหากทำการสกัดแอสตาแซนทินในสภาวะที่เซลล์มีผนังเซลล์ที่บางลงสามารถเพิ่มผลผลิตแอสตาแซนทินได้ [14] ดังนั้น การศึกษาผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์ในวงจรชีวิต การสังเคราะห์แอสตาแซนทิน และนำข้อมูลที่ได้มาหาสภาวะที่เหมาะสมในระหว่างการเพาะเลี้ยง จึงเป็นองค์ความรู้ที่นำไปสู่แนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแอสตาแซนทินในระดับอุตสาหกรรมได้ในที่สุด



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ซึ่งมี 2 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell growth stage) และขั้นการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน (astaxanthin accumulation stage) โดยเส้นประ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์ภายใต้สภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียด และเส้นทึบ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์ภายใต้สภาวะที่ไม่ก่อให้เกิดความเครียดแก่เซลล์จุลสาหร่าย (รูปเซลล์สาหร่ายดัดแปลงจาก [15])

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่ายังมีหลายด้านที่ต้องการการศึกษาเพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* สำหรับการผลิตแอสตาแซนทิน แม้ว่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับวงจรชีวิตของจุล

สำหรับตัวอย่างกว้างขวาง ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงชนิดของเซลล์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างระดับโมเลกุลของเซลล์รวมไปถึงกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงในวงจรชีวิต อย่างไรก็ตาม จลนพลศาสตร์ของการเปลี่ยนแปลงวงจรชีวิตต่อสิ่งเร้าหรือตัวกระตุ้น และระดับของผลกระทบจากสิ่งเร้าหรือตัวกระตุ้นซึ่งในที่นี้คือสภาวะการเพาะเลี้ยง ยังไม่มีการศึกษามากนัก ซึ่งเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญต่อการปรับปรุงพัฒนาเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อการผลิตแอสตาแซนทิน เช่น การศึกษาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มจำนวนเซลล์และเพิ่มการสังเคราะห์แอสตาแซนทินภายในเซลล์เป็นต้น การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเปลี่ยนแปลงวงจรชีวิตสามารถทำได้ จากทั้งการทำการทดลองและการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ มีหลายงานวิจัยได้นำเสนอแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* อย่างไรก็ตาม แบบจำลองที่มีอยู่ส่วนใหญ่ไม่ได้สนใจการเปลี่ยนแปลงในวงจรชีวิตมากนักและมักเป็นแบบจำลองที่ไม่สะท้อนซึ่งกลไกภายในเซลล์เท่าที่ควร ดังนั้นการนำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เหล่านี้ ไปใช้เพื่อศึกษาสภาวะในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อการผลิตแอสตาแซนทินจึงค่อนข้างจำกัด

ในงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ดังต่อไปนี้ เพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเปลี่ยนแปลงในวงจรชีวิตของจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*

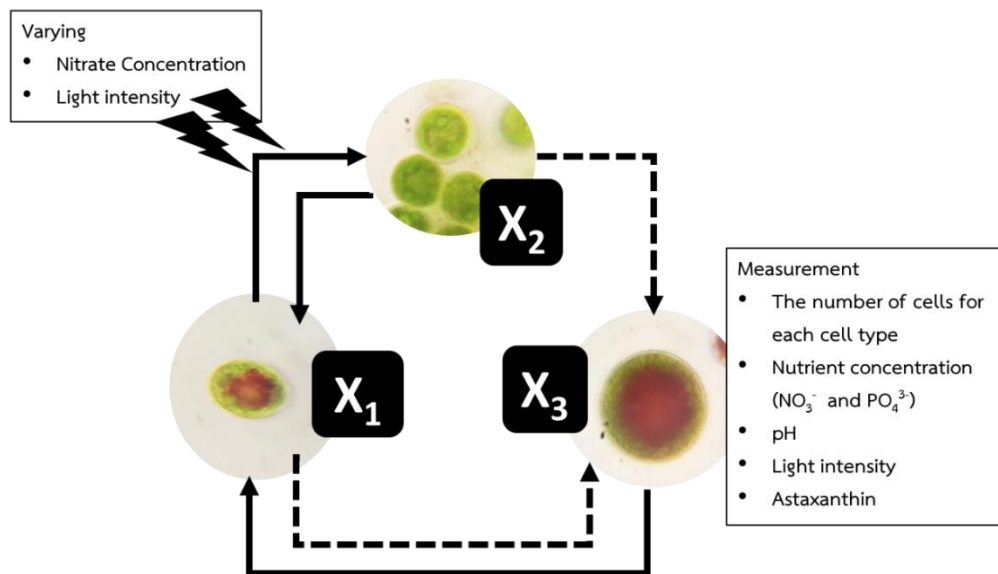
- นำเสนอแผนงานซึ่งจะนำไปสู่การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เพื่อการผลิตแอสตาแซนทินอย่างเป็นระบบ
- ทำการทดลองที่จำเป็นต่อประเมินผลกระทบของปัจจัยสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ส่งผลต่อวงจรชีวิตของจุลสาหร่ายและการสังเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระแอสตาแซนทินในเชิงจลนพลศาสตร์
- สร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สามารถอธิบายและทำนายการเจริญเติบโตของเซลล์และจลนพลศาสตร์การเปลี่ยนแปลงในวงจรชีวิตของเซลล์จุลสาหร่ายเทียบกับสภาวะการเพาะเลี้ยงที่สนใจโดยใช้หลักการ first-principles และ experimental observation
- วิเคราะห์แบบจำลองที่ได้เพื่อที่จะปรับปรุงแบบจำลองให้ดีขึ้น
- สอบเทียบผลที่ได้จากแบบจำลองกับผลจากการทดลองโดยการทำ model validation

3. การดำเนินงานวิจัย

3.1. การทดลอง

แผนงานสำหรับการทดลองเพื่อศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อการเปลี่ยนแปลงวงจรชีวิตของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* แสดงในรูปที่ 3 โดยสภาวะการเพาะเลี้ยงที่สนใจในงานวิจัยนี้ ได้แก่ 1) ความเข้มข้นของไนเตรตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนของเซลล์จุลสาหร่ายและ 2) ความเข้มข้นของแสง การ

เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในการทดลองจะกระทำภายใต้ระดับของสภาวะการเพาะเลี้ยงดังกล่าวที่แตกต่างกัน และเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผลกระทบที่เกิดขึ้น



รูปที่ 3 แผนการทำการทดลองเพื่อศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ความเข้มข้นของไนเตรต และความเข้มแสง ต่อวงจรชีวิตของจุลสาหร่าย โดยที่ X₁ คือ motile cells ซึ่งมักจะเป็น zoospore, X₂ คือ non-motile vegetative cells ซึ่งมักจะเป็น palmella cell และ X₃ คือ aplanospore cells โดยเส้นประแสดงการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์ภายใต้สภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียด และเส้นทึบ แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์ภายใต้สภาวะที่ไม่ก่อให้เกิดความเครียดแก่เซลล์จุลสาหร่าย

เก็บตัวอย่างเป็นประจำอย่างน้อยทุก 24 ชั่วโมง และถี่มากขึ้นหากต้องการเห็นผลกระทบเชิง จลนพลศาสตร์ จากนั้นจะนำตัวอย่างไปวิเคราะห์เพื่อหา 1) จำนวนเซลล์ต่อปริมาตรของรูปแบบเซลล์แต่ละ ชนิดในวงจรชีวิต 2) ความเข้มข้นสารอาหารที่เหลือ ได้แก่ ไนเตรต ฟอสเฟตและพีเอช 3) ปริมาณการ สังเคราะห์แอสตาแซนทิน

3.1.1. การศึกษาผลกระทบของความเข้มแสงต่อวงจรชีวิตและการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน

ใช้ระดับความเข้มแสงสำหรับการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันเพื่อศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้น โดยในระยะ การเจริญเติบโต (120 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง) ใช้ความเข้มแสง เท่ากับ 21.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ จากนั้น จะ เปลี่ยนความเข้มแสงเป็น 21.9, 87.6, 175.2 และ 262.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของชนิด เซลล์ในวงจรชีวิต การบริโภคแหล่งไนโตรเจนหรือไนเตรต และการสังเคราะห์แอสตาแซนทินภายในเซลล์ จากการเก็บตัวอย่างและนำไปวิเคราะห์

3.1.2. การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อวงจรชีวิตและการสังเคราะห์ แอสตาแซนทิน

เปลี่ยนปริมาณสารอาหารไนเตรตเพื่อให้เห็นผลกระทบต่อวงจรชีวิตและการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน โดยทำการเปลี่ยนระดับความเข้มข้นไนเตรตที่แตกต่างกัน ได้แก่ 40, 80, และ 120 mg L⁻¹ หลังจากการเพาะเลี้ยงไปแล้ว 96 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของชนิดเซลล์ในวงจรชีวิต การบริโภคแหล่งไนโตรเจนหรือไนเตรต และการสังเคราะห์แอสตาแซนทินภายในเซลล์ จากการเก็บตัวอย่างและนำไปวิเคราะห์ เมื่อครบระยะเวลา 5 วันหรือ 120 ชั่วโมงแล้ว ทำการเติมไนเตรตกลับเข้าสู่การเพาะเลี้ยงให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 750 mg L⁻¹ เก็บตัวอย่างและนำไปวิเคราะห์ เช่นเดียวกัน

3.1.3. วิธีทดลองและวิธีการวิเคราะห์

- การเพิ่มจำนวนเซลล์บนอาหารแข็ง

ทำการเตรียมอาหาร BG-11 (สูตรอาหารแสดงในภาคผนวก ตารางที่ ก-1) ผสมกับผงวุ้นเทลงในหลอดแก้วประมาณ 5 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งแบบบอไอน้ำ จากนั้นนำมาพันพาราฟิล์มแล้ววางหลอดแก้วให้เอียง ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารแข็ง (slant agar) เก็บอาหารแช่ในตู้บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 คืน แล้วทำการเชื่อมต่อสายร่ายลงบนอาหารแข็ง (slant agar) และทำการถ่ายเชื้อลงหลอดแก้วใหม่ทุก 1 เดือน

- การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเซลล์สายร่ายจากอาหารแข็งลงอาหารเหลว BG-11 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 7 วัน แล้วถ่ายเชื้อลงขวดเพาะเลี้ยงขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ เลี้ยงที่ความเข้มแสง 21.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อัตราการให้อากาศ 1 vvm (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเหลวต่อวินาที) ซึ่งมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็น 1 % ของปริมาณอากาศที่ให้ แล้วทำการขยายขนาดขวดที่ทำการเพาะเลี้ยง ก่อนนำไปทดลองต่อไป

- การเพาะเลี้ยงเซลล์สายร่าย *H. pluvialis* ในการทดลอง

ในการทดลองนี้ทำการเลี้ยงสายร่ายลงขวดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด สำหรับการศึกษาผลกระทบของความเข้มแสง และ 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด สำหรับการศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และโดยใส่หัวเชื้อ ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น $4 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ ในอาหารเหลว BG-11 แล้วให้ความเข้มแสงเริ่มต้นคงที่ 21.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ให้อากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 1 VVM จากนั้นทำการทดลองตามหัวข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 โดยสำหรับการศึกษาผลกระทบของความเข้มแสง หลังจากกระตุ้นด้วยความเข้มแสงที่เปลี่ยนไปแล้ว เก็บตัวอย่างทุกวัน วันละ 6 มิลลิลิตร แล้วทำการวัดความเข้มข้นของ

เซลล์ชนิดต่างๆ ปริมาณไนเตรต ปริมาณฟอสเฟต ความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณแอสตาแซนธิน จนกระทั่งครบเวลาการเพาะเลี้ยง 200 ชั่วโมง และสำหรับการศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนหลังจากเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรตแล้ว ทำการเก็บตัวอย่างปริมาณ 4 มิลลิลิตร ทุกๆ 4 ชั่วโมงใน 16 ชั่วโมงแรก จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 68 ชั่วโมง ทำการวัดความเข้มข้นเซลล์ ปริมาณไนเตรต ปริมาณฟอสเฟต ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณแอสตาแซนธินและสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา เมื่อครบระยะเวลา 5 วันหรือ 120 ชั่วโมงและทำการเติมไนเตรตกลับเข้าสู่การเพาะเลี้ยงให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 750 mg L^{-1} ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วัน ทำการวัดความเข้มข้นเซลล์ ปริมาณไนเตรต ปริมาณฟอสเฟต ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณแอสตาแซนธิน และสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา

- การวัดความเข้มข้นของเซลล์ชนิดต่างๆ ในวงจรชีวิตของ *H. pluvialis*

นำตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร จำแนกชนิดเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 3 ได้แก่ เซลล์ที่เคลื่อนที่ได้ X_1 (motile cells) เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว X_2 (non-motile vegetative cells หรือ palmelloid cells) และเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดง X_3 (non-motile aplanospore cells หรือ cyst cells) โดยการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์และนับจำนวนโดยใช้เครื่องนับเซลล์ (haemocytometer) และคำนวณดังสมการด้านล่าง

ความหนาแน่นเซลล์ (cell mL^{-1}) = (จำนวนเซลล์ x dilute factor x 10^4) / (จำนวนช่องที่นับ)

- การวัดความเข้มข้นของไนเตรต (NO_3^-)

วิธีการวัดความเข้มข้นของไนเตรต (NO_3^-) ดำเนินการตามวิธีการนำเสนอโดย Armstrong และคณะ (1963) [16] นำตัวอย่างหรือสารละลายเจือจางสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน 100 ไมโครลิตร ผสมไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 4,000 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 220 และ 275 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร จะแสดงถึงสารเจือปนอื่นๆ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 220 นาโนเมตรมาหักลบค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร แล้วนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของไนเตรตในตัวอย่าง

- การวัดความเข้มข้นของฟอสเฟต (PO_4^{2-})

วิธีการวัดฟอสเฟตดัดแปลงจากวิธีการที่นำเสนอโดย Kitson และคณะ (1944) [17] เริ่มจากเตรียมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 12.5 กรัม ละลายน้ำ 100 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายแอมโมเนียมเมตาวานาเดต (NH_4VO_3) 0.3 กรัม ละลายในน้ำ 200 มิลลิลิตร ผสมสารละลายดังกล่าว จากนั้นเติมกรดไนตริกเจือจาง (HNO_3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงไปและปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร นำตัวอย่างหรือสารละลายเจือจางสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมกับรี

เอเจนท์ที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 4,000 ไมโครลิตร นำของผสมที่ได้ไป วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร บันทึกค่าที่วัดได้เพื่อนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานฟอสเฟต

- การวัดความเข้มข้นแอสตาแซนทินภายในเซลล์

นำตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่มีส่วนใส เก็บตะกอนเซลล์ จากนั้นเติมอะซิโตนปริมาตร 2 มิลลิลิตร บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำการเก็บส่วนใสรอบแรก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำการเก็บส่วนใสรอบที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำส่วนใสทั้ง 2 รอบ มาผสมกันเพื่อให้ได้ส่วนใสสำหรับนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นแอสตาแซนทินด้วย High-performance liquid chromatography (HPLC) โดยฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าสู่คอลัมน์ C18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้ 35% methanol ใน acetonitrile เป็น mobile phase ที่อัตราการไหล 1.0 ml min^{-1} วัด elution ที่ความยาวคลื่น 476 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานและคำนวณความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน

3.2. แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของวงจรชีวิตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*

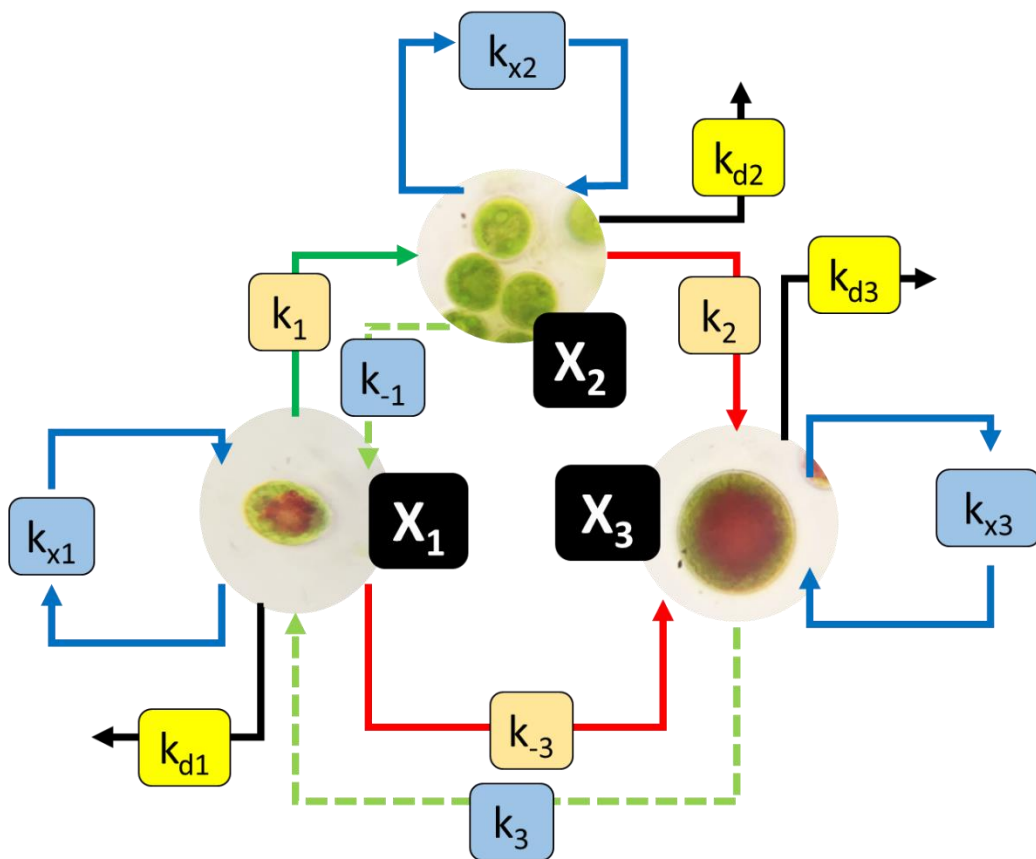
แบบจำลองทางคณิตศาสตร์จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของชนิดของเซลล์ในวงจรชีวิตต่อสภาวะการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ความเข้มแสงและความเข้มข้นของไนเตรต และการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน แบบจำลองดังกล่าวจะมาจากสมการทางคณิตศาสตร์จากการศึกษาที่ผ่านมา และนำมาดัดแปลงให้สอดคล้องกับการศึกษานี้ การสร้างแบบจำลอง แสดงผลจากแบบจำลองและตรวจสอบผลจากแบบจำลองกับผลการทดลอง จะกระทำการโปรแกรม COPASI ซึ่งเป็นโปรแกรมสำหรับจำลองเหตุการณ์ทางชีวเคมี ที่ไม่เรียกเก็บค่าใช้จ่ายใดๆ

ในการศึกษานี้ จะสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ตามแผนผังการเปลี่ยนแปลงในวงจรชีวิตจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *H. pluvialis* ตามสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งมีที่มาจากผลการทดลองในการศึกษานี้และการศึกษาที่ผ่านมา โดยพบว่าวงจรชีวิตจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *H. pluvialis* ประกอบไปด้วยรูปแบบเซลล์ของจุลสาหร่าย 3 ชนิดหลัก ได้แก่ motile cells (X_1), non-motile vegetative cells (X_2) และ aplanospore cells (X_3) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเซลล์ดังกล่าว ขึ้นอยู่กับระดับของสภาวะแวดล้อม ได้แก่ ความเข้มแสงและความเข้มข้นของไนเตรต

จากรูปที่ 4 อัตราการเปลี่ยนรูปแบบของเซลล์ในวงจรชีวิตจะแทนด้วยตัวแปร k ซึ่ง k_1 และ k_{-1} แสดงถึงอัตราการเปลี่ยนจาก motile cells (X_1) ไปเป็น non-motile vegetative cells (X_2) และอัตราย้อนกลับ

ตามลำดับ (hr^{-1}), k_2 คือ อัตราการเปลี่ยนจาก non-motile vegetative cells (X_2) ไปเป็น aplanospore cells (X_3) ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงย้อนกลับ (hr^{-1}), และ k_3 และ k_{-3} แสดงถึงอัตราการเปลี่ยนจาก aplanospore cells (X_3) ไปเป็น motile cells (X_1) และอัตราย้อนกลับ ตามลำดับ (hr^{-1})

ดังที่กล่าวข้างต้น อัตราการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์ในวงจรชีวิตเหล่านี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นแสงและความเข้มข้นของไนเตรต ดังนั้น สมการทางคณิตศาสตร์แสดงอัตราการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์เหล่านี้จึงเป็นความสัมพันธ์ของระดับความเข้มข้นแสงที่ให้แก่เซลล์จุลสาหร่าย (I , $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) และความเข้มข้นไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยง (N , mg/L), และอัตราการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์ต่างๆ ดังกล่าว (k_1, k_{-1}, k_2, k_3 , และ k_{-3}) ในการศึกษาได้นำรูปแบบของความสัมพันธ์ตามที่ได้นำเสนอในงานวิจัยของ Monod [18], Hill [19] และ Haldane [20] มาดัดแปลงให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงเซลล์ภายในวงจรชีวิตของจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *H. pluvialis* ดังแสดงในสมการที่ 1-5



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงชนิดเซลล์ภายในวงจรชีวิตจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *H. pluvialis* สำหรับการ
สร้างแบบจำลองในการศึกษานี้

$$k_1 = V_{\max_k1} \cdot \frac{I^*}{I^* + K_{X1}k1 + \frac{(I^*)^2}{K_{I_X1}k1}} \cdot \frac{(N - N_{\min, I})}{(N - N_{\min, I}) + K_{XN}k1} \quad (1)$$

$$k_{-1} = V_{\max_k-1} \cdot \frac{I^*}{I^* + K_{Xl_{k-1}} + \frac{(I^*)^2}{K_{i_Xl_{k-1}}}} \cdot \frac{(N-N_{\min, I})^{1.38}}{(N-N_{\min, I})^{1.38} + K_{XN_{k-1}}^{1.38}} \quad (2)$$

$$k_2 = V_{\max_k2} \cdot \frac{(I^*)^4 \cdot \left(1 + \frac{b \cdot (N-N_{\min, I})}{a \cdot K_{ms}}\right)}{(I^*)^4 \cdot \left(1 + \frac{(N-N_{\min, I})}{K_{ms}}\right) + (K_{Xl_{k2}})^4 \cdot \left(1 + \frac{(N-N_{\min, I})}{a \cdot K_{ms}}\right)} \cdot \frac{K_{XN_{k2}}}{(N-N_{\min}) + K_{XN_{k2}}} \quad (3)$$

$$k_3 = V_{\max_k3} \cdot \frac{K_{Xl_{k3}}}{I^* + K_{Xl_{k3}}} \cdot \frac{(N-N_{\min, I})}{(N-N_{\min, I}) + K_{XN_{k3}}} \quad (4)$$

$$k_{-3} = V_{\max_k-3} \cdot \frac{I^*}{I^* + K_{Xl_{k-3}}} \cdot \frac{K_{XN_{k-3}}}{(N-N_{\min, I}) + K_{XN_{k-3}}} \quad (5)$$

โดยที่

$V_{\max_k1}, V_{\max_k-1}, V_{\max_k2}, V_{\max_k3},$ และ $V_{\max_k-3}$	คือ อัตราการการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์สูงสุดจากเซลล์ X_1 เป็น X_2 , จากเซลล์ X_2 เป็น X_1 , จากเซลล์ X_2 เป็น X_3 , จากเซลล์ X_3 เป็น X_1 , และ จากเซลล์ X_1 เป็น X_3 , ตามลำดับ (hr^{-1})
$K_{Xl_{k1}}, K_{Xl_{k-1}}, K_{Xl_{k2}}, K_{Xl_{k3}},$ และ $K_{Xl_{k-3}}$	คือ ค่าคงที่ผลกระทบของความเข้มข้นต่ออัตราการการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์ $k_1, k_{-1}, k_2, k_3,$ และ k_{-3} , ตามลำดับ ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$)
$K_{XN_{k1}}, K_{XN_{k-1}}, K_{XN_{k2}}, K_{XN_{k3}},$ และ $K_{XN_{k-3}}$	คือ ค่าคงที่ผลกระทบของความเข้มข้นไนโตรเจนต่ออัตราการการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์ $k_1, k_{-1}, k_2, k_3,$ และ k_{-3} , ตามลำดับ ($mg.L^{-1}$)
$K_{i_Xl_{k1}}$ และ $K_{i_Xl_{k-1}}$	คือ ค่าคงที่ผลยับยั้งของความเข้มข้นต่ออัตราการการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์ k_1 และ k_{-1} , ตามลำดับ ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$)
$N_{\min, I}$	คือ ระดับฐานของปริมาณไนโตรเจนตามความเข้มข้นที่ใช้ ($mg.L^{-1}$)
a, b, K_{ms}	คือ ค่าคงที่ไฮเปอร์บอลิคสำหรับผลกระทบของความเข้มข้นต่ออัตราการการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์ k_2 โดยที่ a และ b ไม่มีหน่วย และ K_{ms} มีหน่วยเป็น $mg.L^{-1}$
I^*	คือ ความเข้มข้นที่ใช้เทียบกับความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ที่ $21.9 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ โดยที่ $I^* = I/21.9$

จากรูปที่ 4 นอกจากอัตราการการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์เหล่านี้แล้ว ยังพบว่าเซลล์แต่ละชนิด (X_1 , X_2 , และ X_3) มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนผ่านกระบวนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยอัตราการเพิ่มจำนวน

ของเซลล์แต่ละชนิดนี้ แทนด้วย k_{X1} , k_{X2} , และ k_{X3} ตามลำดับ ซึ่งอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ดังกล่าวขึ้นอยู่กับสถานะแวดล้อมที่ให้แก่เซลล์ ได้แก่ ความเข้มแสงและความเข้มข้นของไนเตรต และแสดงความสัมพันธ์ด้วยสมการ ของ Monod และ Haldane เช่นเดียวกับอัตราการการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์ข้างต้น ดังแสดงในสมการที่ 6-8

$$k_{X1} = V_{\max_kX1} \cdot \frac{I^*}{I^* + K_{XI_kX1} + \frac{(I^*)^2}{K_{I_XI_kX1}}} \cdot \frac{(N - N_{\min, I})}{(N - N_{\min, I}) + K_{XN_kX1}} \quad (6)$$

$$k_{X2} = V_{\max_kX2} \cdot \frac{I^*}{I^* + K_{XI_kX2} + \frac{(I^*)^2}{K_{I_XI_kX2}}} \cdot \frac{(N - N_{\min, I})}{(N - N_{\min, I}) + K_{XN_kX2}} \quad (7)$$

$$k_{X3} = V_{\max_kX3} \cdot \frac{K_{XI_kX3}}{I^* + K_{XI_kX3}} \cdot \frac{(N - N_{\min, I})}{(N - N_{\min, I}) + K_{XN_kX3}} \quad (8)$$

โดยที่

$V_{\max_kX1}$, $V_{\max_kX2}$, และ $V_{\max_kX3}$	คือ	อัตราการการเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุดด้วยการแบ่งตัวเองแบบไม่อาศัยเพศของเซลล์ X_1 , X_2 , และ X_3 ตามลำดับ (hr^{-1})
K_{XI_kX1} , K_{XI_kX2} , และ K_{XI_kX3}	คือ	ค่าคงที่ผลกระทบของความเข้มแสงต่ออัตราการการเพิ่มจำนวนเซลล์ k_{X1} , k_{X2} , และ k_{X3} ตามลำดับ ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
K_{XN_kX1} , K_{XN_kX2} , และ K_{XN_kX3}	คือ	ค่าคงที่ผลกระทบของความเข้มข้นไนเตรตต่ออัตราการการเพิ่มจำนวนเซลล์ k_{X1} , k_{X2} , และ k_{X3} ตามลำดับ (mg.L^{-1})
$K_{I_XI_kX1}$ และ $K_{I_XI_kX2}$	คือ	ค่าคงที่ผลยับยั้งของความเข้มแสงต่ออัตราการการเพิ่มจำนวนเซลล์ k_{X1} และ k_{X2} ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

นอกจากนี้ ดังแสดงในรูปที่ 4 เซลล์แต่ละชนิด (X_1 , X_2 , และ X_3) เกิดการตายขึ้น โดยให้ k_{dX1} , k_{dX2} , และ k_{dX3} แทนอัตราการตายของเซลล์ X_1 , X_2 , และ X_3 ตามลำดับ ซึ่งมีหน่วยเป็น hr^{-1}

จากรูปที่ 4 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์จะมาจากความสัมพันธ์เชิงสมมูลมวลสาร โดยมีสมการทางคณิตศาสตร์ ดังแสดงในสมการต่อไป

สมมูลมวลสารของเซลล์ motile cells หรือ X_1 ในสมการที่ (9)

$$\frac{d(VX_1)}{dt} = (-k_1X_1 + m_{X_2}k_{-1}X_2 - k_{-3}X_1 + m_{X_3}k_3X_3 + S_{X_1}k_{X1}X_1 - k_{dX1}X_1)V \quad (9)$$

สมดุลมวลสารของเซลล์ non-motile vegetative cells หรือ X_2 ในสมการที่ (10)

$$\frac{d(VX_2)}{dt} = (k_1X_1 - k_{-1}X_2 - k_2X_2 + S_{X_2}k_{X2}X_2 - k_{dX2}X_2)V \quad (10)$$

สมดุลมวลสารของเซลล์ aplanospore cells หรือ X_3 ในสมการที่ (11)

$$\frac{d(VX_3)}{dt} = (k_2X_2 + k_{-3}X_1 - k_3X_3 + S_{X_3}k_{X3}X_3 - k_{dX3}X_3)V \quad (11)$$

โดยที่

V	คือ ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับในระบบเพาะเลี้ยง (L)
m_{X_2} และ m_{X_3}	คือ สัมประสิทธิ์จำนวนเซลล์ X_1 ที่เกิดขึ้นจากการแบ่งตัวจากเซลล์ X_2 และ X_3 ตามลำดับ
S_{X_1} , S_{X_2} , และ S_{X_3}	คือ สัมประสิทธิ์จำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้นจากการแบ่งตัวของเซลล์ X_1 , X_2 และ X_3 ตามลำดับ

นอกจากสมดุลมวลสารของเซลล์แล้ว แบบจำลองยังอธิบายการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้น ความเข้มข้นของไนเตรตและการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (แอสตาแซนทิน) โดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์ดังต่อไปนี้

สมการอธิบายความเข้มข้นที่เซลล์ได้รับโดยดัดแปลงสมการความเข้มข้นของ Beer-Lambert [21]

$$I = I_0 \exp\left(-\frac{z_1 X_{tot} l}{z_2 + X_{tot}}\right) \quad (12)$$

สมการสมดุลมวลสารของไนเตรต

$$\frac{d(VN)}{dt} = (-Q_{N/X_1} VX_1 - Q_{N/X_2} VX_2 - \frac{1}{Y_{P/N}} \frac{d(VP)}{dt}) \frac{I^{0.5} N}{K_{N, min} K_{NI} + (K_{NI} + N) I^{0.5}} \left(1 - \frac{K_{N, min}}{N}\right) \quad (13)$$

สมการสมดุลมวลสารของแอสตาแซนทิน

$$\frac{d(VP)}{dt} = \frac{1}{Y_{P/X_3}} \frac{d(VX_3)}{dt} + Q_P VX_3 \quad (14)$$

โดยที่

I_0	คือ	ความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสงซึ่งในงานวิจัยนี้ ได้แก่ 21.9, 87.6 และ 175.2 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Z_1 และ Z_2	คือ	สัมประสิทธิ์ของการดูดซับแสงของเซลล์ (m^{-1}) และผลกระทบของความเข้มข้นของเซลล์ต่อความเข้มแสง (cell mL^{-1}) ตามลำดับ
X_{gtot}	คือ	ความเข้มข้นของเซลล์รวมทุกชนิดเซลล์ (mg.L^{-1})
l	คือ	ระยะทางเฉลี่ยระหว่างแหล่งกำเนิดแสงและเซลล์ในระบบ (m)
N และ P	คือ	ความเข้มข้นของไนเตรตในอาหารเลี้ยง (mg.L^{-1}) และความเข้มข้นของแอสตาแซนทีนภายในเซลล์รวม (mg.L^{-1}) ตามลำดับ
Q_{N/X_1} และ Q_{N/X_2}	คือ	อัตราการบริโภคไนเตรตจำเพาะของเซลล์ X_1 และ X_2 ($\text{mg L}^{-1} \text{ cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
$Y_{P/N}$ และ Y_{P/X_3}	คือ	สัมประสิทธิ์ผลผลิตของแอสตาแซนทีน (mg mg^{-1}) ต่อการใช้ไนเตรต และสัมประสิทธิ์ผลผลิตของแอสตาแซนทีนต่อปริมาณเซลล์ X_3 (mg cell^{-1})
$K_{N, \min}$ และ K_{NI}	คือ	ค่าคงที่ของความเข้มข้นไนเตรตที่น้อยที่สุดในระบบ (mg.L^{-1}) และค่าคงที่ของยับยั้งอัตราการใช้นิเตรตจากความเข้มข้นแสง (mg.L^{-1})
Q_p	คือ	อัตราการสังเคราะห์แอสตาแซนทีนจำเพาะจากเซลล์ X_3 ($\text{mg cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

จากสมการทั้งหมด (1)-(14) มีจำนวนค่าคงที่หรือพารามิเตอร์ทั้งหมด 48 พารามิเตอร์ โดยค่าของพารามิเตอร์ประมาณได้จากโมดูล Parameter Estimation ใน COPASI ซึ่งเป็นเทียบผลที่ได้จากแบบจำลองกับผลที่ได้จากการทดลอง ซึ่งความแตกต่างหรือค่าความคลาดเคลื่อนระหว่างผลทั้งสองต้องมีค่าน้อยที่สุด ดังแสดงในสมการที่ (15)

$$O(p) = \sum_i \sum_j \sum_k \frac{(X_{k,i,j} - Y_{k,i,j}(p))^2}{X_{k,i,j}} \quad (15)$$

โดยที่ $X_{k,i,j}$ คือ ผลการทดลอง, $Y_{k,i,j}$ คือ ผลจากแบบจำลอง, p คือ เวกเตอร์ของตัวแปรแบบจำลอง, i คือ จำนวนการทดลอง, j คือ จำนวนตัวแปรสถานะ และ k คือ จำนวนข้อมูลของการทดลอง

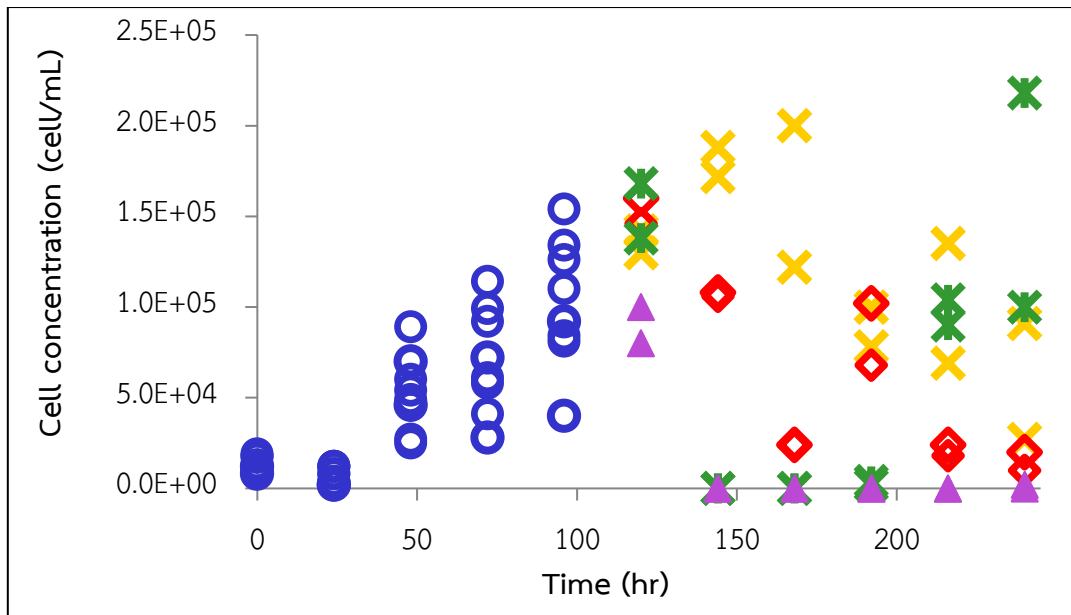
4. ผลงานวิจัย

4.1 ผลการทดลองการศึกษาผลกระทบของความเข้มแสงต่อการดำเนินวงจรชีวิตจุลสาหร่าย

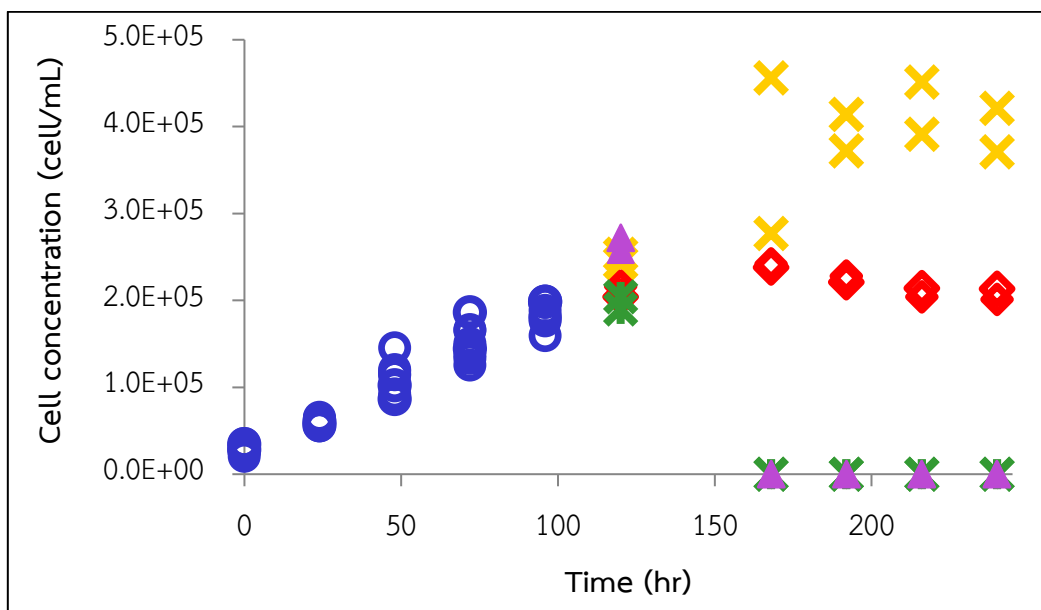
การศึกษาผลกระทบของความเข้มแสงต่อการดำเนินวงจรชีวิตจุลสาหร่าย *H. pluvialis* กระทำโดยเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายดังกล่าวในอาหารเลี้ยง BG-11 ความเข้มข้นของไนเตรตเริ่มต้น 750 mg L^{-1} ให้อากาศที่ประกอบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 1% ที่อัตราการไหล 1 VVM ในระยะแรกเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงปกติที่ $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นจึงเปลี่ยนแปลงความเข้มแสง ได้แก่ 1) 21.9, 2) 87.6, 3) 175.2, และ 4) $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ เพื่อศึกษาการดำเนินไปของวงจรชีวิตจุลสาหร่ายและการสังเคราะห์แอสตาแซนทีน

4.1.1 ผลของความเข้มแสงต่อเซลล์จุลสาหร่ายในวงจรชีวิต

จากรูปที่ 3 การศึกษาสนใจชนิดของเซลล์ทั้งหมด 3 ชนิดในวงจรชีวิตของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ได้แก่ X_1 คือ motile cells, X_2 คือ non-motile vegetative cells และ X_3 คือ aplanospore cells จากผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5-7 พบว่า ใน 5 วันของการเพาะเลี้ยง พบเซลล์ 2 ชนิด คือ motile cells (X_1) และ non-motile vegetative cells (X_2) ซึ่งเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่อง ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นของเซลล์ X_1 อยู่ที่ประมาณ $80,000\text{--}160,000 \text{ cell mL}^{-1}$ (รูปที่ 5) ขณะที่ความเข้มข้นของเซลล์ X_2 อยู่ที่ประมาณ $200,000\text{--}270,000 \text{ cell mL}^{-1}$ (รูปที่ 6) แสดงให้เห็นว่า ภายใต้ความเข้มแสงที่ $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ส่งเสริมให้วงจรชีวิตของเซลล์สาหร่ายอยู่ในระยะเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่ใช้ความเข้มแสงคงที่ ที่ $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ พบว่าจำนวนเซลล์ X_1 เริ่มลดลงในช่วงวันที่ 168 ของการเพาะเลี้ยงพร้อมๆกับการเพิ่มขึ้นของเซลล์ X_2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเริ่มมีปัจจัยที่ยับยั้งระยะการเจริญเติบโตเกิดขึ้น ซึ่งอาจจะมาจากปริมาณอาหารหลัก (ไนเตรต) ที่น้อยลงมากและสาร metabolite ที่อาจเป็นพิษต่อเซลล์เกิดขึ้น

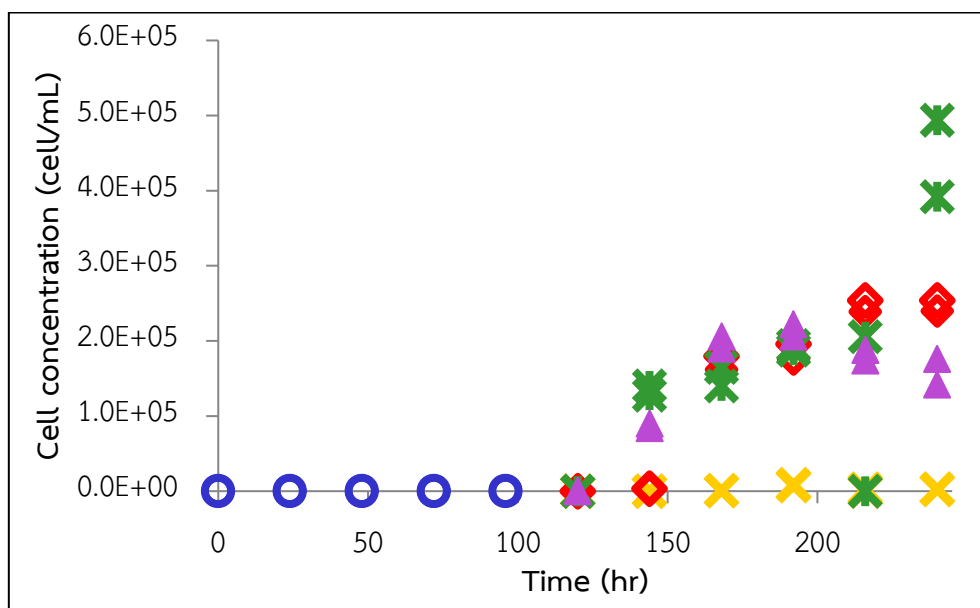


รูปที่ 5 ความเข้มข้นของเซลล์ X1 ที่ความเข้มแสงต่างๆ เมื่อ $\circ$ คือ ที่ความเข้มแสง $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ในช่วง 120 ชั่วโมงแรก, $\times$ คือ ที่ความเข้มแสง $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ หลัง 120 ชั่วโมง, $\diamond$ คือ ที่ความเข้มแสง $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ หลัง 120 ชั่วโมง, $*$ คือ ที่ความเข้มแสง $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ หลัง 120 ชั่วโมง, และ $\blacktriangle$ คือ ที่ความเข้มแสง $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ หลัง 120 ชั่วโมง



รูปที่ 6 ความเข้มข้นของเซลล์ X2 ที่ความเข้มแสงต่างๆ เมื่อ $\circ$ คือ ที่ความเข้มแสง $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ในช่วง 120 ชั่วโมงแรก, $\times$ คือ ที่ความเข้มแสง $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ หลัง 120 ชั่วโมง, $\diamond$ คือ ที่ความเข้มแสง $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ หลัง 120 ชั่วโมง, $*$ คือ ที่ความเข้มแสง $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ หลัง 120 ชั่วโมง, และ $\blacktriangle$ คือ ที่ความเข้มแสง $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ หลัง 120 ชั่วโมง

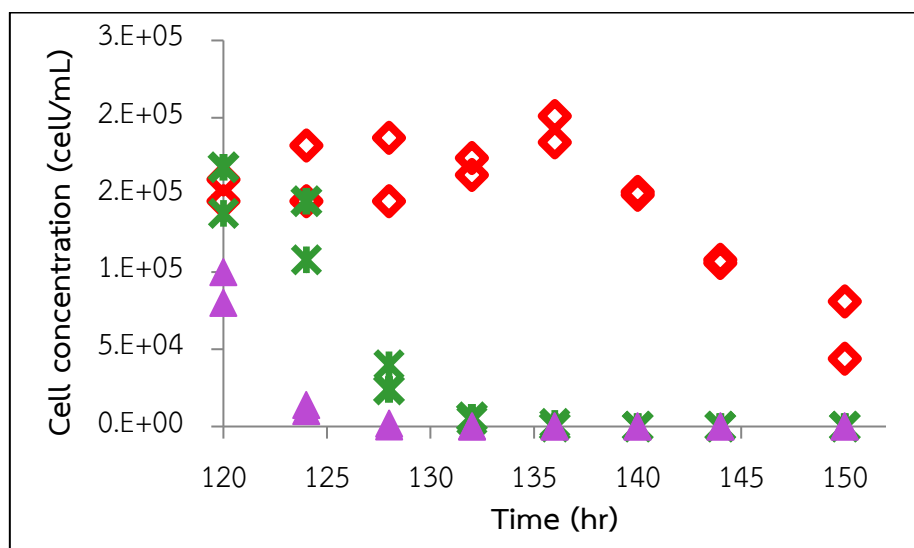
เมื่อเปลี่ยนความเข้มแสงเป็น $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ที่เวลา 120 ชั่วโมง พบว่า เริ่มพบเซลล์ X_3 ที่มีการสะสมแอสตาแซนธินภายในเซลล์ในชั่วโมงที่ 144 และที่เวลา 168 ชั่วโมง เซลล์ X_3 เป็นเซลล์แบบเดียวที่พบในระบบเพาะเลี้ยง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวงจรชีวิตของจุลสาหร่ายอยู่ในระยะสะสมแอสตาแซนธินโดยสภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียดแก่เซลล์ โดยนับเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากเปลี่ยนความเข้มแสงเป็น $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อย่างไรก็ตามหลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสงเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จะพบเซลล์ X_1 ที่มีสีแดงและเริ่มปรากฏสีเขียวภายในเซลล์ ซึ่งเกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์ X_3 สาเหตุที่เป็นไปได้ คือ เซลล์ X_3 เกิดการปรับตัวกับสภาวะความเข้มแสงที่ให้ และเริ่มกลับมาแบ่งตัวเพื่อเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตอีกครั้ง เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงการภายใต้ความเข้มแสงเป็น $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ พบว่ามีเซลล์ X_3 มีสัดส่วน 73.5% และเซลล์ X_1 ที่มีสีแดง เป็น 26.5% ของเซลล์ทั้งหมด และไม่มีเซลล์ X_2 เลย



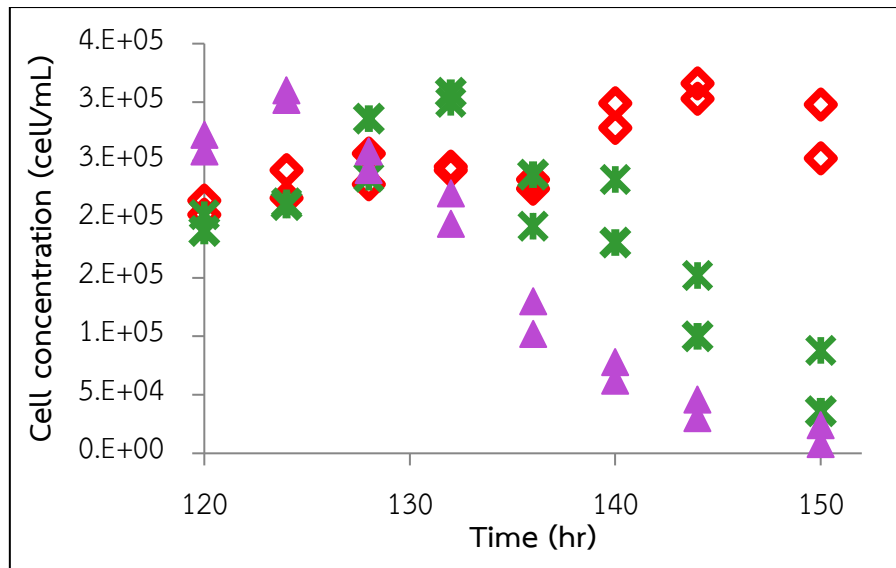
รูปที่ 7 ความเข้มข้นของเซลล์ X_3 ที่ความเข้มแสงต่างๆ เมื่อ $\bigcirc$ คือ ที่ความเข้มแสง $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ในช่วง 120 ชั่วโมงแรก, $\times$ คือ ที่ความเข้มแสง $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ หลัง 120 ชั่วโมง, $\diamond$ คือ ที่ความเข้มแสง $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ หลัง 120 ชั่วโมง, $*$ คือ ที่ความเข้มแสง $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ หลัง 120 ชั่วโมง, และ $\blacktriangle$ คือ ที่ความเข้มแสง $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ หลัง 120 ชั่วโมง

เมื่อเปลี่ยนความเข้มแสงเป็น $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ที่เวลา 120 ชั่วโมง หลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสงแล้ว 24 ชั่วโมง พบว่าไม่พบเซลล์ X_1 และ X_2 พบเพียงแต่เซลล์ X_3 เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของเซลล์รวมทั้งหมดลดลงเนื่องจากเซลล์ตายและพบปริมาณเซลล์ X_3 เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มแสงนี้ ทำให้เซลล์เครียดและสะสมแอสตาแซนธินทันทีและมากขึ้น อย่างไรก็ตาม หลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสงไปแล้ว 96 ชั่วโมง จะพบว่าปริมาณเซลล์ X_3 ลดลงเรื่อยๆ จนจบระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ซึ่งเหลือเพียงเซลล์ X_3 เท่านั้น

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงในวงจรชีวิตของจุลสาหร่ายจากผลของการเปลี่ยนแสงภายใน 30 ชั่วโมงแรก ได้ทำการเก็บตัวอย่างหลังจากเปลี่ยนความเข้มแสงทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างอีกครั้งที่ชั่วโมงที่ 30 จากรูปที่ 8 ซึ่งแสดงเซลล์ X_1 หลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสง พบว่าที่ความเข้มแสง $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ปริมาณเซลล์ X_1 เริ่มลดลงหลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มแสง $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ปริมาณเซลล์ X_1 ลดลงหลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และหลังจากนั้น 20 ชั่วโมง ไม่พบเซลล์ X_1 เหลืออยู่ ($p = 0.0003$) และที่ความเข้มแสง $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ พบว่าเหลือความเข้มข้นของเซลล์ X_1 ประมาณ $10,000 \text{ cell mL}^{-1}$ หลังจากเปลี่ยนความเข้มแสง และไม่พบเซลล์ X_1 เลยหลังจากเปลี่ยนความเข้มแสง 12 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายิ่งความเข้มแสงสูง จะยิ่งมีผลยับยั้งเซลล์ X_1



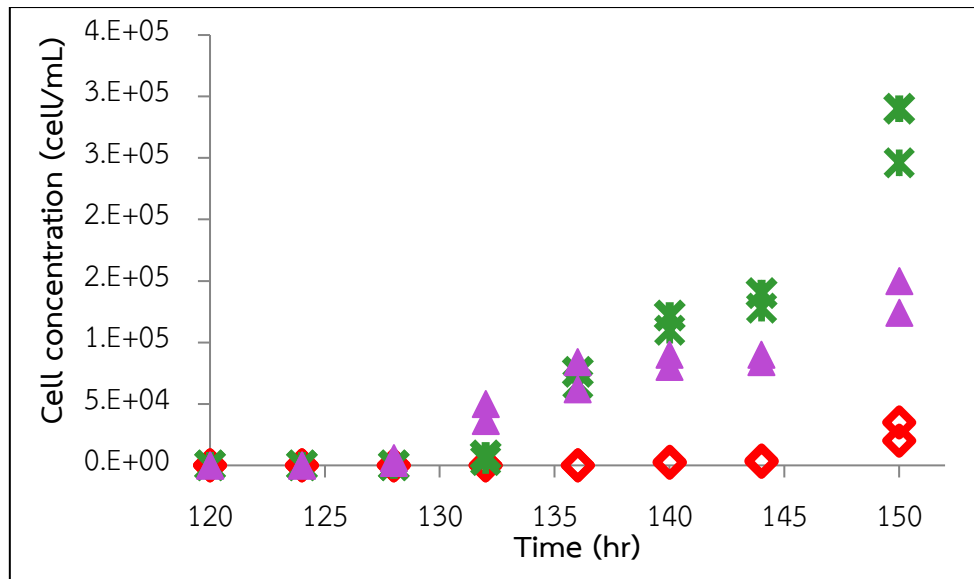
รูปที่ 8 ความเข้มข้นของเซลล์ X_1 เป็นเวลา 30 ชั่วโมงหลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสงที่ 120 ชั่วโมง โดย $\diamond$ คือ ที่ความเข้มแสง $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $*$ คือ ที่ความเข้มแสง $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, และ $\blacktriangle$ คือ ที่ความเข้มแสง $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$



รูปที่ 9 ความเข้มข้นของเซลล์ X_2 เป็นเวลา 30 ชั่วโมงหลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสงที่ 120 โดย $\diamond$ คือ ที่ความเข้มแสง $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $*$ คือ ที่ความเข้มแสง $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, และ $\blacktriangle$ คือ ที่ความเข้มแสง $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

จากรูปที่ 9 เมื่อเปลี่ยนความเข้มแสงเป็น $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ที่ 120 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง เซลล์ X_2 ยังคงเพิ่มจำนวนเป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มคงที่ ในขณะที่เมื่อเปลี่ยนความเข้มแสงเป็น $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เซลล์ X_2 ยังคงเพิ่มจำนวนประมาณ $60,000 \text{ cell mL}^{-1}$ เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์ X_2 ลดลงอย่างต่อเนื่อง และเมื่อเปลี่ยนความเข้มแสงเป็น $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ปริมาณเซลล์ X_2 เริ่มลดลงหลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสงเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

หากพิจารณาเซลล์ X_3 ดังแสดงในรูปที่ 10 พบว่า เมื่อเปลี่ยนความเข้มแสงไปที่ $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ มีปริมาณเซลล์ X_3 มากที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งมากกว่าที่พบที่การเปลี่ยนแปลงความเข้มแสงไปเป็น $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ทั้งนี้เนื่องจากการตายของเซลล์เกิดขึ้นซึ่งอาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของแสงที่สูงเกินไป อย่างไรก็ตามทั้งสองสภาวะดังกล่าว ให้ปริมาณเซลล์ X_3 สูงกว่าในสภาวะที่เปลี่ยนความเข้มแสงไปเป็น $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($p = 0.0176, 0.0097$ ตามลำดับ)



รูปที่ 10 ความเข้มข้นของเซลล์ X_3 เป็นเวลา 30 ชั่วโมงหลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสงที่ 120 ชั่วโมง โดย $\diamond$ คือ ที่ความเข้มแสง $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $*$ คือ ที่ความเข้มแสง $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, และ $\blacktriangle$ คือ ที่ความเข้มแสง $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

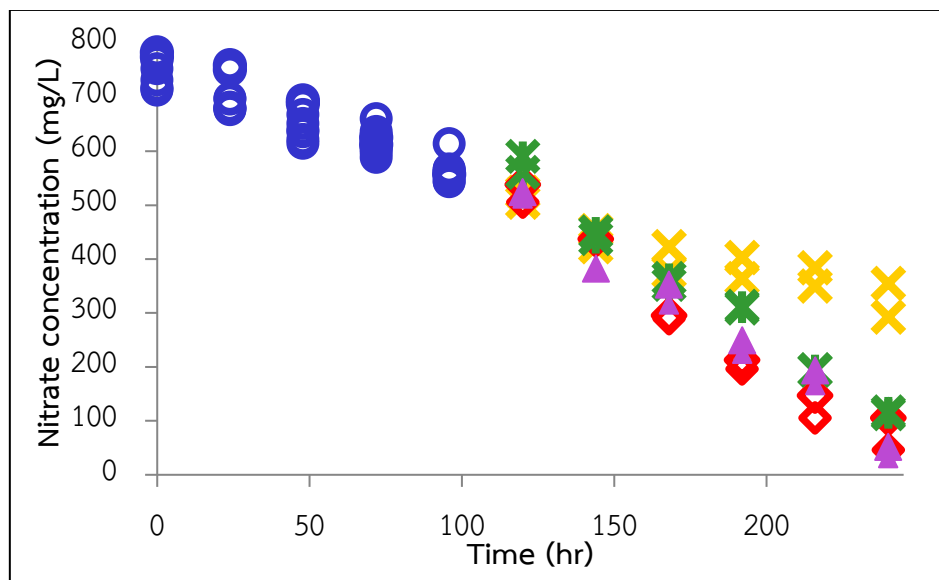
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงวงจรชีวิตของจุลสาหร่ายพบว่าการเปลี่ยนความเข้มแสงมีผลต่อความเร็วในการเปลี่ยนวงจรของจุลสาหร่าย จากผลการทดลองที่ความเข้มแสงสูง $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ส่งผลกับความเร็วในการเปลี่ยนแปลงวงจรชีวิตของจุลสาหร่ายเร็วที่สุด ซึ่งจะเห็นได้ว่าเซลล์ X_1 และ X_2 นั้นเปลี่ยนเป็นเซลล์ X_3 ได้เร็วกว่าที่ความเข้มแสงต่ำกว่า แสดงให้เห็นว่าเป็นสภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียดและทำให้สะสมแอสตาแซนธินได้เร็วกว่า นอกจากนี้ ที่ความเข้มแสง $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เมื่อจบการทดลองแล้วยังไม่ปรากฏเซลล์ X_1 ที่มีสีแดงซึ่งแตกต่างกับที่ความเข้มแสง $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ที่พบเซลล์ X_1 ที่มีสีแดงในชั่วโมงที่ 192 ซึ่งเกิดจากเซลล์ X_3 ที่มีการแบ่งตัว (gametogenesis) กลับไปเป็นเซลล์ X_1 แสดงให้เห็นว่าเซลล์จุลสาหร่ายสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะภายใต้ความเครียดที่ความเข้มแสง $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ได้ ส่วนที่ความเข้มแสงที่ $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เมื่อสิ้นสุดการทดลองยังคงพบเซลล์ X_2 และเซลล์ X_1 ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกับเซลล์ X_3 แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มแสง $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อาจยังไม่มีผลให้เซลล์เครียดมากพอที่จะสะสมแอสตาแซนธินขึ้นภายในเซลล์

4.1.2 ผลกระทบของความเข้มแสงต่อการใช้ในไตรต

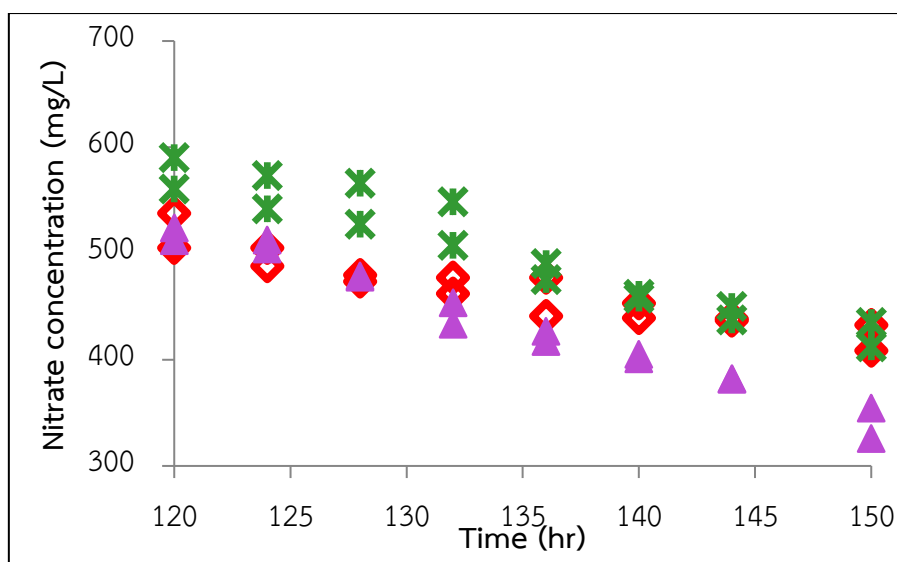
ความเข้มข้นไนเตรตเริ่มต้นในอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 คือ 750 mg L^{-1} ใน 5 วันแรกของการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ พบว่าเซลล์จุลสาหร่ายมีการใช้ในไตรตอย่างต่อเนื่อง ดังแสดงในรูปที่ 11 ภายหลังจากเปลี่ยนความเข้มแสงที่เวลา 120 ชั่วโมง ไปเป็น 87.6 , 175.2 , และ $262.8 \mu\text{mol m}^{-2}$

s^{-1} พบว่าเซลล์จุลสาหร่ายมีอัตราการใช้ในเตรตแตกต่างจากสภาวะที่ไม่มีความเข้มแสงเปลี่ยนแปลงความเข้มแสง ซึ่งมีอัตราการใช้ในเตรตอยู่ที่ 1.41, 3.94, 3.75 และ 3.63 mg L^{-1} ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งพบว่าโดยเมื่อเปลี่ยนความเข้มแสงสูงขึ้นจาก $21.9 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ส่งผลให้อัตราการใช้ในเตรตเพิ่มขึ้น โดยอาจเป็นผลเนื่องมาจากเซลล์จุลสาหร่ายมีการนำไนเตรตไปใช้ในเมตาบอลิซึมของเซลล์ เพื่อเป็นการเปลี่ยนจากเซลล์ X_1 กลายเป็นเซลล์ X_3 ที่มีผนังเซลล์ที่หนาขึ้น [92] อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มแสงสูงทั้ง 3 ค่า มีอัตราการใช้ในเตรตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

รูปที่ 12 แสดงผลกระทบของการเปลี่ยนความเข้มแสงต่อการใช้ในเตรตภายใน 30 ชั่วโมงแรก หลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสง โดยพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มแสงเป็น 87.6, 175.2 และ $262.8 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ เซลล์จุลสาหร่ายมีการใช้ในเตรตซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.1542$ และ $p = 0.1919$)



รูปที่ 11 ความเข้มข้นไนเตรตตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย โดย ○ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $21.9 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ในช่วง 120 ชั่วโมงแรก, × คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $21.9 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ◇ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $87.6 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, * คือ ผลการทดลองภายใต้ความเข้มแสงที่ $175.2 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, และ ▲ คือ ผลการทดลองภายใต้ความเข้มแสงที่ $262.8 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

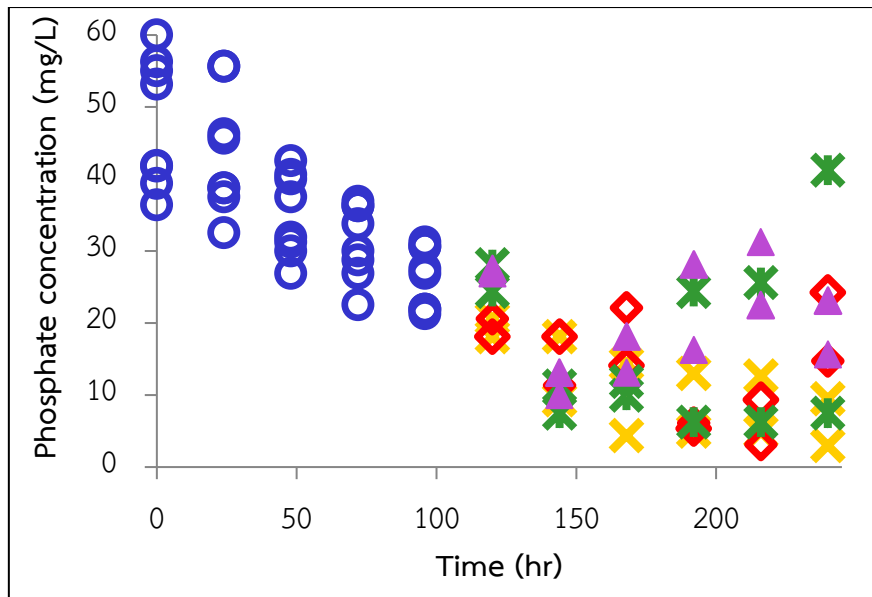


รูปที่ 12 ความเข้มข้นไนเตรตระหว่าง 30 ชั่วโมงแรกหลังการเปลี่ยนความเข้มแสง โดย $\diamond$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $*$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, และ $\blacktriangle$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

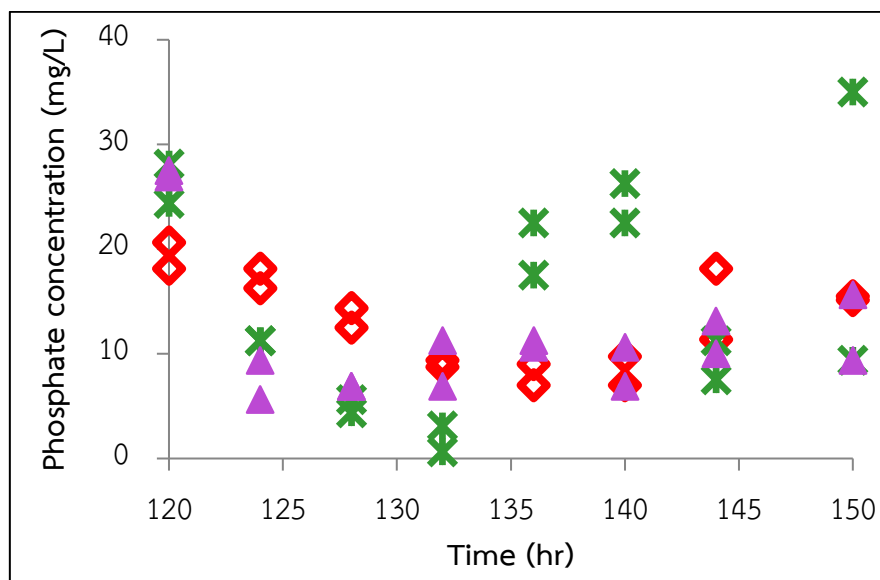
4.1.3 ผลกระทบของความเข้มแสงต่อการใช้ฟอสเฟต

ในอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 มีความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นที่ 50 mg L^{-1} ใน 120 ชั่วโมงแรก หรือ 5 วันแรกของการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ พบว่าเซลล์จุลสาหร่ายมีอัตราการใช้ฟอสเฟตอย่างต่อเนื่อง ดังแสดงในรูปที่ 13 เมื่อทำการเปลี่ยนความเข้มแสงไปเป็น 87.6 , 175.2 และ $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ พบว่ามีการใช้ฟอสเฟตไม่แตกต่างจากสภาวะปกติที่ไม่มีการเปลี่ยนความเข้มแสงอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.7215$, $p = 0.2273$ และ $p = 0.0772$, ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม อัตราการใช้ฟอสเฟตภายใต้ 3 สภาวะความเข้มแสงดังกล่าวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.3554$ และ $p = 0.1269$) เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง พบว่ามีปริมาณฟอสเฟตที่เหลืออยู่ 6.25 , 19.50 , 24.38 และ 19.38 mg L^{-1} ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์จุลสาหร่ายมีการใช้ฟอสเฟตที่ไม่คงที่ เนื่องจากเซลล์เกิดสภาวะ autolysis ซึ่งเป็นสภาวะที่เซลล์ย่อยตัวเอง ทำให้มีการปลดปล่อยฟอสเฟตหลังจากเซลล์ตายหลังจากชั่วโมงที่ 148 และความเข้มข้นฟอสเฟตยังมีความไวต่อการวิเคราะห์มากกว่าความเข้มข้นไนเตรตอีกด้วย

รูปที่ 14 แสดงผลของความเข้มแสงต่อการใช้ฟอสเฟต ภายใน 30 ชั่วโมงแรกหลังการเพิ่มความเข้มแสง โดยพบว่า พบว่าทั้งสามสภาวะของความเข้มแสงที่สูงขึ้น มีการใช้ฟอสเฟตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.7594$ และ $p = 0.1228$)



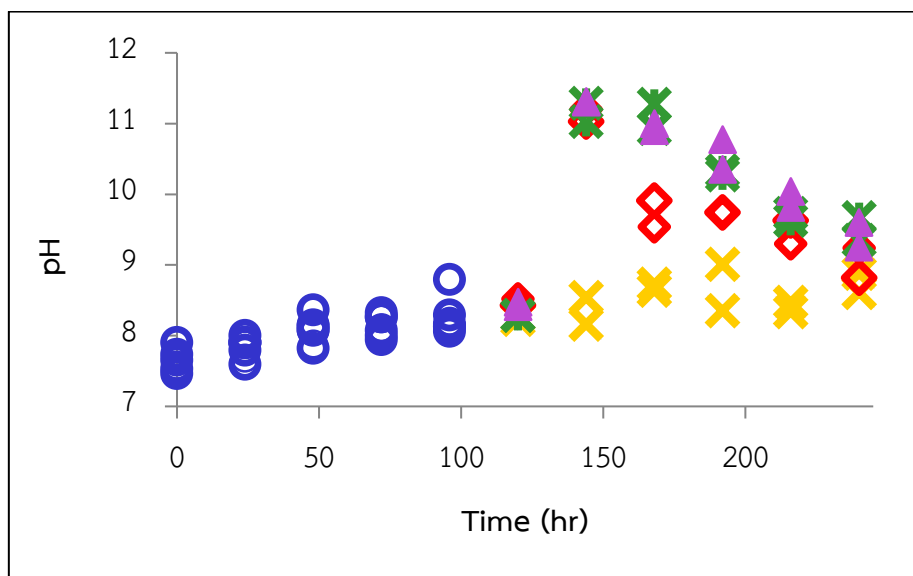
รูปที่ 13 ความเข้มข้นฟอสเฟตตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย โดย $\bigcirc$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ในช่วง 120 ชั่วโมงแรก, $\times$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\diamond$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $*$ คือ ผลการทดลองภายใต้ความเข้มแสงที่ $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, และ $\blacktriangle$ คือ ผลการทดลองภายใต้ความเข้มแสงที่ $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$



รูปที่ 14 ความเข้มข้นฟอสเฟตระหว่าง 30 ชั่วโมงแรกหลังการเปลี่ยนความเข้มแสง โดย $\diamond$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $*$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, และ $\blacktriangle$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

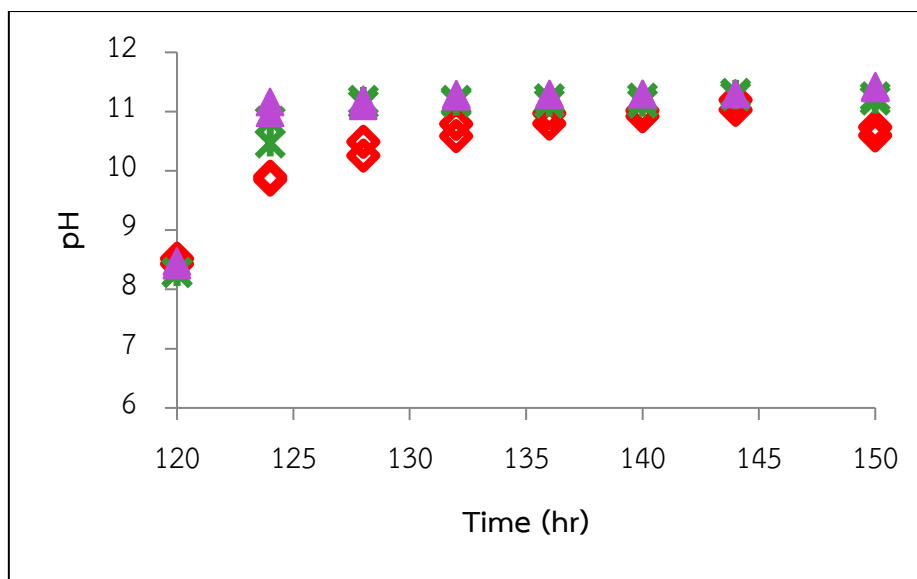
4.1.4 ผลกระทบของความเข้มแสงต่อพีเอช

ค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 เริ่มต้นที่ 7.0-8.0 ซึ่งค่าที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 5 วันแรก พบว่าค่าพีเอชค่อนข้างไม่เปลี่ยนแปลงดังแสดงในรูปที่ 15 หลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสงไปเป็น 87.6, 175.2 และ $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ พบว่า ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นอย่างมากหลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากในสภาวะที่ไม่มีการเปลี่ยนความเข้มแสง ($p = 0.0085$, $p = 0.0010$ และ $p = 0.0007$) โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองทั้งสี่สภาวะมีค่า พีเอช อยู่ 8.75, 9.03, 9.51 และ 9.44 ตามลำดับ



รูปที่ 15 ค่าพีเอชตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย สาหร่าย โดย $\circ$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ในช่วง 120 ชั่วโมงแรก, $\times$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\diamond$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $*$ คือ ผลการทดลองภายใต้ความเข้มแสงที่ $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, และ $\blacktriangle$ คือ ผลการทดลองภายใต้ความเข้มแสงที่ $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

รูปที่ 16 แสดงผลของความเข้มแสงต่อค่าพีเอชภายใน 30 ชั่วโมงแรกหลังจากเปลี่ยนความเข้มแสง ค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้น ภายใต้ความเข้มแสงที่ 175.2 และ $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ มีค่ามากกว่าค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้น ภายใต้ความเข้มแสงที่ $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$



รูปที่ 16 ค่าพีเอชระหว่าง 30 ชั่วโมงแรกหลังการเปลี่ยนความเข้มแสง โดย $\diamond$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $*$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, และ $\blacktriangle$ คือ ภายใต้ความเข้มแสงที่ $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

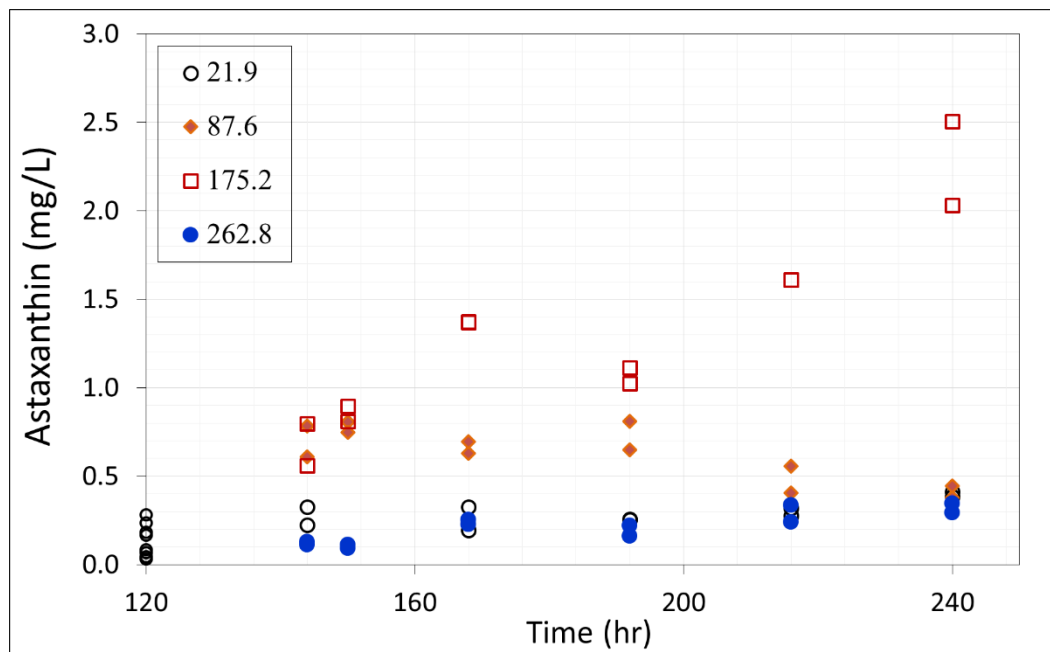
4.1.5 ผลกระทบของความเข้มแสงต่อความเข้มข้นของแอสตาแซนธิน

ดังแสดงในรูปที่ 17 ปริมาณแอสตาแซนธินจากการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงคงที่ที่ $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของเซลล์ X_3 (รูปที่ 10) ที่มีสัดส่วนร้อยละ 0.55 ของเซลล์ทั้งหมด หากมีการเปลี่ยนความเข้มแสง พบว่าหลังจากเปลี่ยนความเข้มแสงเป็น $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ที่เวลา 120 ชั่วโมง ความเข้มข้นของแอสตาแซนธินเริ่มเพิ่มขึ้นหลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสง 12 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 30 และค่อยๆ ลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 196 จนจบการทดลอง ซึ่งสอดคล้องความเข้มข้นของเซลล์ X_3 (รูปที่ 10) ซึ่งเริ่มพบหลังจากชั่วโมงที่ 168

สำหรับการเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนความเข้มแสงเป็น $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ที่ พบว่าชั่วโมงที่ 136-150 มีความเข้มข้นแอสตาแซนธินเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของเซลล์ X_3 ที่มีการสะสมแอสตาแซนธินขึ้นในเซลล์ (รูปที่ 10) และความเข้มข้นของแอสตาแซนธินสุดท้ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะนี้ ประมาณ 2.3 mg L^{-1} ซึ่งมากที่สุดเมื่อเทียบกับสภาวะอื่นๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนความเข้มแสงเป็น $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ พบว่ามีการสะสมแอสตาแซนธินเพิ่มขึ้น 0.2 mg L^{-1} ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากเซลล์ไม่สามารถทนต่อสภาวะการกระตุ้นและมีเซลล์ตายเกิดขึ้น

ที่การเปลี่ยนความเข้มแสง $262.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ความเข้มข้นแอสตาแซนธินเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าเพิ่มขึ้นเพียง 0.2 mg L^{-1} ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากเซลล์ไม่สามารถทนต่อสภาวะการกระตุ้นและมี

เซลล์ตายเกิดขึ้นและอาจจะทำให้เซลล์อยู่ในเกิดสภาวะ autolysis ทำให้มีความเข้มข้นแอสตาแซนธินใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($p = 0.1781$)



รูปที่ 17 ความเข้มข้นแอสตาแซนธินหลังเปลี่ยนความเข้มแสงที่ 120 ชั่วโมง ตามความเข้มแสงต่างๆ

จากการทดลองนี้ พบว่า การเปลี่ยนความเข้มแสงไปเป็นที่ $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ทำให้การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายให้ความเข้มข้นของเซลล์ X_3 สูงที่สุด และให้ความเข้มข้นแอสตาแซนธินที่สกัดออกมาได้สูงที่สุดเช่นกัน และจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มแสงสูงเกินไปและต่ำเกินไปจะไม่ทำให้เซลล์สะสมแอสตาแซนธินในความเข้มข้นที่มากขึ้นได้

4.2 ผลการทดลองการศึกษาผลกระทบของปริมาณไนเตรตต่อการดำเนินวงจรชีวิตจุลสาหร่าย

ในการทดลองนี้ทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในอาหารเลี้ยง BG-11 ความเข้มข้นของไนเตรตเริ่มต้นเป็น 750 mg L^{-1} ให้อากาศที่อัตราการไหล 1 VVM ที่ประกอบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 1% ภายใต้ความเข้มแสง $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน หรือ 96 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนความเข้มข้นของไนเตรตให้ลดลงเป็น 40, 80 และ 120 mg L^{-1} เพื่อศึกษาผลกระทบของปริมาณไนเตรตที่เกิดขึ้น

4.2.1 ผลกระทบของปริมาณไนเตรตต่อการดำเนินวงจรชีวิต

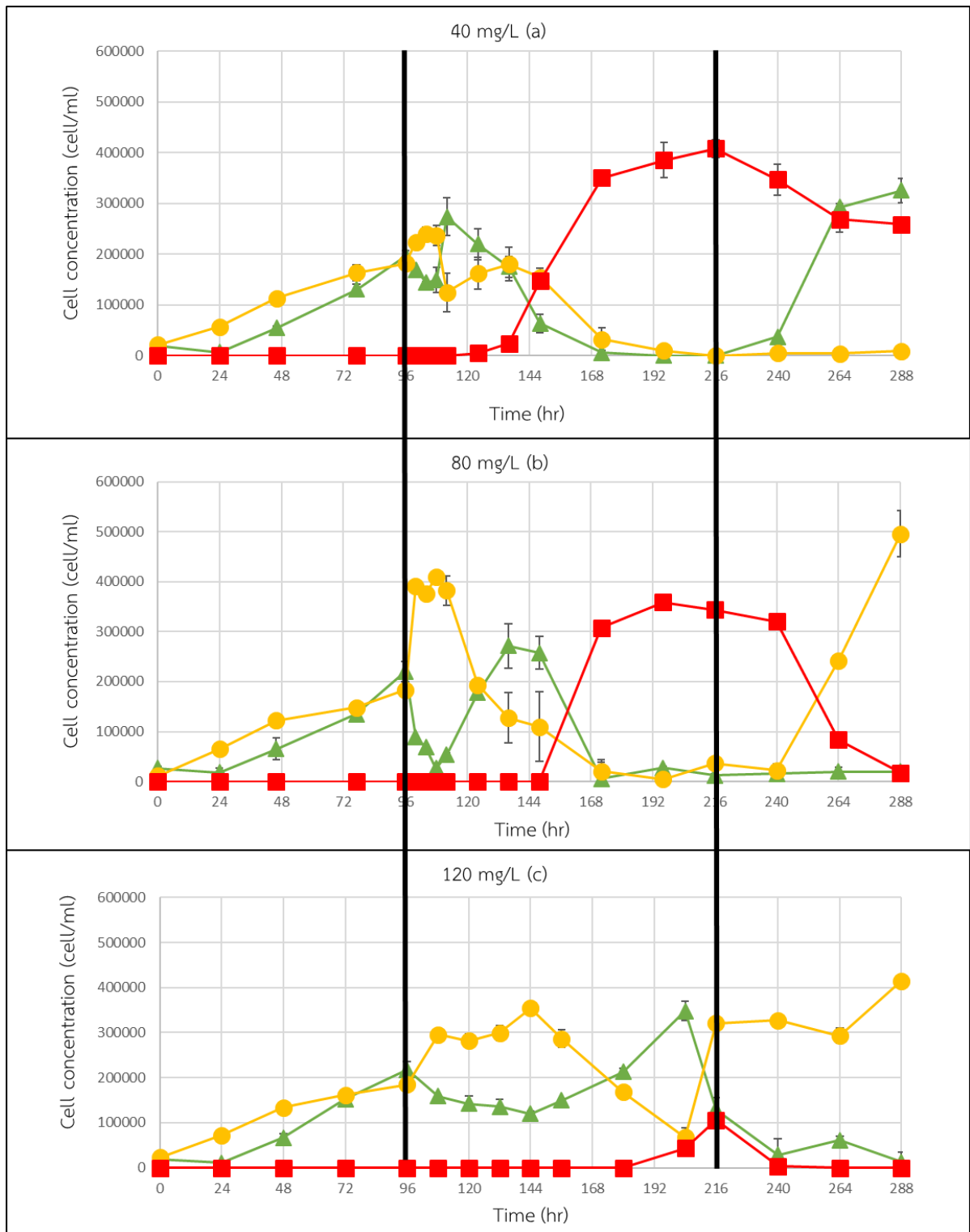
ในช่วง 96 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง จะพบเซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ X_1 และเซลล์ X_2 ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่อง ดังแสดงในรูปที่ 18 ในวันที่ 4 มีความเข้มข้นของเซลล์ X_2 ประมาณ 180,000 cell

mL^{-1} และเซลล์ X_1 ประมาณ $200,000 \text{ cell mL}^{-1}$ โดยไม่พบเซลล์ X_3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวงจรชีวิตของเซลล์อยู่ในระยะเจริญเติบโต ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการทดลองซ้ำ

เมื่อทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของไนเตรต $40, 80$ และ 120 mg L^{-1} ณ เวลา 96 ชั่วโมงหรือวันที่ 4 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง (5 วัน) พบการเปลี่ยนแปลงในวงจรชีวิตของเซลล์สาหร่ายและการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ โดยปริมาณเซลล์ X_1 ลดลง ใน 12 ชั่วโมงแรกหลังจากเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรตเป็น $40, 80$ และ 120 mg L^{-1} เนื่องจากมีการเปลี่ยนอาหารทำให้เซลล์เกิดการปรับสภาพเพราะเซลล์ชนิดนี้ค่อนข้างไวต่อการเปลี่ยนแปลง (ผนังเซลล์บาง) นอกจากนี้ ที่สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40 และ 80 mg L^{-1} ไม่พบเซลล์ชนิดนี้หลังจากการกระตุ้น 76 ชั่วโมง (ชั่วโมงที่ 172) ($p > 0.05$) (รูปที่ 18 a และ b) ในขณะที่สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 120 mg L^{-1} เซลล์ชนิดนี้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึง 108 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้น (ชั่วโมงที่ 204) จากนั้นลดลงในชั่วโมงที่ 216 ($p < 0.05$) (รูปที่ 18 c)

สำหรับเซลล์ X_2 พบว่าหลังจากการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรตเป็น $40, 80$ และ 120 mg L^{-1} ใน 24 ชั่วโมงแรก (ชั่วโมงที่ 120) มีความเข้มข้นของเซลล์ X_2 เพิ่มขึ้นเป็น $160,000, 190,000$ และ $280,000 \text{ cell mL}^{-1}$ ตามลำดับ (รูปที่ 18) จากนั้นจึงพบว่า ที่การเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40 และ 80 mg L^{-1} มีความเข้มข้นของเซลล์ X_2 ลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการกระตุ้น (รูปที่ 18 a และ b) ในขณะที่การเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 120 mg L^{-1} มีความเข้มข้นของเซลล์ X_2 คงที่และเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 48 หลังจากการกระตุ้น (ชั่วโมงที่ 144) จนถึงชั่วโมงที่ 204 จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์ X_2 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนสิ้นสุดการกระตุ้น (รูปที่ 18 c)

สำหรับเซลล์ X_3 พบว่าชั่วโมงที่ 28 (ชั่วโมงที่ 124) หลังจากการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40 mg L^{-1} มีความเข้มข้นของเซลล์ X_3 เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและพบความเข้มข้นเซลล์ดังกล่าวสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 หลังจากการกระตุ้น (ชั่วโมงที่ 216) ($p < 0.05$) ซึ่งสูงถึง $400,000 \text{ cell mL}^{-1}$ (รูปที่ 18 a) ในขณะที่การเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 80 mg L^{-1} เริ่มพบเซลล์ X_3 ในชั่วโมงที่ 76 หลังจากการกระตุ้น (172 ชั่วโมง) และพบเซลล์ X_3 สูงสุด ในชั่วโมงที่ 100 หลังจากการกระตุ้น (ชั่วโมงที่ 196) สูงถึง $360,000 \text{ cell mL}^{-1}$ (รูปที่ 18 b) ที่การเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 120 mg L^{-1} เริ่มพบเซลล์ X_3 ในชั่วโมงที่ 108 หลังจากการกระตุ้น (ชั่วโมงที่ 204) และพบเซลล์ X_3 สูงสุด ในชั่วโมงที่ 120 หลังจากการกระตุ้น (ชั่วโมงที่ 216) สูงถึง $100,000 \text{ cell mL}^{-1}$ (รูปที่ 18 c)



รูปที่ 18 ความเข้มข้นของเซลล์ตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 คือ สภาวะการเจริญเติบโต, ชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 216 คือ สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40 mg L⁻¹ (a) สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 80 mg L⁻¹ (b) สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 120 mg L⁻¹ (c) และ ชั่วโมงที่ 216 ถึงชั่วโมงที่ 288 คือ สภาวะการเปลี่ยนกลับ โดยที่ ▲ เซลล์ X₁, ● เซลล์ X₂ และ ■ เซลล์ X₃

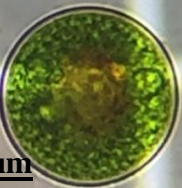
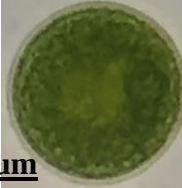
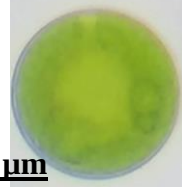
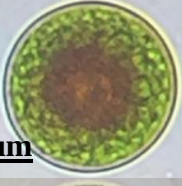
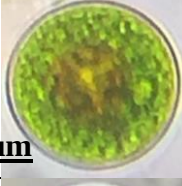
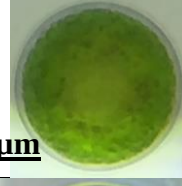
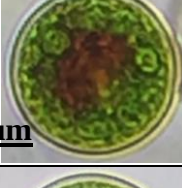
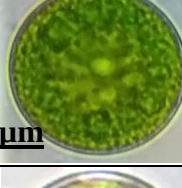
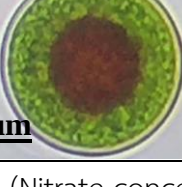
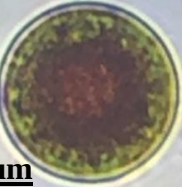
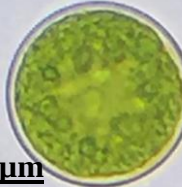
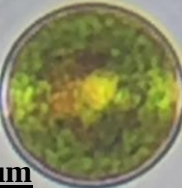
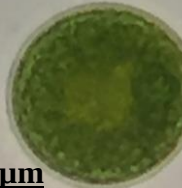
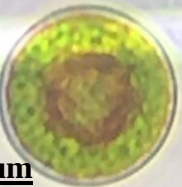
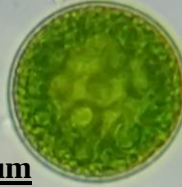
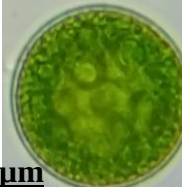
จากรูปที่ 18 จะเห็นได้ว่า ที่การเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40 และ 80 mg L⁻¹ พบว่าเซลล์ X₂ ลดลงเพื่อเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเซลล์ X₃ (รูปที่ 19) ในขณะที่การเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 120 mg L⁻¹ มีการลดลงของเซลล์ X₂ เพื่อเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเซลล์ X₁ นอกจากนี้ ที่การเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40 mg L⁻¹ พบสัดส่วนเซลล์ X₁ เป็น 0% เซลล์ X₂ เป็น 0% และเซลล์ X₃ 100% ของเซลล์ทั้งหมดในวันสุดท้ายของการเปลี่ยนไนเตรต สำหรับการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 80 mg L⁻¹ พบสัดส่วนเซลล์ X₁ เป็น 3.22% เซลล์ X₂ เป็น 9.32% และเซลล์ X₃ 87.46% ของเซลล์ทั้งหมดในวันสุดท้ายของการกระตุ้น ในขณะที่การเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 120 mg L⁻¹ พบสัดส่วนเซลล์ X₁ เป็น 23.23% เซลล์ X₂ เป็น 57.72% และเซลล์ X₃ 19.04% ของเซลล์ทั้งหมดในวันสุดท้ายของการกระตุ้น

การศึกษาจลนพลศาสตร์การเกิดเซลล์ X₃ พบว่าการเปลี่ยนความเข้มข้นของไนเตรต 40, 80 และ 120 mg L⁻¹ มีอัตราการเกิดเซลล์ X₃ เท่ากับ 9,055.56, 7,472.20 และ 5,222.25 cell mL⁻¹ hr⁻¹ ตามลำดับ และเมื่อเติมไนเตรตกลับมีอัตราการเปลี่ยนจากเซลล์ X₃ เป็นเซลล์ X₁ และ X₂ เท่ากับ 2191.70, 5066.70 และ 1341.7 25 cell mL⁻¹ hr⁻¹ ตามลำดับ

หลังจากการเพาะเลี้ยงในระยะที่มีการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40, 80 และ 120 mg L⁻¹ เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนกลับโดยการทำให้ความเข้มข้นของไนเตรตในระบบเป็น 750 mg L⁻¹ ทั้ง 3 สถานะการเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง (3 วัน) เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของวงจรชีวิต และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สาหร่าย *H. pluvialis* ดังแสดงในรูปที่ 18

สำหรับเซลล์ X₁ พบว่าเซลล์ที่ผ่านการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40 mg L⁻¹ เมื่อมีการเปลี่ยนกลับมีความเข้มข้นของเซลล์ X₁ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วถึง 330,000 cell mL⁻¹ ในชั่วโมงที่ 72 หลังการเปลี่ยนกลับ (ชั่วโมงที่ 288) (รูปที่ 18 a) ในขณะที่เซลล์ที่ผ่านการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 80 และ 120 mg L⁻¹ เมื่อมีการเปลี่ยนกลับ ทำให้ความเข้มข้นของเซลล์ X₁ ลดลงอย่างต่อเนื่องจนไม่พบเซลล์ชนิดนี้ (รูปที่ 18 b และ c)

สำหรับเซลล์ X₂ พบว่าเซลล์ที่ผ่านการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40 mg L⁻¹ เมื่อมีการเปลี่ยนกลับด้วยไนเตรต จะไม่พบเซลล์ X₂ (รูปที่ 18 a) ในขณะที่เซลล์ที่ผ่านการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 80 mg L⁻¹ เมื่อมีการเปลี่ยนกลับ พบว่าในชั่วโมงที่ 48 หลังการเปลี่ยนกลับ (ชั่วโมงที่ 264) เซลล์ X₂ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการเปลี่ยนกลับสูงถึง 500,000 cell mL⁻¹ (รูปที่ 18 b) และการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 120 mg L⁻¹ เมื่อมีการเปลี่ยนกลับพบว่าในชั่วโมงที่ 72 หลังการเปลี่ยนกลับ (ชั่วโมงที่ 288) เซลล์ X₂ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกันและมีความเข้มข้นเซลล์ X₂ สูงถึง 410,000 cell mL⁻¹ (รูปที่ 18 c)

ระยะเวลาหลังจากการ เปลี่ยนไนเตรต (Time, hr)	ความเข้มข้นไนเตรต (Nitrate concentration, mg L ⁻¹)		
	40 mg L ⁻¹	80 mg L ⁻¹	120 mg L ⁻¹
40			
76			
100			
120			
ระยะเวลาหลังจากการ เปลี่ยนกลับ (Time, hr)	ความเข้มข้นไนเตรต (Nitrate concentration, mg L ⁻¹)		
	40 mg L ⁻¹	80 mg L ⁻¹	120 mg L ⁻¹
24			
48			
72			

รูปที่ 19 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ *H. pluvialis* ที่เปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรดที่ความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ 40, 80 และ 120 mg L⁻¹

สำหรับเซลล์ X_3 พบว่าเซลล์ที่ผ่านการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40 mg L^{-1} เมื่อมีการเปลี่ยนกลับทำให้เซลล์ X_3 มีความเข้มข้นลดลงเล็กน้อย เมื่อสิ้นสุดการเปลี่ยนกลับมีความเข้มข้นเซลล์ X_3 เท่ากับ $260,000 \text{ cell mL}^{-1}$ (รูปที่ 18 a) ในขณะที่เซลล์ที่ผ่านการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 80 และ 120 mg L^{-1} เมื่อมีการเปลี่ยนกลับ พบว่าเซลล์ X_3 ลดลงอย่างรวดเร็วจนมีค่าใกล้เคียงศูนย์เมื่อสิ้นสุดการเปลี่ยนกลับ (รูปที่ 18 b และ c)

จากการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40 mg L^{-1} เมื่อมีการเปลี่ยนกลับพบว่าสัดส่วนเซลล์ X_1 เป็น 54.89%, เซลล์ X_2 เป็น 1.46% และ เซลล์ X_3 43.64% ของเซลล์ทั้งหมดในวันสุดท้ายของการเปลี่ยนกลับ ส่วนการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 80 mg L^{-1} เมื่อมีการเปลี่ยนกลับพบสัดส่วนเซลล์ X_1 เป็น 3.75%, เซลล์ X_2 เป็น 93.0% และ เซลล์ X_3 3.25% ของเซลล์ทั้งหมดในวันสุดท้ายของการเปลี่ยนกลับ ในขณะที่การเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 120 mg L^{-1} เมื่อมีการเปลี่ยนกลับพบสัดส่วนเซลล์ X_1 เป็น 3.11%, เซลล์ X_2 เป็น 96.88% และ เซลล์ X_3 0% ของเซลล์ทั้งหมดในวันสุดท้ายของการเปลี่ยนกลับ

4.2.2 ผลกระทบของความเข้มข้นไนเตรตต่อความเข้มข้นแอสตาแซนธิน

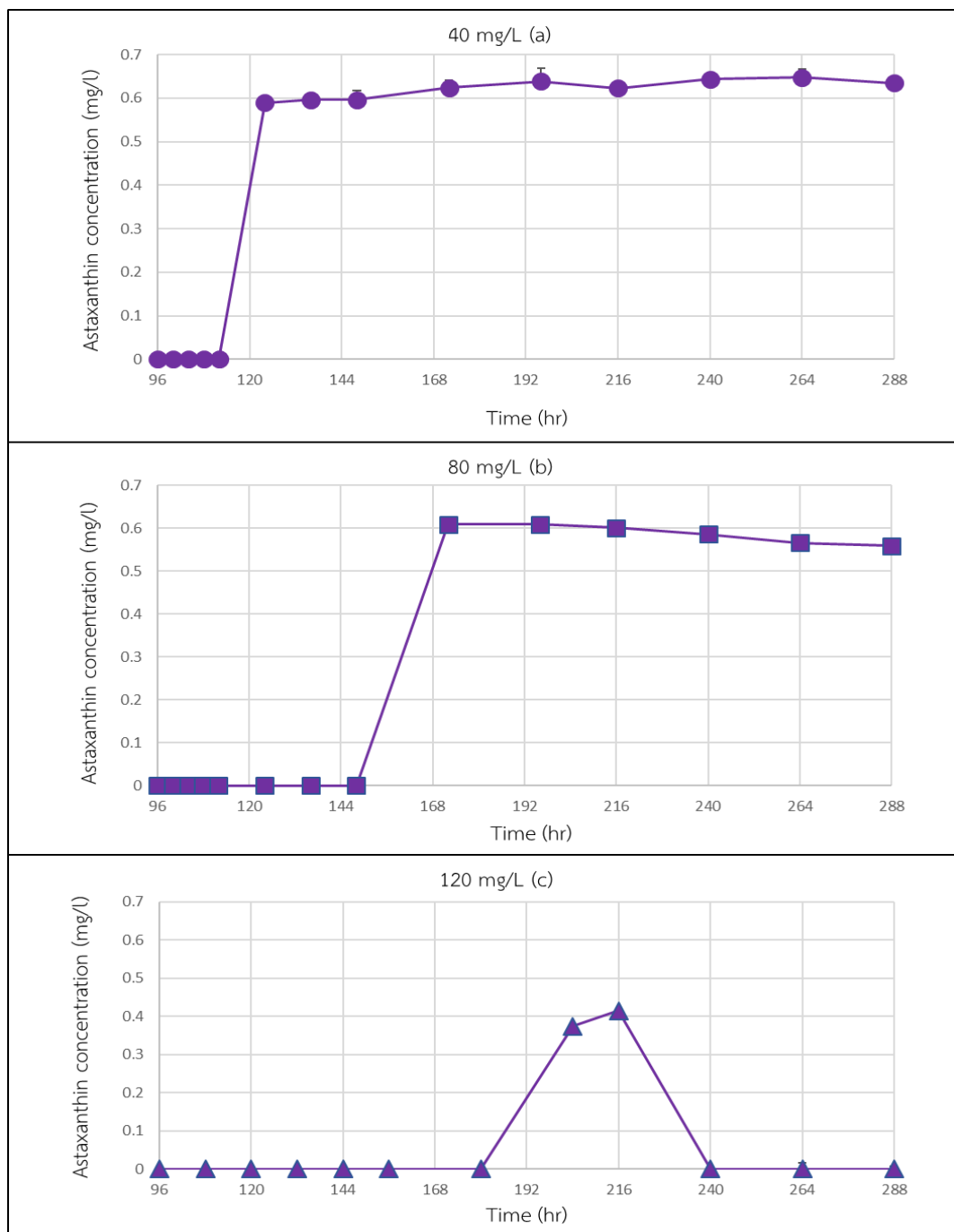
ในระยะเวลาเจริญเติบโต 4 วันแรกที่มีความเข้มข้นของไนเตรตเริ่มต้น 750 mg L^{-1} ทั้ง 3 สภาวะกระตุ้นพบว่าความเข้มข้นของแอสตาแซนธินมีค่าน้อยมากซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของเซลล์ X_3 ที่มีสัดส่วนเป็น 0% ของเซลล์ทั้งหมด (รูปที่ 18)

ซึ่งภายหลังการเปลี่ยนไนเตรตที่ความเข้มข้น 40 mg L^{-1} พบว่าในช่วงเวลาที่ 124-196 มีความเข้มข้นของแอสตาแซนธินเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของเซลล์ X_3 ที่มีการสะสมแอสตาแซนธินในเซลล์ (รูปที่ 20) เมื่อมีการเติมไนเตรทกลับในช่วงเวลาที่ 216 พบว่าความเข้มข้นของแอสตาแซนธินเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเนื่องจากเซลล์เกิดการแบ่งตัวเป็นเซลล์เคลื่อนที่จำนวนมากแต่ภายในเซลล์ยังมีการสะสมแอสตาแซนธินอยู่ (รูปที่ 20) และเซลล์ในระยะนี้มีผนังเซลล์ที่บางจึงง่ายกับการสกัดแอสตาแซนธิน

ที่การเปลี่ยนไนเตรตที่ความเข้มข้น 80 mg L^{-1} พบว่าในช่วงเวลาที่ 172 มีความเข้มข้นของแอสตาแซนธินเพิ่มขึ้นและคงที่สอดคล้องกับความเข้มข้นของเซลล์ X_3 ที่มีการสะสมแอสตาแซนธินในเซลล์ (รูปที่ 20) เมื่อมีการเติมไนเตรทกลับในช่วงเวลาที่ 216 พบว่าความเข้มข้นของแอสตาแซนธินคงที่เนื่องจากเซลล์ไม่ได้รับความเครียดที่สูงมากส่งผลให้เกิดการสะสมแอสตาแซนธินต่ำ

ที่การเปลี่ยนไนเตรตที่ความเข้มข้น 120 mg L^{-1} พบว่าในช่วงเวลาที่ 204 มีความเข้มข้นของแอสตาแซนธินเพิ่มขึ้นและสอดคล้องกับความเข้มข้นของเซลล์ X_3 ที่มีการสะสมแอสตาแซนธินในเซลล์ (รูปที่ 20) เมื่อมีการเติมไนเตรทกลับในช่วงเวลาที่ 216 พบว่าความเข้มข้นของแอสตาแซนธินลดลงจนมีค่าน้อยมากเนื่องจาก

เซลล์ไม่ได้รับความเครียดที่สูงมากส่งผลให้เกิดการสะสมแอสตาแซนธินต่ำและเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นมีการสะสมแอสตาแซนธินน้อยทำให้เมื่อทำการเปลี่ยนกลับทำให้เซลล์กลับสู่สภาวะเซลล์สีเขียวได้ง่าย



รูปที่ 20 ความเข้มข้นแอสตาแซนธินในช่วงการเปลี่ยนโนเตรต โดยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 216 โดยที่ ● คือ ที่สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นโนเตรต 40 mg L⁻¹ (a), ■ คือ ที่สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นโนเตรต 80 mg L⁻¹ (b) และ ▲ คือ สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นโนเตรต 120 mg L⁻¹ (c) และ จากชั่วโมงที่ 216 ถึงชั่วโมงที่ 288 คือ สภาวะการเปลี่ยนกลับ

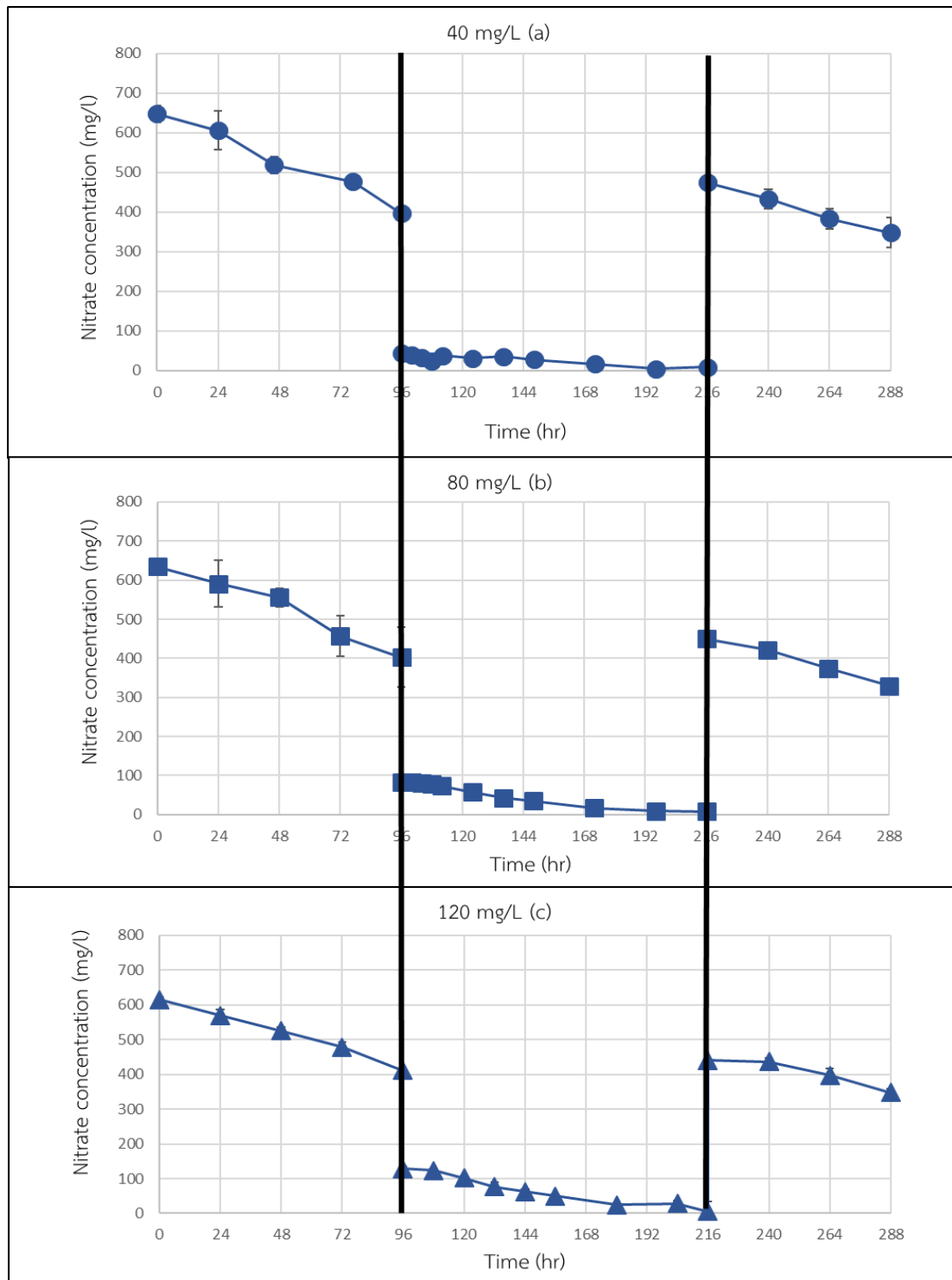
4.2.3 ผลกระทบของไนเตรตต่อการใช้ในไตรตและฟอสเฟส และค่าพีเอช

ในช่วง 96 ชั่วโมง (4 วัน) แรกของการเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นไนเตรตเริ่มต้น เท่ากับ 750 mg L^{-1} พบว่าจุลสาหร่ายมีอัตราการใช้นิไตรตไม่ต่างกันระหว่างทดลอง และมีอัตราการใช้นิไตรตเฉลี่ยเท่ากับ $2.510 \text{ mg L}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ ($p > 0.05$) (รูปที่ 21) หลังการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรตเป็น 40, 80 และ 120 mg L^{-1} เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (5 วัน) พบว่าเซลล์จุลสาหร่ายมีอัตราการใช้นิไตรตแตกต่างกันในแต่ละสภาวะการกระตุ้นซึ่งมีอัตราการใช้นิไตรตเท่ากับ 0.700, 1.080 และ $1.700 \text{ mg L}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ ตามลำดับ ($p < 0.05$) โดยเมื่อมีการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรตที่ความเข้มข้น 120 mg L^{-1} พบว่าเซลล์จุลสาหร่ายมีอัตราการใช้นิไตรตที่มากกว่าที่ความเข้มข้น 40 และ 80 mg L^{-1} โดยชั่วโมงที่ 120 หลังจากการเปลี่ยนไนเตรต (ชั่วโมงที่ 216) มีความเข้มข้นไนเตรตเหลืออยู่ 9.000 , 7.300 และ 5.300 mg L^{-1} ตามลำดับ (รูปที่ 21)

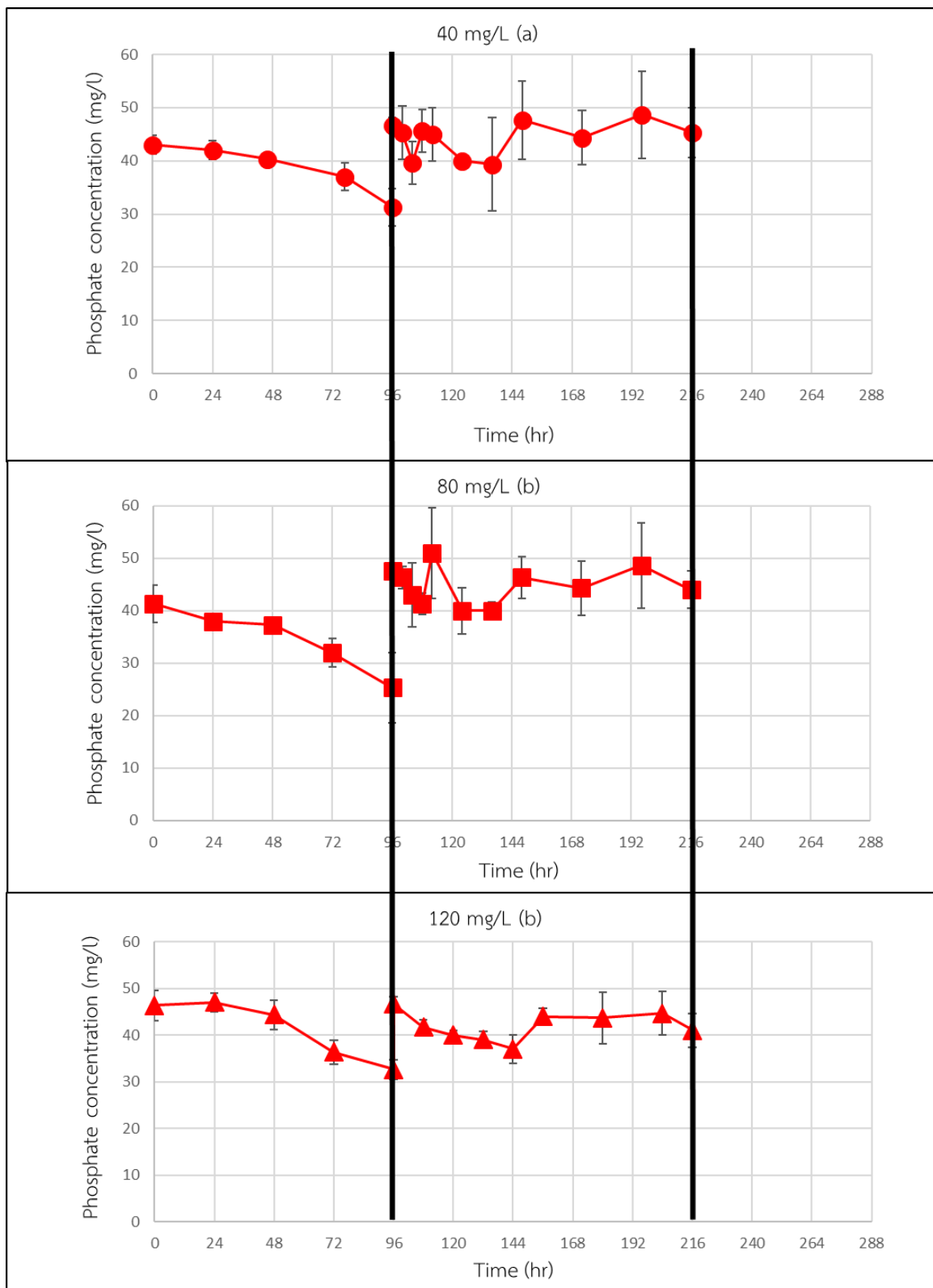
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงวงจรชีวิตของจุลสาหร่าย พบว่าการเปลี่ยนความเข้มข้นของ ไนเตรตมีผลต่อความเร็วในการเปลี่ยนวงจรของจุลสาหร่าย จากผลการทดลองที่ความเข้มข้นของไนเตรต 40 mg L^{-1} ส่งผลกับความเร็วในการเปลี่ยนแปลงวงจรชีวิตของจุลสาหร่ายเร็วที่สุดตามด้วย 80 และ 120 mg L^{-1} ตามลำดับ ($p < 0.05$) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเซลล์ X_1 และเซลล์ X_2 นั้นเปลี่ยนเป็นเซลล์ X_3 ได้เร็วกว่าการกระตุ้นที่ความเข้มข้นของไนเตรตที่สูงกว่าแสดงให้เห็นว่าเซลล์เครียดและสะสมแอสตาแซนธินได้เร็วกว่า เนื่องจากไนเตรตเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญและใช้ในการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีความเข้มข้นไนเตรตที่เหมาะสมเซลล์จะสามารถแบ่งตัวแล้วเพิ่มจำนวนแต่เมื่อในสภาวะที่มีความเข้มข้น ไนเตรตน้อยเซลล์จะเกิดความเครียดจากการขาดสารอาหารทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาโดยการผลิตสารแอสตาแซนธินเพื่อปกป้องเซลล์ให้ทนอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้

สำหรับความเข้มข้นฟอสเฟตในอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 เริ่มต้นที่ $40\text{-}50 \text{ mg L}^{-1}$ หลังจากเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น $21.9 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ เป็นเวลา 4 วัน พบว่าเซลล์จุลสาหร่ายมีอัตราการใช้ฟอสเฟตอย่างต่อเนื่องและอัตราการใช้ฟอสเฟตไม่ต่างกันระหว่างการทดลองซ้ำ และมีอัตราการใช้ฟอสเฟตเฉลี่ยเท่ากับ $0.00014 \text{ mg L}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ ($p > 0.05$) (รูปที่ 22) ซึ่งภายหลังจากการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40, 80, และ 120 mg L^{-1} เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง (5 วัน) พบว่าเซลล์ทั้ง 3 สภาวะมีการใช้ฟอสเฟตไม่ต่างกัน ($p > 0.05$) โดยเมื่อสิ้นสุดการกระตุ้น 5 วัน มีความเข้มข้นฟอสเฟตเหลืออยู่เท่ากับ 45.33, 44.00 และ 41.00 mg L^{-1} ตามลำดับ (รูปที่ 22)

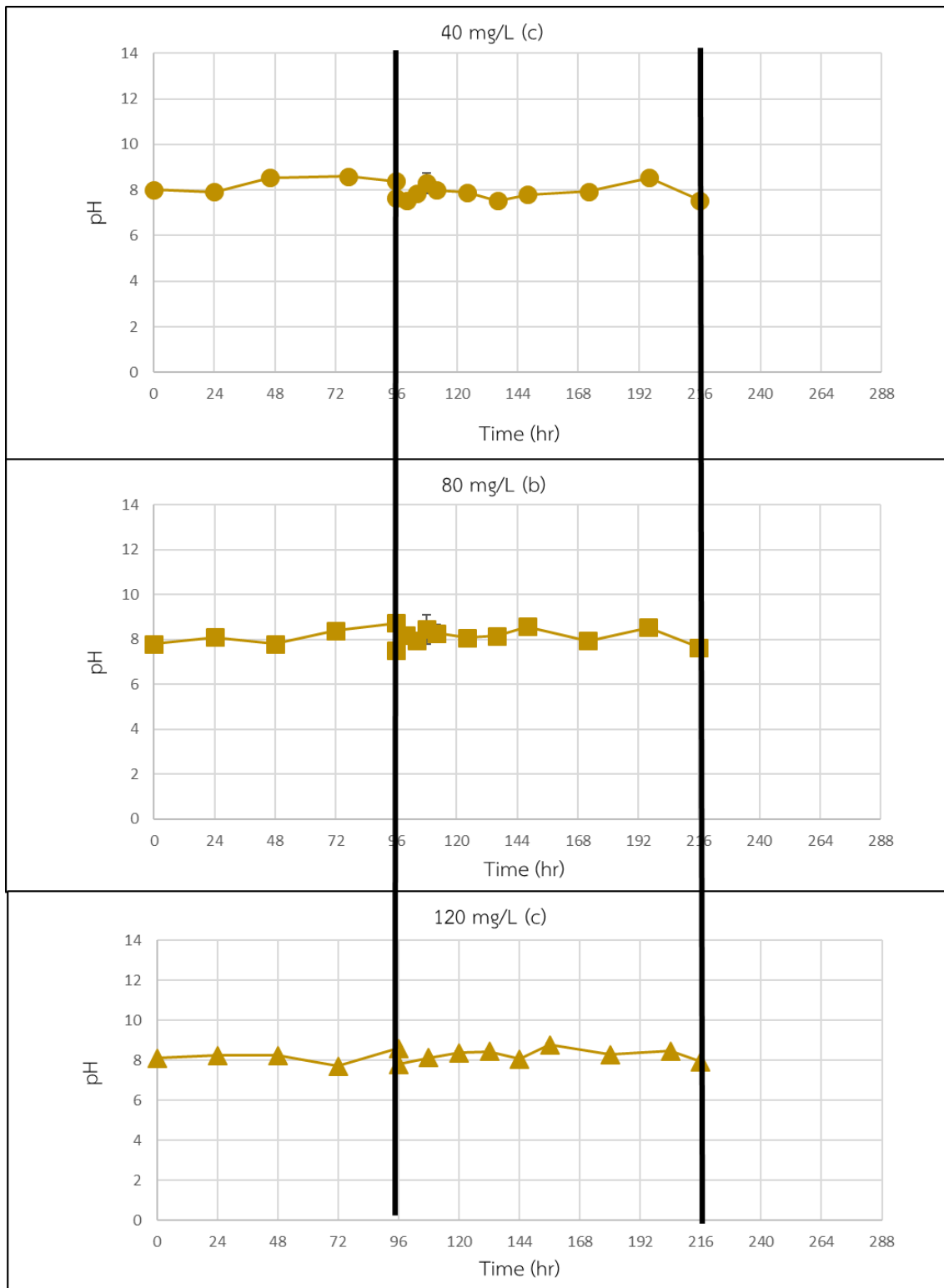
ค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 เริ่มต้นที่ 7.0-8.0 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย ในระยะการเจริญเติบโตทั้ง 3 สภาวะและภายหลังจากการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต พบว่ามีค่า พีเอช ใกล้เคียงกัน ($p > 0.05$) ซึ่งมีค่า พีเอช อยู่ระหว่าง 7 – 9 ($p > 0.05$) โดยเมื่อสิ้นสุดการกระตุ้นไนเตรตทั้ง 3 สภาวะมีค่า พีเอช เท่ากับ 7.65, 7.54 และ 7.94 ตามลำดับ (รูปที่ 23)



รูปที่ 21 ความเข้มข้นของไนเตรตตลอดระยะเวลาการทดลองในช่วงการเปลี่ยนไนเตรต โดยชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 96 คือ สภาวะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 216 โดยที่ ● คือ ที่สภาวะการเปลี่ยน ความเข้มข้นไนเตรต 40 mg L⁻¹ (a), ■ คือ ที่สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 80 mg L⁻¹ (b) และ ▲ คือ สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 120 mg L⁻¹ (c) และ จากชั่วโมงที่ 216 ถึงชั่วโมงที่ 288 คือ สภาวะการเปลี่ยนกลับ



รูปที่ 22 ความเข้มข้นของฟอสเฟตตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 คือ สภาวะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 216 คือ สภาวะการเปลี่ยนไนเตรต โดยที่ ● คือ ที่สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40 mg L⁻¹ (a), ■ คือ ที่สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 80 mg L⁻¹ (b) และ ▲ คือ ที่สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 120 mg L⁻¹ (c)

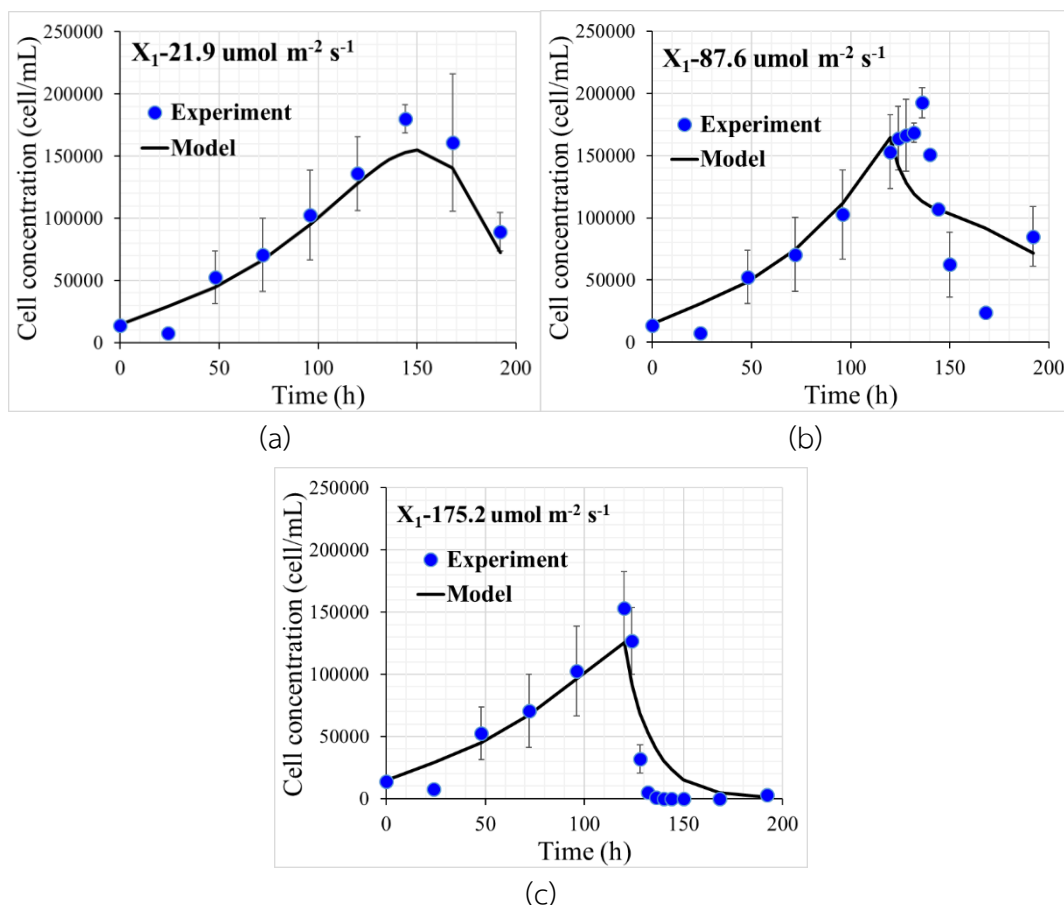


รูปที่ 23 ค่าความเป็นกรด-ด่างตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 คือ สภาวะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 216 คือ สภาวะการเปลี่ยนไนเตรต โดยที่ ● คือ ที่สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 40 mg L⁻¹ (a), ■ คือ ที่สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 80 mg L⁻¹ (b) และ ▲ คือ ที่สภาวะการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรต 120 mg L⁻¹ (c)

โดยสรุป การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรตซึ่งเป็นสารอาหารหลักสำหรับการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ส่งผลกระทบต่ออัตราการดำเนินวงจรชีวิต การเปลี่ยนรูปแบบเซลล์ และการเมแทบอลิซึมของเซลล์ โดยพบว่า ที่การเปลี่ยนไนเตรตให้มีปริมาณที่น้อยลงมากในระยะเวลาเจริญเติบโต ทำให้เซลล์เกิดการสะสมแอสตาแซนทิน จากการทดลองนี้ การให้ปริมาณไนเตรตที่ 40 mg L^{-1} ทำให้เกิดเซลล์ X_3 เร็วที่สุดและดังนั้นมีการสะสมแอสตาแซนทินเร็วที่สุด นอกจากนี้ยังพบอีกว่า เมื่อเปลี่ยนกลับปริมาณไนเตรตในสภาวะนี้จะทำให้เกิดเซลล์ X_1 ที่มีสีแดงจากการแบ่งตัวโดยตรงจากเซลล์ X_3 ซึ่งเซลล์รูปแบบนี้เป็นที่ต้องการ เนื่องจากมีผนังเซลล์ที่บางแต่ยังมีปริมาณแอสตาแซนทินสะสมอยู่ภายในเซลล์ ทำให้สามารถสกัดออกมาได้ง่ายขึ้น

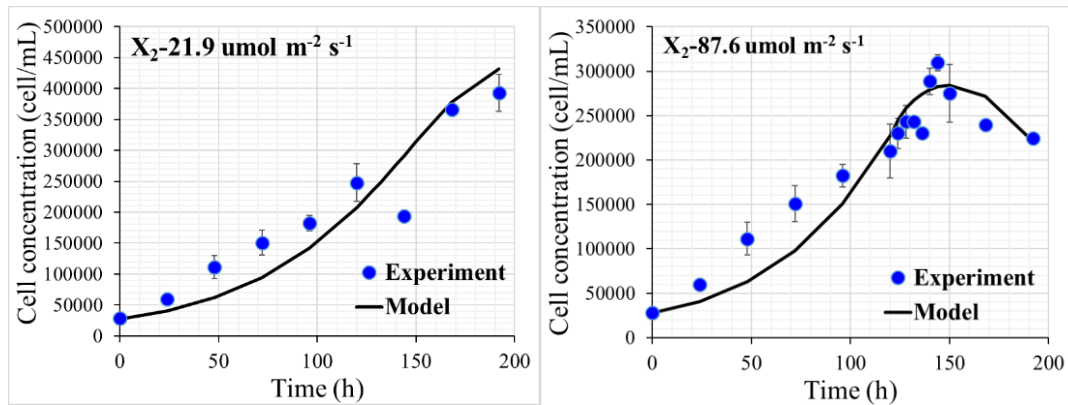
4.3 ผลจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของวงจรชีวิตจุลสาหร่าย *H. pluvialis*

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ดังแสดงในสมการที่ (1)-(14) ประกอบไปด้วยค่าคงที่จำนวน 48 ค่าคงที่ซึ่งค่าของค่าคงที่เหล่านี้ได้มาจากการสอบเทียบผลที่ได้จากแบบจำลองกับผลการทดลอง และแสดงในตารางที่ ก-2 ในภาคผนวก การจำลองด้วยแบบจำลองและการหาค่าคงที่กระทำในโปรแกรม COPASI



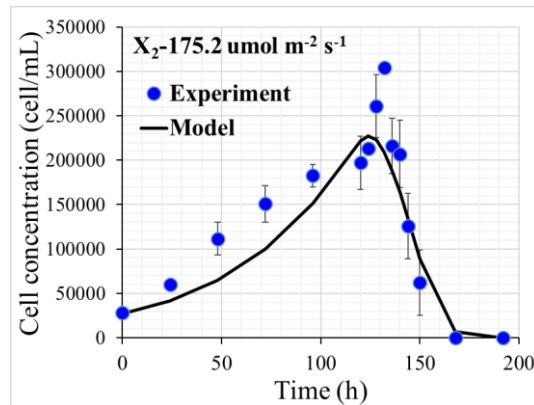
รูปที่ 24 ผลของแบบจำลองเทียบกับผลการทดลองของความเข้มข้นของเซลล์ X_1 หรือ motile cells โดยภายใต้ความเข้มแสง $21.9 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (a) $87.6 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (b) และ $175.2 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (c)

จากรูปที่ 24 แสดงให้เห็นว่าผลจากแบบจำลองที่แสดงความเข้มข้นของเซลล์ X_1 หรือ motile cells ภายใต้สภาวะการเปลี่ยนความเข้มแสงต่างๆ สามารถจำลองผลจากการทดลองได้ค่อนข้างดี มีเพียงบริเวณหลังจากการเปลี่ยนความเข้มแสงประมาณ 30 ชั่วโมงที่แบบจำลองให้ค่าที่คลาดเคลื่อนจากผลการทดลอง



(a)

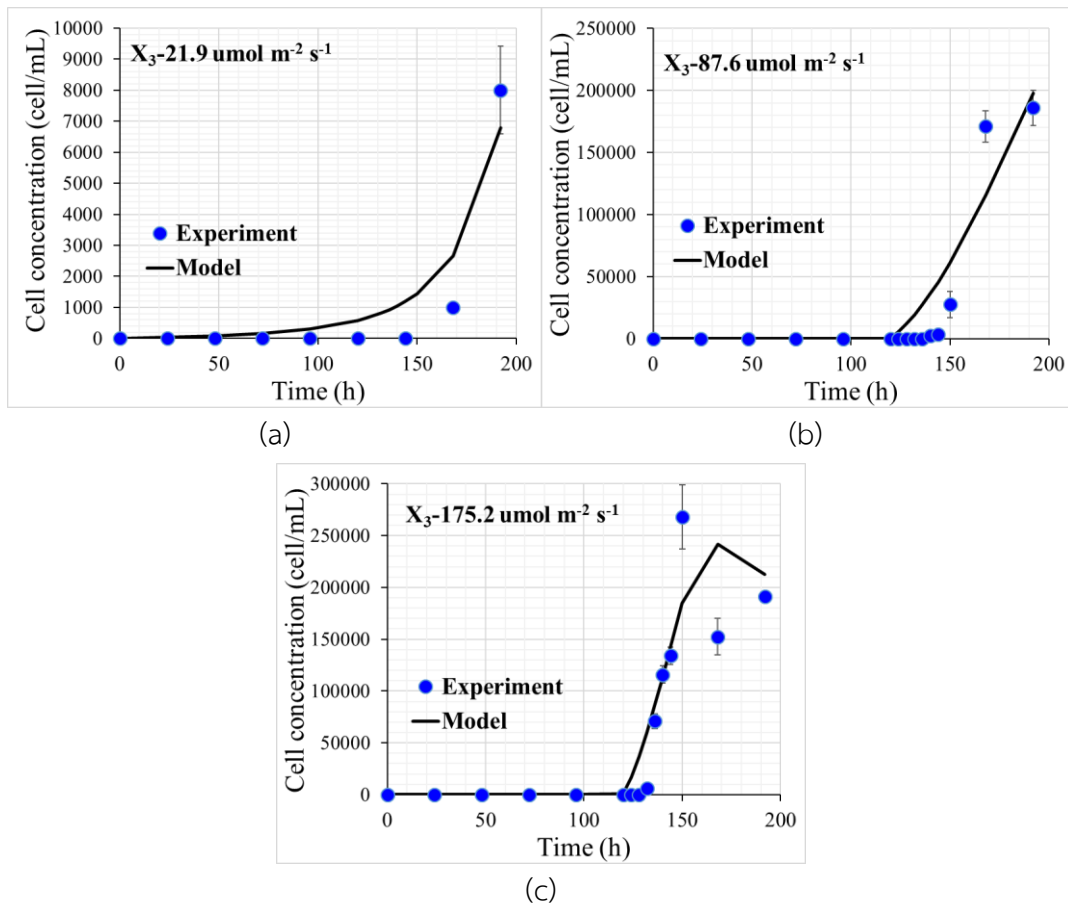
(b)



(c)

รูปที่ 25 ผลของแบบจำลองเทียบกับผลการทดลองของความเข้มข้นของเซลล์ X_2 หรือ non-motile vegetative cells โดยภายใต้ความเข้มแสง $21.9 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (a) $87.6 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (b) และ $175.2 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (c)

รูปที่ 25 แสดงผลจากแบบจำลองของความเข้มข้นของเซลล์เซลล์ X_2 หรือ non-motile vegetative cells ภายใต้สภาวะการเปลี่ยนความเข้มแสงต่างๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลจากแบบจำลองสามารถจำลองผลการทดลองได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับ ผลจากแบบจำลองของเซลล์ X_1 หรือ motile cells พบว่าให้ผลที่ดีกว่า ทั้งนี้ อาจเป็นไปได้ว่า ผลการทดลองจากเซลล์ X_1 มีความคลาดเคลื่อนสูงกว่า เนื่องจากเป็นเซลล์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ นอกจากนี้ เซลล์ X_1 สามารถกำเนิดขึ้นได้จากการแบ่งตัวทั้งจากเซลล์ X_2 และ เซลล์ X_3 ซึ่งทำให้การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ชนิดนี้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว

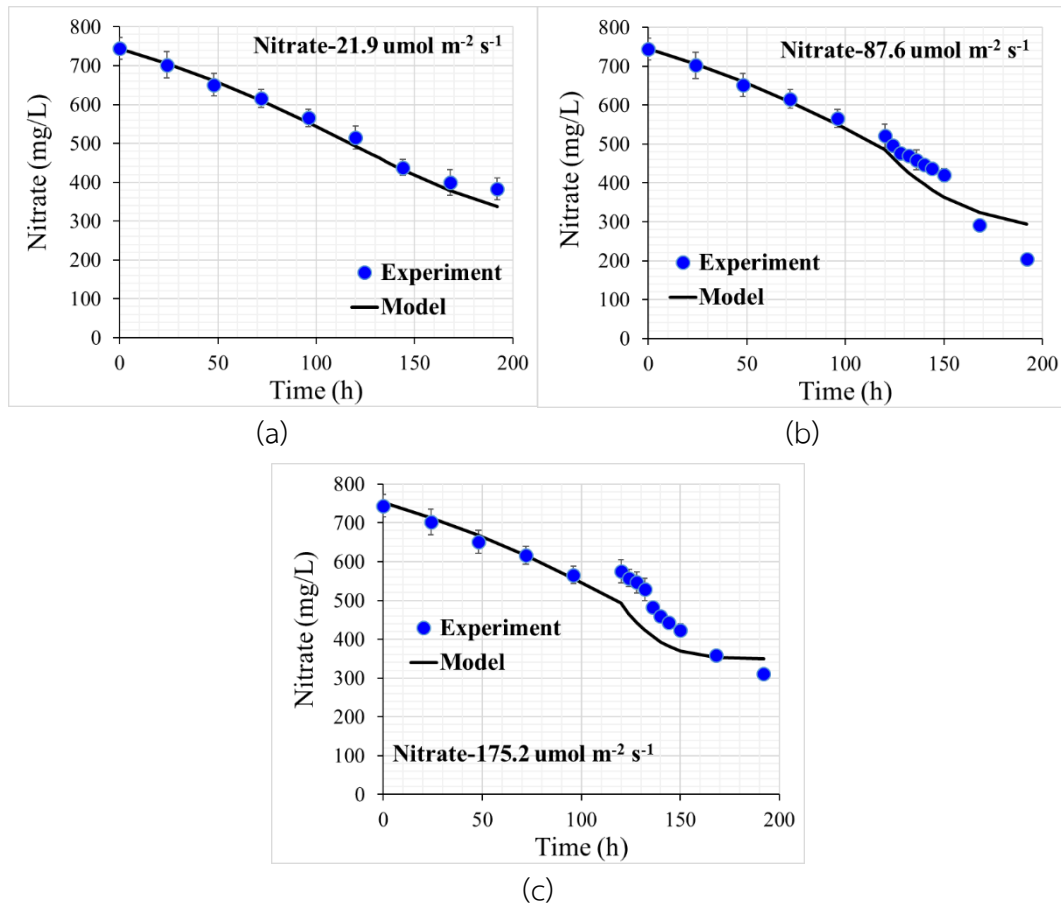


รูปที่ 26 ผลของแบบจำลองเทียบกับผลการทดลองของความเข้มข้นของเซลล์ X_3 หรือ aplanospores หรือ cyst cells โดยภายใต้ความเข้มแสง $21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (a) $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b) และ $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (c)

จากรูปที่ 26 แสดงให้เห็นว่าผลจากแบบจำลองที่แสดงความเข้มข้นของเซลล์ X_3 หรือ aplanospores หรือ cyst cells ภายใต้สภาวะการเปลี่ยนความเข้มแสงต่างๆ สามารถจำลองผลจากการทดลองได้ดี แต่จะมีช่วงเวลาที่ 120-150 ชั่วโมง ที่แบบจำลองให้ผลที่ค่อนข้างคลาดเคลื่อน ซึ่งสาเหตุอาจมาจากการเปลี่ยนรูปแบบเซลล์จากเซลล์ X_2 ไปเป็น X_3 ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงหลักที่เห็นได้ชัด คือ เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีแดง ซึ่งในช่วงของการเปลี่ยนแปลงตรงนี้อาจจะทำให้การวัดคลาดเคลื่อนได้

สำหรับผลจากแบบจำลองของความเข้มข้นของไนเตรตและแอสตาแซนทินแสดงในรูปที่ 27 และ 28 ตามลำดับ โดยพบว่า ผลจากแบบจำลองของความเข้มข้นของไนเตรตภายใต้สภาวะการเปลี่ยนความเข้มแสงต่างๆ ในช่วง 120 ชั่วโมงแรก สามารถจำลองผลจากการทดลองได้ดีมาก หลังจากเปลี่ยนความเข้มแสงเป็น 87.6 และ $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ พบว่ามีความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นในผลจากจำลอง อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากแบบจำลองยังมีแนวโน้มที่ไปทางเดียวกันกับผลจากแบบจำลอง

สำหรับผลจากแบบจำลองของความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน มีความคลาดเคลื่อนจากผลจากแบบจำลองบ้าง แต่ในสภาวะความเข้มแสง $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ผลจากแบบจำลองค่อนข้างให้ผลการจำลองที่ดีเมื่อเทียบกับผลการทดลอง



รูปที่ 27 ผลของแบบจำลองเทียบกับผลการทดลองของความเข้มข้นของไนเตรต โดยภายใต้ความเข้มแสง

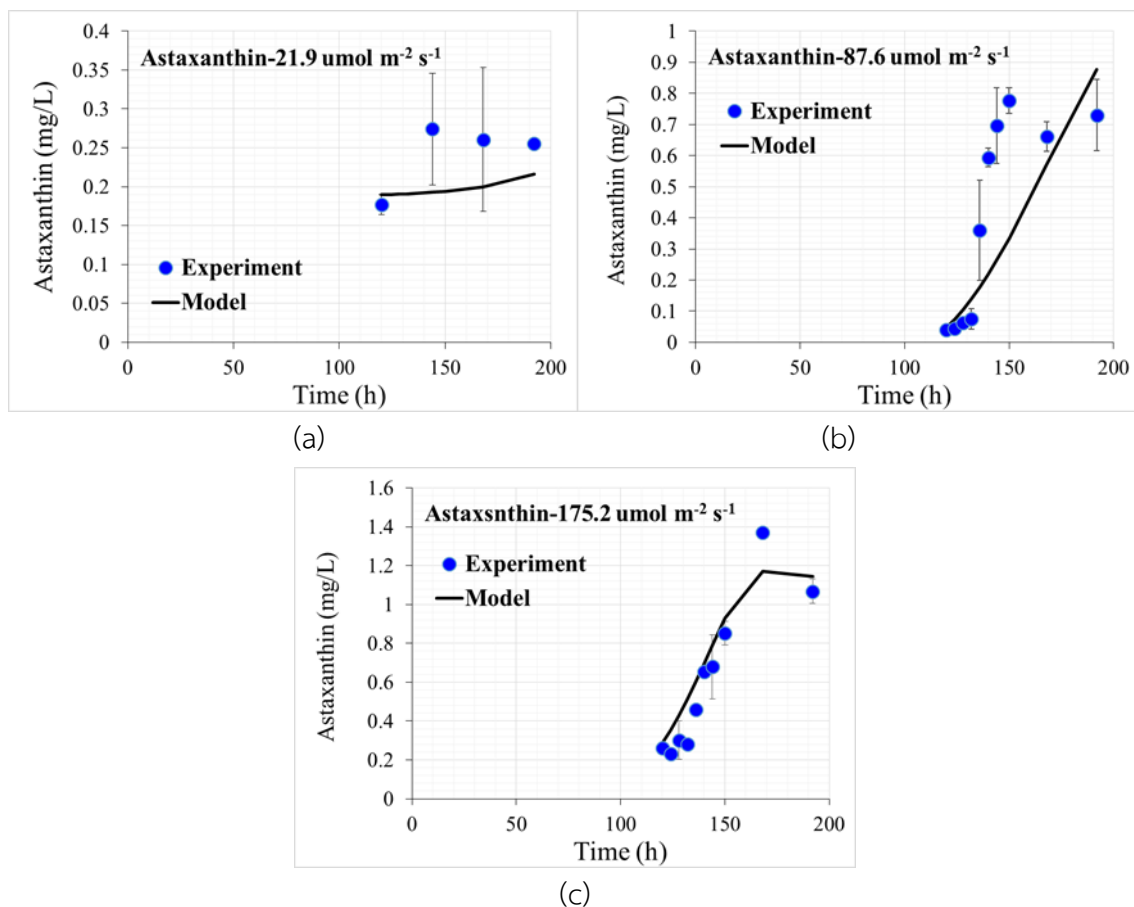
$21.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (a) $87.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b) และ $175.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (c)

5. สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลที่ได้โครงการวิจัยนี้ พบว่า

1) การให้ความเข้มแสงเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอสตาแซนทินในเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ไม่ควรให้ในปริมาณที่สูงหรือต่ำเกินไป หากต่ำเกินไปจะทำให้ใช้เวลาในการสะสมสารดังกล่าวของเซลล์นานขึ้น หรืออาจไม่ทำให้เกิดการสะสมสารดังกล่าวเลย ขณะที่การให้ความเข้มแสงที่สูงเกินไปจะก่อให้เกิดความเครียดแก่เซลล์มากเกินไปและทำให้เซลล์ตายก่อนที่จะเกิดการสะสมสารดังกล่าวในปริมาณมาก ในส่วนนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการใช้ปริมาณความเข้มแสงที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นการสร้างสารดังกล่าวในเซลล์สาหร่ายนี้

2) สามารถใช้ปริมาณไนเตรดที่น้อยเพื่อกระตุ้นการเกิดการสร้างสารแอสตาแซนทินได้ แต่ปริมาณไนเตรดต้องน้อยที่สุดเท่าที่ทำได้ อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบกับการใช้ความเข้มข้นกระตุ้น จะพบว่าการใช้ในเตรดในปริมาณที่น้อยไม่ก่อให้เกิดภาวะเครียดแก่เซลล์มากเท่าที่ควร และอาจทำให้มีการสะสมแอสตาแซนทินที่น้อยกว่า อย่างไรก็ตามในงานนี้ยังพบว่า หากบรรเทาความเครียดแก่เซลล์ที่สะสมสารแอสตาแซนทิน ด้วยการให้ไนเตรดกลับไปปริมาณเริ่มต้น จะก่อให้เกิดการสร้างเซลล์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ ที่ยังมีสารแอสตาแซนทินอยู่ในเซลล์ ซึ่งอาจเป็นอีกหนทางหนึ่งในการเก็บเกี่ยวสารดังกล่าวจากเซลล์ในสภาวะนี้แทนเซลล์แบบ X_3 เดิมซึ่งมีผนังเซลล์ที่หนากว่าและทำให้การสกัดทำได้ยากกว่า



รูปที่ 28 ผลของแบบจำลองเทียบกับผลการทดลองของความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน โดยภายใต้ความเข้มข้นแสง 21.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (a) 87.6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b) และ 175.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (c)

3) แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างมาจากสมการจลพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์ทั่วไปสามารถจำลองผลกระทบของความเข้มข้นที่เกิดขึ้นต่อวงจรชีวิต การเปลี่ยนแปลงรูปแบบเซลล์และการผลิตแอสตาแซนทินรวมถึงการใช้สารอาหารของเซลล์ แม้ว่ามีความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้น แต่แบบจำลองสามารถที่จะมาเป็นเครื่องมือในการประเมินผลของความเข้มข้นที่พอเหมาะแก่การกระตุ้นการสร้างสารดังกล่าวได้

ภาคผนวก

ตารางที่ ก-1 สูตรอาหาร BG-11

สารเคมี	ปริมาณ (g/L)	ความเข้มข้น (g/L) (100X)	สัดส่วนการผสม อาหาร BG-11 (L)	หมายเหตุ
NaNO ₃	0.75		0.75 g	
Na ₂ CO ₃	0.02	20	10 ml	Stock 1
MgSO ₃ •7H ₂ O	0.075	7.5	10 ml	Stock 2
KH ₂ PO ₄ •3H ₂ O	0.05	50	10 ml	Stock 3
Citric acid	0.006	0.6	10 ml	Stock 4
EDTA (disodium salt)	0.001	0.1		
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.036	3.6		
ferric ammonium citrate	0.006	0.6		
สารเคมี	ปริมาณ (g/L)	ความเข้มข้น (g/L) (100X)	สัดส่วนการผสม อาหาร BG-11 (L)	หมายเหตุ
Trace metal mix A5 ซึ่งประกอบไปด้วย				
H ₃ BO ₃	2.86		1 ml	Stock 5
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.079			
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.22			
MnCl ₂ •4H ₂ O	1.81			
NaMoO ₄ •2H ₂ O	0.39			
Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	4.9			

ตารางที่ ก-2 ค่าพารามิเตอร์หรือค่าคงที่ในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

ค่าคงที่	ค่าและหน่วย	ค่าคงที่	ค่าและหน่วย
$V_{\max_k1}$	0.4631 hr^{-1}	$K_{Xl_{kX1}}$	$0.708 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
$V_{\max_k-1}$	0.00135 hr^{-1}	$K_{Xl_{kX2}}$	$3.26 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
$V_{\max_k2}$	0.2678 hr^{-1}	$K_{Xl_{kX3}}$	$1.648 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
$V_{\max_k3}$	0.174 hr^{-1}	$K_{XN_{kX1}}$	73.63 mg.L^{-1}
$V_{\max_k-3}$	$2.92 \times 10^{-6} \text{ hr}^{-1}$	$K_{XN_{kX2}}$	70.717 mg.L^{-1}
$K_{Xl_{k1}}$	$8.483 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	$K_{XN_{kX3}}$	70 mg.L^{-1}
$K_{Xl_{k-1}}$	$0.047 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	$K_{i_Xl_{kX1}}$	$2.414 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
$K_{Xl_{k2}}$	$3.038 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	$K_{i_Xl_{kX2}}$	$0.40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
$K_{Xl_{k3}}$	$0.314 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	m_{X_2}	15.6
$K_{Xl_{k-3}}$	$4.906 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	m_{X_3}	8.33
$K_{XN_{k1}}$	27.69 mg.L^{-1}	S_{X_1}	2
$K_{XN_{k-1}}$	$131.126 \text{ mg.L}^{-1}$	S_{X_2}	8.02
$K_{XN_{k2}}$	9.674 mg.L^{-1}	S_{X_3}	11.11
$K_{XN_{k3}}$	401.71 mg.L^{-1}	I_0	21.9, 87.6, และ $175.2 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
$K_{XN_{k-3}}$	58.34 mg.L^{-1}	z_1	12.88 m^{-1}
$K_{i_Xl_{k1}}$	$0.6257 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	z_2	$87986 \text{ cell mL}^{-1}$
$K_{i_Xl_{k-1}}$	$0.850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	l	0.332 m
$N_{\min, I}$	321.18, 201.13, 349.177 mg.L^{-1}	Q_{N/X_1}	$2.391 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1} \text{ cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$
a	0.488	Q_{N/X_2}	$0.001197 \text{ mg L}^{-1} \text{ cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$
b	30.255	$Y_{P/N}$	$447.714 \text{ mg mg}^{-1}$
K_{ms}	$88116.4 \text{ mg.L}^{-1}$	Y_{P/X_3}	$262767 \text{ mg cell}^{-1}$
$V_{\max_kX1}$	0.004095 hr^{-1}	$K_{N, \min}$	$246.226 \text{ mg.L}^{-1}$
$V_{\max_kX2}$	0.00268 hr^{-1}	K_{NI}	$105.584 \text{ mg.L}^{-1}$
$V_{\max_kX3}$	$8.323 \times 10^{-5} \text{ hr}^{-1}$	Q_p	$1.263 \times 10^{-8} \text{ mg cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$

เอกสารอ้างอิง

1. Miki W (1991) Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure Appl Chem. <https://doi.org/10.1351/pac199163010141>
2. Koller M, Muhr A, Braunegg G (2014) Microalgae as versatile cellular factories for valued products. Algal Res.
3. Shah MMR, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M (2016) Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. Front Plant Sci 7: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
4. Industry Experts (2015) Global Astaxanthin Market: Sources, Technologies and Applications. Healthc Pharma
5. Rüfer CE, Moeseneder J, Briviba K, et al (2008) Bioavailability of astaxanthin stereoisomers from wild (*Oncorhynchus* spp.) and aquacultured (*Salmo salar*) salmon in healthy men: a randomised, double-blind study. Br J Nutr 99:1048–1054. <https://doi.org/DOL: 10.1017/S0007114507845521>
6. Yang Y, Kim B, Lee JY (2013) Astaxanthin structure, metabolism, and health benefits. J Hum Nutr Food Sci 1:1–1003
7. Lorenz, R.T., Cysewski GR (2000) Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends Biotechnol 18:160–167
8. Kang CD, Lee JS, Park TH, Sim SJ (2005) Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. Appl Microbiol Biotechnol. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1889-2>
9. Hata N, Ogbonna JC, Hasegawa Y, et al (2001) Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. J Appl Phycol 13:395–402. <https://doi.org/10.1023/A:1011921329568>
10. Kobayashi M, Kurimura Y, Kakizono T, et al (1997) Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. J Ferment Bioeng 84:94–97. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82794-8](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82794-8)
11. Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S (1993) Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga,

Haematococcus pluvialis. *Appl Environ Microbiol* 59:867–873

12. Santos FM, Mesquita FJ (1984) Ultrastructural Study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis
13. Boussiba S, Vonshak A (1991) Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*1. *Plant Cell Physiol* 32:1077–1082
14. Sun H, Guan B, Kong Q, et al (2016) Repeated cultivation: non-cell disruption extraction of astaxanthin for *Haematococcus pluvialis*. *Sci Rep* 6:20578. <https://doi.org/10.1038/srep20578>
15. AlgaeCan (2020) *Haematococcus pluvialis* is a simple algae with a complex lifecycle. <http://algaecan.com/>
16. Armstrong FAJ (1963) Determination of Nitrate in Water Ultraviolet Spectrophotometry. *Anal Chem* 35:1292–1294. <https://doi.org/10.1021/ac60202a036>
17. Kitson RE, Mellon MG (1944) Colorimetric Determination of Phosphorus as Molybdivanadophosphoric Acid. *Ind Eng Chem Anal Ed* 16:379–383. <https://doi.org/10.1021/i560130a017>
18. Monod J (1949) THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES. *Annu Rev Microbiol* 3:371–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
19. Gesztelyi R, Zsuga J, Kemeny-Beke A, et al (2012) The Hill equation and the origin of quantitative pharmacology. *Arch Hist Exact Sci* 66:427–438. <https://doi.org/10.1007/s00407-012-0098-5>
20. JONES GL, JANSEN F, MCKAY AJ (1973) Substrate Inhibition of the Growth of Bacterium ncib 8250 by Phenol. *Microbiology* 74:139–148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00221287-74-1-139>
21. Gao X, Wang X, Li H, et al (2017) Parameterization of a light distribution model for green cell growth of microalgae: *Haematococcus pluvialis* cultured under red LED lights. *Algal Res* 23:20–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.018>