



ผลกระทบของความเข้มข้นไนเตรทและแสงต่อวงจรชีวิตและการสังเคราะห์แอสตาแซนธินของจุล  
สาหร่าย *Haematococcus pluvialis*



โดย  
นางสาวกานดา พลจรร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

ผลกระทบของความเข้มข้นไนเตรทและแสงต่อวงจรชีวิตและการสังเคราะห์แอสตาแซนทีน  
ของจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต  
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

EFFECT OF NITRATE CONCENTRATION AND LIGHT ON LIFE CYCLE  
PROGRESSION AND ASTAXANTHIN SYNTHESIS IN  
*HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)  
Department of BIOTECHNOLOGY  
Graduate School, Silpakorn University  
Academic Year 2021  
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	ผลกระทบของความเข้มข้นไนเตรทและแสงต่อวงจรชีวิตและการ สังเคราะห์แอสตาแซนธินของจุลสาหร่าย <i>Haematococcus pluvialis</i>
โดย	นางสาวกานดา พลจร
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร. ชลเทพ อูสาคุ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ  
(อาจารย์ ดร. อธิวัฒน์ รุ่งกฤษณ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(อาจารย์ ดร. ชลเทพ อูสาคุ)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน  
(รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก  
(อาจารย์ ดร. ชาญณรงค์ ภูซงควาริน)

60401201 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : แอสตาแซนธิน, จุลสาหร่าย *Haematococcus* sp., วงจรชีวิต, แบบจำลองทาง

คณิตศาสตร์, ไนเตรท

นางสาว กานดา พลจร: ผลกระทบของความเข้มข้นไนเตรทและแสงต่อวงจรชีวิตและการสังเคราะห์แอสตาแซนธินของจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร. ชลเทพ อูสาคุ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงในวงจรชีวิตของเซลล์จุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระที่เรียกว่าแอสตาแซนธิน โดยมีการบูรณาการการทดลองร่วมกับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อทำนายวงจรชีวิตของเซลล์ซึ่งมีเซลล์อยู่ 3 รูปแบบ ได้แก่ เซลล์เคลื่อนที่สีเขียว เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว และเซลล์ที่มีการสะสมแอสตาแซนธิน ซึ่งเซลล์ทั้งหมดจะมีการเปลี่ยนแปลงไปจากการใช้ธาตุไนโตรเจนจากไนเตรทและการสะสมแอสตาแซนธินของเซลล์ โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางสัญญาณวิทยาของเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและมีการให้แสงตลอดเวลาที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ และให้อากาศปริมาณ 1 vvm ที่ประกอบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 1 โดยเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 4-5 วัน ( $250,000 \text{ cell.ml}^{-1}$ ) แล้วเปลี่ยนเป็นระยะกระตุ้นด้วยการลดความเข้มข้นไนเตรท การเพิ่มความเข้มแสง และเปลี่ยนแสงสีเพื่อให้เกิดการสะสมแอสตาแซนธิน พบว่าการกระตุ้นด้วยความเข้มแสงที่ 18,000 ลักซ์ และการลดความเข้มข้นไนเตรทเหลือ  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  ส่งผลให้เกิดการสะสมแอสตาแซนธินภายใน 24 ชั่วโมงหลังได้รับการกระตุ้นเซลล์ แต่ผลผลิตแอสตาแซนธินที่ความเข้มแสง 12,000 ลักซ์ กลับให้ปริมาณแอสตาแซนธินที่สูงที่สุด อยู่ที่  $5.7 \text{ mg.L}^{-1}$  ในส่วนของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์อธิบายกระบวนการเปลี่ยนแปลงภายในวงจรชีวิตด้วยสมการของที่ดัดแปลงจาก Monod ภายใต้สภาวะที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ผลเปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองกับแบบจำลองมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน โดยมีการประเมินค่าความคลาดเคลื่อนระหว่างผลการทดลองกับแบบจำลองด้วยค่า  $R^2$  และค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปรเชิงเส้นตรง ( $r_p$ ) เข้าใกล้ 1 งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อนำผลกาทดลองที่ได้ไปพัฒนาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อเป็นแนวทางและใช้หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายรูปแบบอื่น ๆ ในการผลิตแอสตาแซนธินต่อไป

60401201 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : Astaxanthin, *Haematococcus* sp., Mathematical model, Nitrate, LED light, Life Cycle

MISS KANDA PONJORN : EFFECT OF NITRATE CONCENTRATION AND LIGHT ON LIFE CYCLE PROGRESSION AND ASTAXANTHIN SYNTHESIS IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* THESIS ADVISOR : CHONLATEP USAKU

This study focuses on kinetics of life cycle progression of *Haematococcus pluvialis*, green microalgae that can produce the highly antioxidant “astaxanthin”, through a combined experimental and mathematical modeling approach. All cell types in the microalgae life cycle; motile cells, non-motile green and red cells, and nitrate concentration were quantified during the culture of *Haematococcus pluvialis* in 1-liter photobioreactors under continuous illumination at light intensity of 1,500 lux at 25°C with CO<sub>2</sub>-enriched (1%) air supply of 1 vvm. It was found that, for the first 120 hours, there existed a relatively higher number of motile and non-motile green cells in the culture. The stimulation phase was performed with nitrate concentration, light intensity and light color to induce astaxanthin accumulation in cell. It was found that stimulation with a light intensity of 18,000 lux and a nitrate concentration of 40 mgL<sup>-1</sup> resulted in astaxanthin accumulation within 24 hours after the stimulation. In contrast, the astaxanthin yield at 12,000 lux gave the highest astaxanthin content at 5.7 mg.L<sup>-1</sup>. Provided the observed results, at 3,000 lux a mathematical model was constructed, in which the transitions in the life cycle were described using conservation laws with modified Monod kinetics. Under the studied culturing conditions, the model simulation was in good agreement with the experimental data as indicated by the calculated correlation factor ( $r_p$ ) and R-square ( $R^2$ ). This work can be a basic for further determination of optimal conditions where either non-motile green or red cells need to be maximized.

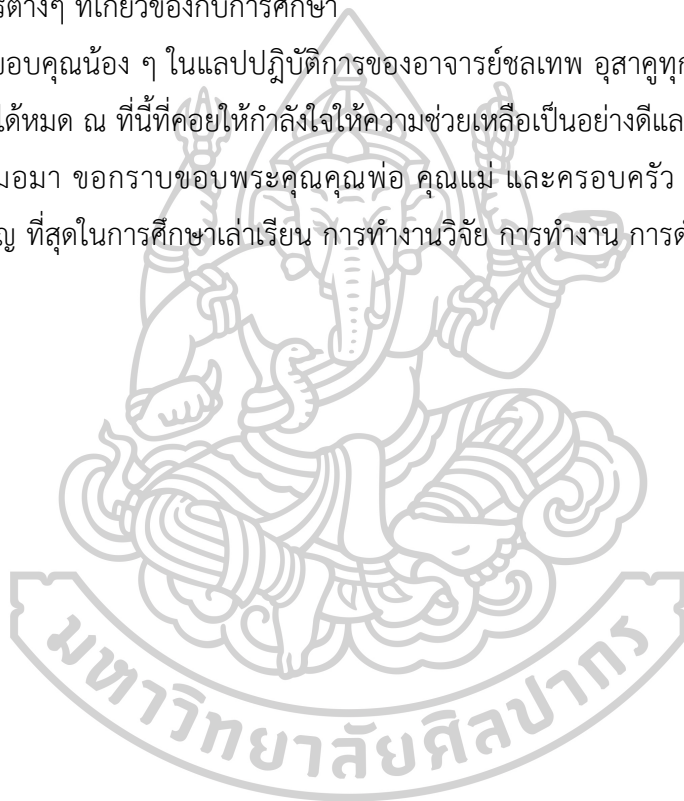
## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้เนื่องจาก อาจารย์ชลเทพ อุสาคุ ขอกราบ  
ขอบพระคุณที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษาที่ดีแนวความคิดในการทำงานวิจัย ตลอดจน ตรวจสอบเล่ม  
วิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และ  
เทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์  
และงานธุรการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

ขอขอบคุณน้อง ๆ ในแลปปฏิบัติการของอาจารย์ชลเทพ อุสาคุทุกคน และหลายๆ ท่านที่ไม่  
สามารถกล่าวได้หมด ณ ที่นี้ที่คอยให้กำลังใจให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีและ ประสพการณ์การทำงาน  
ร่วมกันที่ดีเสมอมา ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ญาติที่สนิททุกคนสำหรับ  
กำลังใจที่สำคัญ ที่สุดในการศึกษาเล่าเรียน การทำงานวิจัย การทำงาน การดำเนินชีวิตที่ดีและทุกสิ่งทุก  
อย่างตลอดมา

นางสาว กานดา พลจร



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยและเอกสารที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 แอสตาแซนธิน.....	4
2.2 แหล่งของแอสตาแซนธิน.....	4
2.3 ประโยชน์ของแอสตาแซนธิน.....	7
2.4 แอสตาแซนธินกับการนำไปใช้ประโยชน์.....	7
2.5 ลักษณะทางชีววิทยาของจุลสาหร่าย <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	8
2.6 การเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์จุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> .....	10
2.7 การสังเคราะห์แอสตาแซนธินของจุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> .....	11
2.8 สภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	14
2.9 แสงและการเจริญเติบโตของพืช.....	16



2.10 การตอบสนองของพืชต่อแสง.....	19
2.11 คุณภาพของแสง (Light quality).....	20
2.12 Light Emitting Diode (LED).....	21
2.14 การประมาณค่าพารามิเตอร์หรือตัวแปรที่เกี่ยวข้อง .....	26
2.15 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	26
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีวิจัย .....	33
3.1 การเตรียมอุปกรณ์ .....	33
3.2 วิธีการทดลอง.....	37
3.3 การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์.....	38
3.4 วิธีการประมาณค่าพารามิเตอร์ .....	46
3.5 วิธีการคำนวณค่า R-Square.....	47
3.6 วิธีการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson Correlation: $r_p$ ).....	48
3.7 การวิเคราะห์.....	48
3.8 การคำนวณความยาวคลื่นของแสงสี.....	50
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง.....	51
4.1 การศึกษาวงจรชีวิตของเซลล์จุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> .....	51
4.2 การศึกษาความเข้มแสง.....	52
4.3 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นไนเตรท .....	54
4.4 การศึกษาผลกระทบความเข้มแสง.....	58
4.5 การศึกษาผลกระทบคลื่นแสงสีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย .....	62
4.6 การศึกษาความเข้มฟอสเฟตต่อวงจรชีวิตของเซลล์สาหร่าย .....	66
4.7 การศึกษาผลกระทบค่าความเป็นกรดต่างต่อวงจรชีวิตของเซลล์จุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> .....	67
4.8 การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์วงจรชีวิตของเซลล์จุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> .....	69
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	77

ภาคผนวก .....79

รายการอ้างอิง.....98

ประวัติผู้เขียน ..... 107



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างของสาหร่ายขนาดเล็กเป็นแหล่งพบแอสตาแซนธิน.....	6
ตารางที่ 2 ปริมาณแอสตาแซนธินที่ได้จากแหล่งทางธรรมชาติอื่นๆนอกจากสาหร่าย.....	6
ตารางที่ 3 สรุปผลการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ .....	15
ตารางที่ 4 สูตรอาหาร BG-11.....	36
ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบค่าสี (RGB) ของแสงที่ใช้เพาะเลี้ยง.....	62
ตารางที่ 6 ค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมของแบบจำลองกับผลการทดลอง .....	69
ตารางที่ 7 ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของความเข้มข้นไนเตรตที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Armstrong .....	79
ตารางที่ 8 ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของความเข้มข้นฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Vanadate-molybdate .....	80
ตารางที่ 9 ข้อมูลค่าพื้นที่ใต้กราฟของแอสตาแซนธินที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	81



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 โครงสร้างไอโซเมอร์ของแอสตาแซนธินชนิดต่างๆ .....	5
ภาพที่ 2 แผนภาพการเจริญเติบโตของการแบ่งเซลล์ของจุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> และระยะการสะสมแอสตาแซนธิน.....	9
ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ของจุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> .....	11
ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบวิถี Mevalonate pathway ของพืชและสาหร่ายในการสร้างสารตั้งต้นผลิตแคโรทีนอยด์.....	12
ภาพที่ 5 การสังเคราะห์แอสตาแซนธิน โดยที่ PSY คือ phytoene synthase, PDS คือ phytoene desaturase, ZDS คือ $\zeta$ -carotene desaturase, CRTISO คือ carotenoid isomerase, LCY คือ lycopene cyclase, BKT คือ $\beta$ -carotene ketolase, CHY คือ $\beta$ -carotene hydroxylase .....	12
ภาพที่ 6 แผนภาพสรุปสังเคราะห์แอสตาแซนธินในจุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> Enzyme designations: CRTL-B คือ lycopene $\beta$ -cyclase; CRTO คือ $\beta$ -carotene oxygenase; CRTR-B คือ $\beta$ -ring hydroxylase; GGPS คือ geranylgeranyl diphosphate synthase; IPI คือ isopentenyl diphosphate isomerase; PDS คือ phytoene desaturase; PSY คือ phytoene synthase; ZDS คือ $\zeta$ -carotene desaturase .....	13
ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ของรงควัตถุต่อการดูดกลืนแสง.....	16
ภาพที่ 8 กระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชบริเวณคลอโรพลาสต์.....	17
ภาพที่ 9 ระบบแสงของพืชบริเวณไทลาคอยด์.....	18
ภาพที่ 10 การเกิดแสงจากหลอดไฟ LED.....	21
ภาพที่ 11 แสดงส่วนประกอบ และชนิดของสารกึ่งตัวนำที่ใช้ในการทำหลอด LED.....	22
ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบผลการทดลองกับแบบจำลองของอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการสะสมไขมัน .....	31
ภาพที่ 13 ลักษณะระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย .....	35
ภาพที่ 14 แผนภูมิสมมูลมวลของวงจรชีวิตจุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> .....	39

ภาพที่ 15 การนับเซลล์ด้วย Haemocytometer .....	49
ภาพที่ 16 หลักการคำนวณความยาวคลื่นแสงสีของแอฟ MJUSPEC.....	50
ภาพที่ 17 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์และชนิดของเซลล์สำหรับที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ( คือ เซลล์ทั้งหมด; คือ เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว; คือ เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดง; คือ เซลล์เคลื่อนที่) .....	51
ภาพที่ 18 เซลล์ในระยะต่างๆของวงจรชีวิตของจุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> ; (A) เซลล์เคลื่อนที่ (vegetative cells); (B) ระยะเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว (palmella cells); (C) เซลล์เดี่ยวในระยะที่มีการสะสมของแอสตาแซนธิน; (D) เซลล์ระยะสะสมของแอสตาแซนธิน (aplanospore cells).....	52
ภาพที่ 19 การเจริญเติบโตของเซลล์ตลอดระยะเวลาชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 240 โดย (A) ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ และ(B) ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์.....	53
ภาพที่ 20 ความเข้มข้นของไนเตรทระหว่างเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน.....	54
ภาพที่ 21 การเจริญเติบโตของเซลล์ตลอดระยะเวลาชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 240 หลังจากชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 คือสภาวะการกระตุ้นด้วยความเข้มข้นไนเตรท โดย (A) ความเข้มข้นไนเตรท 40 มิลลิกรัมต่อลิตร; (B) ความเข้มข้นไนเตรท 80 มิลลิกรัมต่อลิตร; (C) ความเข้มข้นไนเตรท 120 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	56
ภาพที่ 22 ความเข้มข้นแอสตาแซนธินในสภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วยความเข้มแสงช่วง 96 ชั่วโมง ถึง 240 ชั่วโมง (วงกลมทึบ : 40 mg/L สีเหลี่ยมทึบ : 80 mg/L สามเหลี่ยมทึบ : 120 mg/L).....	57
ภาพที่ 23 การเจริญเติบโตของเซลล์ตลอดระยะเวลาชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 240 หลังจากชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 คือสภาวะการกระตุ้นด้วยความเข้มข้นแสง โดย (A) ความเข้มแสง 6,000 ลักซ์; (B) ความเข้มข้นแสง 12,000 ลักซ์ และ (C) ความเข้มข้นแสง 18,000 ลักซ์.....	59
ภาพที่ 24 ความเข้มข้นไนเตรท ภายหลังจากชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 ในสภาวะการกระตุ้นด้วยความเข้มข้นแสงต่างๆ .....	60
ภาพที่ 25 ความเข้มข้นแอสตาแซนธิน (Astaxanthin concentration, mg/l) ในช่วงการกระตุ้น ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 ในสภาวะการกระตุ้นด้วยความเข้มข้นแสง 6,000 ลักซ์ ความเข้มแสง 12,000 ลักซ์ และความเข้มแสง 18,000 ลักซ์ (วงกลมทึบ : 12,000 ลักซ์ สีเหลี่ยมโปร่ง : 8,000 ลักซ์ สามเหลี่ยมโปร่ง : 6,000 ลักซ์) .....	61
ภาพที่ 26 การทำงานของแอฟฟลิเคชั่นในการวัดความยาวคลื่นแสงสี .....	62

ภาพที่ 27 ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> ในสภาวะกระตุ้นด้วยแสงสีน้ำเงิน (A) สีแดง (B) และสีม่วง (C) .....	63
ภาพที่ 28 การเจริญเติบโตของเซลล์ตลอดระยะเวลาชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 240 หลังจากชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 คือสภาวะการกระตุ้นด้วยแสงสี โดย (A) Blue light; (B) Red light และ (C) Purple light .....	64
ภาพที่ 29 ความเข้มข้นไนเตรทที่ (A) และที่ความเข้มข้นแอสตาแซนธิน (B) .....	65
ภาพที่ 30 ความเข้มข้นฟอสเฟต (Phosphate concentration, mg/l) ในช่วงการกระตุ้น ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 ในสภาวะการกระตุ้น .....	67
ภาพที่ 31 ค่าความเป็นกรดต่างในช่วงการกระตุ้น ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 ในสภาวะการกระตุ้น .....	68
ภาพที่ 32 กราฟแสดงผลการทดลอง(วงกลม) กับแบบจำลอง(เส้น) ของเซลล์ $X_1$ ที่ความเข้มข้นแสง 3,000 ลักซ์ .....	71
ภาพที่ 33 กราฟแสดงผลการทดลอง(วงกลม) กับแบบจำลอง(เส้น) ของเซลล์ $X_2$ ที่ความเข้มข้นแสง 3,000 ลักซ์ .....	71
ภาพที่ 34 กราฟแสดงผลการทดลอง(วงกลม) กับแบบจำลอง(เส้น) ของเซลล์ $X_3$ ที่ความเข้มข้นแสง 3,000 ลักซ์ .....	72
ภาพที่ 35 กราฟแสดงผลการทดลอง (วงกลม) กับแบบจำลอง (เส้น) ของความเข้มข้นไนเตรทที่ความเข้มข้นแสง 3,000 ลักซ์ .....	73
ภาพที่ 36 ผลการทดลอง (วงกลม) และผลของแบบจำลอง (เส้น) ของความเข้มข้นของเซลล์ชนิด .75 .....	75
ภาพที่ 37 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นไนเตรตและค่าการดูดกลืนแสงที่ 220 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer .....	79
ภาพที่ 38 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นฟอสเฟตและค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer .....	80
ภาพที่ 39 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นแอสตาแซนธินและพื้นที่ใต้กราฟ โดยวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....	81
ภาพที่ 40 โปรแกรม Copasi .....	82
ภาพที่ 41 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการสร้าง Compartments .....	83

ภาพที่ 42 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการสร้างตัวแปร.....	83
ภาพที่ 43 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการกำหนดชื่อตัวแปร ประเภทของตัวแปร และค่าเริ่มต้น .....	84
ภาพที่ 44 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการระบุชนิด Simulation type และค่า Initial Concentration .....	84
ภาพที่ 45 นำตัวแปรต่างๆมาเขียนเป็นสมการจลนพลศาสตร์ .....	85
ภาพที่ 46 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการใส่ข้อมูล Simulation type .....	85
ภาพที่ 47 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการใส่ข้อมูล Simulation type .....	86
ภาพที่ 48 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการเลือกตัวแปรในสมการที่ต้องการ .....	86
ภาพที่ 49 กด Commit เพื่อเป็นการยืนยันการเลือกตัวแปร .....	87
ภาพที่ 50 การตรวจสอบความถูกต้องของสมการในภาพรวม .....	87
ภาพที่ 51 หน้าต่างการเลือกสร้างกราฟ.....	88
ภาพที่ 52 การตั้งชื่อกราฟ.....	88
ภาพที่ 53 หน้าต่างแสดงการกำหนดแกน X และ แกน Y.....	89
ภาพที่ 54 กำหนด แกน X คือเวลา แกน Y คือ ความเข้มข้นเซลล์ $X_1$ .....	90
ภาพที่ 55 กด Commit และสร้างกราฟให้ครบ .....	90
ภาพที่ 56 หน้าต่างการตั้งค่า Duration.....	91
ภาพที่ 57 กราฟที่ได้จากการกำหนดค่าด้วยโปรแกรม copasi.....	91
ภาพที่ 58 การเตรียมข้อมูลผลการทดลองใส่ Notepad.....	92
ภาพที่ 59 การนำข้อมูลจาก Notepad เข้าสู่โปรแกรม Copasi .....	93
ภาพที่ 60 การกำหนดผลการทดลองที่ได้ใส่เข้ามาให้ขึ้นกับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้น .94	
ภาพที่ 61 การเพิ่มค่าพารามิเตอร์.....	94
ภาพที่ 62 การกำหนดค่าตัวแปร.....	95
ภาพที่ 63 การปรับเปลี่ยนค่าตัวแปร .....	96

ภาพที่ 64 หน้าต่างก่อนเริ่มการประมาณค่าพารามิเตอร์.....97





## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

แอสตาแซนธิน (3,3'-dihydroxy- $\beta$ -carotene-4,4'-dione) เป็นรงควัตถุในกลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ (Keto-carotenoid) เป็นสารสีแดงสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้แก่ สัตว์ทะเลแบคทีเรีย ยีสต์และสาหร่ายขนาดเล็กหลากหลายชนิด (Higuera-Ciapara, Felix-Valenzuela et al. 2006) (Ambati, Phang et al. 2014) ซึ่งมีมูลค่าสูงในท้องตลาดโดยราคาของแอสตาแซนธินอยู่ที่ กิโลกรัมละ 2500 ดอลลาร์สหรัฐ (Milledge 2011) หรือ ประมาณ 79,733 บาท เนื่องด้วยแอสตาแซนธินมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเบต้าแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) วิตามินซี ซีแซนธินและ แอลฟา-โทโคฟีรอล ( $\alpha$ -tocopherol) ซึ่งมีงานวิจัยจำนวนมากได้ศึกษาแอสตาแซนธินพบว่าสามารถยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation (Miki 1991) ป้องกันผลกระทบจากรังสียูวี ช่วยลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็งต่างๆ การต้านการอักเสบ (Seon-Jin 2003) ชะลอกระบวนการแก่ชรา จึงมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อความสวยงาม ปัจจุบันแอสตาแซนธินสามารถผลิตได้จาก 2 กระบวนการหลัก ได้แก่ จากการสังเคราะห์ทางเคมี (synthetic astaxanthin) และจากการสังเคราะห์ทางธรรมชาติ (natural astaxanthin) โดยแหล่งแอสตาแซนธินในธรรมชาติที่สำคัญและมีการผลิตชีวมวลที่สูง คือ สาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็ก *Haematococcus pluvialis* ซึ่งสามารถสะสมแอสตาแซนธินได้สูงสุดถึงร้อยละ 5 ของน้ำหนักแห้ง (Lorenz and Cysewski 2000) โดยแอสตาแซนธินที่ได้จากสาหร่ายดังกล่าวจะมีโครงสร้างโมเลกุล ไอโซเมอร์แบบทรานส์ประมาณร้อยละ 80 (Yuan and Chen 2000) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อเทียบกับโครงสร้างชนิดอื่นๆ

จุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* สามารถสังเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอสตาแซนธิน การสะสมแอสตาแซนธินในเซลล์ของจุลสาหร่ายชนิดนี้มีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับแอสตาแซนธินจากแหล่งธรรมชาติอื่นๆ ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลให้เกิดการสะสมแอสตาแซนธิน เช่น สารอาหาร ความเข้มแสง (Sarada, Bhattacharya et al. 2002) อุณหภูมิ (Hong, Choi et al. 2016) ความเป็นกรด-ด่าง (Kang, Lee et al. 2005) ความเข้มข้นอาหาร และคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งในธรรมชาติแสงและสารอาหารเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย โดยแสงในธรรมชาติสามารถแบ่งแสงสีได้จากความยาวคลื่นแสง ซึ่งแต่

ละความยาวคลื่นแสงจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสงของพืช แต่จะพบอุปสรรคที่สำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายในธรรมชาติคือการเปลี่ยนแปลงฤดูกาลและอุณหภูมิตลอดทั้งปีซึ่งส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายดังกล่าวให้มีการสังเคราะห์แอสตาแซนธิน จึงมีการสร้างระบบการให้แสงเทียมจากแหล่งกำเนิดแสงที่สร้างขึ้นเพื่อเลี้ยงในอาคาร เช่น หลอดฟลูออเรสเซนต์ ไฟแอลอีดี โคมไฟ เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการใช้ไฟแอลอีดี (light-emitting diodes) ซึ่งมีขนาดเล็ก ใช้พลังงานน้อย ก่อให้เกิดความร้อนต่ำและสามารถควบคุมสีและความเข้มแสงได้ง่าย (Glemser, Heining et al. 2016)

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาภาวะการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ที่เกี่ยวเนื่องกับการแบ่งตัวและการสร้างสารแอสตาแซนธิน ภายใต้ความเข้มข้นไนเตรท ความเข้มแสงและแสงสี โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปของเซลล์จุลสาหร่ายและผลผลิตแอสตาแซนธิน แล้วนำผลการทดลองของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* แบบ 2 ขั้นตอน มาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ดังนั้นแบบจำลองที่ได้ในงานวิจัยนี้จึงอาจเป็นต้นแบบของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเพาะเลี้ยง *H. pluvialis* เพื่อการผลิตแอสตาแซนธินที่จะนำไปใช้ในการควบคุมและหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงและเพิ่มผลผลิตแอสตาแซนธินในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของไนเตรท ความเข้มแสง และแสงสีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงในวงจรชีวิต และการผลิตแอสตาแซนธิน
2. เพื่อศึกษาจลนศาสตร์ของการเปลี่ยนแปลงในวงจรชีวิตของเซลล์สาหร่ายต่อความเข้มข้นของไนเตรท ความเข้มแสง และแสงสี
3. เพื่อศึกษาการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ของการเปลี่ยนแปลงในวงจรชีวิตและการผลิตแอสตาแซนธิน

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ที่ความเข้มข้นของไนเตรทต่ำกว่าความเข้มข้นเริ่มต้น และแสงสีที่แตกต่างกัน โดยวัดความหนาแน่นเซลล์ชนิดต่างๆในวงจรชีวิต ความเข้มข้นฟอสเฟต ความเข้มข้นไนเตรทและพีเอช

2. ศึกษาจลนศาสตร์ของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* การเปลี่ยนแปลงของเซลล์แต่ละชนิดในวงจรชีวิตต่อการเปลี่ยนไปของระดับปัจจัยสารอาหารและแสงสีต่างๆ
3. การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* จากผลกระทบของความเข้มแสง

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบผลกระทบของความเข้มข้นของไนเตรทในอาหารและแสงสีที่ส่งผลต่อการการเจริญเติบโตและการสะสมแอสตาแซนธินในเซลล์
2. ทำให้ทราบถึงจลนศาสตร์การเปลี่ยนแปลงของเซลล์สาหร่ายในวงจรชีวิตของจุลสาหร่าย *H. Pluvialis*
3. ทำให้เข้าใจวงจรชีวิตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในสถานะที่ได้รับการกระตุ้นและการผันกลับเป็นเซลล์ปกติ
4. ใช้ข้อมูลในการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์วงจรชีวิตของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* เพื่อนำไปใช้ในการออกแบบ ควบคุมและหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย



## บทที่ 2

### งานวิจัยและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

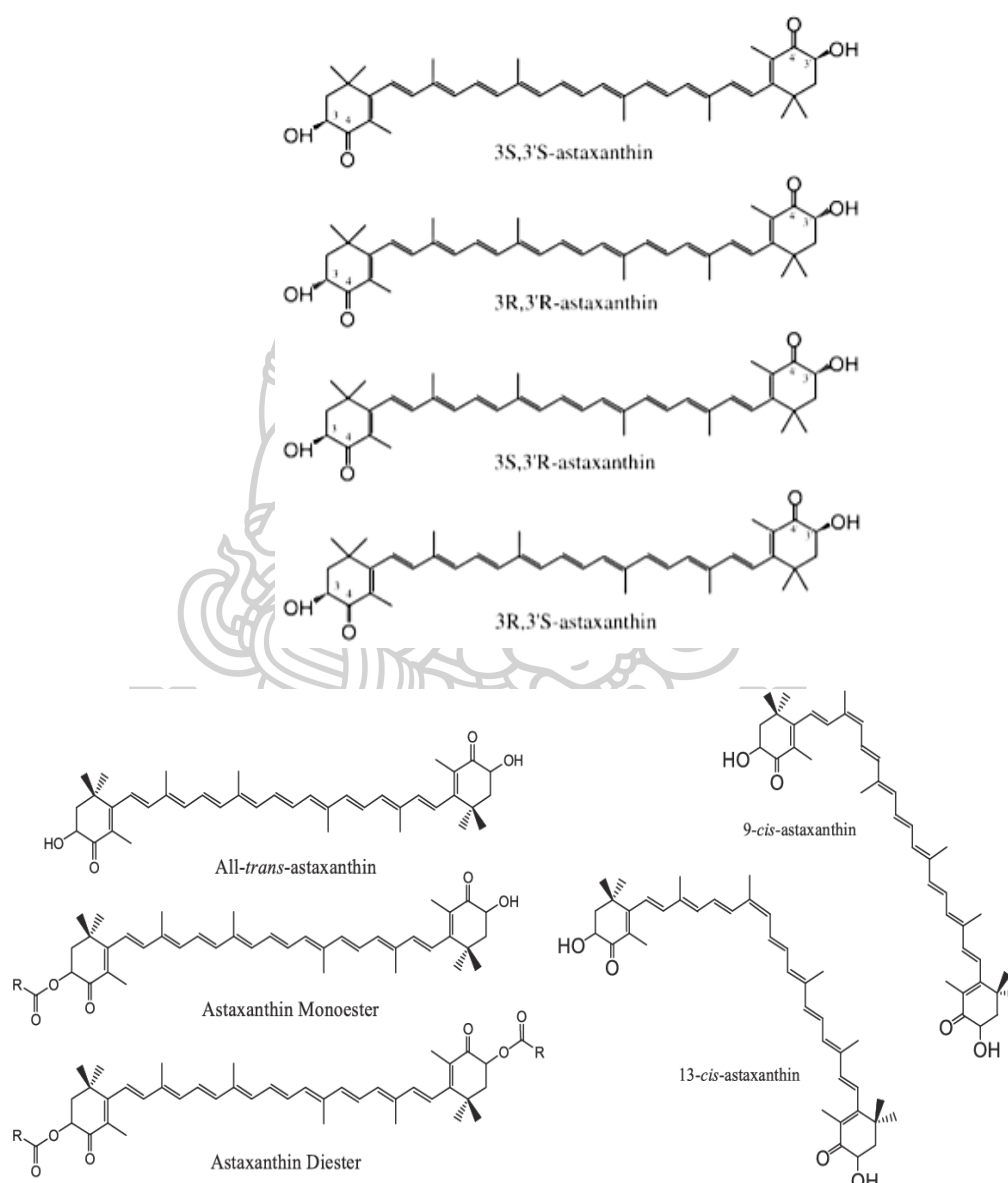
#### 2.1 แอสตาแซนธิน

แอสตาแซนธิน (3,3'-dihydroxy- $\beta$ -carotene-4,4'-dione) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่จัดอยู่ในกลุ่มของแซนโทฟิลล์ หรืออาจเรียกว่า คีโตนอยด์ (Keto-carotenoid) ซึ่งเป็นรงควัตถุในธรรมชาติ มีลักษณะสีแดง สามารถพบได้พบได้จากสัตว์น้ำในตระกูล crustacean เช่น กุ้ง ปู ปลาแซลมอน ปลาเทราท์ รวมทั้งสาหร่ายและยีสต์บางชนิด (Higuera-Ciapara, Felix-Valenzuela et al. 2006, Ambati, Phang et al. 2014) เป็นต้น จัดจำแนกโครงสร้างทางเคมีของแอสตาแซนธินได้ 5 ชนิด คือ (3S, 3'S)-*trans*-astaxanthin (3R, 3'S)-*trans*-astaxanthin (3R, 3'R)-*trans*-astaxanthin, 9-*cis*-astaxanthin และ 13-*cis*-astaxanthin นอกจากนี้ยังพบในรูปของแอสตาแซนธินเอสเทอร์ ได้แก่ astaxanthin Monoester และ astaxanthin Diester ดังภาพที่ 1

#### 2.2 แหล่งของแอสตาแซนธิน

ในปัจจุบันการผลิตแอสตาแซนธินเพื่อการค้าทำได้ 2 วิธี ได้แก่ 1) การสังเคราะห์ทางเคมี (synthetic astaxanthin) 2) การสังเคราะห์จากแหล่งธรรมชาติ (natural astaxanthin) ซึ่งในช่วงแรก บริษัท F. Hoffmann-LaRoche, Ltd. เป็นบริษัทแรกที่ทำการผลิตแอสตาแซนธินจากทางเคมี โดยมีมูลค่าทางการตลาดของแอสตาแซนธินอยู่ที่ 200 ล้านดอลลาร์ต่อปี ในปัจจุบันมีอุตสาหกรรมการผลิตแอสตาแซนธินทางเคมีขนาดใหญ่ ได้แก่ DSM ของประเทศเนเธอร์แลนด์ BASF ของประเทศฝรั่งเศส และ NHU ในประเทศจีน ซึ่งมีการประมาณมูลค่าผลผลิตอยู่ที่ประมาณกิโลกรัมละ 1000 เหรียญสหรัฐ และมูลค่าทางการตลาดอยู่ที่กิโลกรัมละ 2000 เหรียญสหรัฐ (Olalizola 2003, Milledge 2011) โดยโครงสร้างแอสตาแซนธินสังเคราะห์จะแตกต่างกับแอสตาแซนธินทางธรรมชาติ แอสตาแซนธินสังเคราะห์จะผสมไอโซเมอร์ 3 ไอโซเมอร์ คือ (3S, 3'S) astaxanthin (3R, 3'S) astaxanthin (3R, 3'R) astaxanthin และ (3S, 3'R) astaxanthin ในสัดส่วน 1:2:1:2 ตามลำดับ ดังภาพที่ 1 ในขณะที่แอสตาแซนธินทางธรรมชาติจะพบโครงสร้างไอโซเมอร์ (3S, 3'S)-*trans*-astaxanthin หรือ (3R, 3'R)-*trans*-astaxanthin แม้การสังเคราะห์ทางเคมีสามารถทำได้อย่างต่อเนื่องและผลิตแอสตาแซนธินได้ปริมาณมาก แต่ด้วยความตระหนักทางชีวภาพและความปลอดภัยทางด้านอาหาร (Oplatowska-Stachowiak and Elliott 2017) แอสตาแซนธินสังเคราะห์ในอเมริกาจึงถูกอนุญาตให้นำมาใช้ในอุตสาหกรรมเลี้ยงแซลมอนเท่านั้น โดยแอสตาแซนธินตามธรรมชาติ (Higuera-Ciapara, Felix-Valenzuela et al. 2006) สามารถพบมากในสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง

ปู ปลาแซลมอน ปลาเทราท์ เป็นต้น รวมทั้งสาหร่ายและยีสต์บางชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2 พบว่าสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เป็นสาหร่ายที่สามารถผลิตแอสตาแซนธินในธรรมชาติได้สูงสุด โดยอยู่ที่ปริมาณ 1.0%-3.0% ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้สาหร่ายชนิดนี้ ยังมีจากแหล่งธรรมชาติอื่นๆ แต่ยังมีผลผลิตแอสตาแซนธินไม่สูงเท่าสาหร่าย *H. pluvialis*



ภาพที่ 1 โครงสร้างไอโซเมอร์ของแอสตาแซนธินชนิดต่างๆ

ที่มา : ดัดแปลงจาก (Higuera-Ciapara, Felix-Valenzuela et al. 2006, Holtin, Kuehnle et al. 2009)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของสาหร่ายขนาดเล็กเป็นแหล่งพบแอสตาแซนธิน

แหล่งที่พบ	แอสตาแซนธิน (โดยน้ำหนักแห้ง)	หมายเหตุ
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3.8	(Ranga, Sarada et al. 2009)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3.8	(Aflalo, Meshulam et al. 2007)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3.6	(Torzillo, Goksan et al. 2003)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3.4	(Orosa, Torres et al. 2000)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	2.7	(Wang, Han et al. 2013)
<i>Chlorococcum</i>	0.2	(Zhang and Lee 1997)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	0.001	(Wang and Peng 2008)
<i>Neochloris wimmeri</i>	0.6	(Orosa, Torres et al. 2000)
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	0.02	(Banerjee, Ghosh et al. 2009)
<i>Ulva lactuca</i>	0.01	(Banerjee, Ghosh et al. 2009)

ตารางที่ 2 ปริมาณแอสตาแซนธินที่ได้จากแหล่งทางธรรมชาติอื่น ๆ นอกจากสาหร่าย

ชนิดของจุลินทรีย์	ปริมาณแอสตาแซนธินที่ผลิต ได้ (ไมโครกรัมต่อกรัม)	หมายเหตุ
<b>แบคทีเรีย</b>		
<i>Mycobacterium lacticoia</i>	30	(Simpson, Antonio et al. 1981)
<i>Halobacterium salinarium</i>	265	(Calo, De Miguel et al. 1995)
<b>ยีสต์</b>		
<i>Phaffia rhodozyma</i>	2,700	(Schroeder, LeBlanc et al. 1996)

### 2.3 ประโยชน์ของแอสตาแซนธิน

1. ป้องกันและฟื้นฟูจอตาที่เสื่อม ซึ่งพบมากในผู้สูงอายุ และ ผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งจอประสาทตาจะเป็นจุดรับภาพของลูกตา ช่วยยับยั้งการสะสมของกรดในดวงตาอันเป็นสาเหตุให้ดวงตาอ่อนล้า ช่วยป้องกันดวงตาจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต
2. ป้องกันการเสื่อมของไต หลอดเลือดในผู้ป่วยเบาหวานและบำบัดในผู้ป่วยความจำเสื่อม และ พาร์กินสัน
3. ปรับสมดุลของโคเลสเตอรอล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง LDL ซึ่งเป็นโคเลสเตอรอลตัวร้าย ช่วยให้ผนังหลอดเลือดยืดหยุ่นมากขึ้น ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูง ควรใช้ร่วมกับสารสกัดจากเมล็ดองุ่น
4. ลดภาวะการอักเสบในร่างกาย ช่วยสร้างภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยภูมิแพ้ตัวเอง ภูมิต้านทานต่ำ และการติดเชื้อไวรัสเรื้อรัง เช่น กลุ่มผู้ป่วย AIDS ผู้ติดเชื้อไวรัสฮิวส์ และเริม เป็นต้น

### 2.4 แอสตาแซนธินกับการนำไปใช้ประโยชน์

#### 2.4.1 การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

แอสตาแซนธินสังเคราะห์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะอยู่รูปแบบของอาหารสัตว์น้ำ เนื่องจากสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง ลอบสเตอร์ ปลาเทราท์ เป็นต้น ได้รับแอสตาแซนธินตามธรรมชาติได้ปริมาณน้อย เนื่องจากการบริโภคสาหร่ายหรือแพลงตอนไม่ได้ปริมาณที่มากพอ โดยแอสตาแซนธินที่สัตว์น้ำบริโภคเข้าไปจะสะสมในส่วนต่างๆ เช่น หนิง กล้ามเนื้อ ไคโรกรกระดูกตลอดจนอวัยวะสืบพันธุ์ เป็นต้น ตัวอย่างที่เห็นได้ชัด ได้แก่ เนื้อปลาแซลมอน ซึ่งจะมีสีส้มแดงช่วยดึงดูดความสนใจของผู้บริโภค นอกจากนี้ยังพบว่าแอสตาแซนธินมีการใช้ในอาหารเลี้ยงกุ้ง เพื่อช่วยเพิ่มความต้านทานต่อความเครียด เสริมภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ และทำให้ตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตและอยู่รอดได้มากขึ้น (Bowen, Soutar et al. 2002) นอกจากนี้ยังมีการใช้ในอาหารสำหรับเลี้ยงไก่ด้วย โดยการผลิตไข่ไก่ให้มีไข่แดงที่มีสีส้มสวยงาม (Akiba, Sato et al. 2001)

#### 2.4.2 ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและยา (Dietary supplement and Pharmaceutical)

แอสตาแซนธินได้มีการนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมและยา เนื่องจากแอสตาแซนธินมีคุณสมบัติที่สำคัญต่อสุขภาพหลายประการ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วย

ป้องกันมะเร็ง (rendering anticancer activity) ช่วยป้องกันโรคในระบบหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น จึงมีการผลิตในรูปแบบแคปซูลหรือยาฉีดเพื่อใช้ในการป้องกันการรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Lorenz and Cysewski 2000)

### 2.4.3 เครื่องสำอาง

แอสตาแซนธินได้กลายเป็นสารสำคัญที่นำมาใช้ในส่วนผสมของเครื่องสำอางมากมาย โดยจากการศึกษาพบว่าแอสตาแซนธินช่วยปกป้องเซลล์จากรังสี ยูวี เอ (UV-A) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดมะเร็งผิวหนัง เนื่องจากรังสี ยูวี เอ (UV-A) ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ่ของไขมัน ทำให้เกิดอนุมูลอิสระและเพอร์ออกไซด์จากคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (Suganuma, Miwa et al. 2010) จึงได้มีการนำแอสตาแซนธินเป็นส่วนผสมในครีมกันแดด หรือผลิตภัณฑ์ผิวหนังต่างๆ

### 2.5 ลักษณะทางชีววิทยาของจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*

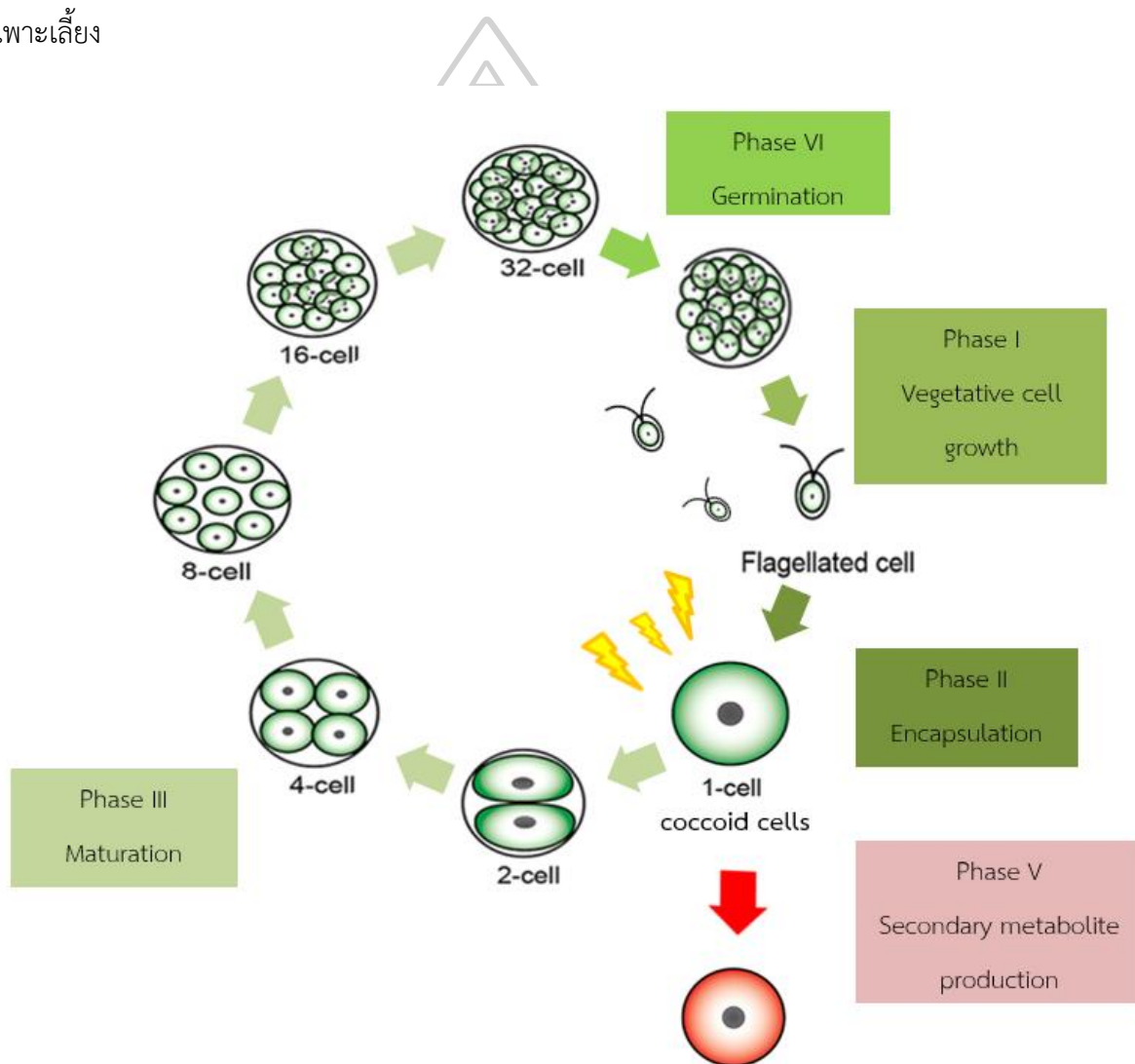
จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ถูกจัดจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ไว้ดังนี้

Domain:	Eukaryota
Kingdom:	Viridiplantae
Phylum:	Chlorophyta
Class:	Chlorophyceae
Order:	Chlamydomonadales
มไฟFamily:	Haematococcaceae
Genus:	Haematococcus
Species:	<i>H. pluvialis</i>
Binomial name:	<i>Haematococcus pluvialis</i>

*Haematococcus pluvialis* เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กและเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (eukaryotic) มีลักษณะเซลล์เดี่ยว (unicellular) เมื่ออยู่ในรูปแบบเซลล์เคลื่อนที่ (vegetative cell) จะมีแฟลกเจลลา 2 เส้น (biflagellate zoospore) เคลื่อนที่รอบตัวเองโดยอาศัยอยู่ในน้ำจืด เช่น ทะเลสาบ เป็นต้น สามารถเจริญภายใต้สภาวะ photoautotrophic และ heterotrophic (Sarada, Bhattacharya et al. 2002) (Kang, Lee et al. 2005) การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าวงจรชีวิต



ของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะการเพาะเลี้ยง โดยส่งผลให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างและโครงสร้างระดับโมเลกุลของเซลล์จากระยะหนึ่งไปอีกระยะหนึ่ง ดังภาพที่ 2 เช่น ระยะเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว (palmella cell) เริ่มมีการสะสมแอสตาแซนธินในเซลล์ แล้วเปลี่ยนเป็นระยะสะสมแอสตาแซนธิน (aplanospore cells) โดยขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่สามารถย้อนกลับได้ (Santos and JF 1984) หรือกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างและโครงสร้างของเซลล์ตามวงจรชีวิตของจุลสาหร่ายชนิดนี้สามารถเปลี่ยนกลับไปได้โดยขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง



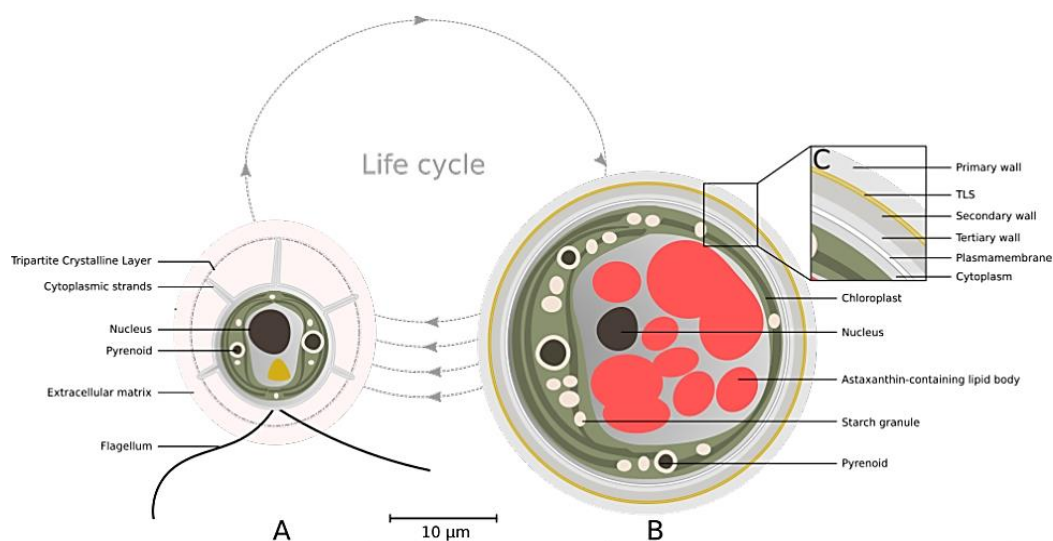
ภาพที่ 2 แผนภาพการเจริญเติบโตของการแบ่งเซลล์ของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* และระยะการสะสมแอสตาแซนธิน

ที่มา : ดัดแปลงจาก (Wayama, Ota et al. 2013)

จากภาพที่ 2 ระยะเวลาการสะสมแอสตาแซนธินจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์เคลื่อนที่ (vegetative cell) เข้าสู่ระยะ encapsulation หรือระยะเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว (palmella cell) เป็นระยะที่เซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตเต็มที่พร้อมจะทำการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์โดยเกิดขึ้นในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตเท่านั้น แต่เมื่อถูกรบกวนด้วยสภาวะแวดล้อมที่ก่อให้เกิดความเครียดแก่เซลล์ เช่น ความเข้มแสงสูง อุณหภูมิสูงและความเข้มข้นอาหารที่ต่ำ เป็นต้น จะหยุดการแบ่งเซลล์เพื่อเข้าสู่ระยะ secondary metabolite production ซึ่งจะเจริญเป็นเซลล์ซิสต์ (cyst cells) หรือเซลล์ที่มีการสะสมแอสตาแซนธิน (aplanospore cell) และมีผนังเซลล์หนา โดยในระยะนี้มีปริมาณแอสตาแซนธินในเซลล์สูงกว่าระยะอื่นๆ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์นี้เกิดขึ้นเพื่อปกป้องเซลล์และนิวเคลียสภายในเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายหรือได้รับผลกระทบจากสภาวะที่รุนแรงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ซึ่งเสี่ยงต่อการทำให้เซลล์สาหร่ายตายได้ และยังเป็นแหล่งพลังงานให้แก่เซลล์สาหร่ายในการใช้เปลี่ยนแปลงเซลล์ให้กลับมาเป็นเซลล์ปกติ (vegetative cell)

## 2.6 การเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*

เมื่อจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะเซลล์เคลื่อนที่เจริญเข้าสู่ระยะเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว (palmella cell) จะเห็นได้จากภาพที่ 3 เซลล์จะสร้างผนังเซลล์ที่แท้จริงขึ้นเรียกว่า trilaminar sheath และจะกลายเป็นเซลล์ที่ไม่มีแฟลกเจลลา เมื่อได้รับความเครียดจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความเข้มแสงสูงหรือต่ำเกินไป การขาดอาหาร อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป ความเค็มสูง เป็นต้น เซลล์สาหร่ายจะเกิดการสะสมแอสตาแซนธินภายในเซลล์ เรียกระยะนี้ว่าเซลล์ที่มีการสะสมแอสตาแซนธิน (aplanospore cell) และมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเซลล์เพื่อปกป้องเซลล์ให้อยู่รอดและลดการแพร่ของสารเข้าเซลล์ในสภาวะไม่เหมาะสม โดยภายในเซลล์จะเริ่มมีการสะสมแป้งและไขมันแล้วมีการก่อตัวของผนังเซลล์ที่หนาโดยเริ่มสร้างผนังเซลล์ primary wall ที่มีการเชื่อมต่อกันด้วย  $\beta$ -1,4-glycosidic linkages ตามด้วยการก่อตัวของชั้น secondary wall และ tertiary wall ซึ่งประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ เมื่อมีการสร้างชั้นผนังเสริมสมบูรณ์จะมีการแบ่งชั้น plasmamembrane ออกมาให้เห็นชัดเจน ซึ่งจากผนังชั้นต่างๆทำให้เซลล์สาหร่ายมีผนังเซลล์ที่แข็งแรงมาก

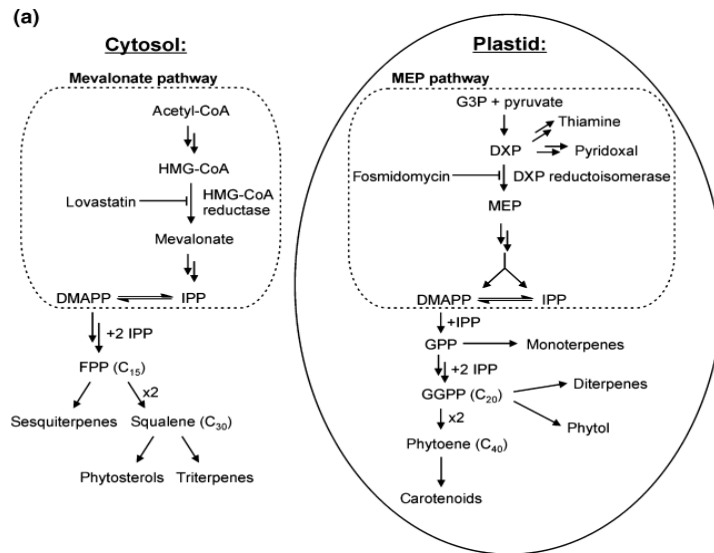


ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ของจุลสาหร่าย *H. pluvialis*  
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก (Baudeflet, Ricochon et al. 2017)

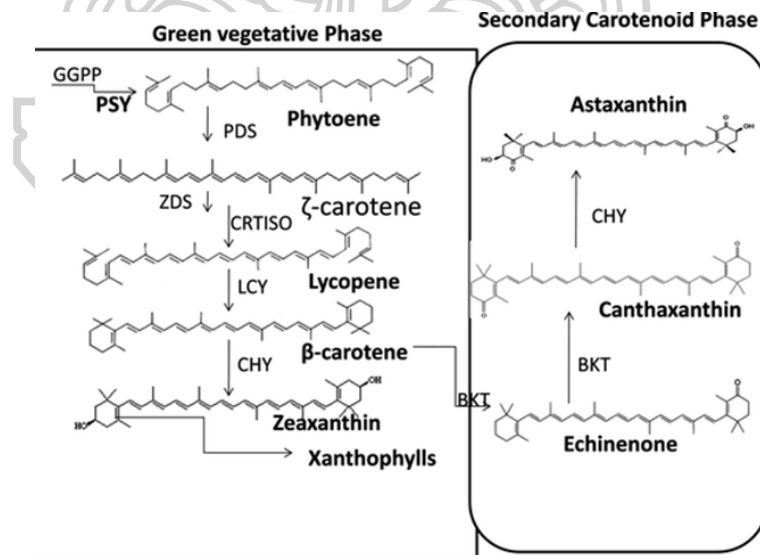
## 2.7 การสังเคราะห์แอสตาแซนธินของจุลสาหร่าย *H. pluvialis*

การสังเคราะห์แอสตาแซนธินเมื่อเซลล์สาหร่ายอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ก่อให้เกิดความเครียดแก่เซลล์ (Paniagua-Michel, Olmos-Soto et al. 2012) เซลล์เริ่มสร้างผนังเซลล์หนาขึ้น (ภาพที่ 3) และเปลี่ยนวิถีเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยเปลี่ยน Acetyl CoA เป็น mevalonic acid แล้วเปลี่ยนเป็น IPP (isopentenyl pyrophosphate) ด้วยวิถี Mevalonate pathway ถูก ก เอ น ไ ซ ม์ geranylgeranyl-diphosphate synthase ได้ เป็น GGPP (geranylgeranyldiphosphate) ซึ่งจะต้องใช้ GGPP 2 โมเลกุล เพื่อสร้างสาร phytoene เป็นแคโรทีนอยด์ตัวแรกในวิถีการสร้างแอสตาแซนธิน มีคาร์บอน 40 อะตอม หลังจากนั้นเอนไซม์ phytoene synthase (PSY) และ phytoene desaturase (PDS) จะเข้าทำงานเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างเป็นคาร์บอนสายยาวและทำให้ได้สารที่มีสีขึ้นนั้นคือ lycopene จากนั้นเอนไซม์ lycopene- $\beta$ -cyclase จะเข้ามาสร้างวงแหวนขึ้นที่ปลายทั้งสองของโมเลกุลของ lycopene ได้เป็น  $\beta$ -carotene เอนไซม์  $\beta$ -carotene ketolase และ  $\beta$ -carotene hydroxylase จะมาเติมหมู่คีโตนที่และหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งของวงแหวนปลายทั้งสองข้างได้เป็นแอสตาแซนธินในที่สุด ดังภาพที่ 5 ซึ่งกลไกการสังเคราะห์แอสตาแซนธินสามารถสรุปเป็นขั้นตอนได้ 5 ขั้นตอน คือ 1.การสังเคราะห์ isopentenyl pyrophosphate (IPP) 2. การสร้างสาร phytoene 3. การเกิดปฏิกิริยา desaturation หรือ

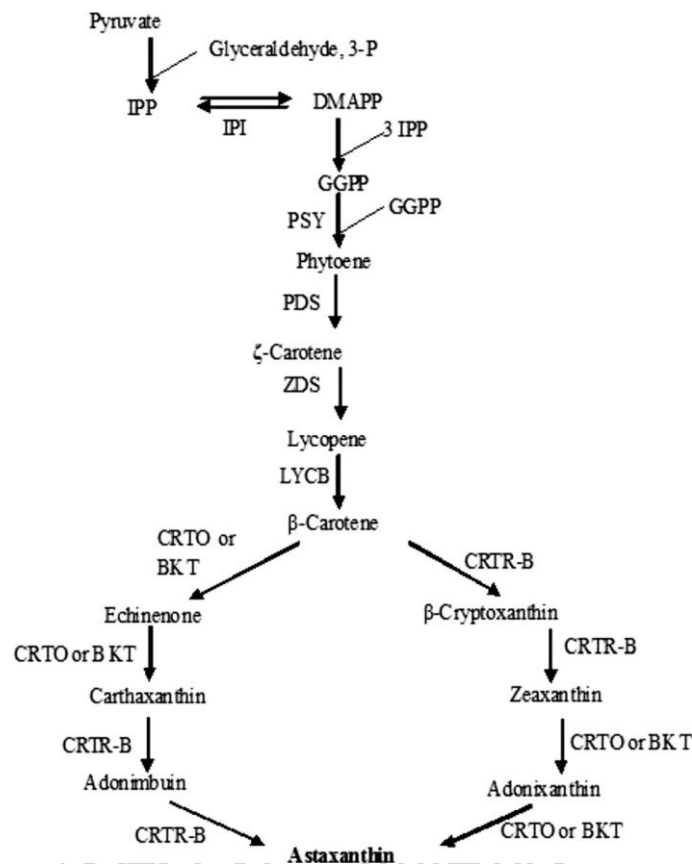
dehydrogenation เป็นปฏิกิริยากำจัดไฮโดรเจนเพื่อเพิ่มพันธคู่ 4. การเกิดปฏิกิริยาไซโคลเซชันของไลโคพีน (cyclization of lycopene) 5. การสังเคราะห์แอสตาแซนทินหรือแอสตาแซนทินเอสเทอร์



ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบ Mevalonate pathway ของพืชและสาหร่ายในการสร้างสารตั้งต้นผลิตภัณฑ์โรทีนอยด์  
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก (Sasso, Pohnert et al. 2012)



ภาพที่ 5 การสังเคราะห์แอสตาแซนทิน โดยที่ PSY คือ phytoene synthase, PDS คือ phytoene desaturase, ZDS คือ ζ-carotene desaturase, CRTISO คือ carotenoid isomerase, LCY คือ lycopene cyclase, BKT คือ β-carotene ketolase, CHY คือ β-carotene hydroxylase  
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก (Barredo 2012)



ภาพที่ 6 แผนภาพสรุปสังเคราะห์แอสตาแซนธินในจุลสาหร่าย *H. pluvialis* Enzyme designations: CRTL-B คือ lycopene  $\beta$ -cyclase; CRTO คือ  $\beta$ -carotene oxygenase; CRTR-B คือ  $\beta$ -ring hydroxylase; GGPS คือ geranylgeranyl diphosphate synthase; IPI คือ isopentenyl diphosphate isomerase; PDS คือ phytoene desaturase; PSY คือ phytoene synthase; ZDS คือ  $\zeta$ -carotene desaturase ที่ดัดแปลงจาก (Grunewald, Eckert et al. 2000) (Gao, Meng et al. 2013)

จากภาพที่ 6 ในกระบวนการการสร้างแอสตาแซนธินจะมียีนที่เกี่ยวข้องในการสร้างแอสตาแซนธินอยู่มากมาย เช่น ipi-1, ipi-2, psy, lyc, crtR-B, bkt2 และ crtO ซึ่งยีนแต่ละตัวจะมีหน้าที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารเพื่อให้เป็นแอสตาแซนธิน โดยการตอบสนองของยีนใน *H. pluvialis* จะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตโดยสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วย ระดับ messenger RNA (mRNA) (Jin, Lee et al. 2006). ยกตัวอย่างศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์ *H. pluvialis* ที่สภาวะความเข้มข้นสูงและความเข้มข้นเกลือ NaCl สูง พบว่ามีเซลล์สาหร่ายมีการแสดงออกของยีน psy และ crtR-B เด่น ตามลำดับ ซึ่งกระตุ้นการสะสมแอสตาแซนธินในเซลล์ได้สูงขึ้น (Steinbrenner and Linden 2001)

## 2.8 สภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

โดยในการเพาะเลี้ยงแบบระบบปิดจะแบ่งการเพาะเลี้ยงสาหร่ายออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

### 2.8.1 การเลี้ยงแบบ Autotrophic

สิ่งมีชีวิตที่สร้างอาหารขึ้นได้เองจากอนินทรีย์สาร (autotrophic nutrition) โดยอนินทรีย์สารนั้น คือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ สิ่งมีชีวิตพวกที่สามารถสร้างอาหารได้เองด้วยวิธีการสังเคราะห์ด้วยแสง เรียกว่า โฟโตซินเทติกออโตโทรฟ (photosynthetic autotrophs) ซึ่งได้แก่ พืชสีเขียวและแบคทีเรียบางชนิดที่มีโมเลกุลของคลอโรฟิลล์เพื่อตรึงพลังงานจากแสงอาทิตย์มาใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง ดังสมการที่ 1



### 2.8.2 การเลี้ยงแบบ Heterotrophic

เป็นการเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้แหล่งประกอบอินทรีย์คาร์บอน เช่น น้ำตาล อะซิเตท เปปโตน เป็นต้น เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน โดยไม่มีการสังเคราะห์ด้วยแสงในระหว่างการเพาะเลี้ยง

### 2.8.3 การเลี้ยงแบบ mixotrophic

เป็นการเลี้ยงสาหร่ายโดยเป็นการรวมกันการเลี้ยงแบบ phototrophic และ heterotrophic เข้าด้วยกัน โดยให้แสงและสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน และคาร์บอน โดยในงานวิจัยได้มีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *H. pluvialis* เพื่อศึกษาการสะสมสารทุติยภูมิ จะมีขั้นตอนหรือรูปแบบการเพาะเลี้ยงอยู่ 2 แบบคือ การเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว เป็นการเพาะเลี้ยงภายใต้อาหาร อุณหภูมิ หรือความเข้มแสงเดียวที่คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยงจนเซลล์สาหร่ายมีการสะสมแอสตาแซนธิน และการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ขั้นแรกจะเพาะเลี้ยงเซลล์สีเขียวซึ่งเป็นเซลล์ในระยะการเจริญเติบโต (growth curve) ให้ได้จำนวนเซลล์สูงสุด แล้วหลังจากนั้นจะทำการกระตุ้นด้วยปัจจัยต่างๆเพื่อให้เซลล์เกิดการสะสมแอสตาแซนธิน

ตารางที่ 3 สรุปผลการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ

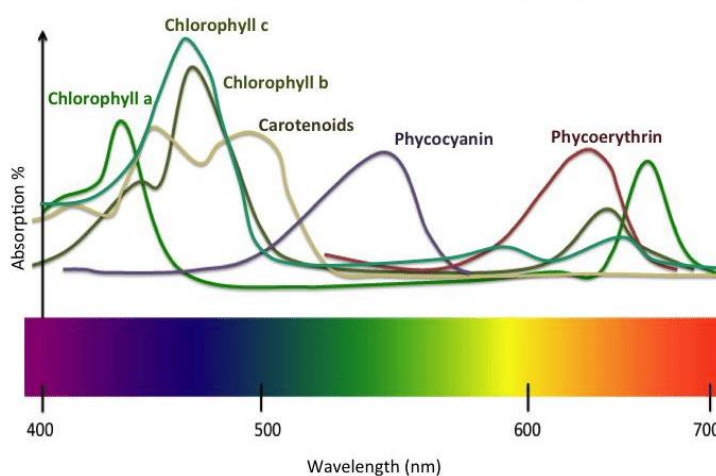
การเพาะเลี้ยง	การกระตุ้นสะสมแอสตาแซนธิน	ความหนาแน่นเซลล์ (g/L)	แอสตาแซนธิน
Phototrophic	ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 0.5 g/L (Wang, Han et al. 2013)	4.0 (10 วัน)	2.5 % ของน้ำหนักแห้ง
	Mixed Red : Blue = 1:3 (Tran, Lee et al. 2015)	3.28 (12 วัน)	84.12 mg/L
	75 $\mu$ M iron ( $Fe^{2+}$ ) (Hong, Choi et al. 2016)	1.58 (25 วัน)	63.0 mg/L
Heterotrophic	22.5 mM acetate + 20 $\mu$ M DCMU (Kobayashi, Kakizono et al. 1992)	0.32 (8 วัน)	10.5 mg/g
	1.986 g/L $NaHCO_3$ (Tripathi, Sarada et al. 1999)	- (45 วัน)	160 pg/cell
Mixotrophic	10 mM $NaHCO_3$ (Pan-utai, Parakulsuksatid et al. 2017)	7.1 (30 วัน)	210 mg/L
	22.5 mM acetate + 20 $\mu$ M DCMU (Kobayashi, Kakizono et al. 1992)	0.46 (8 วัน)	11 mg/g

โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *H. pluvialis* ในสภาวะ phototrophic ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนเป็นระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในการทำการทดลองเนื่องจากเป็นระบบที่ดูแลง่ายและไม่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยง ในขณะที่เซลล์อยู่ในระยะการเจริญเติบโต ซึ่งเซลล์สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มชีวมวลได้ดีกว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงอื่นๆ เมื่อเทียบกับระยะเวลาเดียวกัน ซึ่งเมื่อมีจำนวนเซลล์ในระยะเจริญที่สูงก็ส่งผลต่อปริมาณผลผลิตแอสตาแซนธินด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นในตารางที่ 3

## 2.9 แสงและการเจริญเติบโตของพืช

### 1. รังควัตถุ

รงควัตถุ คือ สารสีในพืชที่สามารถดูดกลืนแสงได้ โดยรงควัตถุแต่ละชนิดจะสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างกัน ดังภาพที่ 7 ซึ่งยกตัวอย่างเช่น คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุที่พบในใบไม้สามารถดูดกลืนแสงสี ม่วง น้ำเงิน แดงซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 nm ได้ดี แต่สะท้อนแสงสีเขียว

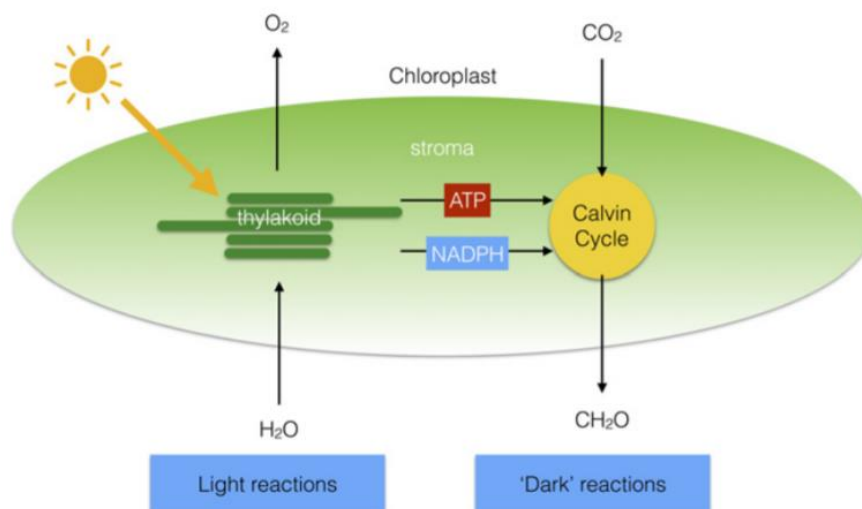


ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ของรงควัตถุต่อการดูดกลืนแสง  
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก (Yarish, Redmond et al. 2012)

### 2. การสังเคราะห์แสงของพืช

การสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชเป็นการเปลี่ยนพลังงานของแสงให้อยู่ในรูปของพลังงานเคมีในโมเลกุลของสารอินทรีย์โดยจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ 1.ปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง (Light reaction) และ 2.ปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub> fixation reaction)



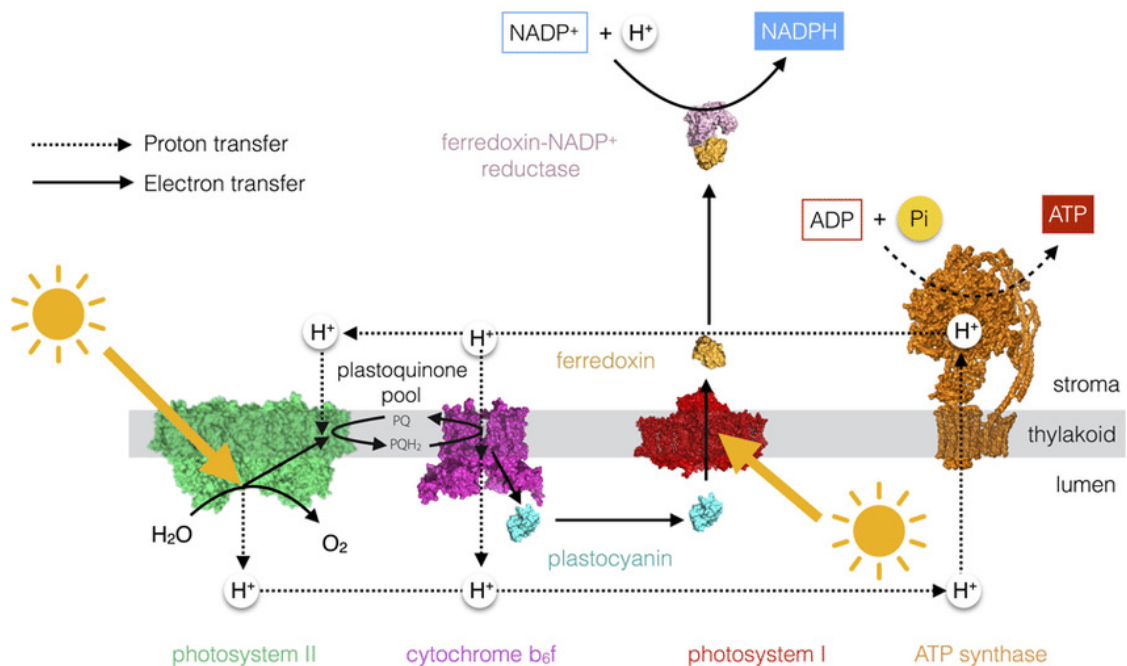


ภาพที่ 8 กระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชบริเวณคลอโรพลาสต์  
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก (Johnson 2017)

ปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสงเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นบริเวณไทลาคอยด์ของคลอโรพลาสต์ดังภาพที่ 8 ซึ่งเป็นการที่รงควัตถุรับพลังงานของแสง แล้วส่งถ่ายพลังงานเพื่อสร้างสารที่มีพลังงานสูง ซึ่งได้แก่ ATP และ NADPH เพื่อที่จะได้นำพลังงานที่ได้ไปสร้างสารอินทรีย์ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ต่อไป ซึ่งเกิดขึ้นบริเวณสโตรมาในคลอโรพลาสต์

### 1. ปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง (Light reaction)

รงควัตถุชนิดต่างๆ ที่อยู่บนไทลาคอยด์ ดังภาพที่ 9 จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มโดยจะเกาะตัวอยู่กับโปรตีนหลายชนิด กลุ่มของโปรตีนบนไทลาคอยด์ที่มีรงควัตถุประกอบอยู่ด้วยจะเรียกว่าระบบแสง (photosystem) โดยจะพบรงควัตถุในระบบแสง ได้แก่ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์ เอ ส่วนใหญ่ในการสังเคราะห์แสงของพืชมีระบบแสง 2 ระบบคือ ระบบแสง I (photosystem I) และระบบแสง II (photosystem II) ซึ่งระบบแสงทั้งสองจะทำหน้าที่ร่วมกันเพื่อส่งถ่ายอิเล็กตรอนและโฟตอนในการสร้าง ATP และ NADPH



ภาพที่ 9 ระบบแสงของพืชบริเวณไทลาคอยด์

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก (Johnson 2017)

เมื่อรังควัดอยู่ในระบบแสงดูดกลืนแสงไว้ภายในระบบแสงจะมีการส่งถ่ายพลังงานที่ได้เข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (reaction center) ซึ่งคือ คลอโรฟิลล์ เอ ในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานแสงซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิด ทั้งแคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์-บี และคลอโรฟิลล์-เอ ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง แล้วส่งพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา ซึ่งคือโมเลกุลของคลอโรฟิลล์-เอ โมเลกุลของคลอโรฟิลล์-เอ นี้เมื่อได้รับพลังงานในช่วงคลื่นที่พอเหมาะ อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์จะถูกกระตุ้นให้อยู่ในชั้นของระดับพลังงานที่สูงขึ้น (excited state) พร้อมทั้งจะถ่ายทอดอิเล็กตรอนนี้ให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป ในระหว่างการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากระบบแสง II ไปสู่ระบบแสง I ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพลังงานบางส่วนที่ได้จากการถ่ายทอดอิเล็กตรอน นั่นคือ โฟตอน ซึ่งถูกนำมาใช้ในการสร้าง ATP ทำให้เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง ทำให้เกิดสารที่มีพลังงานสูงสองชนิดคือ NADPH และ ATP ที่จะถูกนำไปใช้ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ต่อไป และยังเกิดการสร้าง  $O_2$  ที่ได้จากการสลายของโมเลกุลน้ำขึ้นอีกด้วย

## 2. ปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ fixation Reaction)

ปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ หรือ Calvin Cycle เป็นปฏิกิริยาที่นำพลังงานจาก ATP และ NADPH ที่ได้จากปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง มาใช้ในการสร้างโมเลกุลของสารอินทรีย์จากสารอ

นิทรีย สารอินทรียเหล่านี้เป็นต้นกำเนิดให้เกิดการนำพลังงานที่เก็บไว้ในโมเลกุลไปใช้ในกระบวนการต่างๆ ของพืชต่อไป รวมทั้งการสร้างสารชนิดอื่นๆ เกิดการเจริญเติบโต

การเกิดปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์นี้ ไม่จำเป็นต้องใช้แสง จึงเรียกกระบวนการนี้ว่า Dark reaction หรือปฏิกิริยาที่ไม่ต้องใช้แสง แต่ต่อมาพบว่า เอนไซม์หลายชนิดที่ทำงานในกระบวนการนี้ ต้องได้รับการกระตุ้นด้วยแสงก่อน จึงสามารถทำงานได้ ในปัจจุบันจึงไม่นิยมเรียกกระบวนการนี้ว่า Dark reaction

Calvin cycle เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใน stroma ของ chloroplast ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ Carboxylation Reduction และ Regeneration ดังนี้

1. Carboxylation เป็นขั้นตอนที่ ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) เข้ารวมกับ  $\text{CO}_2$  และเกิดเป็น 3-phosphoglycerate 2 โมเลกุล ซึ่งเป็นสารเสถียร (stable intermediate) ตัวแรกของ Calvin cycle
2. Reduction เป็นขั้นตอนที่ 3-phosphoglycerate ถูก reduced เกิดเป็น glyceraldehyde-3-phosphate ซึ่งเป็นสารประเภทน้ำตาล ขั้นตอนนี้จะมีการใช้สารพลังงานสูงที่ได้จากปฏิกิริยาแสง คือ ATP และ NADPH
3. Regeneration เป็นขั้นตอนที่จะสร้างโมเลกุล RuBP ขึ้นมาอีกครั้งหนึ่ง เพื่อวนกลับไปเป็นตัวรับ  $\text{CO}_2$  ในรอบต่อไป ในขั้นตอนนี้ต้องอาศัยพลังงานจาก ATP ซึ่งได้จากปฏิกิริยาแสง

## 2.10 การตอบสนองของพืชต่อแสง

ความเข้มของแสง (Light Intensity) คือ ปริมาณฟotonของแสงทั้งหมดที่พืชได้รับซึ่งความเข้มของแสงจะแตกต่างกันตามพื้นที่ เวลา ฤดูกาล

1. **ความเข้มของแสงน้อย** จะทำให้การสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชเกิดขึ้นได้น้อยกว่ากระบวนการสลายโมเลกุลของสารอาหาร พืชจะไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานเมื่ออัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงน้อยเกินไป แต่ก็ไม่ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มของแสงเท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับความยาวคลื่น (คุณภาพ) ของแสง และช่วงเวลาที่ได้รับแสงในการสังเคราะห์อาหาร
2. **ความเข้มของแสงสูง** จะทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แต่อุณหภูมิกับความเข้มของแสง มีผลต่ออัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงร่วมกัน คือ ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นเพียง

อย่างเดียว แต่ความเข้มของแสงน้อยจะไม่สามารถทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงเพิ่มขึ้น อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงจุดอิ่มตัวของแสง (light saturation point) อยู่ในช่วงประมาณ 300 – 1,000 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที แล้ว อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงจะลดต่ำลงตามอุณหภูมิ

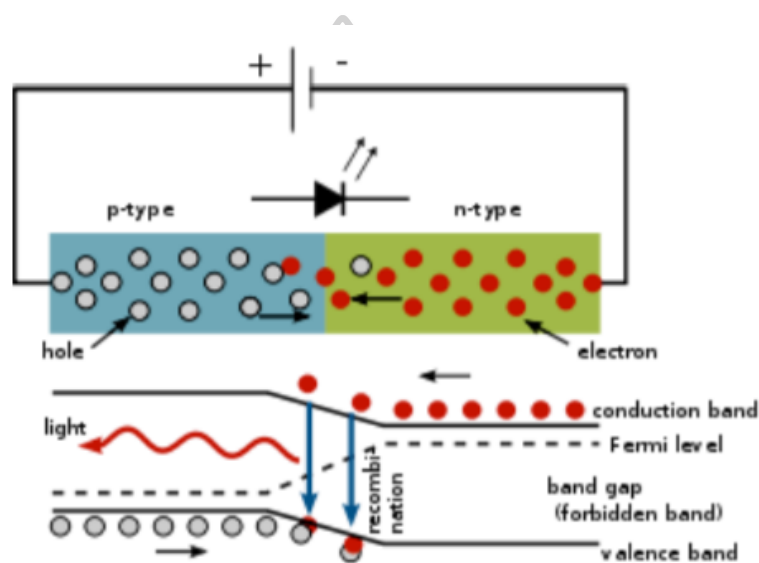
## 2.11 คุณภาพของแสง (Light quality)

คุณภาพของแสง หมายถึง ความยาวของคลื่นแสง โดยแต่ละช่วงความยาวคลื่นจะมีสีแตกต่างกัน

1. **แสงสีแดง** พืชมีความไวต่อสีแดงในสเปกตรัมของแสง ความไวที่เกิดขึ้นนั้นมาจากพืชที่มีสิ่งที่ถูกเรียกว่า เซลล์รับแสงสีแดง (Red light photoreceptor) ตัวรับที่เป็นรงควัตถุสีฟ้า-เขียว เรียกว่า Phytochrome มีอยู่ในเซลล์ของพืช แสงสีแดงส่งผลกระทบต่อพืชในหลายๆ ด้าน พืชที่ปลูกในที่ที่มีแสงสีแดงมักมีขนาดใหญ่ แต่โดยทั่วไปจะให้การเจริญเติบโตด้านความสูง ถ้า Photoreceptor รับแสงสีแดงเป็นปริมาณมาก การผลิตฮอร์โมน (Metatopolin) จะเพิ่มขึ้น ฮอร์โมนนี้ช่วยป้องกันคลอโรฟิลล์ในพืชที่จะถูกทำลายลงทำให้พืชมีสีเขียวสดซึ่งเป็นประโยชน์ต่อพืช เพราะพืชต้องการคลอโรฟิลล์เพื่อสร้างสารที่มีพลังงานสูง
2. **แสงสีเขียว** ไม่จำเป็นต่อการสังเคราะห์แสง แต่เป็นส่วนประกอบสำคัญของแหล่งกำเนิดแสงบางชนิด ซึ่งแสงสีเขียวถูกดูดกลืนไว้สูงกว่าแสงสีแดงและน้ำเงินใน ตัวรับแสง Cryptochrome และ Photoreceptor ของการสังเคราะห์ด้วยแสง เนื่องจากแสงสีเขียวสามารถทะลุเข้าไปในใบได้ดีกว่าแสงสีแดงหรือน้ำเงิน ซึ่งแสงสีเขียวจะถูกดูดซับโดยคลอโรพลาสต์ในใบพืชที่อยู่ต่ำลงมา จะส่งผลต่อการเปิดของปากใบและการยืดยาวของลำต้น โดยแสงสีเขียวสามารถกระตุ้นการออกดอกของพืชบางชนิดได้ (Wang and Folta 2013)
3. **แสงสีน้ำเงิน** สำหรับแสงสีน้ำเงิน พืชจะใช้ตัวรับแสงที่เรียกว่า Cryptochrome ถ้ามีแสงสีน้ำเงินมากจะกระตุ้นการทำงานของฮอร์โมนพืช ที่เรียกว่า Auxin ฮอร์โมนนี้มีบทบาทในการเจริญเติบโตของลำต้น นอกจากนี้ยังกระตุ้นการสะสมสารทุติยภูมิในพืชพบว่าแสงสีน้ำเงินช่วยกระตุ้นการสะสมสาร flavonoids และช่วยเพิ่มการยืดยาวของราก (Ebisawa, Shoji et al. 2008)

## 2.12 Light Emitting Diode (LED)

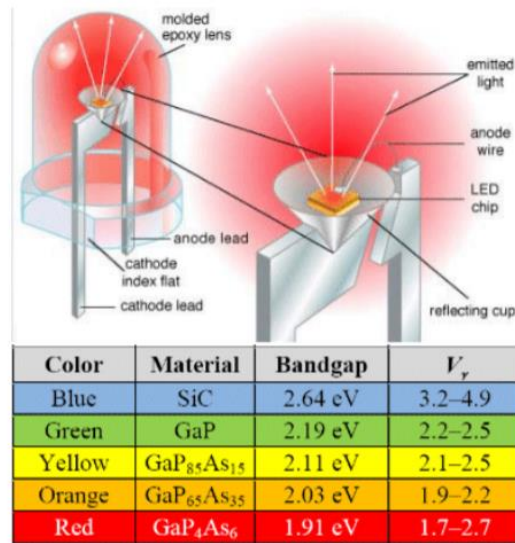
โครงสร้างประกอบไปด้วยสารกึ่งตัวนำสองชนิด (สารกึ่งตัวนำชนิด N และสารกึ่งตัวนำชนิด P) ประกบเข้าด้วยกัน มีผิวข้างหนึ่งเรียบคล้ายกระจกเมื่อจ่ายไฟฟ้ากระแสตรงผ่านตัว LED โดยจ่ายไฟบวกให้ขาแอนโนด (A) จ่ายไฟลบให้ขาแคโทด (K) ทำให้อิเล็กตรอนที่สารกึ่งตัวนำชนิด N มีพลังงานสูงขึ้น จนสามารถวิ่งข้ามรอยต่อจากสารชนิด N ไปรวมกับโฮลในสารชนิด P การที่อิเล็กตรอนเคลื่อนที่ผ่านรอยต่อ PN ทำให้เกิดกระแสไหล เป็นผลให้ระดับพลังงานของอิเล็กตรอนเปลี่ยนไปและคายพลังงานออกมาในรูปคลื่นแสงดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 การเกิดแสงจากหลอดไฟ LED

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก (หมื่นกล้า 2013)

สีของแสงที่เกิดจากรอยต่อจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุที่นำมาใช้ในการสร้าง LED ทั้งชนิดที่เป็นของเหลวและก๊าซ การควบคุมปริมาณแสงสว่างจะควบคุมกระแสที่ไหลผ่านหลอด LED หากกระแสที่ไหลสูงมากไปจะทำให้หลอดมีความสว่างมาก แต่หากป้อนกระแสสูงมากไปจะทำให้บริเวณรอยต่อของสารกึ่งตัวนำเกิดความร้อนปริมาณมากจนทำให้โครงสร้างหลอดเสียหายไม่สามารถใช้งานได้ อีก โดยแสงสีที่เกิดขึ้นในการสร้างไฟ LED ทำมาจากวัสดุที่ต่างกันดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แสดงส่วนประกอบ และชนิดของสารกึ่งตัวนำที่ใช้ในการทำหลอด LED  
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก (หมื่นกล้า 2013)

## 2.13 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เป็นการนำสมการทางคณิตศาสตร์มาประยุกต์ใช้ โดยการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์จะอยู่บนพื้นฐานความสัมพันธ์ที่ได้จากการสังเกตการณ์จากการทดลอง

### 2.13.1 รูปแบบสมการอัตราการเจริญเติบโต

สมการที่ 2 อัตราการเจริญเติบโตของ Monod equation

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S+K_s}$$

$\mu$  อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\text{hr}^{-1}$ )

$\mu_{\max}$  อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ( $\text{hr}^{-1}$ )

$S$  ความเข้มข้น substrate ( $\text{g/L}$ )

$K_s$  ค่าคงที่การอิ่มตัว substrate ( $\text{g/L}$ )

เป็นสมการของการเจริญเติบโตที่ขึ้นกับความเข้มข้น substrate เพียงอย่างเดียว

สมการที่ 3 อัตราการเจริญเติบโตของ Blackman equation

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{2K_s}$$

เป็นสมการของการเจริญเติบโตที่ขึ้นกับความเข้มข้น substrate เพียงตัวเดียว และมีการนำค่าคงที่การอิ่มตัวคิดเป็นสองเท่าต่อการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดกับความเข้มข้น substrate

สมการที่ 4 อัตราการเจริญเติบโตของ Tessier equation

$$\mu = \mu_{\max} [1 - \exp^{-K_s S}]$$

เป็นสมการของการเจริญเติบโตที่มีการนำมาประยุกต์ร่วมกับฟังก์ชันเอกซ์โพเนนเชียลที่ยกกำลังค่าคงที่การอิ่มตัวกับความเข้มข้น substrate เพียงตัวเดียว

สมการที่ 5 อัตราการเจริญเติบโตของ Moser equation

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S^n}{K_s + S^n}$$

เป็นสมการของการเจริญเติบโตที่พัฒนามาจาก monod equation แต่จะมีการเพิ่มค่าเลขยกกำลังเข้ามาและเป็นสมการที่ขึ้นกับความเข้มข้น substrate เพียงตัวเดียว

สมการที่ 6 อัตราการเจริญเติบโตของ Contois equation

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_{sx} X + S}$$

$K_{sx}$  ค่าคงที่การอิ่มตัว substrate ที่เป็นสัดส่วนต่อความเข้มข้นเซลล์ (g/L)

$X$  ความเข้มข้นชีวมวล (g/L)

เป็นสมการของการเจริญเติบโตที่พัฒนามาจาก monod equation มีการเพิ่มตัวแปรความเข้มข้นของเซลล์เข้ามาและเป็นสมการที่ขึ้นกับความเข้มข้น substrate เพียงตัวเดียว

สมการที่ 7 อัตราการเจริญเติบโตของ Haldane equation

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_s + \frac{S^2}{K_{IS}}}$$

$K_{IS}$  ค่าคงที่การยับยั้ง substrate (g/L)

เป็นสมการของการเจริญเติบโตที่พัฒนามาจาก monod equation มีการเพิ่มตัวแปรค่าคงที่การยับยั้งของ substrate เข้ามาและเป็นสมการที่ขึ้นกับความเข้มข้น substrate เพียงตัวเดียว

สมการที่ 8 อัตราการเจริญเติบโตของ Hill equation

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S^n}{K_s^n + S^n}$$

n ค่าสัมประสิทธิ์ Hill

เป็นสมการของการเจริญเติบโตที่พัฒนามาจาก Monod equation ที่มีรูปแบบคล้ายกับสมการ Moser equation โดยในตัวแปรค่าคงที่การยับยั้งจะมีการเพิ่มตัวแปรยกกำลัง n เข้ามา และเป็นสมการที่ขึ้นกับความเข้มข้น substrate เพียงตัวเดียว

### 2.13.2 รูปแบบสมการอัตราการเจริญเติบโตจุลสาหร่ายที่คำนึงถึงผลกระทบแสง

สมการที่ 9 อัตราการเจริญเติบโตที่ด้วยแสงได้ถูกนำเสนอโดย (Tamiya, Hase et al. 1953)

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{I}{K_I + I}$$

สมการที่ 10 อัตราการเจริญเติบโตและการยับยั้งการเจริญเติบโตจากผลกระทบแสงได้ถูกนำเสนอโดย (van Oorschot 1955)

$$\mu = \mu_{\max} (1 - e^{-\frac{1}{K_I}})$$

สมการที่ 11 อัตราการเจริญเติบโตด้วยแสงและการยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยแสงได้ถูกนำเสนอโดย (Aiba 1982)

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{I}{K_I + I + \frac{I^2}{K_{i,L}}}$$

$K_{i,L}$  ค่าคงที่การยับยั้งของแสง ( $m^2 W^{-1}$ )



### 2.13.3 สมดุลมวล

$$\frac{d(pv)}{dt} = F_{in} - F_{out}$$

สมการที่ 12 อัตราการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - k_d X$$

X ความเข้มข้นของชีวมวล (cells/ml)

$\mu$  อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $hr^{-1}$ )

$k_d$  ค่าคงที่จำเพาะของการตาย ( $hr^{-1}$ )

เป็นสมการอัตราการเจริญเติบโตที่คำนึงถึง ความเข้มข้นชีวมวล และค่าคงที่จำเพาะการตาย

สมการที่ 13 อัตราการใช้สารตั้งต้นของจุลสาหร่าย

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/N}} \cdot \frac{dX}{dt}$$

N ความเข้มข้นไนโตรเจน (g/L)

$Y_{x/N}$  ค่าสัมประสิทธิ์ผลผลิตของชีวมวลต่อไนโตรเจน (g/g)

เป็นสมการการใช้ไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโต โดยใช้ตัวแปรค่าสัมประสิทธิ์ผลผลิตของชีวมวลต่อ ไนโตรเจนเทียบกับอัตราการเจริญเติบโต

สมการที่ 14 อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลสาหร่ายที่พัฒนารูปแบบมาจาก monod

equation

$$\frac{dP}{dt} = k \cdot \frac{S}{S+K_S} \cdot \frac{N}{N+K_N}$$

P ความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ (g/L)

S ความเข้มข้น substrate (g/L)

$K_S$  ค่าคงที่ความอิ่มตัวผลิตภัณฑ์ที่ขึ้นกับ substrate (g/L)

$K_N$  ค่าคงที่ความอิ่มตัวผลิตภัณฑ์ที่ขึ้นกับไนโตรเจน (g/L)

k ค่าคงที่

สมการที่ 15 อัตราการผลิตภัณฑ์ของจุลสาหร่ายของที่พัฒนามาจาก Haldane equation

$$\frac{dP}{dt} = k \cdot \frac{S}{S+K_S} \cdot \frac{N}{N+K_N + \frac{N^2}{K_{iN}}}$$

$K_{iN}$  ค่าคงที่การยับยั้งการผลิตภัณฑ์ที่ขึ้นกับไนโตรเจน (g/L)

## 2.14 การประมาณค่าพารามิเตอร์หรือตัวแปรที่เกี่ยวข้อง

ค่าคงที่ในแบบจำลองที่จะถูกประมาณโดยใช้โปรแกรม COPASI ในหัวข้อ parameter estimation ซึ่งเป็นการประมาณค่าคงที่ในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ซึ่งจะทำให้ค่าความคลาดเคลื่อนระหว่างผลที่ได้จากแบบจำลองกับผลการทดลองมีค่าน้อยที่สุด แบบจำลองที่ได้จะมีความแม่นยำในการทำนายมากขึ้น จากนั้นจะนำค่าคงที่ที่ได้นั้นไปทำนายผล

## 2.15 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.15.1 การศึกษาเกี่ยวกับแสง

งานวิจัยของ Sun และคณะ (2015) ได้ศึกษาการเพิ่มขึ้นของเซลล์ชีวมวลและกิจกรรมของเซลล์ขณะสะสมแอสตาแซนธินของ *H. pluvialis* โดยเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 วัน อุณหภูมิเพาะเลี้ยง 22 องศาเซลเซียส ให้แสง 12 ชั่วโมงสลับกับไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง ความเข้มแสง 2500 ลักซ์ พบว่าเมื่อลดความเข้มข้นของอาหาร การเพิ่มค่า pH ในอาหารเพาะเลี้ยงในช่วงต้นของการเพาะเลี้ยงช่วยลดการเกิด substrate inhibition ผลผลิตชีวมวลของ *Haematococcus pluvialis* ที่ได้ขึ้นกับความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟต โดย 1 กรัมของไนเตรทและฟอสเฟตสามารถได้ผลิตผลชีวมวลถึง 14.85 และ 3.21 กรัมเซลล์ต่อกรัมไนเตรทและฟอสเฟต และในเวลากลางคืนจะมีการเพิ่มขึ้นของชีวมวลลดลง จึงมีการศึกษาแสงที่ใช้ระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยพบว่าการให้แสงที่ความเข้มแสง 7000 ลักซ์ แบบผสมในสัดส่วนแสงสีน้ำเงินและขาว อัตราส่วน 3:1 จะช่วยให้เพิ่มขึ้นของชีวมวลและการสะสมแอสตาแซนธินได้ถึง  $91.8 \pm 2.53$  มิลลิกรัมต่อลิตร

งานวิจัยของ Tran และคณะ (2015) ได้ศึกษาผลกระทบของไฟ LED ต่อการเพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 18 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในอาหาร OHM โดยพบว่าการให้แสงผสมระหว่างแสงสีแดงและแสงสีน้ำเงิน สัดส่วน 1:3 มีชีวมวลและกระตุ้นการผลิตแอสตาแซนธินได้สูง โดยอยู่ที่ 2.3 กรัมต่อลิตร และ 55.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อ

เพิ่มความเข้มแสงที่ 160 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วยเพิ่มชีวมวลและการผลิตแอสตาแซนธิน โดยอยู่ที่ 3.28 กรัมต่อลิตร และ 84.12 มิลลิกรัมต่อลิตร

งานวิจัยของ Hong และคณะ (2016) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์สีแดงที่ได้รับการกระตุ้นจากอุณหภูมิสูงและการเติมธาตุเหล็กในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตแอสตาแซนธินของ *Haematococcus pluvialis* โดยเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 36 วัน ที่อุณหภูมิ 23-33 องศาเซลเซียส โดยพบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์สีแดงแล้วทำการกระตุ้นด้วยอาหารที่มีการเติมเหล็กความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตแอสตาแซนธินได้โดยสูงสุดอยู่ที่ 5.53 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 24 วัน

งานวิจัยของ Choi และคณะ (2015) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Acutodesmus obliquus* เพื่อกระตุ้นการผลิตไขมันของเซลล์สาหร่ายโดยการกระพริบไฟ ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 18 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยการใช้ไฟ LED แสงผสมระหว่างน้ำเงินและสีแดง โดยเลี้ยงภายในขวดเพาะเลี้ยง พบว่าการกระตุ้นด้วยไฟกระพริบที่ 10 ครั้งต่อนาที ทำให้มีคลอโรฟิลล์ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นในช่วง lag phase และขณะที่การกระตุ้นด้วย 5 ครั้งต่อนาที ช่วยกระตุ้นการสะสมไขมันในระยะ stationary phase

งานวิจัยของ Xi และคณะ (2016) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* โดยการกระตุ้นด้วยไฟ LED แสงสีแดงและสีน้ำเงินเพื่อกระตุ้นให้สะสมแอสตาแซนธิน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในอาหาร OHM โดยพบว่า การเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีแดงช่วยเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์สาหร่ายในระยะ log phase แต่ในขณะที่การเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีน้ำเงินช่วยกระตุ้นการสะสมแอสตาแซนธินและเพิ่มขนาดเซลล์สาหร่าย จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในระยะแรกด้วยไฟสีแดงแล้วทำการเปลี่ยนแสงเป็นสีน้ำเงิน เติมนิโคติน คาร์บอน และเพิ่มความเข้มแสง เป็นกระบวนการที่ช่วยปรับปรุงการเจริญเติบโตและการกระตุ้นแอสตาแซนธินของเซลล์สาหร่าย

งานวิจัยของ Ra และคณะ (2016) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *N. salina*, *N. oceanica* และ *N. oculata* เพื่อกระตุ้นการผลิตไขมันของเซลล์สาหร่าย ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยแบ่งออกเป็น 2 ระยะการเพาะเลี้ยงซึ่งจะมีการให้แสงทั้ง 6 สีทั้ง 2 ระยะ ได้แก่ สีขาว สีม่วง สีน้ำเงิน สีเขียว สีเหลือง สีแดง พบว่าในระยะแรกเป็นระยะที่เลี้ยงเพื่อเพิ่มชีวมวลโดยแสงสีน้ำเงินและแสงสีแดงเป็นแสงสีที่ช่วยในการเจริญเติบโต ซึ่งสาหร่าย *Nannochloropsis oculata* เป็นสาหร่ายที่มีอัตราการเจริญสูงสุด ในขณะที่ระยะที่สองเป็นระยะที่

กระตุ้นการผลิตไขมันของเซลล์สาหร่ายพบว่าแสงสีเขียวช่วยกระตุ้นการผลิตไขมันในเซลล์ได้สูงสุดซึ่งประกอบด้วยน้ำมันปาล์มมาติกและโอเลอิก

งานวิจัยของ Sun และคณะ (2017) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบ staged cultivation เพื่อเพิ่มเซลล์ชีวมวลของ *Haematococcus pluvialis* และแก้ปัญหาการสะสมสาร Extracellular โดยเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงเบ็ดเสร็จในระยะเวลาแรกช่วยเพิ่มเซลล์ที่มีการสะสมชีวมวลประมาณ 1.16 เท่า หลังจากนั้นทำการเติมอาหารใหม่ลงไปแล้วทำการเพาะเลี้ยงต่อพบว่าเซลล์สาหร่ายที่มีการสะสมชีวมวลสามารถเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการเลี้ยงภายใต้การให้แสงผสมระหว่างแสงสีแดงและขาว พบว่าที่สัดส่วนแสงสีแดงและสีขาว 2:1 มีการเจริญเติบโตของเซลล์ชีวมวลสูงสุด

งานวิจัยของ Lee และคณะ (2018) ได้ศึกษาผลกระทบระดับโมเลกุลของการกระตุ้นด้วยแสงสีจากไฟ LED เพื่อผลิตแอสตาแซนธินของเซลล์จุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีน้ำเงิน (450 nm) และสีแดง (660 nm) พบว่ายีน *minD* จะถูกกระตุ้นด้วยแสงสีแดงซึ่งเป็นยีนที่ถูกกระตุ้นเมื่อมีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตของเซลล์ ในขณะที่แสงสีน้ำเงินจะกระตุ้นยีน *CAT* *BKT* และ *CHY* ซึ่งเป็นยีนที่ถูกพบเมื่อมีสาร ROS และการผลิตแอสตาแซนธิน

### 2.15.2 การศึกษาเกี่ยวกับการสารอาหาร

งานวิจัยของ Borowitzka และคณะ (1991) ได้ศึกษาการอุณหภูมิและแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของแต่ละชนิดเซลล์จุลสาหร่าย *Haematococcus sp.* พบว่าเซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิค่าที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส แต่ในขณะที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตและกลายเป็น aplanospores ภายใน 21 วัน และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเซลล์จะตาย และแหล่งไนโตรเจนเป็น co-Factor ที่ใช้ในการสร้างแคโรทีนอยด์ในเซลล์โดยไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดอื่น

งานวิจัยของ Fábregas และคณะ (2001) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* โดยการกระตุ้นด้วยการขาดธาตุไนโตรเจนและแมกนีเซียมเพื่อกระตุ้นให้สะสมแอสตาแซนธิน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นแสง 230 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และเพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุไนโตรเจนมีการสะสมแอสตาแซนธินอยู่ที่ 49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

งานวิจัยของ Sarada และคณะ (2002) ได้ศึกษาอิทธิพลของความเครียดต่อผลผลิตแอสตาแซนธินใน *Haematococcus pluvialis* ภายใต้สภาวะควบคุม โดยเฉพาะเลี้ยงระยะเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1.5 เคล็กซ์ตลอดเวลา โดยพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากโพแทสเซียมไนเตรทเซลล์สามารถเจริญได้สูงสุดถึง  $6.2 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรและแอมโมเนียมไนเตรทมีการเจริญเติบโตของเซลล์ต่ำสุดคือ  $1.65 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรเซลล์ที่เจริญในอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรทมีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับอาหารอื่นๆ ในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรทมีคลอโรฟิลล์สูงที่สุดคือ 12.4 มิลลิกรัมต่อลิตรแต่ในอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรทกลับมีคลอโรฟิลล์ต่ำสุดคือ 4.97 มิลลิกรัมต่อลิตรปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และผลผลิตแอสตาแซนธินมีมากในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรท และน้อยในอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรทคลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นสารสำคัญแต่เมื่ออยู่ในสภาวะเครียดจะลดลงต่ำลงเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ โดยเฉพาะในอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรทและแอมโมเนียมไนเตรทคลอโรฟิลล์จะลดลงถึง 90% ส่วนแอสตาแซนธินจะเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด โดยเฉพาะในอาหารที่มีแคลเซียมไนเตรทและโซเดียมไนเตรท

งานวิจัยของ Pang และคณะ (2017) ได้ศึกษาอิทธิพลของน้ำตาล C5 และแสงต่อการเจริญเติบโตของ *Haematococcus pluvialis* ภายใต้สภาวะ mixotrophic พบว่าน้ำตาลไรโบสที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 7 วัน ช่วยเพิ่มชีวมวลของเซลล์ กิจกรรมภายในเซลล์ และระยะการแบ่งตัวของเซลล์ ช่วยลดโอกาสการปนเปื้อนระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยน้ำตาลไรโบสมีส่วนเซลล์เคลื่อนที่ในระยะเซลล์สีเขียวสูงถึง 31% ซึ่งมากกว่าโซเดียมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน (7%)

### 2.15.3 การศึกษาเกี่ยวกับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

M. C. García-Malea และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์จุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงหลายความเข้มข้น โดยคำนึงถึงผลกระทบสารอาหารและความเข้มแสง ทำการศึกษาผลกระทบความเข้มข้นของสารอาหารที่และความเข้มแสง จากนั้นได้ทำสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ทำนายอัตราการเจริญเติบโตแล้วทำการสอบเทียบ จะมีสมการอัตราการเจริญเติบโตดังนี้

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot I^n}{I \cdot k^n + I^n}$$

สมการที่ 16 อัตราการเจริญเติบโตที่ขึ้นกับความเข้มข้นเพียงอย่างเดียวและมีรูปแบบสมการคล้ายกับ Hill equation

$$\mu = \frac{N \cdot \mu_{Nmax} \cdot I^n}{K_N + N \cdot (a - b \cdot N)^n + I^n}$$

$\mu_{Nmax}$  อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดขึ้นกับความเข้มข้นสารอาหาร ( $\text{day}^{-1}$ )

$N$  ความเข้มข้นสารอาหาร ( $\text{g/L}$ )

$K_N$  ค่าคงที่ความอิ่มตัวที่สัมพันธ์กับสารอาหาร ( $\text{g/L}$ )

$I$  ความเข้มแสง  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$

$n$  พารามิเตอร์รูปร่าง

$a$  ค่าคงที่ความเข้มแสง  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$

$b$  ค่าคงที่ความเข้มแสงต่อความเข้มข้นสารอาหาร  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}/(\text{g/L})$

สมการที่ 17 อัตราการเจริญเติบโตที่ขึ้นกับความเข้มแสงและความเข้มข้นสารอาหารและมีรูปแบบสมการคล้ายกับ Hill equation

M. Bekirogullari และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไขมันของจุลสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ที่คำนึงผลกระทบต่อความเข้มข้น acetate ความเข้มข้น  $\text{NH}_4\text{Cl}$  และความเข้มแสงจากนั้นได้ทำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แล้วทำการสอบเทียบกับผลการทดลอง หลังจากที่ได้แบบจำลองมาได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อให้ได้การผลิตน้ำมันที่มากที่สุด

$$\mu_x = \mu_{xmax} \cdot \frac{S}{S + K_{XS} + \frac{S^2}{K_{iXS}}} \cdot \frac{N}{N + K_{XN} + \frac{N^2}{K_{iXN}}} \cdot \frac{I(L)}{I(L) + K_{XI} + \frac{I(L)^2}{K_{iXI}}}$$

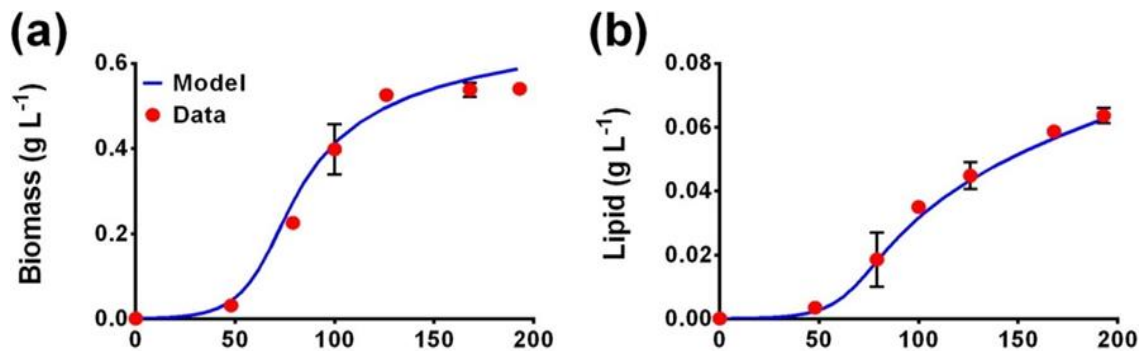
สมการที่ 18 อัตราการเจริญเติบโตอยู่ในรูป Haldane equation ที่มีตัวแปรในการยับยั้งเข้ามา

$$\mu_L = q_{Lmax} \cdot \frac{S}{S + K_{LS} + \frac{S^2}{K_{iLS}}} \cdot \frac{K_{iNL}}{N + K_{iNL}} \cdot \frac{I(L)}{I(L) + K_{LI} + \frac{I(L)^2}{K_{iLI}}}$$

สมการที่ 19 อัตราการสะสมไขมันอยู่ในรูป Haldane equation ที่มีตัวแปรในการยับยั้งเข้ามา เพราะจากการทดลองพบว่าถ้าความเข้มข้นของ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  จะเป็นตัวยับยั้งการสะสมไขมัน

$$I(I) = I_0 \cdot e^{-\sigma x I}$$

สมการที่ 20 ความเข้มแสงเป็นการนำสมการของ Beer-Lambert มาใช้



ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบผลการทดลองกับแบบจำลองของอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการสะสมไขมัน

Dongda Zhang และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตแอสตาแซนธินของจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ชนิดให้แสงโดยคำนึงถึงผลกระทบความเข้มแสงกับอุณหภูมิ

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{I}{I + k_s + \frac{I^2}{k_i}}$$

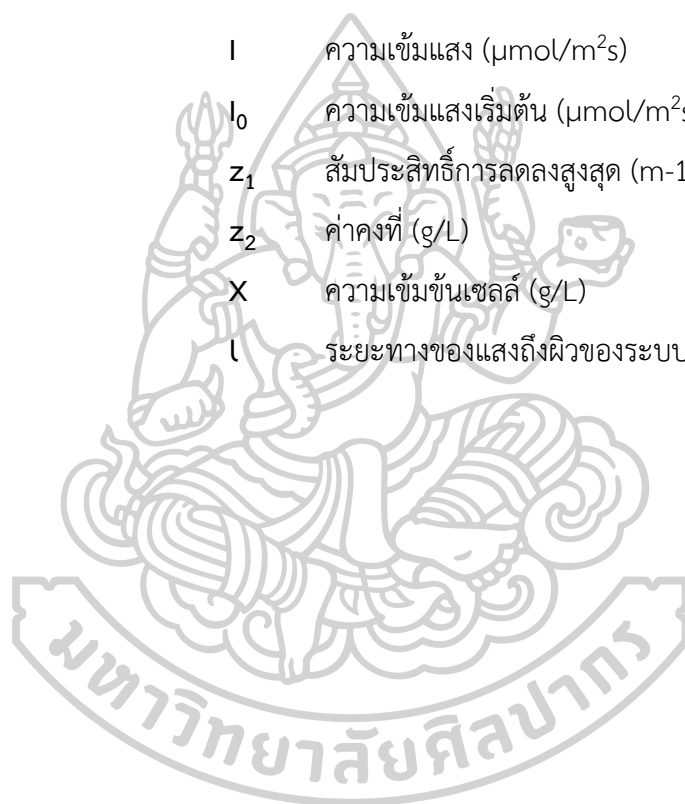
สมการที่ 21 เป็นการนำสมการ Haldane equation มาใช้ในบ่อก้ออัตราการเจริญเติบโตโดยมีแสงเป็นตัวยับยั้ง

Xin Gao และคณะ (2017) ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาแบบจำลองการเจริญเติบโตของจุล  
 สหรัาย *Haematococcus pluvialis* ภายใต้สภาวะแสงสีแดงซึ่งเลี้ยงเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายในการ  
 ทดลองนี้เป็นการเลี้ยงแบบ Autotrophic

สมการที่ 22 สมการความเข้มแสงที่ใช้เป็นการดัดแปลงสมการความเข้มแสงมาจาก Beer-  
 Lambert (Gao, Wang et al. 2017)

$$I = I_0 \cdot \exp \left( - \frac{z_1 \cdot X I}{z_2 + X} \right)$$

I	ความเข้มแสง ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )
$I_0$	ความเข้มแสงเริ่มต้น ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )
$z_1$	สัมประสิทธิ์การลดลงสูงสุด ( $\text{m}^{-1}$ )
$z_2$	ค่าคงที่ ( $\text{g}/\text{L}$ )
X	ความเข้มข้นเซลล์ ( $\text{g}/\text{L}$ )
l	ระยะทางของแสงถึงผิวของระบบ (m)





### บทที่ 3

#### วัสดุอุปกรณ์และวิธีวิจัย

#### 3.1 การเตรียมอุปกรณ์

##### 3.1.1 แหล่งของจุลสาหร่าย

สายพันธุ์ของจุลสาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง คือ *Haematococcus pluvialis* K-0084 จาก Scandinavian Culture Collection for Algae & Protozoa ประเทศสวีเดน

##### 3.1.2 สารเคมีที่ใช้

#### สารเคมี

#### บริษัท

- Ammonium metavanadate Fluka (USA)
- Ammonium molybdate Fluka (USA)
- Hydrochloric acid (HCl) RCI Labscan (Thailand)
- Sodium hydroxide (NaOH) RCI Labscan (Thailand)
- Acetone RCI Labscan (Thailand)
- Acetonitrile RCI Labscan (Thailand)
- Dimethyl sulfoxide RCI Labscan (Thailand)
- Methanol RCI Labscan (Thailand)
- Sodium nitrate ( $\text{NaNO}_3$ ) Ajax Finechem Pty Ltd (Australia)
- Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) Ajax Finechem Pty Ltd (Australia)
- Magnesium sulfite heptahydrate ( $\text{MgSO}_3$ ) Krungthep Chemi (Thailand)
- Potassium hypophosphitetrihydrate Krungthep Chemi (Thailand)
- Citric acid Ajax Finechem Pty Ltd (Australia)
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) CHEMIPAN (Thailand)
- Calcium chloride dihydrate ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) Fluka (Switzerland)

สารเคมี	บริษัท
● Ferric ammonium citrate( $C_6H_8FeNO_7$ )	Sigma-Aldrich Chemistry (Germany)
● Boric acid ( $H_3BO_3$ )	Fluka (Switzerland)
● Copper(II) sulfate pentahydrate ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )	Ajax Finechem Pty Ltd (Australia)
● Zinc sulfate heptahydrate ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	Krungthep Chemi (Thailand)
● Manganese(II) chloride tetrahydrate ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ )	Sigma-Aldrich Chemistry (Germany)
● Sodium molybdate dihydrate ( $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ )	Fluka (Switzerland)
● Cobalt(II) nitrate hexahydrate ( $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ )	CHEMIPAN (Thailand)

### 3.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

เครื่องมือ	ยี่ห้อ/บริษัท
● Spectrophotometer รุ่น Libra S22	biochrom (UK)
● Microscope รุ่น Cover-018	Olympus (Japan)
● Centrifuge รุ่น TD3	UGAIYA (China)
● pH meter รุ่น pH 33 LAQUAtwin	Horiba (Japan)
● Haemacytometer รุ่น Neubauer-improved	Marienfeld Superior (Germany)
● Hot air oven รุ่น FED115	Binder (Germany)
● Autoclave รุ่น SX-700	TOMY (Korea)
● เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TE214S	Sartorius (Germany)
● เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น TE1502S	Sartorius (Germany)
● ตู้แช่	Nuaire (USA)
● เครื่องวัดความเข้มแสง	
● ตู้เพาะเลี้ยง	รุ่งอนันต์เครื่องเย็น (Thailand)
● ตู้เขี่ยเชื้อ	Biobase (China)

- Centrifuge รุ่น 5810 R eppendorf (Germany)
- Centrifuge รุ่น Z 36 HK Hermle (Germany)
- Sonicator Branson, USA
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Shimadzu (Japan)
- เครื่องแก้วและอุปกรณ์ทดลองต่างๆ เช่น ปีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ แท่งแก้ว เป็นต้น

### 3.1.4 ระบบการเพาะเลี้ยง

จากภาพที่ 13 ระบบการเพาะเลี้ยงประกอบไปด้วย 1) ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่สามารถรักษาระดับอุณหภูมิ  $25 \pm 1$  องศาเซลเซียส ซึ่งภายในมีเทอร์โมมิเตอร์เป็นตัวชี้วัดอุณหภูมิอิสระจากตู้ 2) การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงไฟ LEDs ที่ควบคุมความเข้มแสงได้สูงสุดถึง 20,000 ลักซ์ 3) การเพาะเลี้ยงจะมีการใช้ระบบปั่นกวนด้วยเครื่องปั่นกวนแม่เหล็ก 4) การเพาะเลี้ยงจะมีให้อากาศจากปั๊มที่มีการผสมอากาศกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ก่อนมีการให้อากาศเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยงผ่านตัวกรองขนาด 0.22 ไมครอนเมตร



ภาพที่ 13 ลักษณะระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย

## 3.1.5 อาหารเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 4 สูตรอาหาร BG-11

สารเคมี	ปริมาณ (g/L )	ความเข้มข้น (g/L) (100X)	สัดส่วนการผสม อาหาร BG-11 (L)	หมายเหตุ
NaNO <sub>3</sub>	1.5		1.5 g	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02	20	10 ml	Stock 1
MgSO <sub>3</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.075	7.5	10 ml	Stock 2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •3H <sub>2</sub> O	0.05	50	10 ml	Stock 3
Citric acid	0.006	0.6		
EDTA (disodium salt)	0.001	0.1		
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.036	3.6	10 ml	Stock 4
ferric ammonium citrate	0.006	0.6		
Trace metal mix A5				
Boric acid	2.86			
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.079			
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.22		1 ml	Stock 5
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	1.81			
NaMoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.39			
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	4.9			

## 3.2 วิธีการทดลอง

### 3.2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย

#### 3.2.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเซลล์สาหร่ายจากตู้ -20 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ให้อากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อัตราการให้อากาศ 1 vvm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน แล้วถ่ายเชื้อลงขวดเพาะเลี้ยงขนาด 500 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทดลองต่อไป

### 3.2.2 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* (K-0084)

#### 3.2.2.1 การศึกษาความเข้มแสงเริ่มต้น

ในการทดลองนี้ทำการเลี้ยงสาหร่ายลงขวดปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยใส่หัวเชื้อความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $4 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว BG-11 ที่ความเข้มข้นไนเตรทเริ่มต้นที่ 0.75 กรัมต่อลิตร ให้ความเข้มแสงที่ 1,500 และ 3,000 ลักซ์ ให้อากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยจะนำตัวอย่างไปนับจำนวนเซลล์ วัดปริมาณฟอสเฟต และวัดปริมาณไนเตรทที่เหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยง

#### 3.2.2.2 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นไนเตรท

ในการทดลองนี้ทำการเลี้ยงสาหร่ายลงขวดปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยใส่หัวเชื้อความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $4 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว BG-11 ที่ความเข้มข้นไนเตรทเริ่มต้นที่ 0.75 กรัมต่อลิตร ให้ความเข้มแสงที่ 1,500 ลักซ์ ให้อากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นระยะเวลา 4 วัน แล้วทำการเปลี่ยนความเข้มข้นอาหาร โดยให้อาหารที่มีความเข้มข้นของไนเตรทที่ 0.4, 0.8 และ 1.2 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุกวัน วันละ 5 มิลลิลิตร โดยในช่วงหลังจากเปลี่ยนอาหารจะเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง โดยจะนำตัวอย่างไปนับจำนวนเซลล์ พีเอช วัดปริมาณฟอสเฟต และวัดปริมาณไนเตรทที่เหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยง รวมถึงความเข้มข้นแอสตาแซนธินในเซลล์

#### 3.2.2.3 การศึกษาผลกระทบความเข้มของแสง

ในการทดลองนี้ทำการเลี้ยงสาหร่ายลงขวดปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยใส่หัวเชื้อความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $4 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว BG-11 ที่ความเข้มข้นไนเตรทเริ่มต้นที่

0.75 กรัมต่อลิตร ให้ความเข้มแสงที่ 1,500 ลักซ์ ให้อากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นระยะเวลา 4 วัน แล้วทำการเปลี่ยนความเข้มแสง โดยเพิ่มความเข้มแสงเป็น 6,000 12,000 และ 18,000 ลักซ์ เก็บตัวอย่างทุกวัน วันละ 5 มิลลิลิตร โดยในช่วงหลังจากเปลี่ยนแสงจะเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง โดยจะนำตัวอย่างไปนับจำนวนเซลล์ พีเอช วัดปริมาณฟอสเฟต และวัดปริมาณไนเตรทที่เหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยง รวมถึงความเข้มข้นแอสตาแซนธินในเซลล์

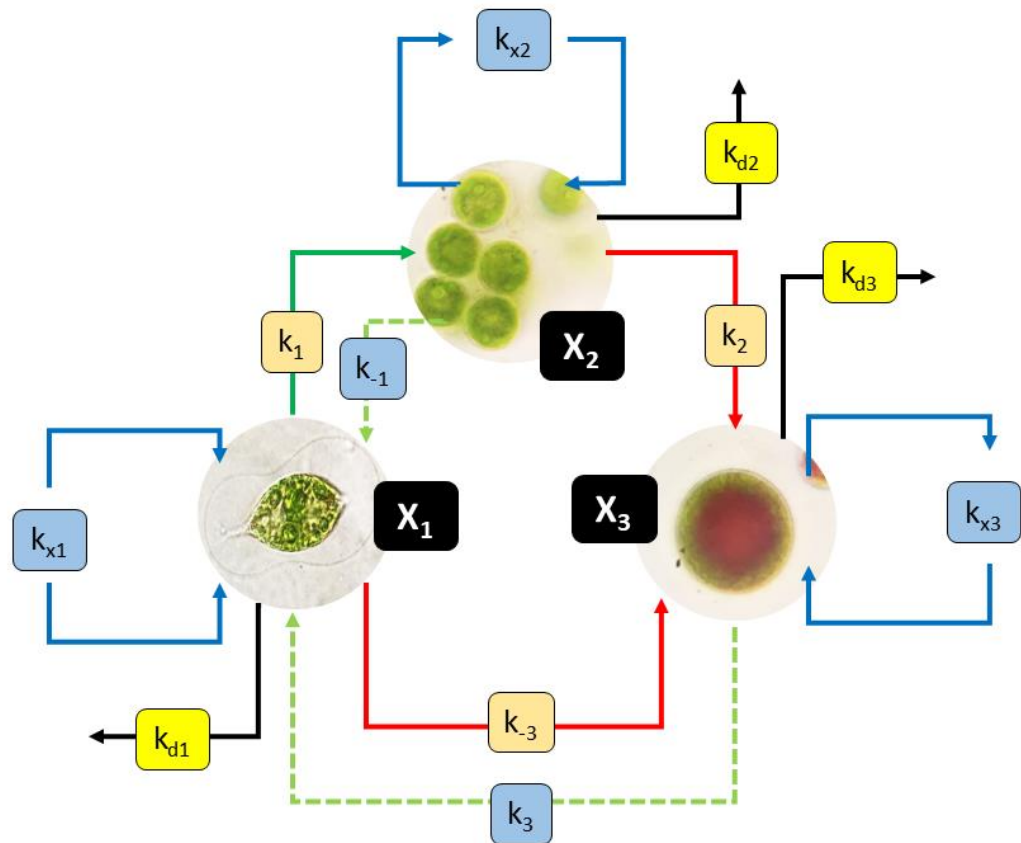
#### 3.2.2.4 การศึกษาผลกระทบของแสงสี

ในการทดลองนี้ทำการเลี้ยงสาหร่ายลงขวดปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยใส่หัวเชื้อความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $4 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว BG-11 ที่มีความเข้มข้นไนเตรทที่ 0.75 กรัมต่อลิตร แล้วให้ความเข้มแสงที่ 1,500 ลักซ์ ให้อากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นระยะเวลา 5 วัน แล้วเปลี่ยนแสงเป็นแสงสีน้ำเงิน สีแดง และสีม่วง เก็บตัวอย่างทุกวัน วันละ 5 มิลลิลิตร โดยในช่วงหลังจากเปลี่ยนแสงสีจะเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปนับจำนวนเซลล์ พีเอช วัดปริมาณฟอสเฟต และวัดปริมาณไนเตรทที่เหลืออยู่ในระบบการเพาะเลี้ยง รวมถึงความเข้มข้นแอสตาแซนธินในเซลล์

### 3.3 การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

โดยนำผลการทดลองจากการศึกษาความเข้มข้นแสงเริ่มต้นที่ 3,000 ลักซ์ ในอาหารเหลว BG-11 ที่มีความเข้มข้นไนเตรทที่ 0.75 กรัมต่อลิตร ให้อากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นระยะเวลา 12 วัน โดยใช้โปรแกรม COPASI ทำนายวงจรชีวิตของเซลล์สำหรับการใช้สารอาหารไนโตรเจน

3.3.1 สร้างแผนภูมิสมมูลมวลของวงจรชีวิตจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เพื่อใช้ในการสร้างสมการการเจริญเติบโตของเซลล์ในระยะต่างๆ



ภาพที่ 14 แผนภูมิสมมูลมวลของวงจรชีวิตจุลสาหร่าย *H. pluvialis*

3.3.2 สมการอัตราการเจริญเติบโต  $X_1$ ,  $X_2$  และ  $X_3$

สมการที่ 23 อัตราการเจริญเติบโต  $X_1$  คือ สมการของเซลล์เคลื่อนที่

$$\frac{dX_1}{dt} = -k_1 X_1 + \text{cell}_{X_2} k_{-1} X_2 - k_{-3} X_1 + \text{cell}_{X_3} k_3 X_3 + k_{x1} X_1 - k_{d1} X_1$$

สมการที่ 24 อัตราการเจริญเติบโต  $X_2$  คือ สมการของเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว

$$\frac{dX_2}{dt} = k_1 X_1 - k_{-1} X_2 - k_2 X_2 + \text{cell}_{\text{budding}X_2} k_{x2} X_2 - k_{d2} X_2$$

สมการที่ 25 อัตราการเจริญเติบโต  $X_3$  คือ สมการของเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดง

$$\frac{dX_3}{dt} = k_2 X_2 + k_{-3} X_1 - k_3 X_3 + \text{cell}_{\text{budding}X_3} k_{x3} X_3 - k_{d3} X_3$$

$k_1, k_{-1}, k_2, k_3, k_{-3}$  สมการอัตราการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ( $hr^{-1}$ ) ดังที่แสดงในภาพ

$k_{x_1}, k_{x_2}, k_{x_3}$  สมการอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในระยะต่างๆ ( $hr^{-1}$ ) ดังที่แสดง  
ในภาพ

$k_{d_1}, k_{d_2}, k_{d_3}$  ค่าคงที่การตายของเซลล์ในระยะต่างๆ ( $hr^{-1}$ ) ดังที่แสดงในภาพ

$cell_{x_2}, cell_{x_3}$  ค่าคงที่การแบ่งตัวย้อนกลับจากระยะต่างๆเข้าสู่เซลล์  $X_1$

$cell_{buddingX_2}, cell_{buddingX_3}$  ค่าคงที่การแบ่งตัวในระยะต่างๆของเซลล์

### 3.3.3 อธิบายสมการอัตราการเปลี่ยนแปลงในระยะต่างๆ

- $k_1$  คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เคลื่อนที่สีเขียวก่อนไปสู่เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียวก่อน สมการอัตราที่คำนึงผลกระทบของแสงที่สภาวะเหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สีเขียวก่อนเคลื่อนที่เปลี่ยนไปเป็นเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียวก่อน แต่เมื่อมีการเปลี่ยนความเข้มแสงที่สูงขึ้นต้องส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโต การเกิดเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียวก่อน จึงเลือกใช้สมการของ Haldane equation (สมการที่ 6) ในการอธิบาย ส่วนสมการไนเตรทใช้สมการของ Monod equation (สมการที่ 2) ในการอธิบายการเจริญเติบโต
- $k_2$  คือ อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียวก่อนเปลี่ยนเป็นเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดง สมการอัตราที่คำนึงผลกระทบของแสงที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียวก่อนไปเป็นเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดง ในความเข้มแสงเริ่มต้นส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง และเมื่อมีการเปลี่ยนความเข้มแสงต้องส่งผลให้มีการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นมากกว่าเดิม จึงเลือกใช้สมการของ Hill equation (สมการที่ 7) สำหรับอธิบายการตอบสนองของแสง ส่วนสมการไนเตรทเลือกใช้สมการที่ดัดแปลงจากสมการ Monod equation (สมการที่ 18) จากการเจริญเติบโตเป็นการยับยั้งการใช้ไนเตรท



- $k_3$  คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดงย้อนกลับเป็นเซลล์เคลื่อนที่สีเขียว ซึ่งสมการอัตรานี้คำนึงผลกระทบของแสงใช้สมการที่ดัดแปลงจากสมการของ Monod equation (สมการที่ 19) ในสถานะที่เหมาะสมจะมีการเปลี่ยนแปลงที่ดีแต่ในสถานะที่ไม่เหมาะสมต้องส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงต่ำลง และใช้เลขยกกำลังในการตอบสนองแสงในการอธิบายส่วนสมการไนเตรทใช้สมการของ Monod equation (สมการที่ 2) ในการอธิบายการเจริญเติบโต
- $k_{-1}$  คือ อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียวย้อนกลับเป็นเซลล์เคลื่อนที่สีเขียว สมการอัตรานี้คำนึงผลกระทบความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เมื่อมีการเปลี่ยนความเข้มข้นที่สูงขึ้นต้องส่งผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียวย้อนกลับเป็นเซลล์เคลื่อนที่สีเขียว จึงเลือกใช้สมการของ Haldane equation (สมการที่ 7) ในการอธิบายการเจริญเติบโต ส่วนสมการไนเตรทใช้สมการของ Monod equation (สมการที่ 2) ในการอธิบายการเจริญเติบโต
- $k_{-3}$  คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เคลื่อนที่สีเขียวเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดง สมการอัตรานี้คำนึงผลกระทบของแสงที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลสาหร่ายในความเข้มข้นเริ่มต้นก็ทำให้เกิดเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดง และเมื่อมีการเปลี่ยนความเข้มข้นที่มากขึ้นต้องส่งผลให้เซลล์อยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสมเกิดสภาวะเครียดเปลี่ยนเป็นเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดงที่เพิ่มมากขึ้นกว่าความเข้มข้นแรก จึงเลือกใช้สมการของ Hill equation (สมการที่ 8) สำหรับการตอบสนองของแสงในการอธิบายการเจริญเติบโต สมการไนเตรทใช้สมการของ Monod equation (สมการที่ 1) ในการอธิบายการเจริญเติบโต
- $k_{x_1}$  คือ อัตราการแบ่งตัวของเซลล์เคลื่อนที่สีเขียว ในสถานะที่เหมาะสมของความเข้มข้นต้องส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ แต่เมื่อมีการเปลี่ยนความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้การแบ่งตัวในช่วงนี้ต่ำลง จึงเลือกใช้สมการ Haldane equation (สมการที่ 7) ในการอธิบายการเจริญเติบโต ส่วนสมการ

ไนเตรทใช้สมการของ Monod equation (สมการที่ 2) ในการอธิบายการเจริญเติบโต

- $k_{x_2}$  คือ อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว ในสภาวะความเข้มแสงที่เหมาะสมต้องส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ที่ดีกว่าการเปลี่ยนความเข้มแสงที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งความเข้มแสงที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้การแบ่งตัวในช่วงนี้ต่ำลง จึงเลือกใช้สมการ Haldane equation (สมการที่ 7) ส่วนสมการไนเตรทใช้สมการของ Monod equation (สมการที่ 2) ในการอธิบายการเจริญเติบโต
- $k_{x_3}$  คือ อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดง ใช้สมการดัดแปลงจากสมการ Monod equation (สมการที่ 19) จากการเจริญเติบโตเป็นการยับยั้งด้วยแสง เพื่ออธิบายผลกระทบความเข้มแสงที่สูงส่งผลให้การแบ่งตัวของเซลล์ลดลงและเมื่อความเข้มแสงลดลงส่งผลให้เกิดการแบ่งตัวที่ดีขึ้น ส่วนสมการไนเตรทใช้ Monod equation (สมการที่ 2) ในการอธิบายการเจริญเติบโต

### 3.3.4 สมการอัตราการเปลี่ยนแปลงในระยะต่างๆ

สมการที่ 26  $k_1$  คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงจาก  $X_1$  ไป  $X_2$

$$k_1 = \mu_{\max_1} \cdot \frac{I}{I + K_{x_{l_1}} + \frac{I^2}{K_{i_{x_{l_1}}}}} \cdot \frac{N - N_{\min}}{(N - N_{\min}) + K_{x_{N_1}}}$$

โดยที่  $\mu_{\max_1}$  คือ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $hr^{-1}$ )

$K_{x_{l_1}}$  คือ ค่าคงที่อิ่มตัวครึ่งหนึ่งของแสง ( $\mu mol/m^2s$ )

$K_{i_{x_{l_1}}}$  คือ ค่าคงที่ยับยั้งของแสง ( $\mu mol/m^2s$ )

$K_{x_{N_1}}$  คือ ค่าคงที่อิ่มตัวครึ่งหนึ่งของไนเตรท (mg/L)

$N_{\min}$  คือ ค่าคงที่ (mg/L)

สมการที่ 27  $k_2$  คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงจาก  $X_2$  ไป  $X_3$

$$k_2 = \mu_{\max_2} \cdot \frac{I^n}{I^n + K_{xl_2}^n} \cdot \frac{K_{ixN_2}}{(N - N_{\min}) + K_{ixN_2}}$$

โดยที่  $\mu_{\max_2}$  คือ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\text{hr}^{-1}$ )

$K_{xl_2}$  คือ ค่าคงที่อิ่มตัวครึ่งหนึ่งของแสง ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )

$K_{ixN_2}$  คือ ค่าคงที่ยับยั้งของไนเตรท ( $\text{mg}/\text{L}$ )

$n$  คือ ค่าคงที่

สมการที่ 28  $k_3$  คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงจาก  $X_3$  ไป  $X_1$

$$k_3 = \mu_{\max_3} \cdot \frac{K_{ixl_3}^n}{I^n + K_{ixl_3}^n} \cdot \frac{N - N_{\min}}{(N - N_{\min}) + K_{xN_3}}$$

โดยที่  $\mu_{\max_3}$  คือ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\text{hr}^{-1}$ )

$K_{ixl_3}$  คือ ค่าคงที่ยับยั้งของแสง ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )

$K_{xN_3}$  คือ ค่าคงที่อิ่มตัวครึ่งหนึ่งของไนเตรท ( $\text{mg}/\text{L}$ )

สมการที่ 29  $k_1$  คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงจาก  $X_2$  ไป  $X_1$

$$k_1 = \mu_{\max_1} \cdot \frac{I}{I + K_{xl_1} + \frac{I^2}{K_{ixl_1}}} \cdot \frac{N - N_{\min}}{(N - N_{\min}) + K_{xN_1}}$$

โดยที่  $\mu_{\max_1}$  คือ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\text{hr}^{-1}$ )

$K_{xl_1}$  คือ ค่าคงที่อิ่มตัวครึ่งหนึ่งของแสง ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )

$K_{ixl_1}$  คือ ค่าคงที่ยับยั้งของแสง ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )

$K_{xN_1}$  คือ ค่าคงที่อิ่มตัวครึ่งหนึ่งของไนเตรท ( $\text{mg}/\text{L}$ )

สมการที่ 30  $k_{-3}$  คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงจาก  $X_1$  ไป  $X_3$

$$k_{-3} = \mu_{\max_{-3}} \cdot \frac{I^n}{I^n + K_{x_{l_{-3}}}^n} \cdot \frac{K_{ixN_{-3}}}{(N - N_{\min}) + K_{ixN_{-3}}}$$

โดยที่  $\mu_{\max_{-3}}$  คือ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $hr^{-1}$ )

$K_{x_{l_{-3}}}$  คือ ค่าคงที่อิ่มตัวครึ่งหนึ่งของแสง ( $\mu mol/m^2/s$ )

$K_{ixN_{-3}}$  คือ ค่าคงที่ยับยั้งของไนเตรท (mg/L)

สมการที่ 31  $k_{x_1}$  คือ อัตราการแบ่งตัวของเซลล์  $X_1$

$$k_{x_1} = \mu_{\max_{x_1}} \cdot \frac{I}{I + K_{x_{l_{x_1}}} + \frac{I^2}{K_{ix_{l_{x_1}}}}} \cdot \frac{N - N_{\min}}{(N - N_{\min}) + K_{xN_{x_1}}}$$

โดยที่  $\mu_{\max_{x_1}}$  คือ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $hr^{-1}$ )

$K_{x_{l_{x_1}}}$  คือ ค่าคงที่อิ่มตัวครึ่งหนึ่งของแสง ( $\mu mol/m^2/s$ )

$K_{ix_{l_{x_1}}}$  คือ ค่าคงที่ยับยั้งของแสง ( $\mu mol/m^2/s$ )

$K_{xN_{x_1}}$  คือ ค่าคงที่อิ่มตัวครึ่งหนึ่งของไนเตรท (mg/L)

สมการที่ 32  $k_{x_2}$  คือ อัตราการแบ่งตัวของเซลล์  $X_2$

$$k_{x_2} = \mu_{\max_{x_2}} \cdot \frac{I}{I + K_{x_{l_{x_2}}} + \frac{I^2}{K_{ix_{l_{x_2}}}}} \cdot \frac{N - N_{\min}}{(N - N_{\min}) + K_{xN_{x_2}}}$$

โดยที่  $\mu_{\max_{x_2}}$  คือ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $hr^{-1}$ )

$K_{x_{l_{x_2}}}$  คือ ค่าคงที่อิ่มตัวครึ่งหนึ่งของแสง ( $\mu mol/m^2/s$ )

$K_{ix_{l_{x_2}}}$  คือ ค่าคงที่ยับยั้งของแสง ( $\mu mol/m^2/s$ )

$K_{xN_{x_2}}$  คือ ค่าคงที่อิ่มตัวครึ่งหนึ่งของไนเตรท (mg/L)

สมการที่ 33  $k_{x_3}$  คือ อัตราการแบ่งตัวของเซลล์  $X_3$

$$k_{x_3} = \mu_{\max_{x_3}} \cdot \frac{K_{iX_3}}{I + K_{iX_3}} \cdot \frac{N - N_{\min}}{(N - N_{\min}) + K_{xN_3}}$$

โดยที่  $\mu_{\max_{x_3}}$  คือ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\text{hr}^{-1}$ )

$K_{iX_3}$  คือ ค่าคงที่ยับยั้งของแสง ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )

$K_{xN_3}$  คือ ค่าคงที่อิ่มตัวครึ่งหนึ่งของไนเตรท ( $\text{mg}/\text{L}$ )

3.3.4 สมการที่ 34 ความเข้มแสง

$$I = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{z_1 \times Xl}{z_2 + X}\right)$$

โดยที่  $I$  คือ ความเข้มแสง ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )

$I_0$  คือ ความเข้มแสงเริ่มต้น ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )

$z_1$  คือ สัมประสิทธิ์การลดลงสูงสุด ( $\text{m}^{-1}$ )

$z_2$  คือ ค่าคงที่ ( $\text{cell}/\text{ml}$ )

$X$  คือ ความเข้มข้นเซลล์ ( $\text{cell}/\text{ml}$ )

$l$  คือ ระยะทางของแสงถึงผิวของระบบ ( $\text{m}$ )

3.3.5 สมการที่ 35 การบริโภคไนเตรท

$$\frac{dN}{dt} = \left( \left( -\frac{1}{Y_{X_1/N}} \cdot \left| \frac{dX_1}{dt} \right| - \frac{1}{Y_{X_2/N}} \cdot \left| \frac{dX_2}{dt} \right| - \frac{1}{Y_{X_3/N}} \cdot \left| \frac{dX_3}{dt} \right| \right) \cdot \frac{I}{I + K_{iX_3}} \cdot \left( 1 - \frac{N}{N_{\min}} \right) - \frac{1}{\mu_{sx}} \cdot \frac{dP}{dt} \right)$$

โดยที่  $N$  คือ ความเข้มข้นไนเตรท ( $\text{mg}/\text{L}$ )

$Y_{X_1/N}$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์ผลผลิตของชีวมวลต่อไนเตรท ( $\text{mg N}$

/Cell)

$\frac{Y_{x_2}}{N}$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์ผลผลิตของชีวมวลต่อไนเตรท (mg N /Cell)

$\frac{Y_{x_3}}{N}$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์ผลผลิตของชีวมวลต่อไนเตรท (mg N /Cell)

$K_{ixi}$  คือ ค่าคงที่ยับยั้งของแสง ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )

$\mu_{sx}$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ต่อไนเตรท (mg N/mg P)

### 3.3.6 สมการที่ 36 การสะสมแอสตาแซนธิน

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{\frac{P}{x}}} \cdot \frac{dX_3}{dt} + \mu_p \cdot X_3$$

โดยที่ P คือ ความเข้มข้นแอสตาแซนธิน (mg/L)

$\frac{Y_{\frac{P}{x}}}{x}$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์ผลผลิตของแอสตาแซนธินต่อเซลล์ (mg As/cell)

$\mu_p$  คือ อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะสูงสุด ( $\text{hr}^{-1}$ )

### 3.4 วิธีการประมาณค่าพารามิเตอร์

การประมาณค่าพารามิเตอร์เป็นการวัดค่าความคลาดเคลื่อนระหว่างค่าของแบบจำลองและผลการทดลองให้มีค่าความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด

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

โดยที่  $X_{k,ij}$  คือ ค่าผลการทดลอง

$Y_{k,ij}$  คือ ค่าของแบบจำลอง

p คือ เวกเตอร์ของตัวแปรแบบจำลอง

- i คือ จำนวนการทดลอง
- j คือ จำนวนตัวแปรสถานะ
- k คือ จำนวนข้อมูลของการทดลอง

$$\frac{(X_{k,i,j} - Y_{k,i,j}(p))^2}{X_{k,i,j}}$$

เป็นค่าคลาดเคลื่อนระหว่างแบบจำลองกับผลการทดลอง

### 3.5 วิธีการคำนวณค่า R-Square

การคำนวณ R-Square เป็นการคำนวณเพื่อตรวจสอบค่าความคลาดเคลื่อนระหว่างผลการทดลองกับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ซึ่งค่า  $R^2$  ของแบบจำลองควรมีค่าไม่ต่ำกว่า 0.75 – 1

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{res}}{SS_{tot}}$$

$$SS_{tot} = \sum_i (y_i - \bar{y})^2$$

$$SS_{res} = \sum_i (y_i - f_i)^2$$

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i$$

โดยที่  $SS_{res}$  คือ ผลรวมความคลาดเคลื่อน

$SS_{tot}$  คือ ความแปรปรวนรวม

$\bar{y}$  คือ ผลรวมค่าเฉลี่ยผลการทดลอง

$y_i$  คือ ข้อมูลผลการทดลอง

$f_i$  คือ ข้อมูลของแบบจำลอง

### 3.6 วิธีการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson Correlation: $r_p$ )

เป็นค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตั้งแต่ 2 ตัวแปรขึ้นไป เพื่อตรวจสอบว่าตัวแปรคู่ใดมีความสัมพันธ์กันจริงหรือไม่ มากหรือน้อย ซึ่งการแปลผลจะบอกในแง่ของความสัมพันธ์ ความสอดคล้อง การแปรผันร่วมกัน หรือไปด้วยกัน แต่จะไม่ได้บอกความหมายต่อตัวแปรหนึ่งเป็นเหตุและอีกตัวแปรเป็นผล

$$r_{xy} = \frac{N \sum XY - \sum X - \sum Y}{\sqrt{[N \sum X^2 - (\sum X)^2][N \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

โดยที่  $r_{xy}$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

$\sum XY$  คือ ผลรวมของผลคูณระหว่าง X และ Y

$\sum X$  คือ ผลรวมของข้อมูล X

$\sum Y$  คือ ผลรวมของข้อมูล Y

$\sum X^2$  คือ ผลรวมของข้อมูล X กำลังสอง

$\sum Y^2$  คือ ผลรวมของข้อมูล Y กำลังสอง

N จำนวนชุดข้อมูล

### 3.7 การวิเคราะห์

#### 3.7.1 การวัดปริมาณไนเตรท ( $\text{NO}_3$ )

วิธี Armstrong (Armstrong 1963)

1. ทำการตกตะกอนเซลล์ตัวอย่าง นำส่วนใสปริมาณ 100 ไมโครลิตร
2. บีบน้ำกลั่นปริมาตร 4,900 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง
3. เติมสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 M ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเทียบกับ Blank (น้ำกลั่น) ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร และ 275 นาโนเมตร



### 3.7.2 การวัดปริมาณฟอสเฟต

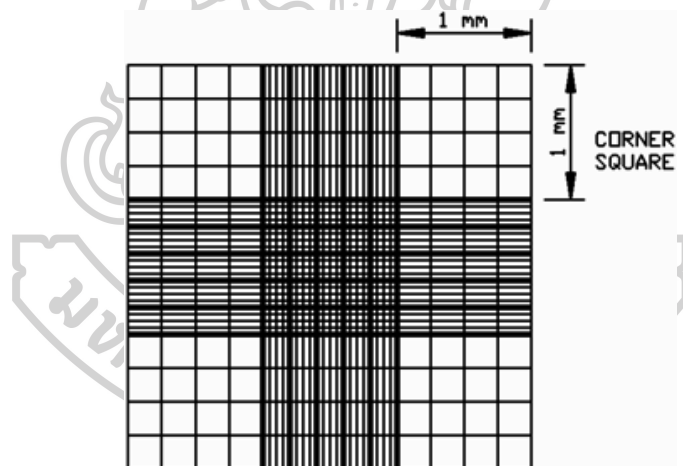
#### วิธี Vanadomolybdo phosphoric Acid colorimetric

1. ทำการตกตะกอนเซลล์ตัวอย่าง นำส่วนใสปริมาตร 1000 ไมโครลิตร
2. ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 4,000 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง
3. เติมนีเอเจนต์ 1,000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเทียบกับ Blank ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

### 3.7.3 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์

นำตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร จำแนกชนิดเซลล์โดยการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์และนับจำนวนโดยใช้เครื่องนับเซลล์ (haemocytometer) และคำนวณด้วยสูตร

$$\text{ความหนาแน่นเซลล์ (cells/ml)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์}}{\text{จำนวนช่องที่นับ}} \times \text{dilute solution} \times 10^4$$



ภาพที่ 15 การนับเซลล์ด้วย Haemocytometer

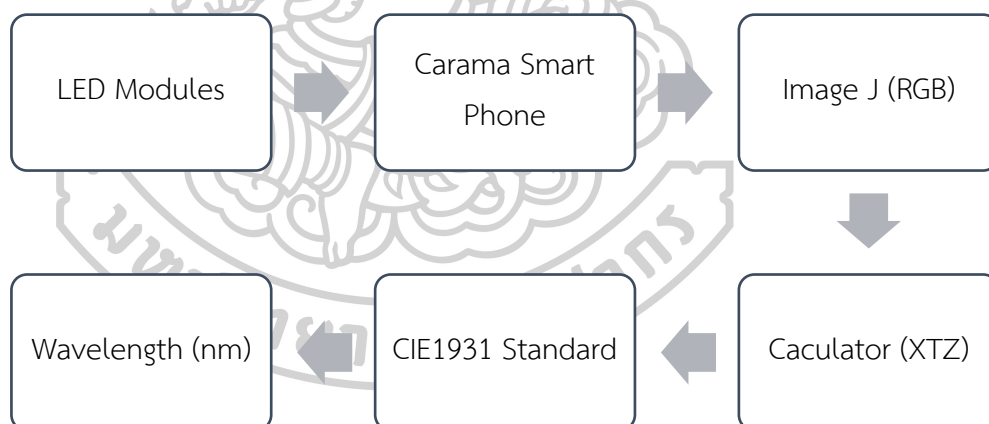
### 3.7.4 การวิเคราะห์แอสตาแซนธินด้วย

นำตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส เก็บตะกอนเซลล์ จากนั้นเติมนีเอเจนต์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเม็ดแก้ว แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำการเก็บส่วนใสรอบแรกปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำการเก็บส่วนใสรอบที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำส่วน

ใส่ทั้ง 2 รอบ มาผสมกันจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ แอสตาแซนธิน โดยใช้เครื่อง HPLC (High-Performance Liquid chromatography) โดยใช้คอลัมน์ C-18 ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร โดยฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าสู่คอลัมน์ C18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้ 35% methanol ใน acetonitrile เป็น mobile phase ที่อัตราการไหล 1.0 ml min<sup>-1</sup> วัด elution ที่ความยาวคลื่น 476 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานและคำนวณความเข้มข้นของแอสตาแซนธิน

### 3.8 การคำนวณความยาวคลื่นของแสงสี

วิธีการคำนวณความยาวคลื่นแสงสีโดยใช้แอปพลิเคชันจากงานวิจัยก่อนหน้า (Pinkeaw 2017) โดยมีหลักการการวิเคราะห์ข้อมูลแสงสีดังภาพที่ 16 โดยการทำงานของระบบจะอาศัยกล้องจากโทรศัพท์ในระบบแอนดรอย์ในการจับภาพคลื่นแสงสีที่ถ่ายได้ ซึ่งจะอาศัยการแปลงค่าภาพให้ได้ข้อมูล RGB เพื่อความแม่นยำจะมีการเปรียบเทียบกับค่า RGB ที่ได้จากแอปพลิเคชันกับค่า RGB ที่ได้ภาพถ่ายโดยใช้โปรแกรม Image J ในการหาค่า RGB ของแสงสีที่ได้ทำการถ่ายภาพได้



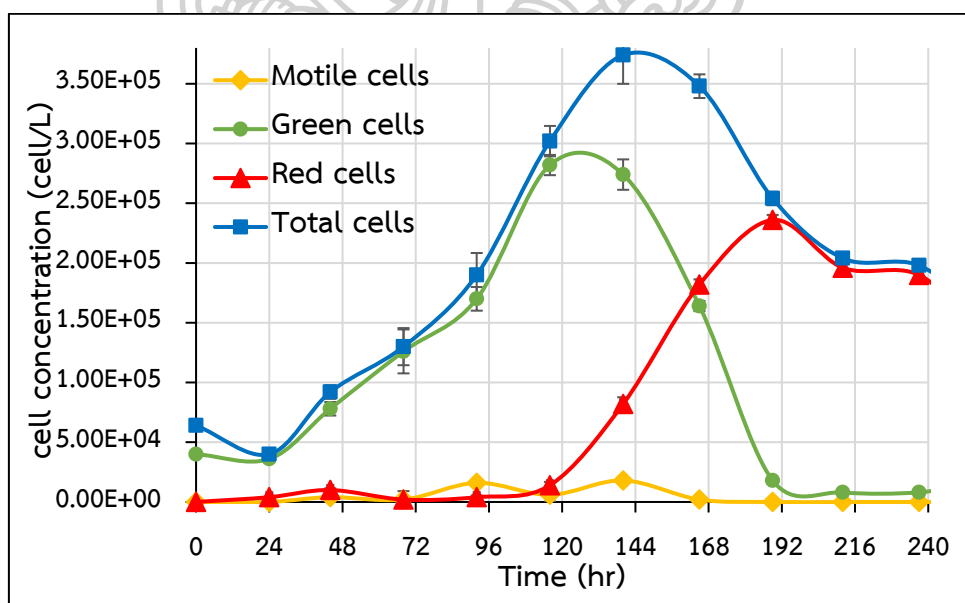
ภาพที่ 16 หลักการคำนวณความยาวคลื่นแสงสีของแอป MJUSPEC  
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก (Pinkeaw 2017)

## บทที่ 4

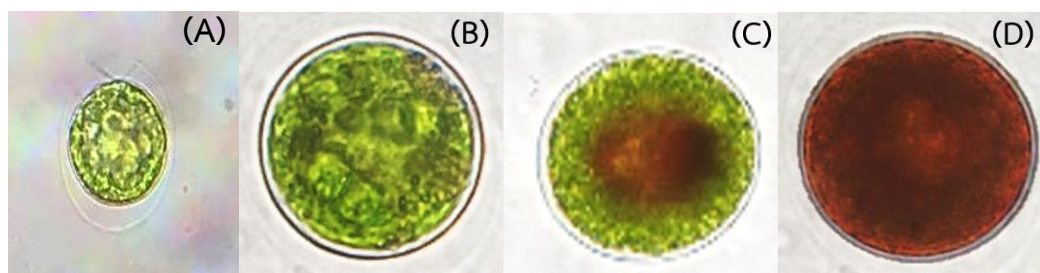
### สรุปผลการทดลอง

#### 4.1 การศึกษาวงจรชีวิตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*

จากการทดลองเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในอาหารเหลว BG-11 พีเอชเริ่มต้น 7.0 โดยควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm ที่ประกอบด้วยให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอากาศ ให้แสงตลอดเวลาที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ความเข้มข้นไนเตรทเริ่มต้นที่ 0.75 กรัมต่อลิตร ในตู้ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน จากภาพที่ 17 พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่ายภายใน 24 ชั่วโมงแรกจะพบเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* มีลักษณะเป็นสีเขียวซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ เซลล์สีเขียวเคลื่อนที่ (vegetative cells) และเซลล์ไม่เคลื่อนที่ (Pamella cell) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์อยู่ในระยะแบ่งตัวของเซลล์ (Log phase) โดยมีจำนวนเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 116 หลังจาก 120 ชั่วโมง เซลล์จะเริ่มเข้าสู่ระยะหยุดนิ่ง เริ่มลดจำนวนเซลล์สีเขียวและพบเซลล์ที่สะสมสารสีแดงภายในเซลล์จนเป็นเซลล์สีแดงเต็มวง (Cyst cells) มีจำนวนเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 189 ซึ่งสามารถสรุปลักษณะของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในเบื้องต้นได้ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 17 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์และชนิดของเซลล์สาหร่ายที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ (■ คือ เซลล์ทั้งหมด; ● คือ เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว; ▲ คือ เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดง; ◆ คือ เซลล์เคลื่อนที่)



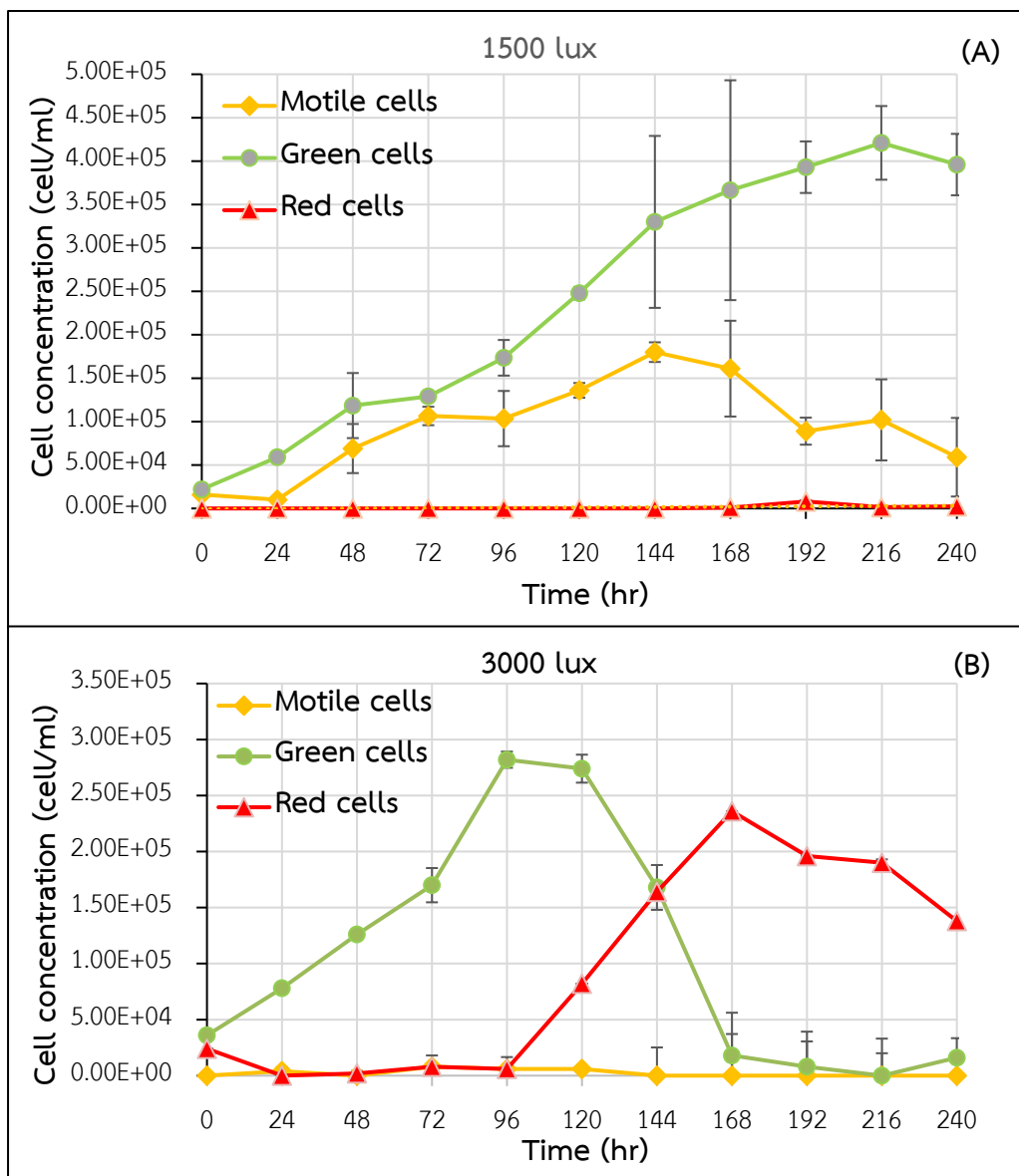
**ภาพที่ 18** เซลล์ในระยะต่างๆของวงจรชีวิตของจุลสาหร่าย *H. pluvisialis*; (A) เซลล์เคลื่อนที่ (vegetative cells); (B) ระยะเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว (palmella cells); (C) เซลล์เดี่ยวในระยะที่มีการสะสมของแอสตาแซนธิน; (D) เซลล์ระยะสะสมของแอสตาแซนธิน (aplanospore cells)

ซึ่งเมื่อจำแนกลักษณะของเซลล์จุลสาหร่ายจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาในวงจรชีวิตของจุลสาหร่าย *H. pluvisialis* แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดใหญ่ๆ ได้แก่ 1) เซลล์เคลื่อนที่ หรือ motile cells 2) เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว หรือ non-motile cells และ 3) เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดง หรือ aplanospore cells ซึ่งในบางสภาวะการเพาะเลี้ยงสามารถพบเซลล์จุลสาหร่ายแบบเคลื่อนที่สีแดงได้

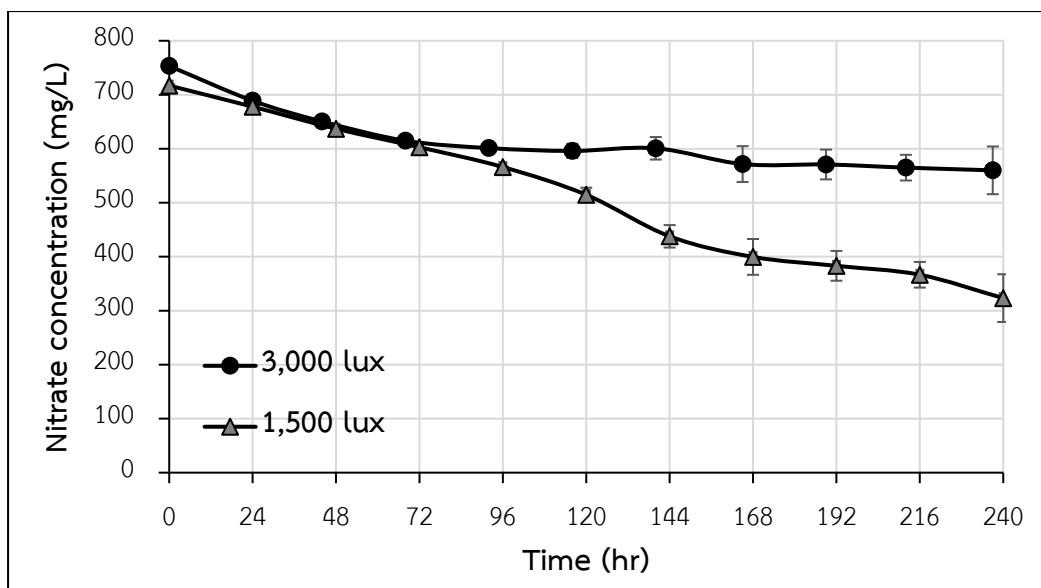
#### 4.2 การศึกษาความเข้มแสง

ในการศึกษานี้ได้ทดลองเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvisialis* ภายใต้สภาวะความเข้มแสงที่แตกต่างกันเพื่อสังเกตวงจรชีวิตของเซลล์จุลสาหร่ายและการสะสมแอสตาแซนธิน โดยมีการแบ่งช่วงการเพาะเลี้ยงออกเป็น 2 ระยะ ระยะแรกจะเป็นช่วงเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีการเจริญเติบโตและผลิตชีวมวลของเซลล์จุลสาหร่าย และระยะที่สองจะเป็นสภาวะกระตุ้นให้เซลล์สะสมแอสตาแซนธิน โดยระยะแรกได้เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ และ 3,000 ลักซ์ เพื่อหาสภาวะที่เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีและมีระยะแบ่งตัวเซลล์ที่ยาวนาน ซึ่งได้เริ่มจากความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ให้ความเข้มขึ้นในตรรกที่ 750 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 10 วัน ดังภาพที่ 19B ต่อมาลดความเข้มแสงลงมาที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงนี้เซลล์จุลสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดี ระยะแบ่งตัวและจำนวนเซลล์เคลื่อนที่มากกว่าที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ในช่วง 5 วันแรกดังภาพที่ 19 ซึ่งมีอัตราการใช้ในตรรกปริมาณมากในการสร้างและแบ่งเซลล์ โดยสอดคล้องกับปริมาณความเข้มขึ้นของในตรรกที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดจนเริ่มคงที่เมื่อเข้าสู่ระยะหยุดนิ่ง (Stationary phase) ดังภาพที่ 20 ในขณะที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ชั่วโมงที่ 116 เซลล์จุลสาหร่ายเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ และมีผลผลิตชีวมวลสูงสุดที่  $2.8 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

และเซลล์เริ่มมีการสะสมแอสตาแซนธิน ลดอัตราการใช้ธาตุไนโตรเจน ซึ่งแตกต่างกับที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เซลล์จุลสาหร่ายยังอยู่ในระยะแบ่งเซลล์และไม่มีเซลล์สาหร่ายที่สะสมแอสตาแซนธิน โดยชั่วโมงที่ 216 เซลล์จุลสาหร่ายที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เริ่มเข้าสู่ระยะหยุดนิ่งและมีผลผลิตชีวมวลสูงสุดที่  $4.21 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มแสงที่ 1,500 ลักซ์ เป็นช่วงความเข้มแสงต่ำที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนชีวมวลของเซลล์จุลสาหร่าย



ภาพที่ 19 การเจริญเติบโตของเซลล์ตลอดระยะเวลาชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 240 โดย (A) ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ และ(B) ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์



ภาพที่ 20 ความเข้มข้นของไนเตรทระหว่างเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน

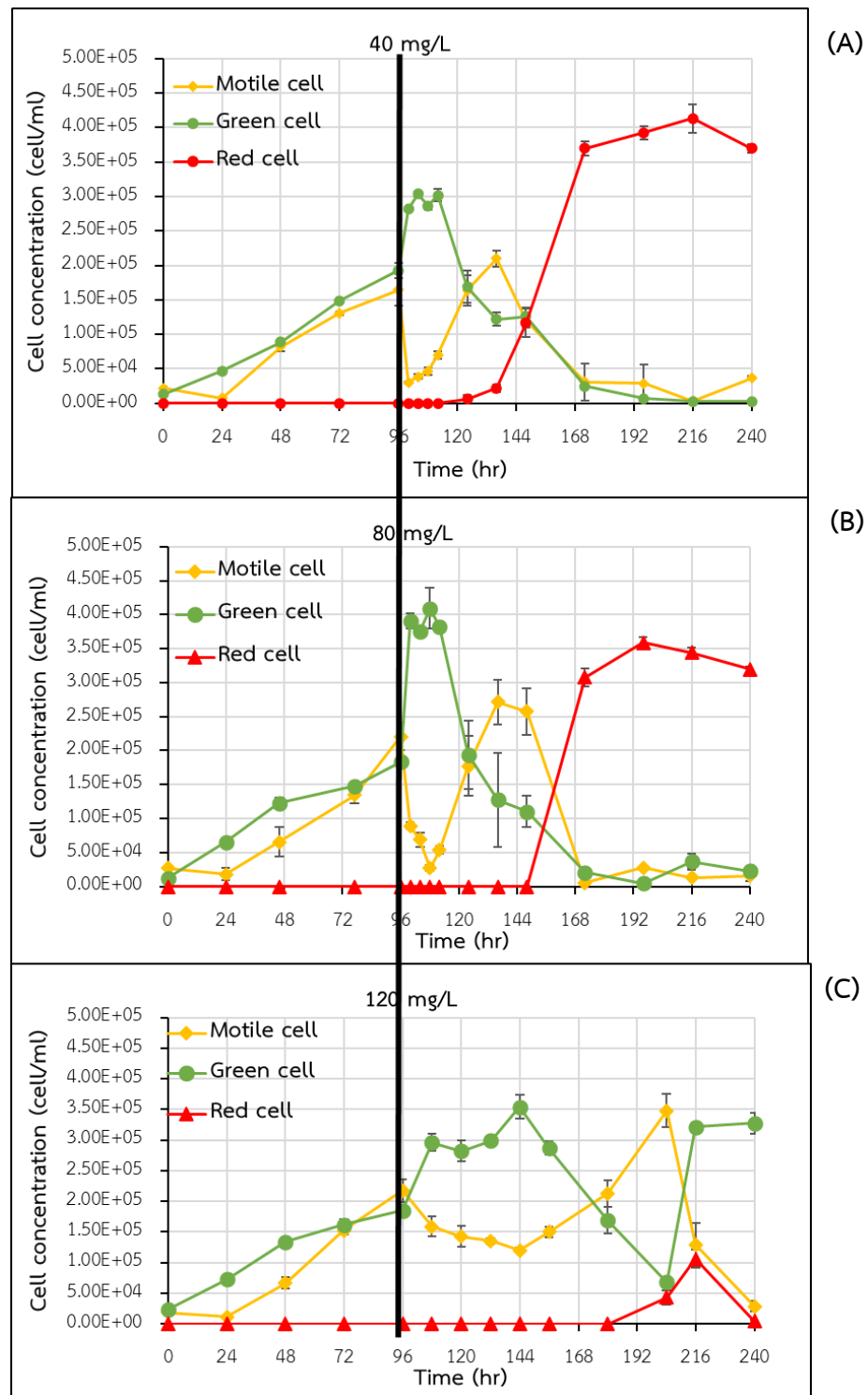
#### 4.3 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นไนเตรท

##### 4.3.1 การเจริญเติบโตของเซลล์

ธาตุอาหารที่มีความสำคัญในการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยทั่วไปคือ ธาตุไนโตรเจนและฟอสเฟต ซึ่งไนเตรทเป็นแหล่งธาตุไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย โดยในการทดลองนี้ได้จำกัดความเข้มข้นฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม และความเข้มข้นของไนเตรทเริ่มต้นที่ 750 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าเซลล์สาหร่ายมีอัตราการใช้นิเตรทในระยะเวลา 10 วัน โดยรวมอยู่ที่ประมาณ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงได้เลือกความเข้มข้นไนเตรทที่ความเข้มข้น 40, 80, 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการศึกษาสภาวะกระตุ้นจากความเข้มข้นไนเตรท โดยในระยะแรกทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในอาหารเหลว BG-11 ความเข้มข้นไนเตรทเริ่มต้นที่ 750 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคุมอัตราการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอากาศ ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 7.0 เป็นระยะเวลา 4 วัน หรือจนได้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น  $4 \times 10^5$  เซลล์ต่อลิตร และทำการเปลี่ยนความเข้มข้นไนเตรทโดยเปลี่ยนอาหาร BG-11 ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นอาหารที่มีความเข้มข้นไนเตรทเริ่มต้นที่ 40, 80, 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 21 พบว่าวงจรชีวิตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ที่ความเข้มข้นไนเตรท 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากได้รับการกระตุ้นภายใน 48 ชั่วโมงแรกของการกระตุ้นพบเซลล์สาหร่ายในระยะเริ่มต้น 2 ชนิด คือ เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว และเซลล์เคลื่อนที่สีเขียว เริ่มลดจำนวนลง และเริ่มมีเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดงเพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งแตกต่างกับที่ความเข้มข้นไนเตรท 120

มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ยังพบเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียวและเซลล์เคลื่อนที่สีเขียวจำนวนมาก เซลล์จะเริ่มมีการเปลี่ยนในชั่วโมงที่ 180 หรือ 3 วันหลังจากเซลล์เข้าสู่สภาวะกระตุ้น โดยในช่วงสภาวะกระตุ้นนี้ ค่าพีเอชของอาหารจะอยู่ในสภาวะเป็นด่าง ดังภาพที่ 31 จึงเห็นได้ชัดว่าธาตุไนโตรเจนมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ของสาหร่าย ซึ่งเมื่อเซลล์เข้าสู่สภาวะขาดธาตุไนโตรเจนเซลล์เริ่มมีการสะสมแอสตาแซนธินเพื่อให้เซลล์ยังอยู่รอดได้ จึงทำให้ที่ความเข้มข้นไนเตรทต่ำสุด 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เริ่มมีการพบเซลล์สีแดงก่อนที่ความเข้มข้นไนเตรท 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Orosa, Franqueira et al. 2005) ที่พบว่าที่ความเข้มข้นไนเตรทต่ำกว่า 150 มิลลิกรัม มีการเจริญเติบโตที่ต่ำและเซลล์เข้าสู่ระยะสภาวะการขาดไนโตรเจนเร็ว แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเซลล์เข้าสู่สภาวะขาดธาตุไนโตรเจน เซลล์จะเจริญอยู่ได้สักระยะหนึ่ง เนื่องจากในเซลล์มีแหล่งไนโตรเจนภายใน เซลล์มีชื่อว่า RuBisCo ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่ช่วยตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ให้กับเซลล์สาหร่าย (García-Ferris, de los Ríos et al. 1996)



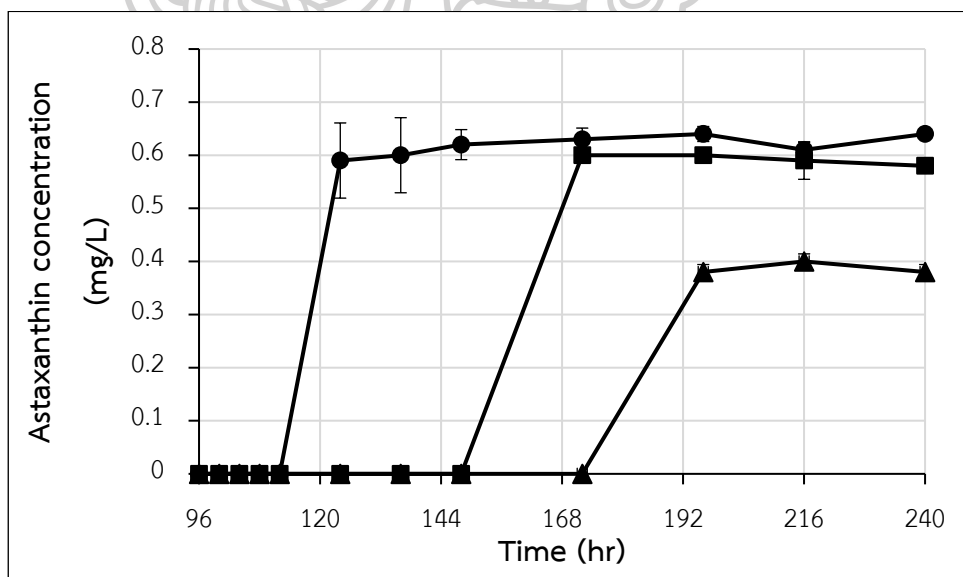


ภาพที่ 21 การเจริญเติบโตของเซลล์ตลอดระยะเวลาชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 240 หลังจากชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 คือสภาวะการกระตุ้นด้วยความเข้มข้นไนเตรท โดย (A) ความเข้มข้นไนเตรท 40 มิลลิกรัมต่อลิตร; (B) ความเข้มข้นไนเตรท 80 มิลลิกรัมต่อลิตร; (C) ความเข้มข้นไนเตรท 120 มิลลิกรัมต่อลิตร



#### 4.3.2 การสะสมแอสตาแซนธินของเซลล์สาหร่าย

ได้ทำการสกัดแอสตาแซนธินโดยสารละลายอะซีโตนและวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนธินด้วยเครื่อง HPLC จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสภาวะกระตุ้นด้วยความเข้มข้นไนเตรทที่ 40, 80, 120 มิลลิกรัมต่อลิตร จนทำให้เกิดการเปลี่ยนของเมตาบอลิซึมภายในเซลล์เกิดการสังเคราะห์ทุติยภูมิที่เรียกว่า แอสตาแซนธิน จากภาพที่ 22 พบว่าที่ความเข้มข้นไนเตรทที่ 40 มิลลิกรัมต่อลิตรมีการสะสมแอสตาแซนธินภายในเซลล์รวดเร็วที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นไนเตรทอื่นๆ โดยให้ปริมาณสารแอสตาแซนธินที่สูงสุด 0.65 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ห้วงจรชีวิตทำให้รู้ว่าเซลล์ส่วนใหญ่ช่วง 24 ชั่วโมงแรกเป็นเซลล์เคลื่อนที่ที่สะสมแอสตาแซนธินในเซลล์ จึงส่งผลให้ยังมีผนังเซลล์ที่ไม่หนามากทำให้สามารถสกัดแอสตาแซนธินออกมาได้ง่ายกว่าเซลล์ที่กระตุ้น ของความเข้มข้นไนเตรทที่ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร และเซลล์สาหร่ายที่ได้รับสภาวะกระตุ้นด้วยความเข้มข้นไนเตรทต่ำ ส่วนใหญ่จะพบเป็นแอสตาแซนธินในรูปเอสเทอร์ (Astaxanthin ester) (Orosa, Franqueira et al. 2005) ซึ่งในความเข้มข้นไนเตรทที่ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์สามารถเจริญเติบโตจนเริ่มสะสมแอสตาแซนธินในวันที่ 3 และตัวเซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีและเซลล์เริ่มมีการตายเกิดขึ้น จึงทำให้ได้ปริมาณแอสตาแซนธินที่ในปริมาณที่น้อยและเซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ที่มีการสะสมแอสตาแซนธินเต็มวงจึงส่งผลให้ความยากลำบากในการสกัดแอสตาแซนธิน

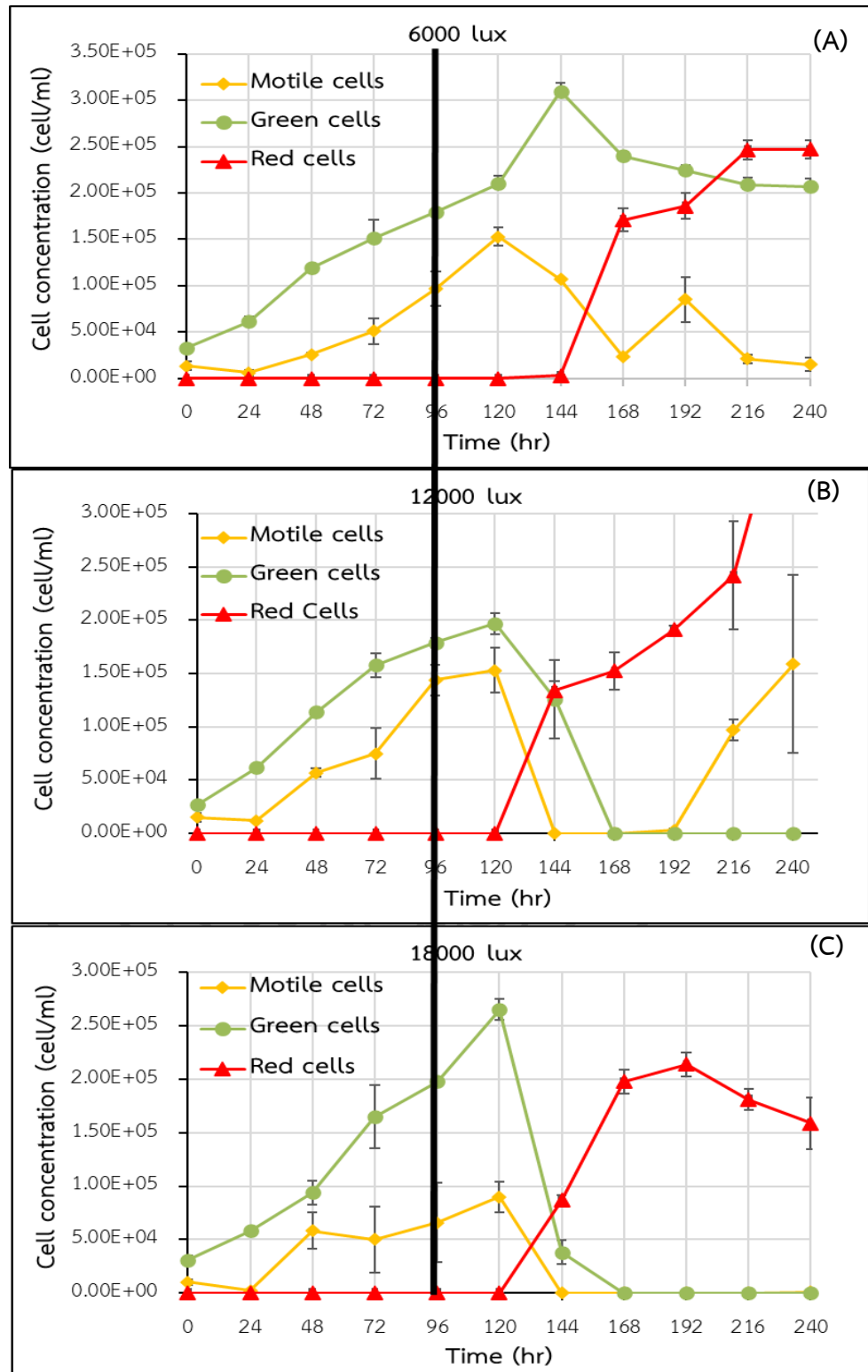


ภาพที่ 22 ความเข้มข้นแอสตาแซนธินในสภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วยความเข้มข้นแสงช่วง 96 ชั่วโมง ถึง 240 ชั่วโมง (วงกลมทึบ : 40 mg/L สี่เหลี่ยมทึบ : 80 mg/L สามเหลี่ยมทึบ : 120 mg/L)

#### 4.4 การศึกษาผลกระทบความเข้มแสง

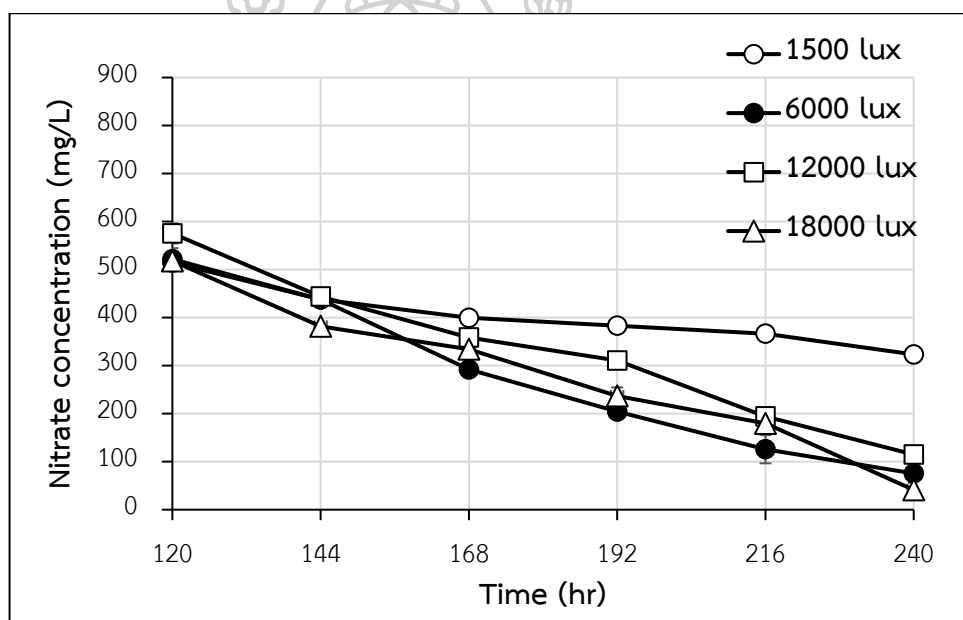
##### 4.4.1 การเจริญเติบโตของเซลล์

แสงเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มชีวมวลของเซลล์จุลสาหร่ายซึ่งแสงก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เซลล์จุลสาหร่ายอยู่ในสภาวะกระตุ้นได้นั้นคือระดับความเข้มของแสง โดยเมื่อมีแสงก็จะมีอนุกรมเข้ามาเกี่ยวข้องในระบบด้วย ในการทดลองนี้จึงได้เลี้ยงควบคุมอนุกรมให้อยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส โดยแหล่งของแสงได้ถูกสร้างขึ้นจากไฟแอลอีดี ซึ่งให้อนุกรมที่ต่ำและใช้พลังงานน้อย โดยความเข้มแสงที่เลือกศึกษาในสภาวะกระตุ้นคือ 6,000 12,000 และ 18,000 ลักซ์ ดังภาพที่ 23 พบว่าในสภาวะขั้นตอนแรกได้เพราะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่ายด้วยความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ จนได้ความเข้มชั้นเซลล์เริ่มต้น  $4 \times 10^5$  เซลล์ต่อลิตร และทำการกระตุ้นด้วยความเข้มแสง หลังจากได้รับการกระตุ้น 24 ชั่วโมงแรก ที่ความเข้มแสง 12,000 ลักซ์ และ 18,000 ลักซ์ จะพบเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว และเซลล์เคลื่อนที่ ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ความเข้มแสง 6,000 ลักซ์ เซลล์สาหร่ายไม่เคลื่อนที่สีเขียวยังสามารถเจริญเติบโตได้แต่เซลล์เคลื่อนที่มีอัตราเจริญลดลง แต่เมื่อดูเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดง ที่ความเข้มแสงสูงที่ 18,000 ลักซ์ภายใน 24 ชั่วโมง มีการเพิ่มจำนวนเซลล์สีแดงเร็วที่สุด และในช่วงท้ายของการทดลองจะพบแค่เซลล์สีแดงเต็มวง ซึ่งแตกต่างกับความเข้มแสง 6,000 ลักซ์และ 12,000 ลักซ์ ที่ยังพบเซลล์สีเขียวและเซลล์สีแดงที่สามารถแบ่งตัวได้ ตามลำดับ ซึ่งเกิดจากการที่เซลล์มีการปรับตัวและยังไม่ถึงจุดอิ่มตัวของแสง จึงทำให้ในช่วงท้ายการทดลอง ชั่วโมงที่ 216 หรือ 4 วันหลังจากได้รับการกระตุ้นแสง เซลล์สีแดงที่ความเข้มแสง 12,000 ลักซ์ ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดประมาณ  $2.46 \times 10^5$  เซลล์ต่อลิตร และยังมีโอกาสเพิ่มจำนวนขึ้นอีก



ภาพที่ 23 การเจริญเติบโตของเซลล์ตลอดระยะเวลาชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 240 หลังจากชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 คือสภาวะการกระตุ้นด้วยความเข้มขึ้นแสง โดย (A) ความเข้มแสง 6,000 ลักซ์; (B) ความเข้มแสง 12,000 ลักซ์ และ (C) ความเข้มแสง 18,000 ลักซ์

ในขณะที่ได้รับการกระตุ้นด้วยความแสงจากภาพที่ 24 จะพบว่าอัตราการใช้ในเตรทไม่แตกต่างกันมากแต่ถ้าหากเปรียบเทียบกับความเข้มข้นแสงเริ่มต้น 1,500 ลักซ์ จะพบว่าที่ความเข้มข้นแสงสูงจะมีอัตราการใช้ในเตรทที่ปริมาณมากกว่าที่ความเข้มข้นแสงเริ่มต้น ซึ่งสืบเนื่องมาจากความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นทำให้จุดอิ่มตัวของแสงในการกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์จะสูงขึ้นตามลำดับ แต่เมื่อถึงระยะเวลานิ่งอัตราการสังเคราะห์จะไม่เพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตของเซลล์ก็จะเริ่มลดลง ซึ่งค่าความเป็นกรดต่างจากภาพที่ 31 พบว่าหลังจากได้รับความเข้มข้นแสงที่เพิ่มขึ้นค่าความเป็นกรดต่างก็ปรับเพิ่มขึ้นตามลำดับของความเข้มข้นแสง และหลังจาก 24 ชั่วโมงแรกหลังจากการกระตุ้น ค่าความเป็นกรดต่างได้ปรับลดลงอย่างเห็นได้ชัดซึ่งเป็นผลมาจากอัตราการสังเคราะห์ภายในเซลล์ที่สูงขึ้นในระยะเฉียบพลัน

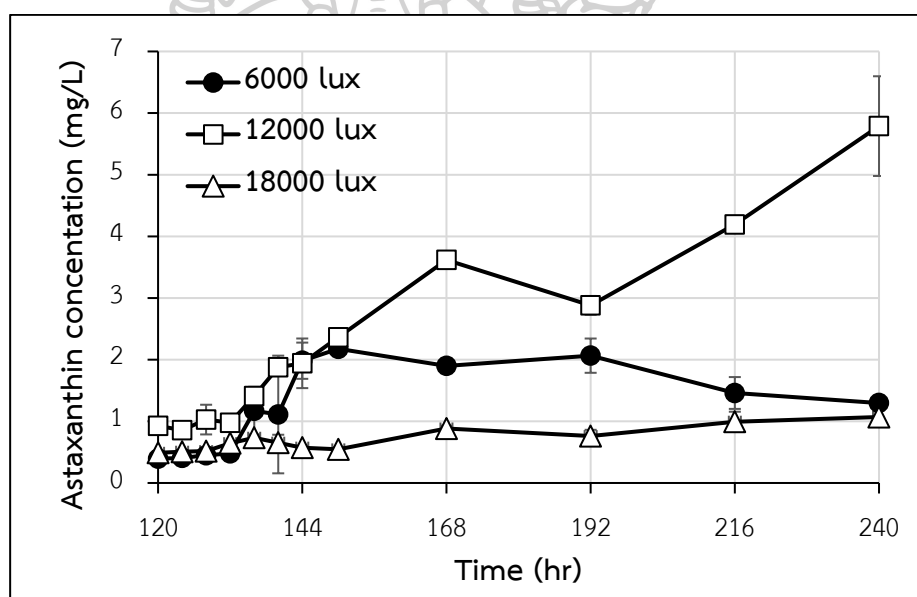


ภาพที่ 24 ความเข้มข้นไนเตรท ภายหลังจากชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 ในสภาวะการกระตุ้นด้วยความเข้มข้นแสงต่างๆ

#### 4.4.2 การสะสมแอสตาแซนธินของเซลล์จุลสาหร่าย

ได้ทำการสกัดแอสตาแซนธินจากตัวอย่างที่เก็บวิเคราะห์จากในช่วงที่เซลล์จุลสาหร่ายได้รับการกระตุ้นและเซลล์จุลสาหร่ายเริ่มมีการสะสมแอสตาแซนธินจากสภาวะกระตุ้น โดยเก็บตัวอย่างปริมาณ 5 มิลลิลิตรปั่นเหวี่ยงเอาส่วนใสออกและนำมาสกัดด้วยสารละลายอะซีโตนและวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนธินด้วยเครื่อง HPLC ในสภาวะกระตุ้นด้วยความเข้มข้นแสง 6,000 ลักซ์,

12,000 ลักซ์ และ 18,000 ลักซ์ ดังภาพที่ 23C ที่แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มแสง 18,000 ลักซ์ เซลล์เริ่มมีการสะสมแอสตาแซนธินภายในเซลล์ก่อนความเข้มแสงอื่นๆ แต่เมื่อสกัดวัดปริมาณแอสตาแซนธินในแต่ละความเข้มแสง ดังภาพที่ 25 พบว่าที่ความเข้มแสง 12,000 ลักซ์ มีปริมาณแอสตาแซนธินสูงสุด มากกว่าที่ความเข้มแสง 6,000 ลักซ์ และ 18,000 ลักซ์ โดยมีความเข้มข้นแอสตาแซนธินสูงสุดในวันสุดท้ายของการทดลองที่ 5.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดงในภาพที่ 23B แต่ในทางตรงกันข้ามที่ความเข้มแสง 6,000 ลักซ์ ที่มีเซลล์สีแดงปริมาณใกล้เคียงกัน กลับพบว่ามีปริมาณความเข้มข้นแอสตาแซนธินน้อยกว่าถึง 5 เท่า ซึ่งนั่นก็เป็นเพราะว่าเซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ที่เพิ่งเริ่มมีการสะสมแอสตาแซนธินซึ่งยังไม่เต็มวงเหมือนกับที่ความเข้มแสง 12,000 ลักซ์ ซึ่งแอสตาแซนธินที่วิเคราะห์ได้จะเป็นแอสตาแซนธินที่อยู่ในรูป ทรานส์-แอสตาแซนธิน (trans-astaxanthin) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสามารถแยกได้จากการดูดกลืนแสงของแอสตาแซนธิน (Weber, Anke et al. 2007)



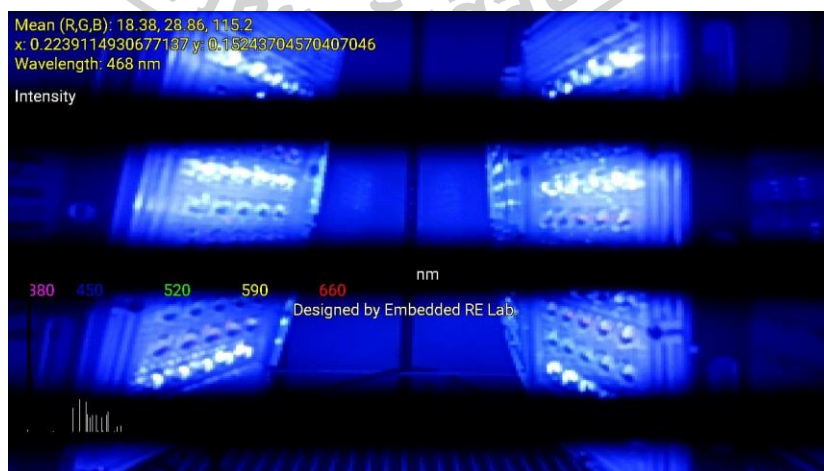
ภาพที่ 25 ความเข้มข้นแอสตาแซนธิน (Astaxanthin concentration, mg/L) ในช่วงการกระตุ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 ในสภาวะการกระตุ้นด้วยความเข้มแสง 6,000 ลักซ์ ความเข้มแสง 12,000 ลักซ์ และความเข้มแสง 18,000 ลักซ์ (วงกลมทึบ : 12,000 ลักซ์ สี่เหลี่ยมโปร่ง : 8,000 ลักซ์ สามเหลี่ยมโปร่ง : 6,000 ลักซ์)

#### 4.5 การศึกษาผลกระทบคลื่นแสงสีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย

ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของเซลล์สาหร่ายต้องใช้รงควัตถุที่เรียกว่า คลอโรฟิลล์ ในการสังเคราะห์แสง ซึ่งในระบบของคลอโรฟิลล์ก็จะมีช่วงความยาวคลื่นแสงที่ดูดกลืนในการสังเคราะห์แสงไม่เท่ากันจึงได้ทำการวัดค่าความยาวคลื่นแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง พบว่าแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในงานวิจัยนี้เป็นแสงผสมระหว่างแสงสีน้ำเงินและแสงสีแดง ซึ่งแสงสีมองเห็นจะเป็นแสงสีขาวแต่แสงที่จับภาพได้จะเป็นแสงสีน้ำเงินเข้มดังตัวอย่างภาพที่ 13 ซึ่งค่าความยาวคลื่นแสงที่วัดได้เป็นดังตารางที่ 5 โดยการทำงานของแอปพลิเคชันจะใช้กล้องจากโทรศัพท์ระบบแอนดรอย์ในการวัดค่าสีและความยาวคลื่นแสงเป็นดังภาพที่ 26 จึงได้เปรียบเทียบความแม่นยำของสีกล้องโทรศัพท์ด้วยค่าสี (RGB) ที่ได้จากการวัดผ่านแอปพลิเคชันและวิเคราะห์จากโปรแกรม image J พบว่ามีค่าสี (RGB) ที่วิเคราะห์ได้มีค่าใกล้เคียงกัน โดยค่าความยาวคลื่นที่อ่านได้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกราฟความสัมพันธ์แสงสีและรงควัตถุในภาพที่ 7 พบว่าแสงสีที่ใช้และค่าความยาวคลื่นแสงสีที่อ่านได้จากแอปพลิเคชันมีความใกล้เคียงกันและแม่นยำ

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบค่าสี (RGB) ของแสงที่ใช้เพาะเลี้ยง

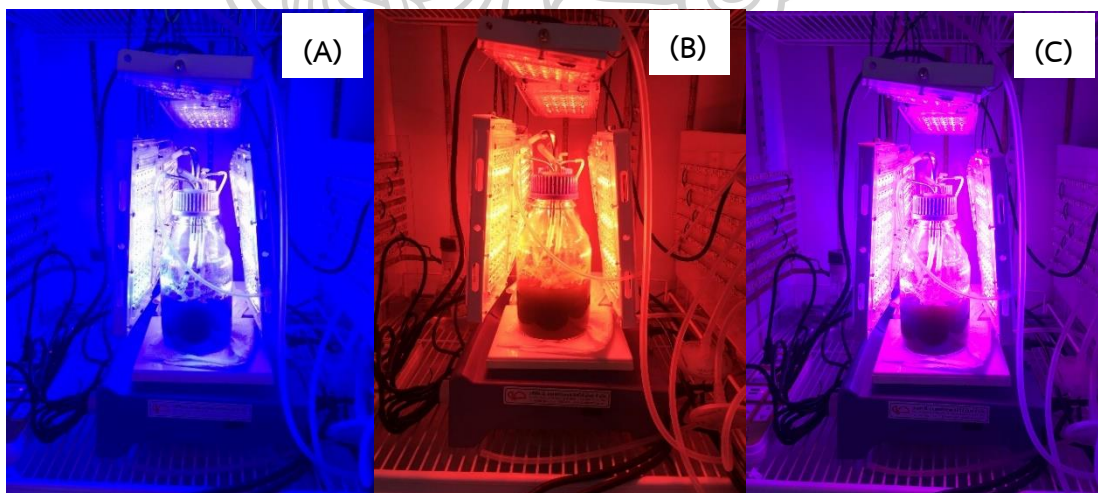
แสงสีที่วัด	โปรแกรม imageJ	แอป MJUSPEC	ความยาวคลื่นที่อ่านได้ (nm)
ไฟที่เลี้ยง	104.0/100.02/159.17	104.9/99.63/163.8	360-468 nm
Blue	20.88/31.23/111.45	18.38/28.86/115.2	468-477 nm
Red	113.47/50.17/38.94	114.4/47.35/37.28	625-630 nm
Purple	63.05/43.72/113.65	61.73/41.06/115.3	360-365 nm



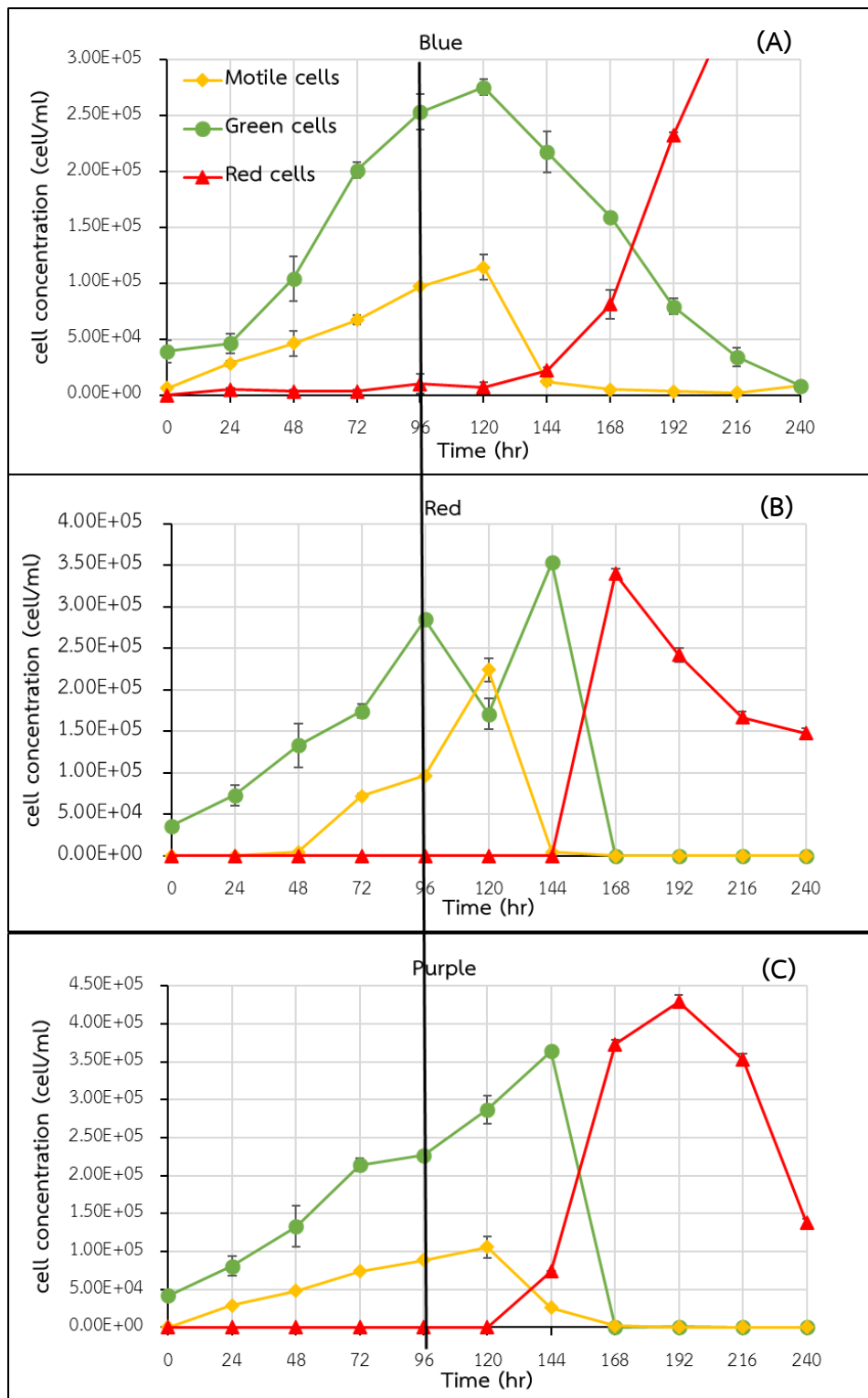
ภาพที่ 26 การทำงานของแอปพลิเคชันในการวัดความยาวคลื่นแสงสี

#### 4.5.1 การเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย

ในการทดลองนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ใน ระยะกระตุ่นโดยใช้แสงสี 3 สี คือ แสงสีน้ำเงิน แสงสีแดง และแสงสีม่วง ดังภาพที่ 27 โดยจากการสังเกตวงจรชีวิตของจุลสาหร่ายในการเพาะเลี้ยงพบว่าเซลล์จุลสาหร่ายมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ดังภาพที่ 28 จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะกระตุ่นด้วยแสงสีทั้ง 3 สี พบหลังจากชั่วโมงที่ 96 การเพาะเลี้ยงสภาวะกระตุ่นด้วยแสงสีแดงกระตุ่นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวและพบเซลล์เคลื่อนที่สีเขียวเป็นจำนวนมาก ในขณะที่สภาวะกระตุ่นด้วยแสงสีน้ำเงินและสีม่วงพบเซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว และเมื่อดูอัตราการใช้ในเตรทในภาพที่ 29A พบว่าสภาวะกระตุ่นด้วยแสงสีแดงมีอัตราการใช้ในเตรทมากที่สุดและในชั่วโมงที่ 120 สภาวะกระตุ่นด้วยแสงสีน้ำเงินและแสงสีม่วงเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์เป็นเซลล์ที่เริ่มมีการสะสมแอสตาแซนธินภายในเซลล์ แต่สภาวะกระตุ่นด้วยแสงสีม่วงมีอัตราหรือจำนวนในการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเซลล์มากกว่าในสภาวะกระตุ่นด้วยแสงสีน้ำเงิน และเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมงหรือชั่วโมงที่ 144 สภาวะกระตุ่นด้วยแสงสีม่วงและแสงสีแดงมีอัตราของจำนวนเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงเกือบ 50% ของเซลล์ทั้งหมด ในขณะที่สภาวะกระตุ่นด้วยแสงสีน้ำเงินต้องใช้เวลาอย่างน้อย 72 ชั่วโมง และเซลล์สีแดงมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 168 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแอสตาแซนธินที่สกัดได้ดังภาพที่ 29B

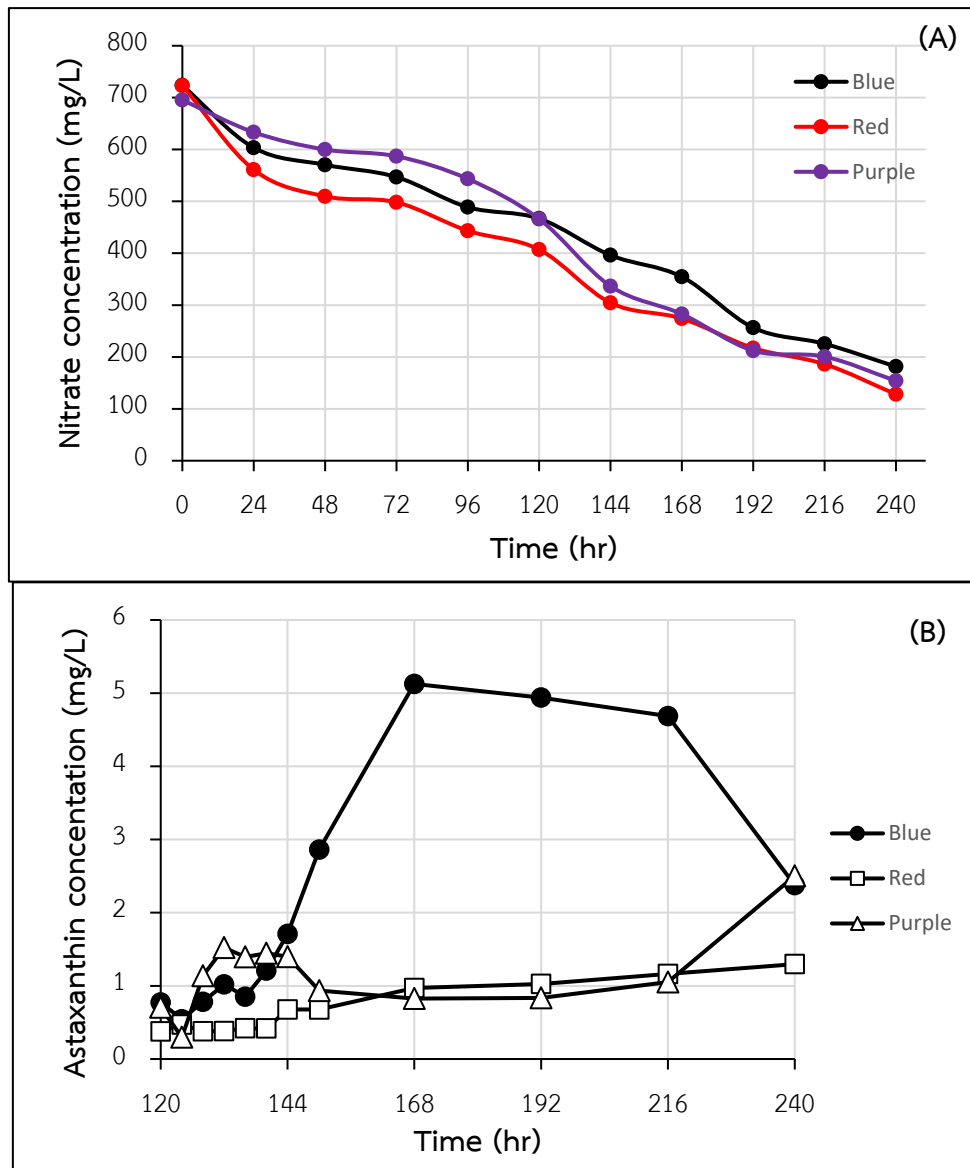


ภาพที่ 27 ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในสภาวะกระตุ่นด้วยแสงสีน้ำเงิน (A) สีแดง (B) และสีม่วง (C)



ภาพที่ 28 การเจริญเติบโตของเซลล์ตลอดระยะเวลาชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 240 หลังจากชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 คือสภาวะการกระตุ้นด้วยแสงสี โดย (A) Blue light; (B) Red light และ (C) Purple light





ภาพที่ 29 ความเข้มข้นไนเตรทที่ (A) และที่ความเข้มข้นแอสตาแซนทิน (B)

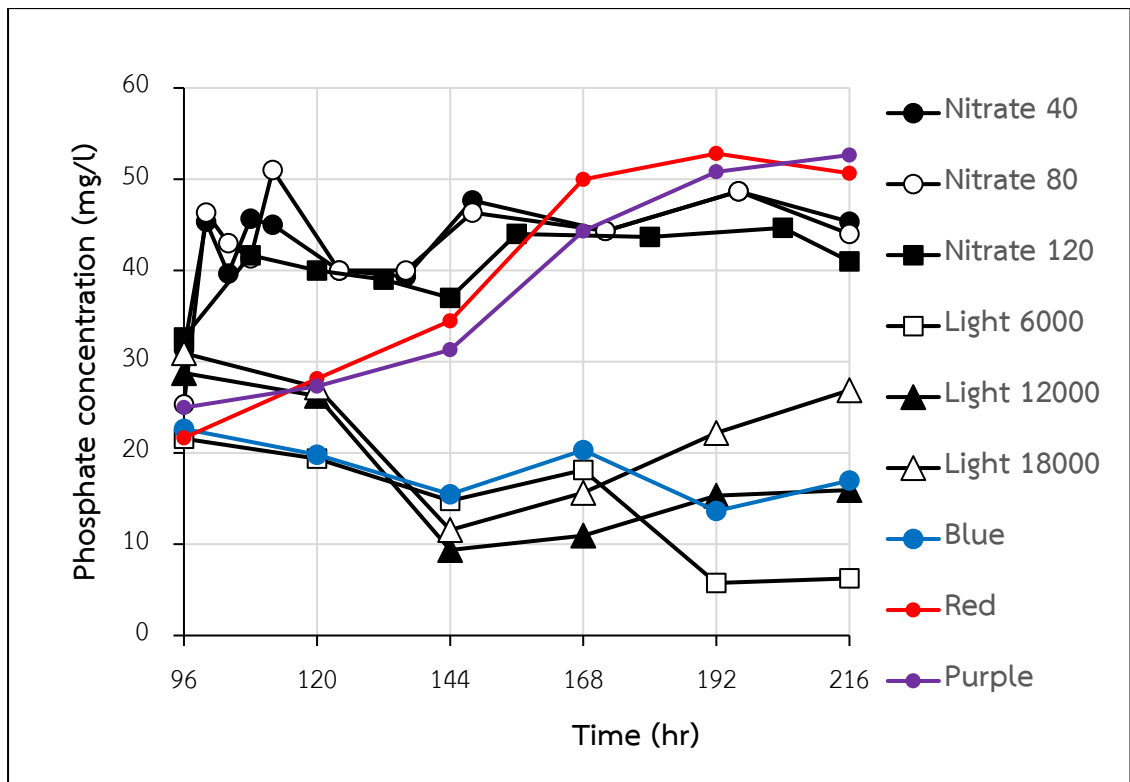
#### 4.5.2 การสะสมแอสตาแซนทินของเซลล์จุลสาหร่าย

ได้ทำการสกัดแอสตาแซนทินจากตัวอย่างที่เก็บวิเคราะห์จากในช่วงที่เซลล์จุลสาหร่ายได้รับการกระตุ้นและเซลล์จุลสาหร่ายเริ่มมีการสะสมแอสตาแซนทินจากสภาวะกระตุ้น โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรปั่นเหวี่ยงเอาส่วนใสออกและนำมาสกัดด้วยสารละลายอะซีโตนและวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินด้วยเครื่อง HPLC ในสภาวะกระตุ้นด้วยความเข้มข้นแสงสีน้ำเงิน แสงสีแดง และแสงสีม่วง ดังภาพที่ 27 หลังจากได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่ายในสภาวะกระตุ้นแล้ว การกระตุ้นด้วยแสงสีน้ำเงินเซลล์เริ่มมีการสะสมแอสตาแซนทินภายในเซลล์ก่อนแสงสีอื่นๆ แต่เมื่อ

สกัดวัดปริมาณแอสตาแซนธินในแต่ละแสงสี ดังภาพที่ 29 พบว่าที่แสงสีน้ำเงินมีปริมาณแอสตาแซนธินสูงสุด มากกว่าสภาวะกระตุ้นด้วยแสงสีแดง และสีม่วงโดยมีความเข้มข้นแอสตาแซนธินสูงสุดใน 48 ชั่วโมงหลังจากได้รับสภาวะกระตุ้นด้วยแสงสี โดยมีปริมาณแอสตาแซนที่ 5.12 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเทียบกลับลักษณะเซลล์สำหรับที่พบในการทดลองจะพบเป็นเซลล์สีแดงไม่เต็มวง แต่เซลล์มีจำนวนมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลักษณะของเซลล์มีผลต่อปริมาณแอสตาแซนธินที่สกัดได้ ในขณะที่แสงสีแดงและสีม่วง มีปริมาณแอสตาแซนธินที่สูงที่ 1.29 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากได้รับการกระตุ้น 5 วัน

#### 4.6 การศึกษาความเข้มฟอสเฟตต่อวงจรชีวิตของเซลล์สำหรับ

ธาตุฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นในการเจริญเติบโตของเซลล์ในทุกๆระยะการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับธาตุไนโตรเจน ซึ่งธาตุฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดนิวคลีอิก เอนไซม์ โคเอนไซม์ นิวคลีโอไทด์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ เช่น การสังเคราะห์แสง ธาตุฟอสฟอรัสมีลักษณะละลายน้ำได้ดีในค่าความเป็นกรด เมื่ออยู่ในสภาวะเบสจะจับกับธาตุอื่นๆ จับตัวเป็นสารแขวนลอยหรือตกตะกอน โดยธาตุฟอสฟอรัสที่พืชดูดซึมไปใช้งานได้มากที่สุด คือกลุ่มออร์โทฟอสเฟต (Orthophosphate) ได้แก่ โมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) และไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) (Aiori, Glick et al. 2017) ซึ่งจากภาพที่ 30 จะพบว่าความเข้มข้นฟอสเฟตมีความผันผวนตลอดเวลา เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบของโคเอนไซม์ (coenzyme) ในการสังเคราะห์แสง เช่น adenosine triphosphate (ATP) และ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งพลังงานซึ่งต้องนำส่งพลังงานที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชเพื่อไปใช้ตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ อีกทั้งใช้ในการสังเคราะห์ไขมัน และเป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ซึ่งจะเห็นได้ชัดจากผลกระทบของความเข้มแสงมีการใช้ฟอสเฟตที่สูงกว่าผลกระทบของไนโตรเจน เพราะด้วยความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้นอัตราสังเคราะห์แสงก็เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการส่งถ่ายพลังงานสูงไปด้วย จึงกล่าวได้ว่า ฟอสเฟตเป็นธาตุที่หมุนเวียนภายในเซลล์



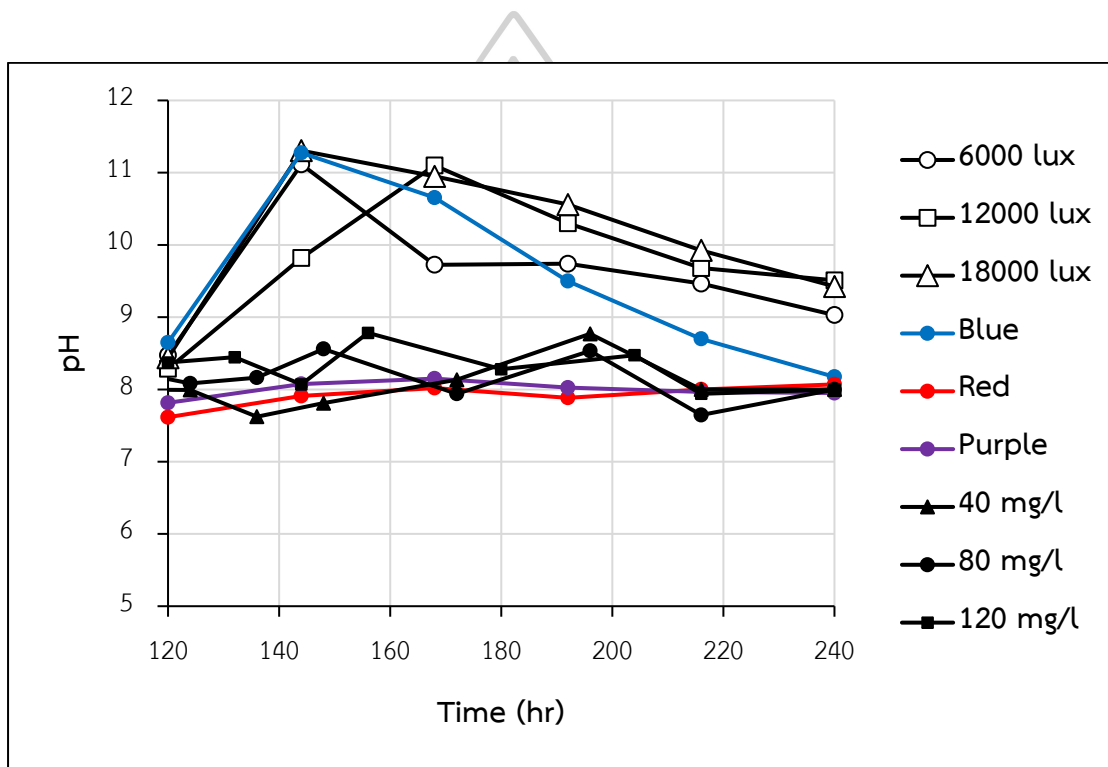
ภาพที่ 30 ความเข้มข้นฟอสเฟต (Phosphate concentration, mg/l) ในช่วงการกระตุ้น ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 ในสภาวะการกระตุ้น

จากการทดลองในการวิจัยนี้พบสภาวะกระตุ้นด้วยความเข้มข้นไนเตรทและคลื่นแสงสีแดง และสีม่วงเป็นสภาวะที่เร่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตหรือการแบ่งตัวของเซลล์จุลสาหร่ายในลักษณะ เซลล์เคลื่อนที่สีเขียวและเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว ซึ่งแสดงให้เห็นจากความเข้มข้นฟอสเฟตที่สูงขึ้น หลังจากได้รับสภาวะกระตุ้นดังกล่าวเนื่องมาจากมีการแบ่งเซลล์และการหมุนเวียนฟอสเฟตภายใน เซลล์เพื่อสร้างเซลล์และขนถ่ายพลังงานภายในเซลล์ที่สูงขึ้นตามจำนวนเซลล์ แต่ในขณะที่สภาวะ กระตุ้นด้วยแสงสีน้ำเงินและความเข้มแสงที่ส่งผลให้เซลล์สะสมแอสตาแซนธินจะมีการใช้ฟอสเฟตลด น้อยลงตามสภาวะความเครียดของเซลล์จุลสาหร่าย

#### 4.7 การศึกษาผลกระทบค่าความเป็นกรดต่างต่อวงจรชีวิตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*

อีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย คือ ค่าความเป็นกรดต่างของสภาวะ แวดล้อมการเพาะเลี้ยง โดยสาหร่ายหรือจุลสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีค่าความเป็นกรดต่างแตกต่างกันไป ค่าความเป็นกรดต่างในสภาวะการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเกิดขึ้นได้จากการแตกตัวของแหล่งคาร์บอนที่

ใช้ในการเพาะเลี้ยง นั่นคือ คาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) ซึ่งเมื่อละลายอยู่ในน้ำจะมีการแตกตัวซึ่งไอออนที่แตกตัวออกมา มีผลต่อความเป็นกรดต่างได้ คาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) จะแตกตัวในน้ำได้เป็น ไบ-คาร์บอเนต ( $\text{HCO}_3^-$ ) มีค่าความเป็นกลาง และคาร์บอเนต ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) มีความเป็นกรดสูง ซึ่งสาหร่ายไม่สามารถนำไปใช้ได้ และในการกิจกรรมสังเคราะห์แสงก็ส่งผลต่อความเป็นกรดต่างได้ ซึ่งในการทดลองดังภาพที่ 31 จะพบว่าในสภาวะกระตุ้นที่เซลล์มีอัตราการแบ่งตัวน้อย อัตราการใช้อาหารต่ำ จะมีค่าความเป็นกรดสูง ซึ่งตรงกันข้ามกับสภาวะกระตุ้นที่ส่งผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์สาหร่ายมีอัตราการใช้อาหารสูงในสภาวะการเพาะเลี้ยงจะมีค่าความเป็นกรด



ภาพที่ 31 ค่าความเป็นกรดต่างในช่วงการกระตุ้น ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 240 ในสภาวะการกระตุ้น

#### 4.8 การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์วงจรชีวิตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*

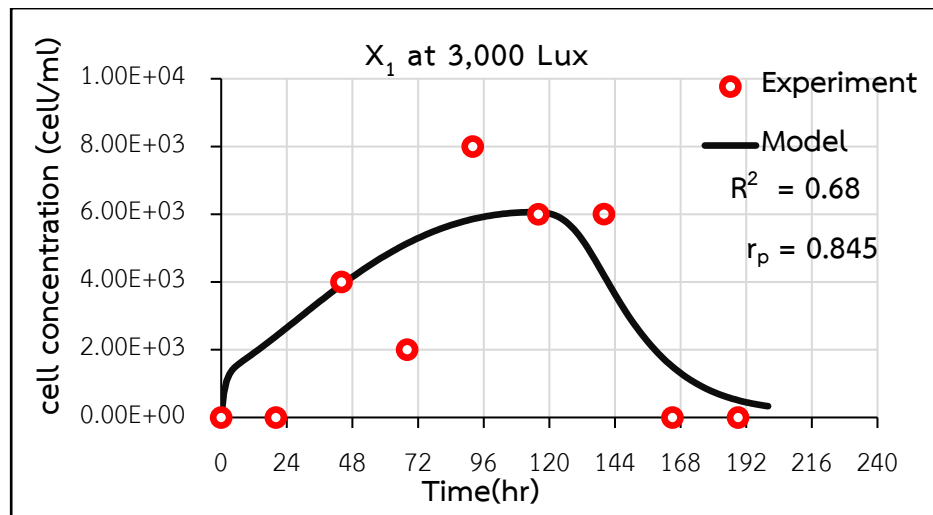
การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อต้องการหาค่าพารามิเตอร์หรือค่าคงที่ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการออกแบบหรือประเมินค่าระบบการเพาะเลี้ยงที่ขนาดใหญ่ขึ้น โดยยมนำผลการทดลองจากสเกลห้องปฏิบัติการมาเป็นข้อมูลในการสร้างและเพื่อให้แบบจำลองมีความแม่นยำและมีค่าความคลาดเคลื่อนระหว่างผลการทดลองกับแบบจำลองน้อย ค่า R-Square ที่คำนวณได้จะใช้เพื่อประเมินค่าความคลาดเคลื่อนระหว่างผลการทดลองกับแบบจำลอง พร้อมทั้งหาค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปร (Pearson Correlation:  $r_p$ ) ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กับผลการทดลองเพื่อดูแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงของทั้ง 2 ค่า เมื่อเทียบในเวลาเดียวกัน

ตารางที่ 6 ค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมของแบบจำลองกับผลการทดลอง

ค่าพารามิเตอร์	ค่าที่ได้	ค่าพารามิเตอร์	ค่าที่ได้
$\mu_{\max_1}$ (hr <sup>-1</sup> )	0.807	$K_{xN_3}$ (mg/L)	959.936
$\mu_{\max_2}$ (hr <sup>-1</sup> )	0.145	$K_{xN_{-1}}$ (mg/L)	906.664
$\mu_{\max_3}$ (hr <sup>-1</sup> )	0.00342	$K_{ixN_{-3}}$ (mg/L)	1095.565
$\mu_{\max_{-1}}$ (hr <sup>-1</sup> )	0.0324	$K_{xN_{x_1}}$ (mg/L)	847.340
$\mu_{\max_{-3}}$ (hr <sup>-1</sup> )	0.00126	$K_{xN_{x_2}}$ (mg/L)	886.071
$\mu_{\max_{x_1}}$ (hr <sup>-1</sup> )	0.00103	$K_{xN_{x_3}}$ (mg/L)	1597.166
$\mu_{\max_{x_2}}$ (hr <sup>-1</sup> )	0.0347	$K_{ixN_2}$ (mg/L)	1.006
$\mu_{\max_{x_3}}$ (hr <sup>-1</sup> )	0.000486	$z_1$ (m <sup>-1</sup> )	0.01752
$K_{x1_1}$ (μmol/m <sup>2</sup> s)	21.165	$z_2$ (cel/ml)	0.00655
$K_{x1_2}$ (μmol/m <sup>2</sup> s)	35.406	$\mu_p$ (hr <sup>-1</sup> )	$5.63 \times 10^{-6}$
$K_{x1_{-1}}$ (μmol/m <sup>2</sup> s)	36.588	$Y_{x1_N}$ (mg N /Cell)	2.356

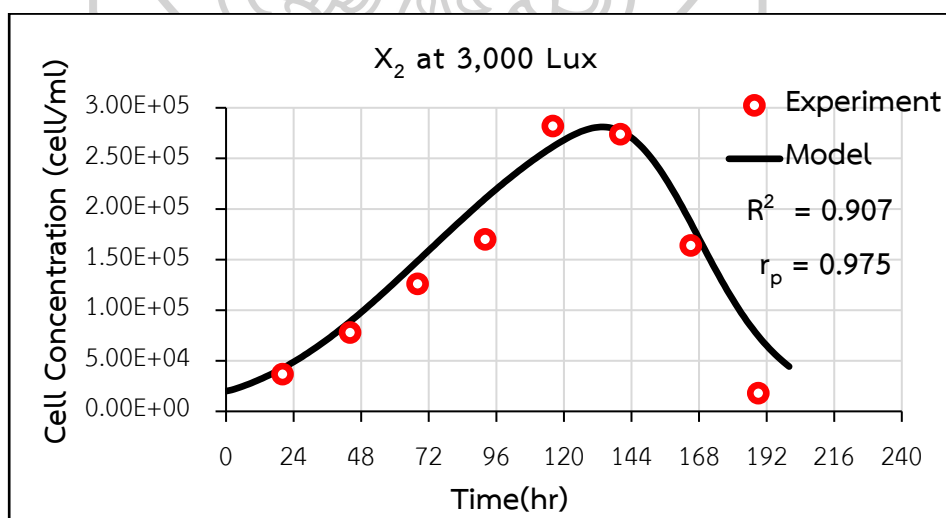
$K_{x1_3}$ ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	8.648	$\frac{Y_{x_2}}{N}$ (mg N /Cell)	437.010
$K_{x1_{x_1}}$ ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	11.033	$\frac{Y_{x_3}}{N}$ (mg N /Cell)	108.577
$K_{x1_{x_2}}$ ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	11.398	$K_{ixi}$ ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	185
$K_{ix1_1}$ ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	131.065	$\mu_{sx}$ (mg N/mg P)	101.859
$K_{ix1_3}$ ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	85.286	$k_{d_1}$ ( $\text{hr}^{-1}$ )	0.1133
$K_{ix1_{-1}}$ ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	34.943	$k_{d_2}$ ( $\text{hr}^{-1}$ )	0.000187
$K_{ix1_{x_1}}$ ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	33.982	$k_{d_3}$ ( $\text{hr}^{-1}$ )	0.00814
$K_{ix1_{x_2}}$ ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	113.25	$N_{\min}$ (mg/L)	575
$K_{ix1_{x_3}}$ ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	21.903	$\text{cell}_{x_2}$	14.433
$K_{xN_1}$ (mg/L)	154.581	$\text{cell}_{x_3}$	12.201
n ของ $k_2$	3.6	$\text{cell}_{\text{budding}x_2}$	18.5963
n ของ $k_3$	2.4	$\text{cell}_{\text{budding}x_3}$	13.810
n ของ $k_3$	1.96	L (m)	0.25

ผลเปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองกับแบบจำลองของความเข้มข้นเซลล์  $X_1$  ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และความเข้มไนเตรท 750 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 32 พบว่ามีค่า  $R^2$  อยู่ที่ 0.68 และค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปรเชิงเส้นตรง (Pearson Correlation:  $r_p$ ) ของผลการทดลองกับแบบจำลองมีค่าความสัมพันธ์อยู่ที่ 0.845 แสดงให้เห็นว่าผลของการทดลองกับแบบจำลองเซลล์สีเขียวเคลื่อนที่มีค่าความคลาดเคลื่อนระดับหนึ่งเนื่องด้วยผลการทดลองที่ค่อนข้างผันผวนเพราะเป็นระยะเซลล์ที่ทำการเพิ่มลดจำนวนได้ตลอดเวลา และค่าทั้งสองของผลการทดลองและแบบจำลองมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันเมื่อเทียบต่อเวลา



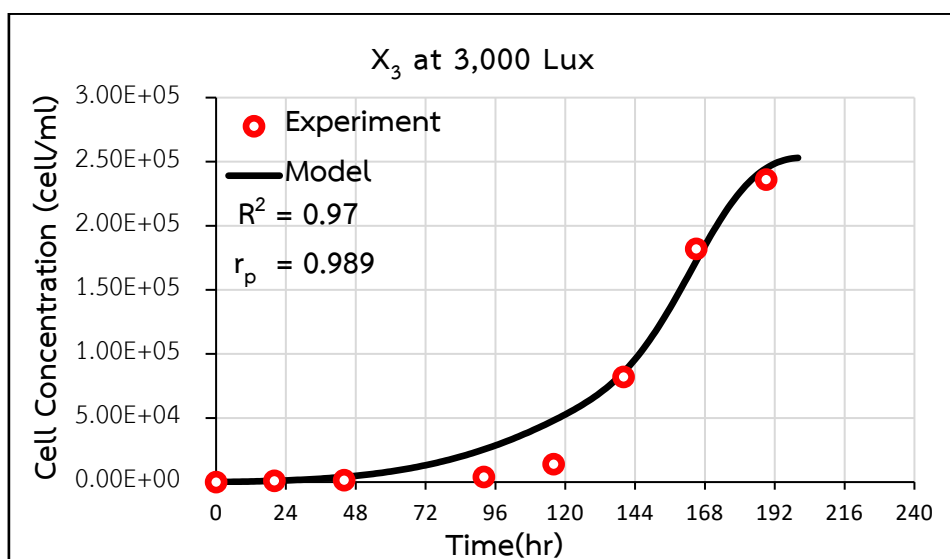
ภาพที่ 32 กราฟแสดงผลการทดลอง(วงกลม) กับแบบจำลอง(เส้น) ของเซลล์ X<sub>1</sub> ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

ผลเปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองกับแบบจำลองของความเข้มข้นเซลล์ X<sub>2</sub> ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และความเข้มไนเตรท 750 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 33 พบว่ามีค่า R<sup>2</sup> อยู่ที่ 0.68 และค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปรเชิงเส้นตรง (Pearson Correlation: r<sub>p</sub>) ของผลการทดลองกับแบบจำลองมีค่าความสัมพันธ์อยู่ที่ 0.907 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลของการทดลองกับแบบจำลองของเซลล์สีเขียวไม่เคลื่อนที่ที่แสดงในภาพที่ 33 ได้ค่าทั้งสองของแบบจำลองกับผลการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกันเมื่อเทียบต่อเวลา



ภาพที่ 33 กราฟแสดงผลการทดลอง(วงกลม) กับแบบจำลอง(เส้น) ของเซลล์ X<sub>2</sub> ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

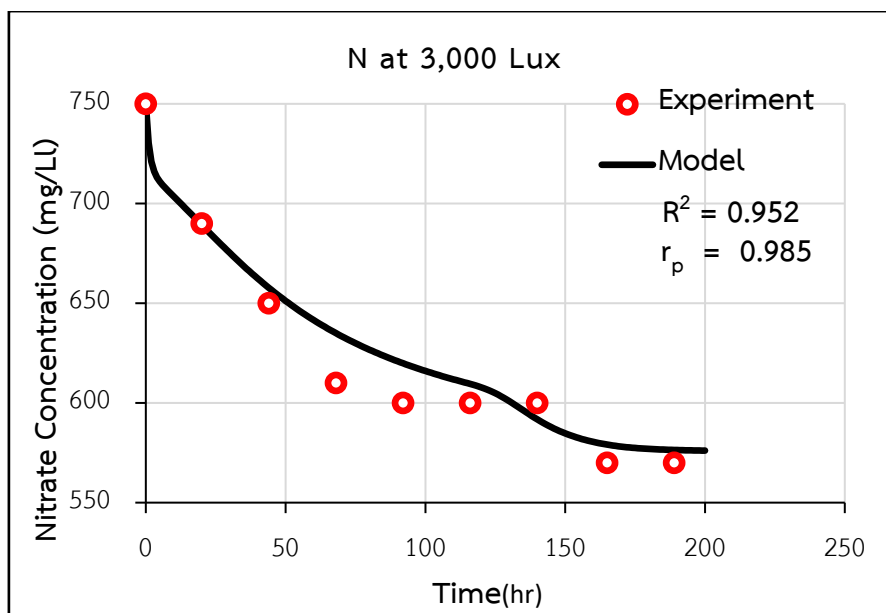
ผลเปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองกับแบบจำลองของความเข้มข้นเซลล์  $X_3$  ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และความเข้มข้นไนเตรท 750 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 34 พบว่ามีค่า  $R^2$  อยู่ที่ 0.97 และค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปรเชิงเส้นตรง (Pearson Correlation:  $r_p$ ) ของผลการทดลองกับแบบจำลองมีค่าความสัมพันธ์อยู่ที่ 0.97 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลของการทดลองกับแบบจำลองของเซลล์สีแดงไม่เคลื่อนที่ มีความคลาดเคลื่อนน้อย และค่าทั้งสองของแบบจำลองกับผลการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกันเมื่อเทียบต่อเวลา



ภาพที่ 34 กราฟแสดงผลการทดลอง(วงกลม) กับแบบจำลอง(เส้น) ของเซลล์  $X_3$  ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

ผลเปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองกับแบบจำลองของความเข้มข้นไนเตรทเริ่มต้น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มแสง 3,000 ดังแสดงในภาพที่ 35 พบว่ามีค่า  $R^2$  อยู่ที่ 0.952 และค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปรเชิงเส้นตรง (Pearson Correlation:  $r_p$ ) ของผลการทดลองกับแบบจำลองมีค่าความสัมพันธ์อยู่ที่ 0.985 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลของการทดลองกับแบบจำลองของการบริโภคไนเตรทที่มีความคลาดเคลื่อนที่ต่ำมีความแม่นยำ และทั้งสองของแบบจำลองกับผลการทดลองมีแนวโน้มการลดลงของไนเตรทไปในทิศทางเดียวกันเมื่อเทียบต่อเวลา





ภาพที่ 35 กราฟแสดงผลการทดลอง (วงกลม) กับแบบจำลอง (เส้น) ของความเข้มข้นไนเตรทที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

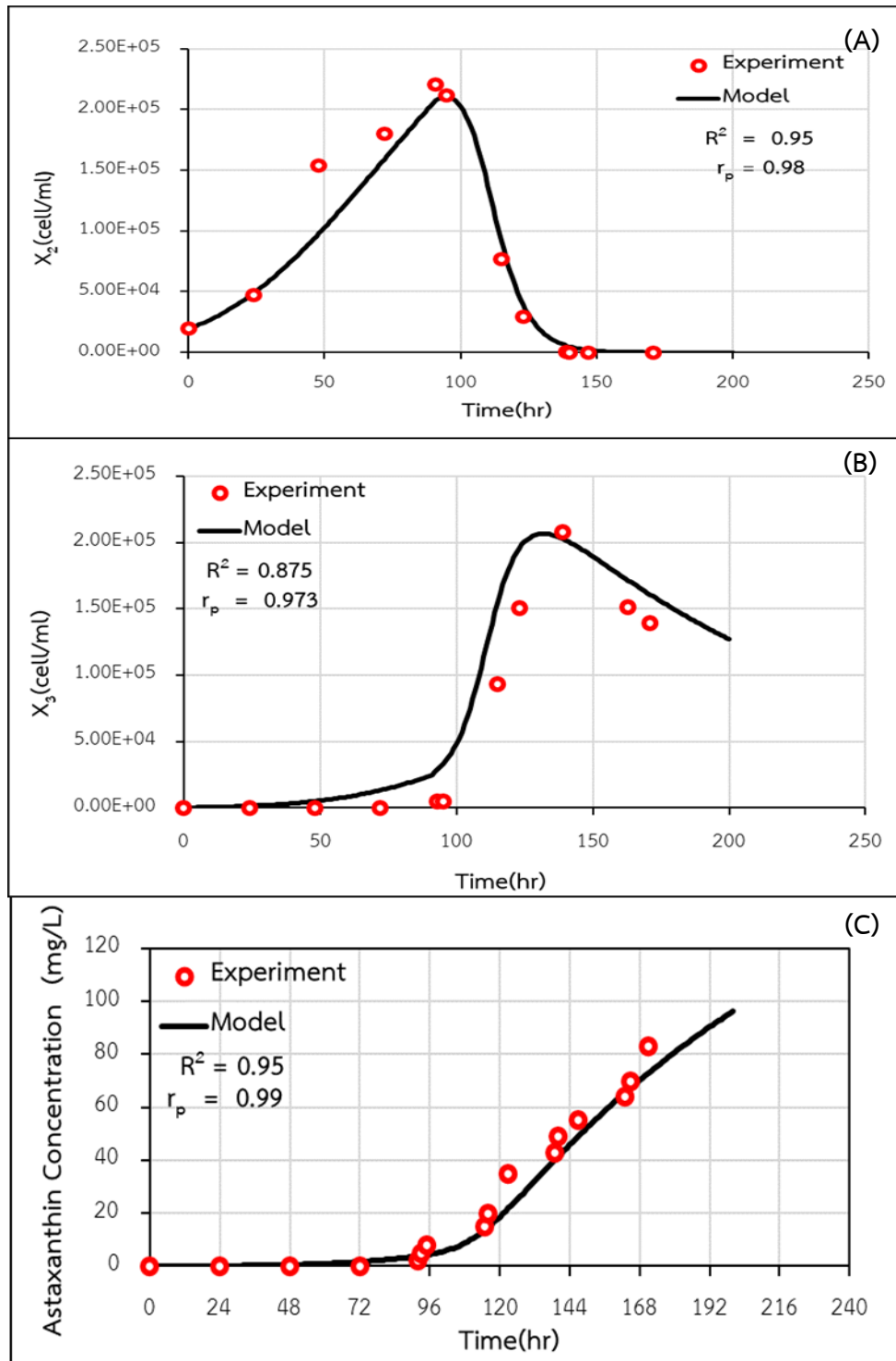
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นของการเจริญเติบโตเซลล์  $X_1$ ,  $X_2$  และ  $X_3$  ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ให้ความเข้มข้นไนเตรท 750 มิลลิกรัมต่อลิตร กับการเจริญเติบโตได้ค่าความคลาดเคลื่อนระหว่างผลการทดลองกับแบบจำลองมีค่าน้อยมีความแม่นยำในการทำนายผล และผลการทดลองกับแบบจำลองนั้นแสดงให้เห็นถึงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สันเพื่ออธิบายการเปลี่ยนแปลงข้อมูลระหว่างผลการทดลองกับแบบจำลอง พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกันเมื่อเทียบต่อเวลา รวมทั้งแบบจำลองของการบริโภคไนเตรทนั้นมีความคลาดเคลื่อนต่ำ มีความสอดคล้องกับผลการทดลองและมีความสอดคล้องเชิงเส้นตรงเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกันเมื่อเทียบต่อเวลา

#### 4.8.1 การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของผลกระทบจากการเปลี่ยนแสง

พบว่ามีการใช้ความเข้มแสงที่สูงขึ้นในการสร้างสภาวะกระตุ้นให้แก่เซลล์และเพิ่มผลผลิตแอสตาแซนธิน โดยเพิ่มความเข้มแสงจาก 3,000 เป็น 6,000 ลักซ์ ซึ่งจากการทดลองดังรูป 36A ความเข้มข้นของเซลล์  $X_2$  ลดลงแทบจะทันทีที่มีการเพิ่มความเข้มแสง ในขณะเดียวกัน ความเข้มข้นของเซลล์  $X_3$  และความเข้มข้นของแอสตาแซนธินเพิ่มขึ้นสอดคล้องกันกับการลดลงของความเข้มข้นของเซลล์  $X_2$  โดยเซลล์  $X_2$  สูงสุดที่ได้ ประมาณ  $220,000 \text{ cell.mL}^{-1}$  ที่ 96 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 36A) ในขณะที่ ปริมาณของเซลล์  $X_3$  สูงสุดที่ได้ ประมาณ  $210,000 \text{ cell.mL}^{-1}$  ที่ 148 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 65B) อาจจะบ่งชี้ได้ว่า เมื่อให้ความเข้มแสงสูงขึ้นที่ 96 ชั่วโมง

ของการเพาะเลี้ยง เซลล์  $X_2$  เปลี่ยนเป็นเซลล์  $X_3$  ภายใน 48-60 ชั่วโมง และมีการหายไปของเซลล์จากการตายประมาณ 10,000 เซลล์ ซึ่งน้อยกว่าในกรณีที่ไม่มีการเพิ่มความเข้มข้น และแม้ว่ามีความเข้มข้นของเซลล์  $X_3$  น้อยกว่า แต่เมื่อวัดความเข้มข้นของแอสตาแซนธินที่ประมาณ 170 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง กลับได้ความเข้มข้นของแอสตาแซนธินที่ ประมาณ  $82 \text{ mg.L}^{-1}$  ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเพิ่มความเข้มข้นเกือบ 2 เท่า





ภาพที่ 36 ผลการทดลอง (วงกลม) และผลของแบบจำลอง (เส้น) ของความเข้มข้นของเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในหน่วย  $\text{cell.mL}^{-1}$  (A) เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียวหรือ  $X_2$ ; และ (B) เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดงหรือ  $X_3$ ; และ (C) ความเข้มข้นของสารแอสตาแซนธินในหน่วย  $\text{mg.L}^{-1}$  ในระบบการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงคงที่ที่ 3,000 ลักซ์ จนถึง 96 ชั่วโมงจากนั้นความเข้มแสงคงที่ที่ 6,000 ลักซ์

ความเข้าใจของวงจรชีวิตของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* จากผลการทดลองในส่วนนี้จะนำไปสร้างแบบจำลองและทำการประมาณค่าพารามิเตอร์และสอบเทียบกับผลการทดลองด้วยโปรแกรม COPASI ต่อไป

ผลจากแบบจำลองการเพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสงที่ความเข้มแสงคงที่ เท่ากับ 3,000 ลักซ์ ดังที่อภิปรายข้างต้น แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองสามารถทำซ้ำข้อมูลผลการทดลองในสภาวะการเพาะเลี้ยงนี้ได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้เนื่องจากการออกแบบแบบจำลองและสมการทางคณิตศาสตร์ที่ใช้รวมไปถึงการทำการประเมินค่าคงที่หรือค่าพารามิเตอร์ทั้ง 48 ค่า ดังตารางที่ 7 อ้างอิงจากผลการทดลองในสภาวะดังกล่าว จึงไม่น่าแปลกใจที่ผลจากแบบจำลองสามารถอธิบายผลการทดลองได้ดี เมื่อนำแบบจำลองที่ได้นี้ไปทดสอบความสามารถในการทำนายกับการเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะ โดยเป็นการเปลี่ยนความเข้มแสงที่ให้จาก 3,000 ไปเป็น 6,000 ลักซ์ ที่เวลา 91 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ในแบบจำลองเท่าเดิมกับกรณีข้างต้น พบว่าแบบจำลองสามารถที่จะทำนายค่าความเข้มข้นของเซลล์  $X_2$  และ  $X_3$  และความเข้มข้นของแอสตาแซนธินได้ดี โดยผลจากแบบจำลองความเข้มข้นของเซลล์  $X_2$  มีค่า  $R^2$  และ  $r_p$  เท่ากับ 0.950 และ 0.980 ตามลำดับ (ภาพที่ 35A) ซึ่งแบบจำลองสามารถเลียนแบบการลดลงของเซลล์  $X_2$  เมื่อมีการเพิ่มความเข้มของแสงที่เวลา 91 ชั่วโมงได้ ในขณะที่เดียวกันแบบจำลองยังสามารถอธิบายการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นเซลล์  $X_3$  หลังจากการเพิ่มความเข้มของแสง และยังอธิบายการหายไปของเซลล์  $X_3$  หลังชั่วโมงที่ 148 ของการเพาะเลี้ยงได้ โดยมีค่า  $R^2$  และ  $r_p$  เท่ากับ 0.875 และ 0.973 ตามลำดับ (ภาพที่ 35C) เช่นเดียวกันแบบจำลองสามารถทำซ้ำผลของความเข้มข้นแอสตาแซนธินได้อย่างดีและสอดคล้องกับค่า  $R^2$  และ  $r_p$  ที่มีค่าสูงและเข้าใกล้ 1 (0.950 และ 0.990 ตามลำดับ) ดังแสดงในภาพที่ 35B อย่างไรก็ตามแบบจำลองยังไม่สามารถทำนายค่าความเข้มข้นของเซลล์  $X_1$  และความเข้มข้นของไนเตรท (ไม่แสดงผล) ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากธรรมชาติของชนิดเซลล์  $X_1$  เองที่มีการเคลื่อนที่เปลี่ยนแปลงตลอดเวลาและตัวแบบจำลองยังไม่มีกรออกแบบให้มีสมการที่อธิบายผลของความเข้มแสงต่อการบริโภคไนเตรทอย่างเหมาะสม

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

เมื่อดูการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่ายจะพบว่าเซลล์จุลสาหร่ายจะมีระยะการเจริญเติบโตอยู่ 2 ระยะ คือ ระยะเซลล์สีเขียว ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มชีวมวลของเซลล์ และระยะเซลล์สีแดง ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการสะสมแอสตาแซนธินภายในเซลล์ แต่เมื่อได้ส่องกล้องจุลทรรศน์ดูลักษณะของเซลล์จุลสาหร่าย จะพบว่าเซลล์จุลสาหร่ายมีระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ 4 แบบ คือ เซลล์เคลื่อนสีเขียว เซลล์เคลื่อนที่สีแดง เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว และเซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดงซึ่งในแต่ละรูปแบบเซลล์จุลสาหร่ายจะบ่งบอกถึงสภาวะของการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย

ในการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ความเข้มข้นไนเตรทต่ำ ซึ่งเป็นธาตุไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญในการสร้างโปรตีนหรือกรดอะมิโนภายในเซลล์จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์โดยตรง และยังส่งผลต่อปริมาณแอสตาแซนธินได้ ซึ่งการกระตุ้นด้วยความเข้มข้นไนเตรทสูงจะได้ชีวมวลที่สูงและได้ปริมาณแอสตาแซนธินมากขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นมากเกินไปจะเกิด Nitrate inhibition จะยับยั้งการเจริญเติบโตในที่สุด (Zhang, Zhou et al. 2018)

ส่วนของความเข้มแสงเมื่อเพาะเลี้ยงในความเข้มแสงต่ำที่เหมาะสมจะช่วยทำให้เซลล์เจริญเติบโตและเพิ่มชีวมวลของเซลล์ได้ ในขณะที่เพาะเลี้ยงด้วยไฟสีแดงช่วยเพิ่มระยะการแบ่งตัวของเซลล์สาหร่าย แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยความเข้มสูงหรือแสงสีน้ำเงินที่มีความเข้มแสงสูงจะช่วยกระตุ้นการสะสมแอสตาแซนธินและมีปริมาณแอสตาแซนธินที่สูงกว่าสภาวะการตั้งแบบอื่นๆ ในปริมาณการเก็บตัวอย่างที่เท่ากันและเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเซลล์สีแดงที่มีการสะสมแอสตาแซนธินภายในเซลล์เต็มเซลล์แล้ว เนื่องจากเซลล์มีขนาดใหญ่กว่า (Xi, Kim et al. 2016) ดังนั้นการกระตุ้นด้วยแสงได้ปริมาณแอสตาแซนธินที่มากกว่าการกระตุ้นด้วยความเข้มข้นไนเตรทถึง 5 เท่า (Zhang, Zhou et al. 2018)

งานวิจัยนี้ได้นำข้อมูลมาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ โดยแบบจำลองดังกล่าวมีพื้นฐานมาจากสมการมวลสารของวงจรชีวิตของจุลสาหร่ายและสมการจลนพลศาสตร์ของ Monod equation, Haldane equation และ Hill equation เพื่ออธิบายการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในวงจรชีวิตจากการใช้ในเตรท โดยการ

ประเมินความแม่นยำของแบบจำลองดังกล่าวทำได้โดยสอบเทียบผลที่ได้จากแบบจำลองกับผลการทดลองแบบจำลองที่ได้สามารถทำนายการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของเซลล์เคลื่อนที่ เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีเขียว เซลล์ไม่เคลื่อนที่สีแดงในวงจรชีวิตและการสะสมแอสตาแซนธินทั้ง 2 ระยะเซลล์ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งประเมินจากค่า  $R^2$  กับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน ( $r_p$ ) รวมทั้งแบบจำลองยังสามารถทำนายผลการบริโภคนิเตรตจากแบบจำลองได้อย่างถูกต้องด้วยเช่นกัน โดยสรุปแล้วแบบจำลองสามารถนำไปพัฒนาต่อในแง่ของการทำนายการเพาะเลี้ยงเพื่อสภาวะกระตุ้นอื่นๆและนำไปใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นก่อนทำการทดลองหรือการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

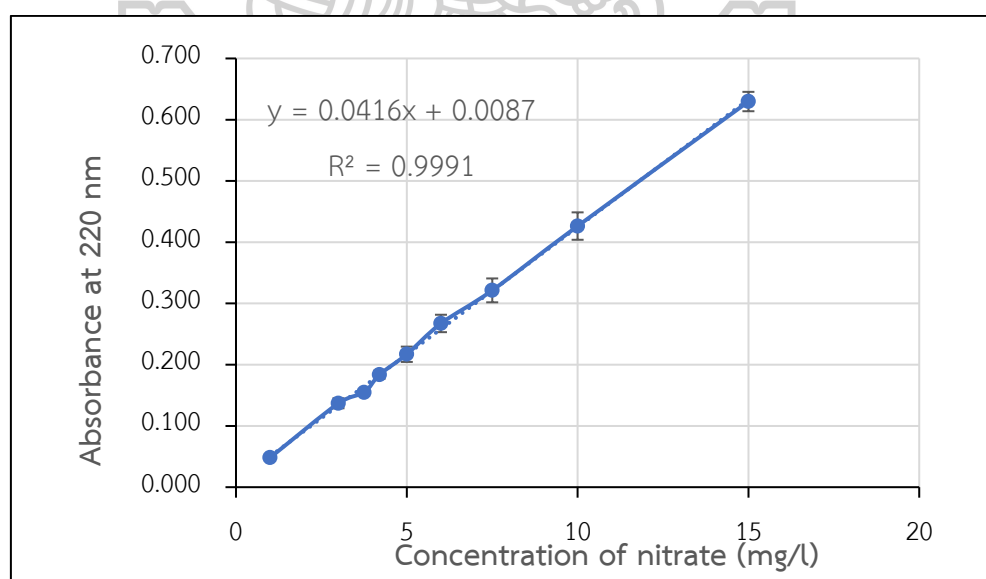


## ภาคผนวก

- การวิเคราะห์ไนเตรท

ตารางที่ 7 ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของความเข้มข้นไนเตรดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Armstrong

Concentration of nitrate (mg/l)	absorbance				SD
	1	2	3	Average	
1	0.05	0.049	0.046	0.048	0.002082
3	0.128	0.139	0.144	0.137	0.008185
3.75	0.156	0.149	0.159	0.155	0.005132
4.2	0.189	0.176	0.186	0.184	0.006807
5	0.221	0.203	0.227	0.217	0.01249
6	0.277	0.274	0.251	0.267	0.014224
7.5	0.341	0.302	0.321	0.321	0.019502
10	0.452	0.416	0.411	0.426	0.022368
15	0.647	0.616	0.626	0.630	0.015822

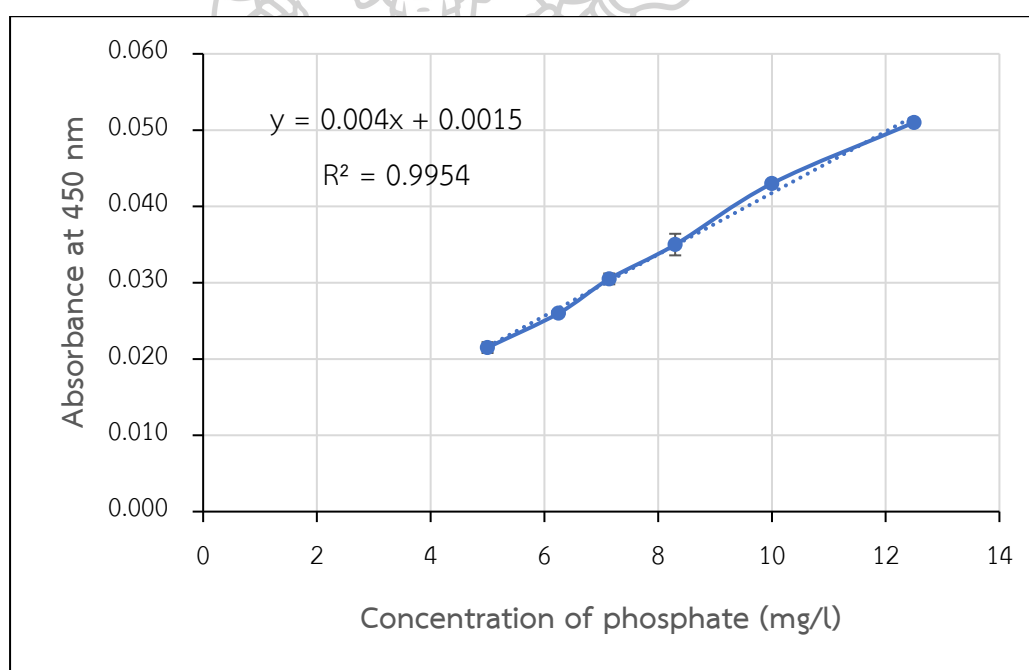


ภาพที่ 37 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นไนเตรดและค่าการดูดกลืนแสงที่ 220 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer

- การวิเคราะห์ฟอสเฟต

ตารางที่ 8 ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของความเข้มข้นฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Vanadate-molybdate

Concentration of phosphate (mg/l)	absorbance			SD
	1	2	Average	
5	0.021	0.022	0.022	0.00071
6.25	0.026	0.026	0.026	0.00000
7.14	0.031	0.030	0.031	0.00071
8.3	0.034	0.036	0.035	0.00141
10	0.043	0.043	0.043	0.00000
12.5	0.051	0.051	0.051	0.00000



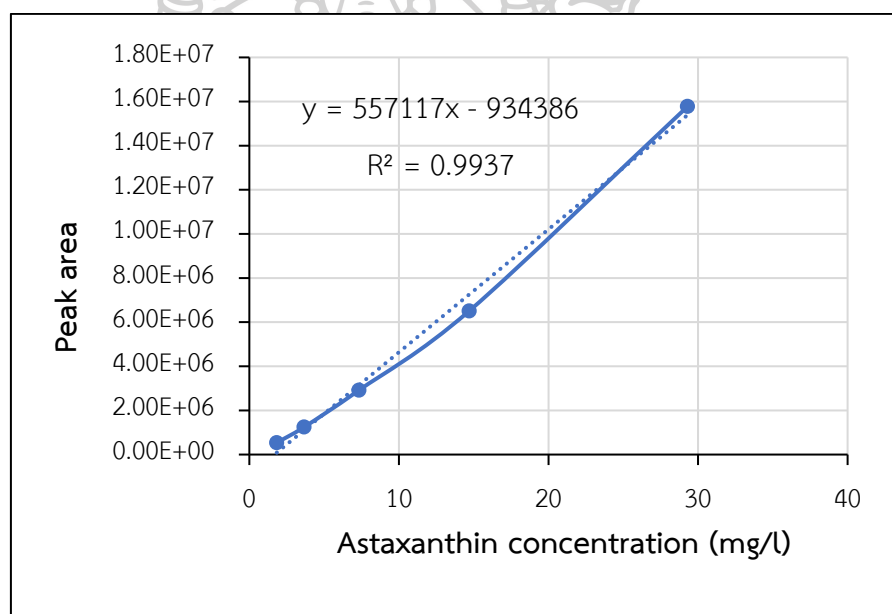
ภาพที่ 38 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นฟอสเฟตและค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer



- การวิเคราะห์แอสตาแซนธิน

ตารางที่ 9 ข้อมูลค่าพื้นที่ใต้กราฟของแอสตาแซนธินที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

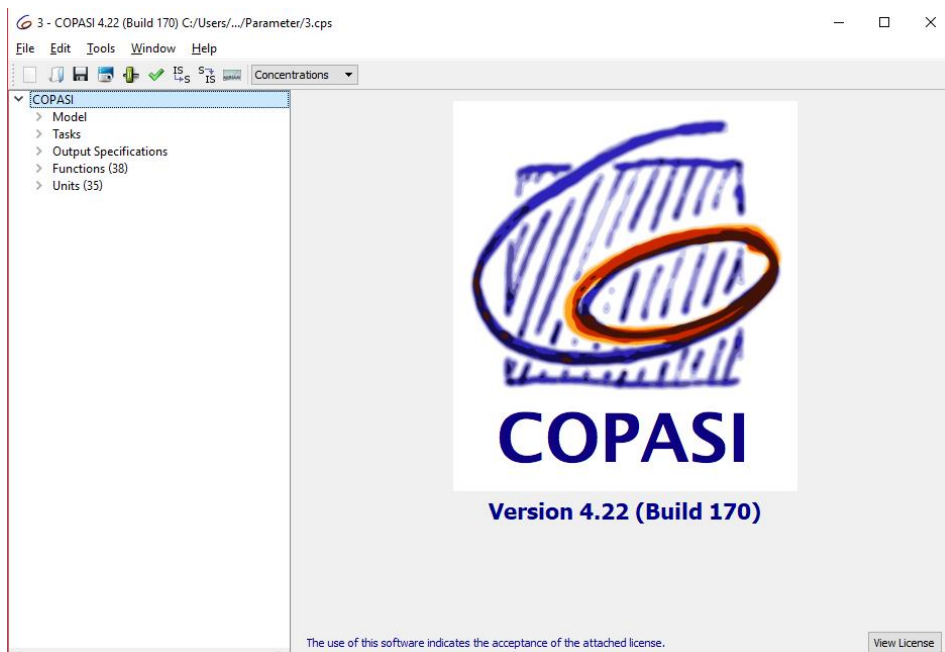
Astaxanthin concentration (mg/l)	Peak area			SD
	1	2	avg	
1.83	546134	1092266	1638398.34	2184530.51
3.66	1246881	2493758	3740635.68	4987513.02
7.33	2913544	5827081	8740617.34	11654154.01
14.7	6493061	6525164	6509112.5	22700.25
29.3	15811524	15740714	15776119	50070.23



ภาพที่ 39 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นแอสตาแซนธินและพื้นที่ใต้กราฟ โดยวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

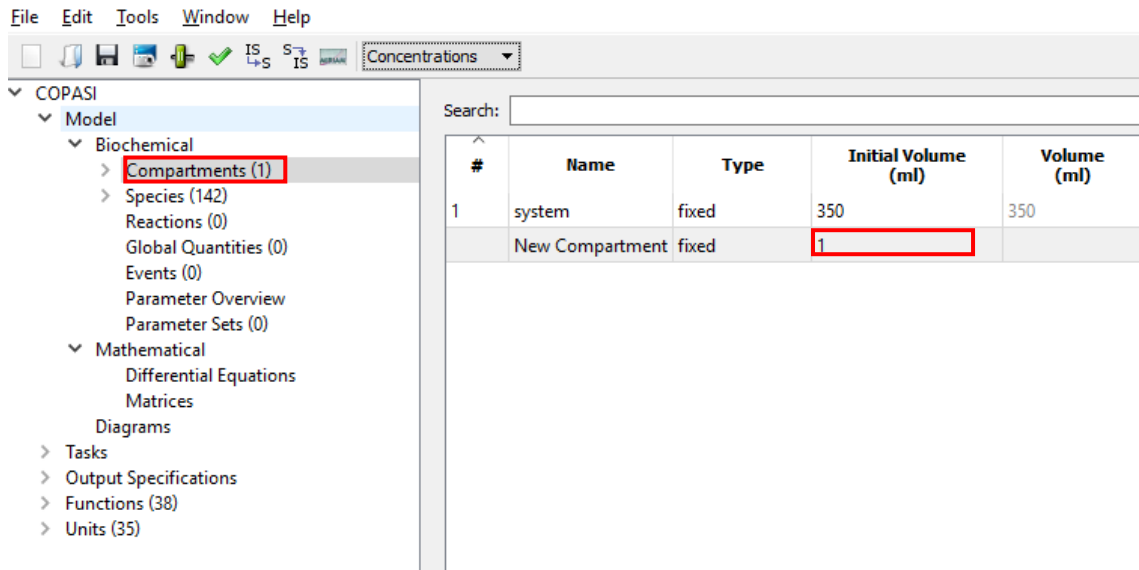
- วิธีสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์บนโปรแกรม Copasi

การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์บนโปรแกรม Copasi เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตในสภาวะที่เหมาะสมและสภาวะที่ไม่เหมาะสม แล้วนำไปใช้ในการทำนายการเจริญเติบโตและการสะสมแอสต้าแซนธินให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นในสภาวะที่เหมาะสม



ภาพที่ 40 โปรแกรม Copasi

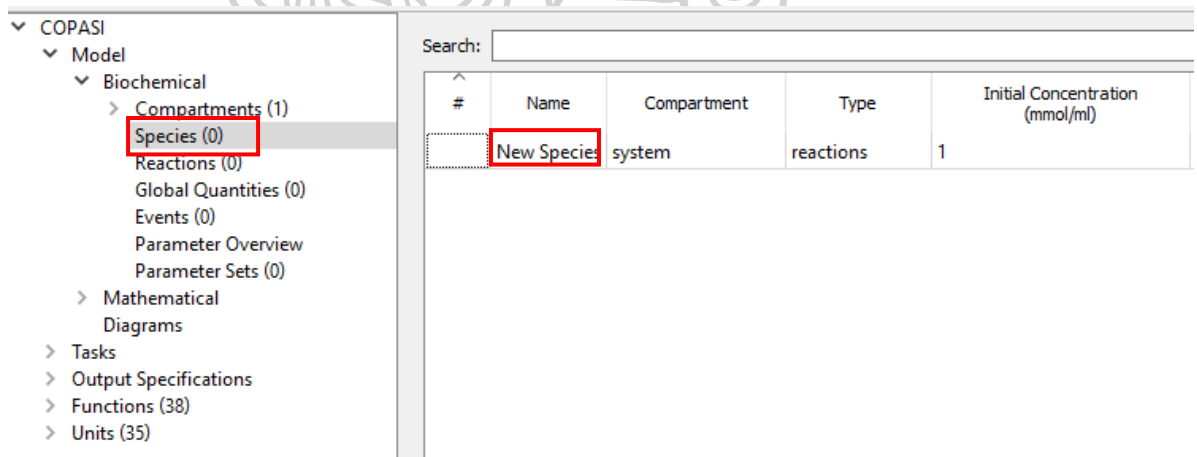
- การสร้าง Compartment
  - การสร้าง Compartment เป็นการสร้างเพื่อแสดงให้เห็นถึงปริมาณของระบบ โดยให้ปริมาตรเริ่มต้นอยู่ที่ 350 ml



ภาพที่ 41 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการสร้าง Compartments

- การสร้างตัวแปร

- เข้าไปในหัวข้อ species เพื่อทำการสร้างตัวแปรที่ใช้



ภาพที่ 42 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการสร้างตัวแปร

- กำหนดชื่อตัวแปร ประเภทของตัวแปร และค่าเริ่มต้น

#	Name	Compartment	Type	Initial Concentration (mmol/ml)
1	k1	system	assignment	nan
2	X1	system	ode	1
3	Umax1	system	fixed	1
	New Species	system	reactions	1

ภาพที่ 43 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการกำหนดชื่อตัวแปร ประเภทของตัวแปร และค่าเริ่มต้น

- ระบุชนิด Simulation type และค่า Initial Concentration โดย Simulation type มีทั้งหมด 4 ชนิด ประกอบด้วย 1) reaction, 2) fixed, 3) assignment และ 4) ode สำหรับ Umax1 จะจัดอยู่ในประเภทค่า fixed (ค่าคงที่) ค่า  $X_1$  เป็นสมการเชิงอนุพันธ์ต่อเวลา และ  $k_1$  เป็นค่าที่ได้จากการนำตัวแปรต่างๆมาทำเป็นสมการจลนพลศาสตร์

**Species** Umax1

Details Notes Annotation RDF Browser

Compartment: system

Simulation Type: fixed

Initial Concentration (mmol/ml): 0.03516054868  Initial Expression

Concentration (mmol/ml): 0.03516054868

Rate (mmol/(ml\*s)): 0

Transition Time (s): nan

Involved in 0 Reactions

ภาพที่ 44 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการระบุชนิด Simulation type และค่า Initial Concentration

**Species** X1

Details Notes Annotation RDF Browser

Compartment system

Simulation Type ode

Expression (mmol/(ml\*s))

$$-([k1] \cdot [X1] + [cell] \cdot [k11] \cdot [X2] + [cell] \cdot [k3] \cdot [X3] - [k33] \cdot [X1] + [K_{xx1}] \cdot [X1] - [kd1] \cdot [X1])$$

Initial Concentration (mmol/ml) 1  Initial Expression

**Species** k1

Details Notes Annotation RDF Browser

Compartment system

Simulation Type assignment

Expression (mmol/ml)

$$[Umax1] \cdot \frac{[I_{30006000}]}{[I_{30006000}] + [Kx11]} \cdot \frac{[N]}{[N] + [Kx1]}$$

Initial Concentration (mmol/ml)  Initial Expression

ภาพที่ 45 นำตัวแปรต่าง ๆ มาเขียนเป็นสมการจลนพลศาสตร์

- การใส่ข้อมูล Simulation type ในหัวข้อ assignment และ ODE โดย  
ต้องทำการคลิกสัญลักษณ์ Copasi จะปรากฏหน้าต่าง Select item

▼ COPASI

- ▼ Model
  - ▼ Biochemical
    - > Compartments (1)
    - ▼ Species (3)
      - k1
      - Umax1
      - X1
    - Reactions (0)
    - Global Quantities (0)
    - Events (0)
    - Parameter Overview
    - Parameter Sets (0)
  - > Mathematical Diagrams
  - > Tasks
  - > Output Specifications
  - > Functions (38)
  - > Units (35)

**Species** k1

Details Notes Annotation RDF Browser

Compartment system

Simulation Type assignment

Expression (mmol/ml)

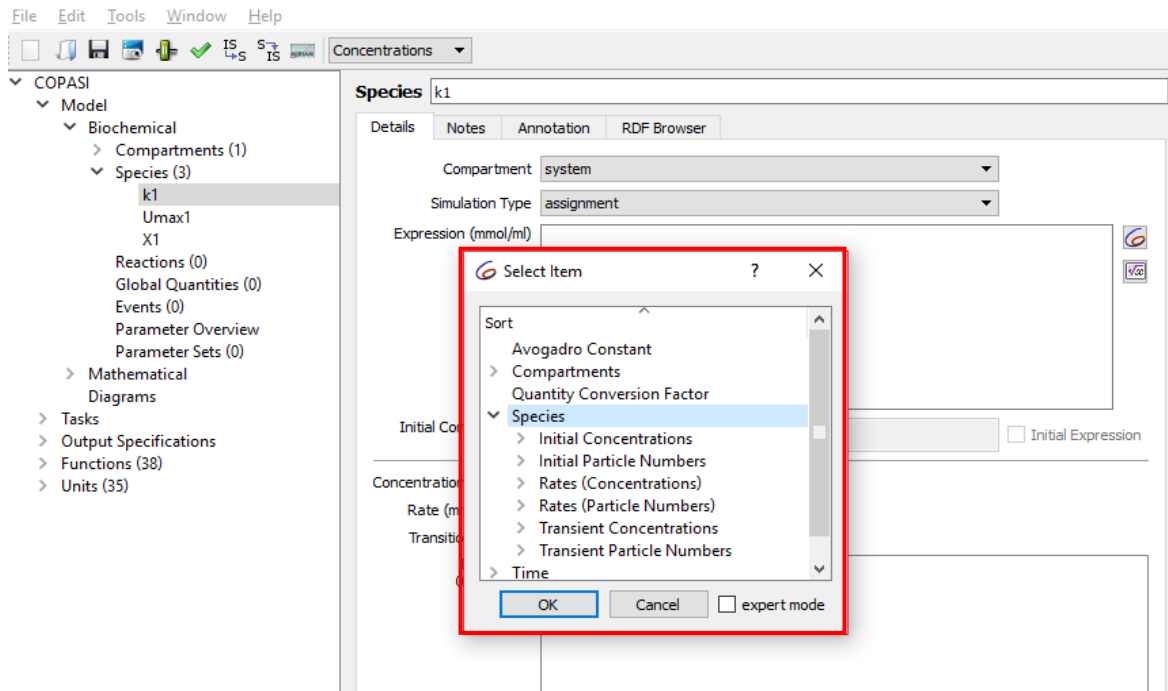
Initial Concentration (mmol/ml) nan  Initial Expression

Concentration (mmol/ml) nan

Rate (mmol/(ml\*s)) nan

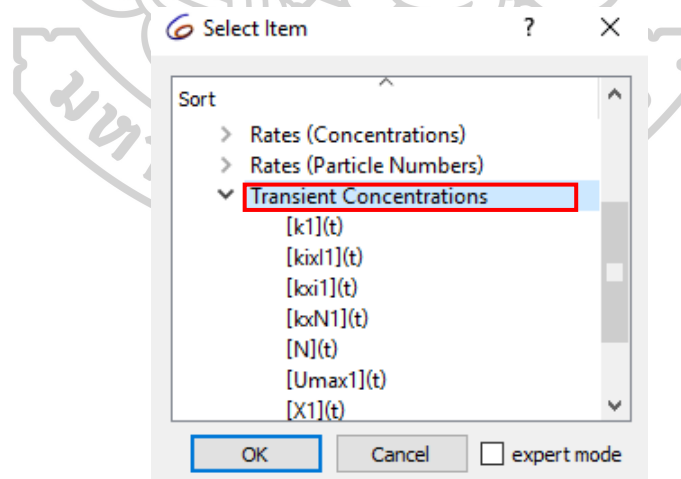
Transition Time (s) nan

ภาพที่ 46 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการใส่ข้อมูล Simulation type



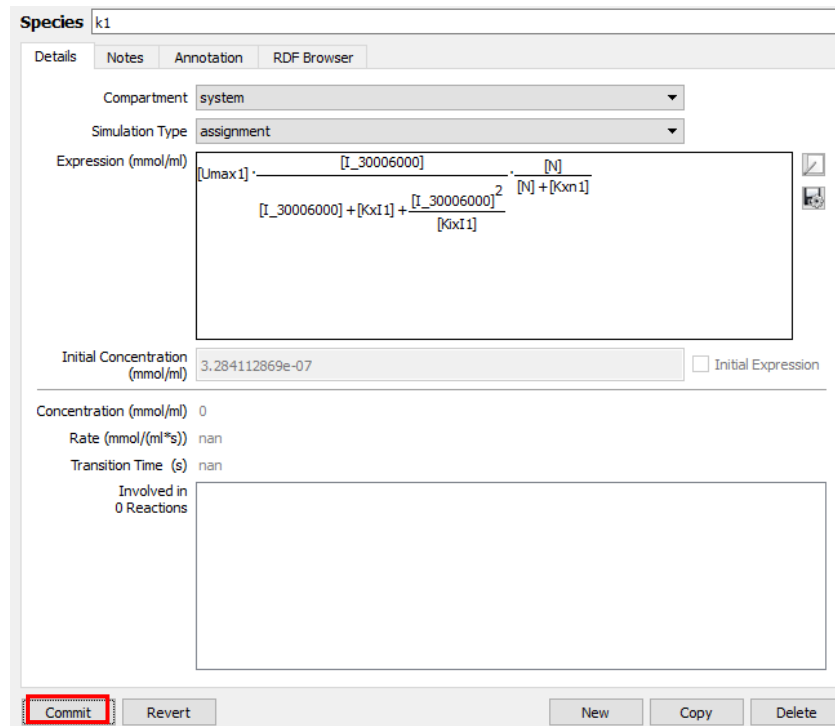
ภาพที่ 47 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการใส่ข้อมูล Simulation type

- จากนั้นไปที่หัวข้อ Transient concentrations หลังจากนั้นเลือกตัวแปรในสมการที่ต้องการแล้วจึงกดตกลง



ภาพที่ 48 หน้าต่างการทำงานในส่วนของการเลือกตัวแปรในสมการที่ต้องการ

- จากนั้นกด Commit เพื่อเป็นการยืนยัน (ในขั้นตอนของ ODE นั้นทำเหมือนกัน)



ภาพที่ 49 กด Commit เพื่อเป็นการยืนยันการเลือกตัวแปร

- การตรวจเช็คสมการในโปรแกรม Copasi

- เป็นขั้นตอนหนึ่งในการตรวจสอบความถูกต้องของสมการในภาพรวม โดยกดเข้าที่หัวข้อ Mathematical แล้วเลือกหัวข้อ Differential Equations ดังที่แสดงในภาพ

COPASI

- Model
  - Biochemical
    - Compartments (1)
    - Species (143)
    - Reactions (0)
    - Global Quantities (0)
    - Events (0)
    - Parameter Overview
    - Parameter Sets (0)
  - Mathematical
    - Differential Equations**
    - Matrices
    - Diagrams

$$[k1] = [Umax1] \cdot \frac{[I_{30006000}]}{[I_{30006000}] + [Kx1] + \frac{[I_{30006000}]^2}{[Kx1]}} \cdot \frac{[N]}{[N] + [Kxn1]}$$

$$[I0] = \begin{cases} \text{Time} > 91, & 114 \\ \text{else,} & 57 \end{cases}$$

$$\frac{d([X1] \cdot V^{\dots(-) \dots})}{dt} = V^{\dots(-) \dots} \cdot \{ -([k1] \cdot [X1] + [cell] \cdot [k11] \cdot [X2] + [cell] \cdot [k3] \cdot [X3] - [k33] \cdot [X1] + [K_{xx1}] \cdot [X1] - [kd1] \cdot [X1]) \}$$

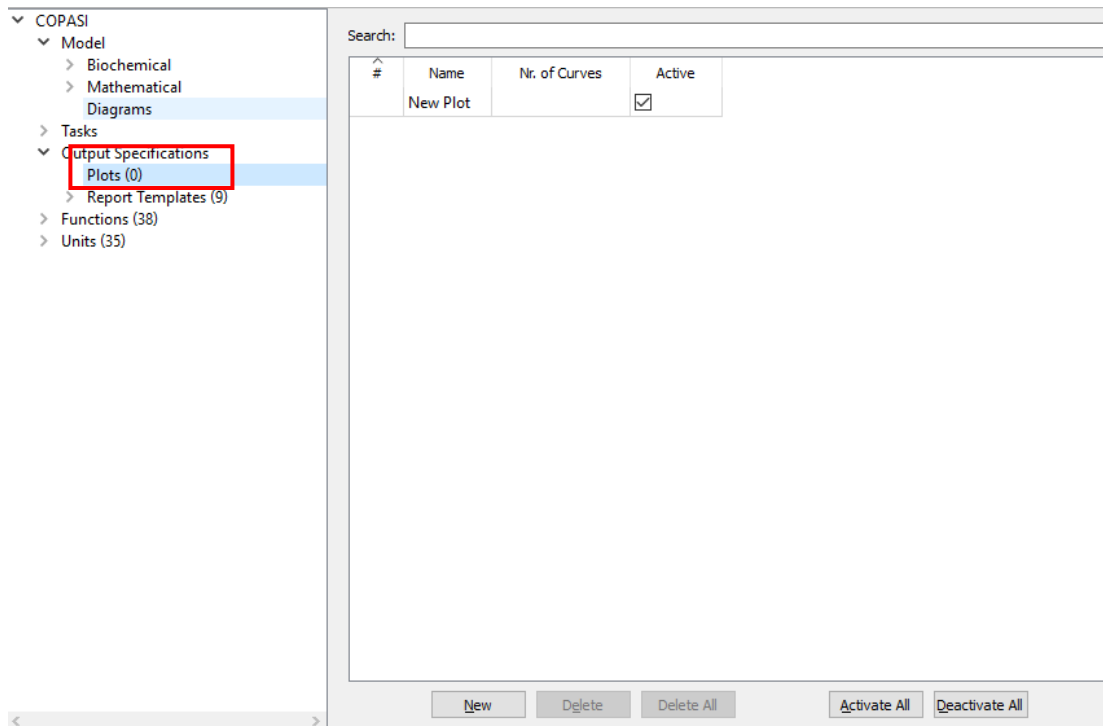
$$\frac{d([X2] \cdot V^{\dots(-) \dots})}{dt} = V^{\dots(-) \dots} \cdot \{ ([k1] \cdot [X1] - [k11] \cdot [X2] - [k2] \cdot [X2] + 7 \cdot [K_{xx2}] \cdot [X2] - [kd2] \cdot [X2]) \}$$

$$\frac{d([X3] \cdot V^{\dots(-) \dots})}{dt} = V^{\dots(-) \dots} \cdot \{ ([k2] \cdot [X2] - [k3] \cdot [X3] + [k33] \cdot [X1] + 7 \cdot [K_{xx3}] \cdot [X3] - [kd3] \cdot [X3]) \}$$

ภาพที่ 50 การตรวจสอบความถูกต้องของสมการในภาพรวม

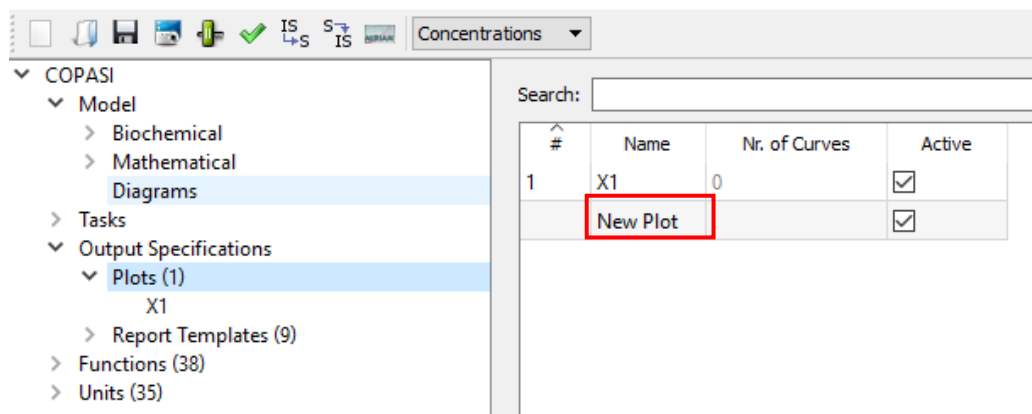
- วิธีสร้างกราฟ

- เมื่อสร้างสมการลงในโปรแกรมแล้ว เราสามารถสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่ากับสมการที่ใส่ไปยังโปรแกรมได้ โดยลำดับขั้นตอนการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ของสมการมีดังนี้
- เลือกหัวข้อ Output specifications แล้วเข้าไปที่ Plot



ภาพที่ 51 หน้าต่างการเลือกสร้างกราฟ

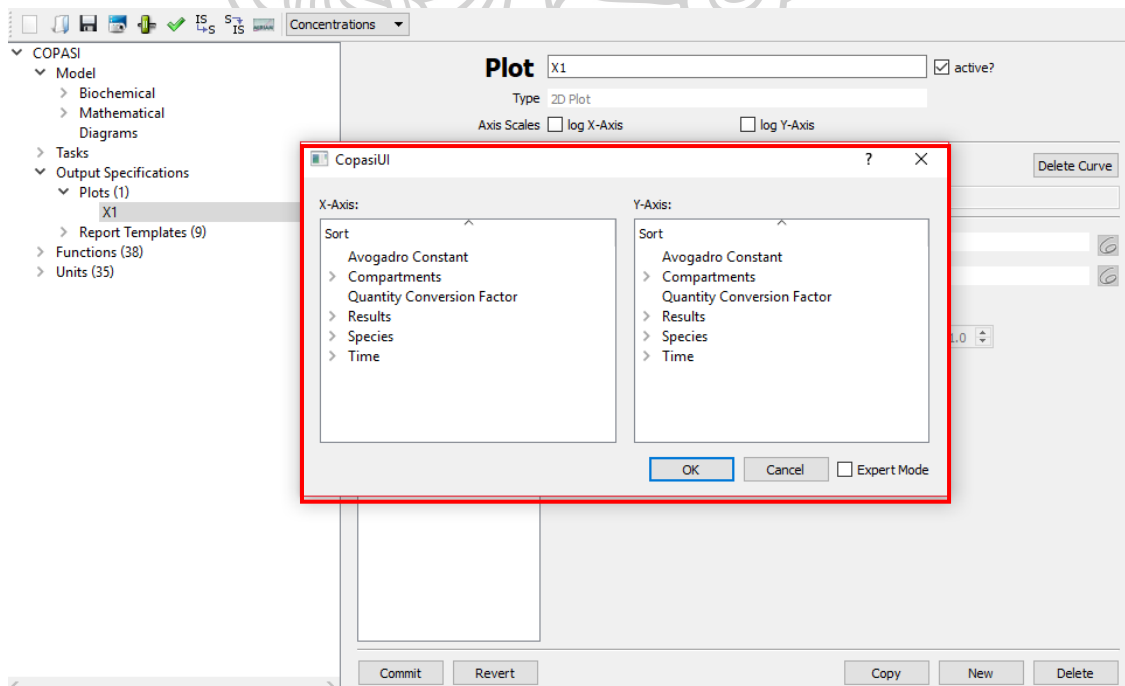
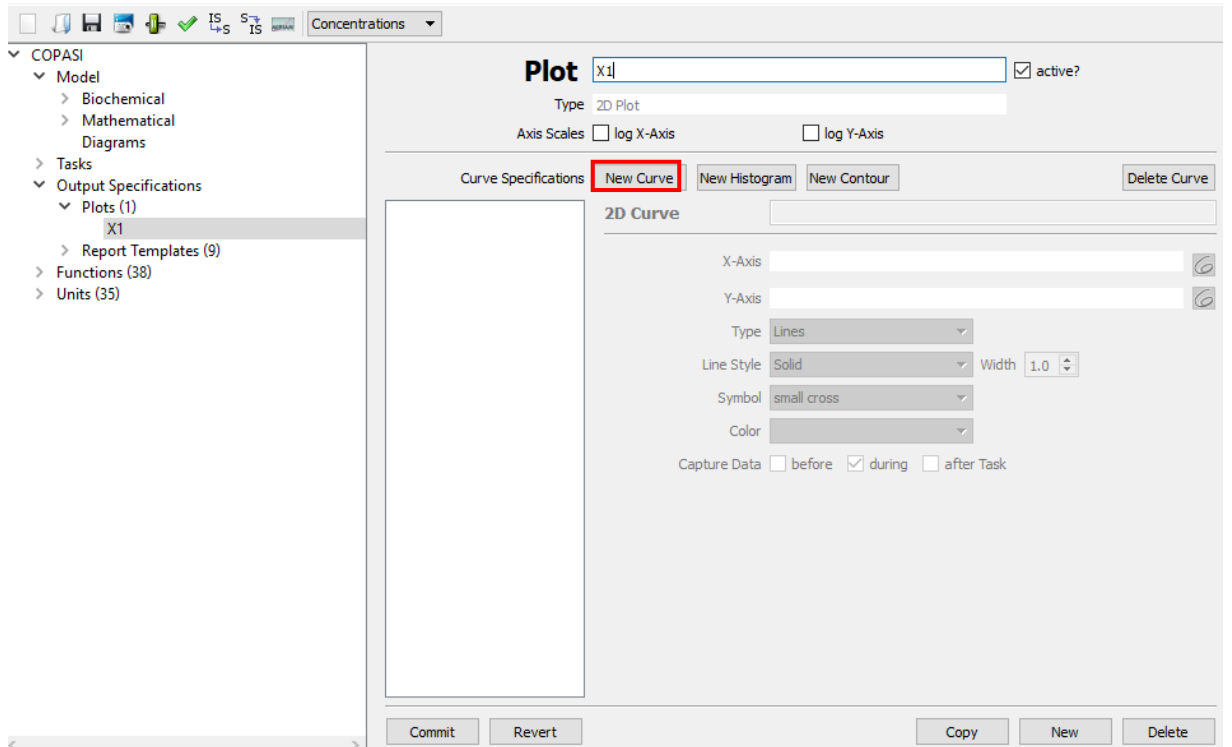
- กด New แล้วตั้งชื่อกราฟ แล้วคลิกเข้าไปตรงชื่อของกราฟที่สร้างขึ้น



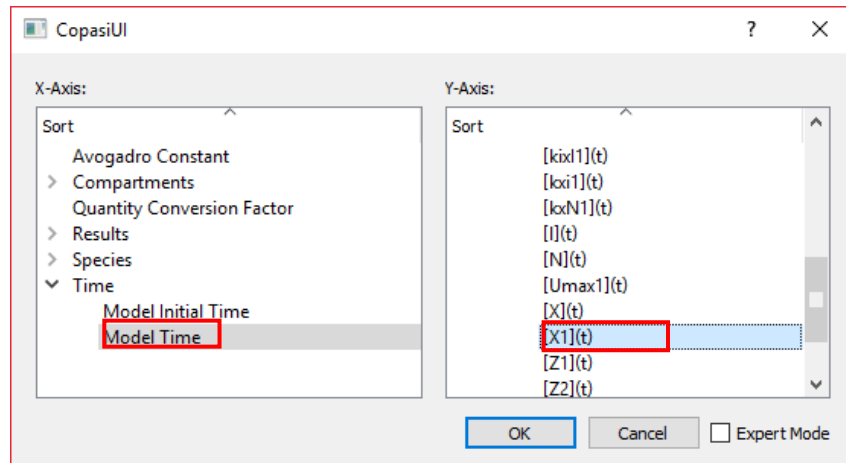
ภาพที่ 52 การตั้งชื่อกราฟ



- กด New Curve เพื่อกำหนด แกน X และ แกน Y

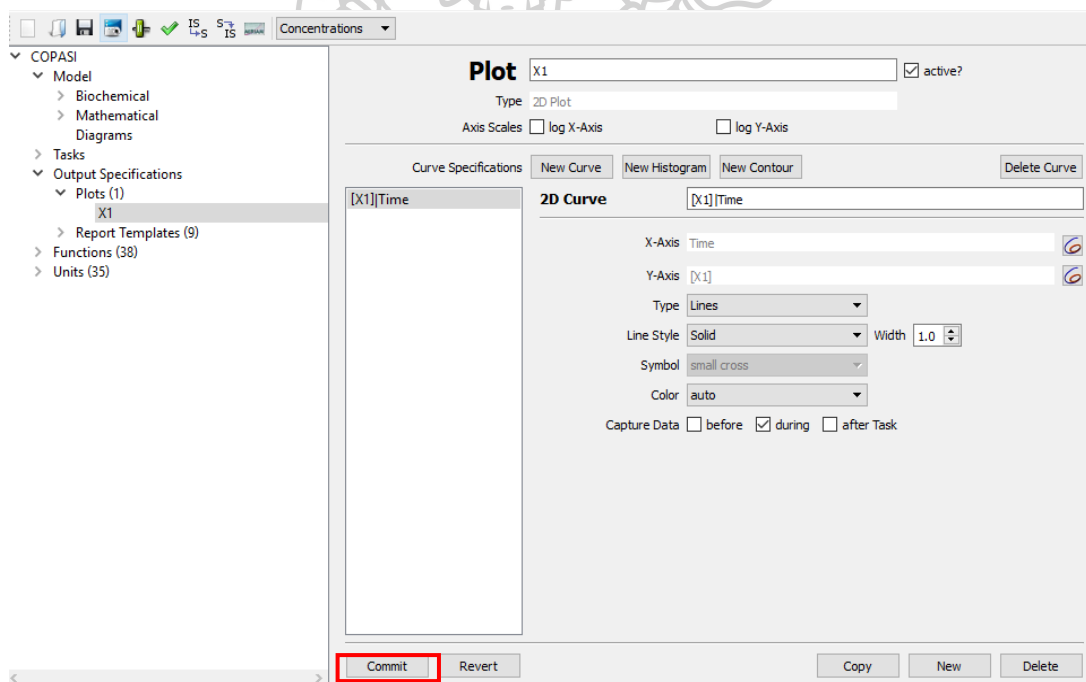


ภาพที่ 53 หน้าต่างแสดงการกำหนดแกน X และ แกน Y



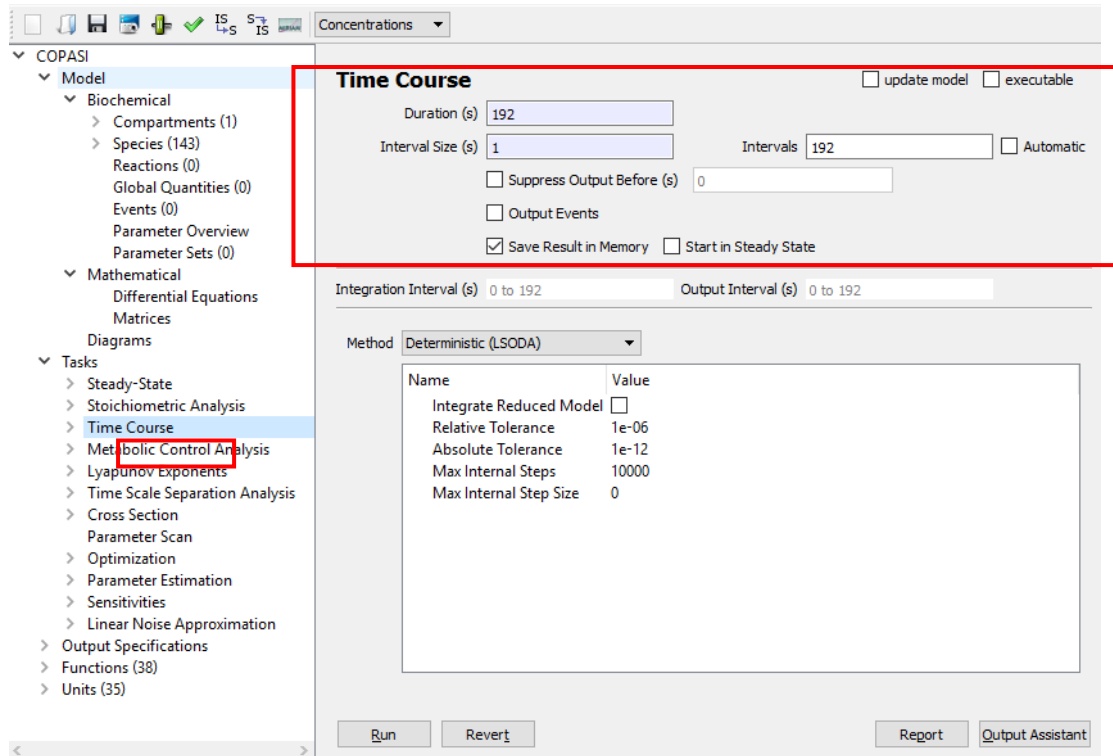
ภาพที่ 54 กำหนด แกน X คือเวลา แกน Y คือ ความเข้มข้นเซลล์  $X_1$

- จากนั้นกด Commit และสร้างกราฟให้ครบ



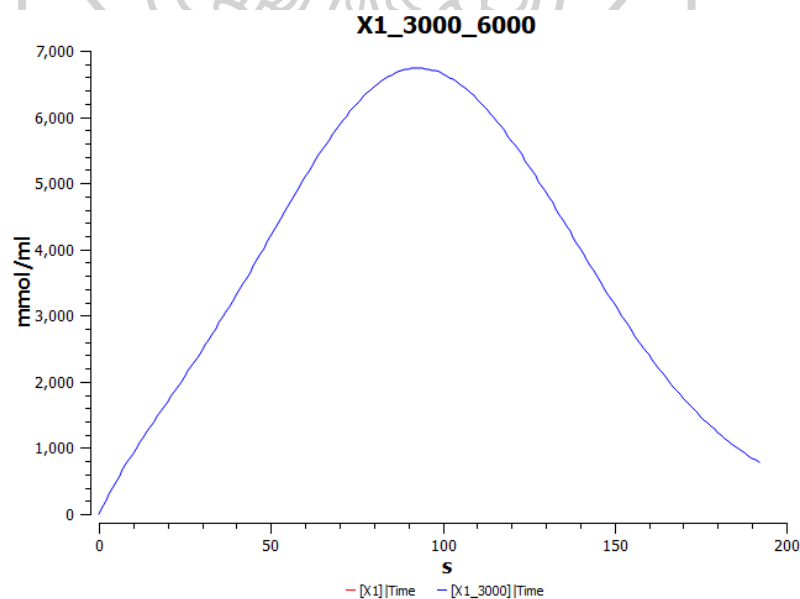
ภาพที่ 55 กด Commit และสร้างกราฟให้ครบ

- ตั้งค่า Duration ใน Time course เพื่อกำหนดระยะเวลาที่ต้องการให้กราฟแสดง โดยเริ่มต้นไปคลิกที่ Task แล้วกดที่ Time course



ภาพที่ 56 หน้าต่างการตั้งค่า Duration

- กด Run เพื่อแสดงกราฟขึ้นมา

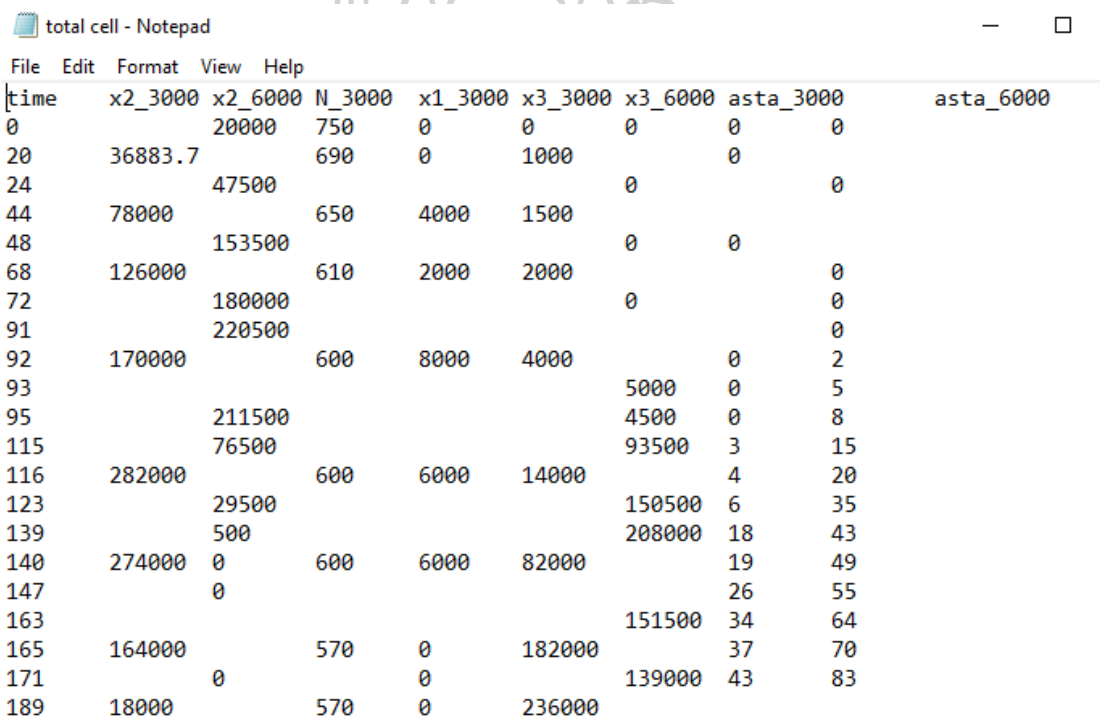


ภาพที่ 57 กราฟที่ได้จากการกำหนดค่าด้วยโปรแกรม copasi

- วิธีการประมาณค่าพารามิเตอร์

จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้น โดยคำนึงถึงการเจริญเติบโตชีวมวลและกา  
 สสมแอสตาแซนธินเกิดจากผลกระทบที่เกิดขึ้นจากความเข้มข้นแสง และความเข้มข้นไนเต  
 รท เบื้องต้นพบว่ายังไม่สามารถนำค่าพารามิเตอร์มาใช้ได้ เนื่องจากความแม่นยำในการ  
 ทำนายยังมีความคลาดเคลื่อน จึงต้องทำการประมาณค่าคงที่ หรือ Parameter Estimation  
 ในระบบสมการอนุพันธ์อันดับ แล้วนำมาสอบเทียบกับผลการทดลองเพื่อตรวจสอบความ  
 แม่นยำในการทำนายผล

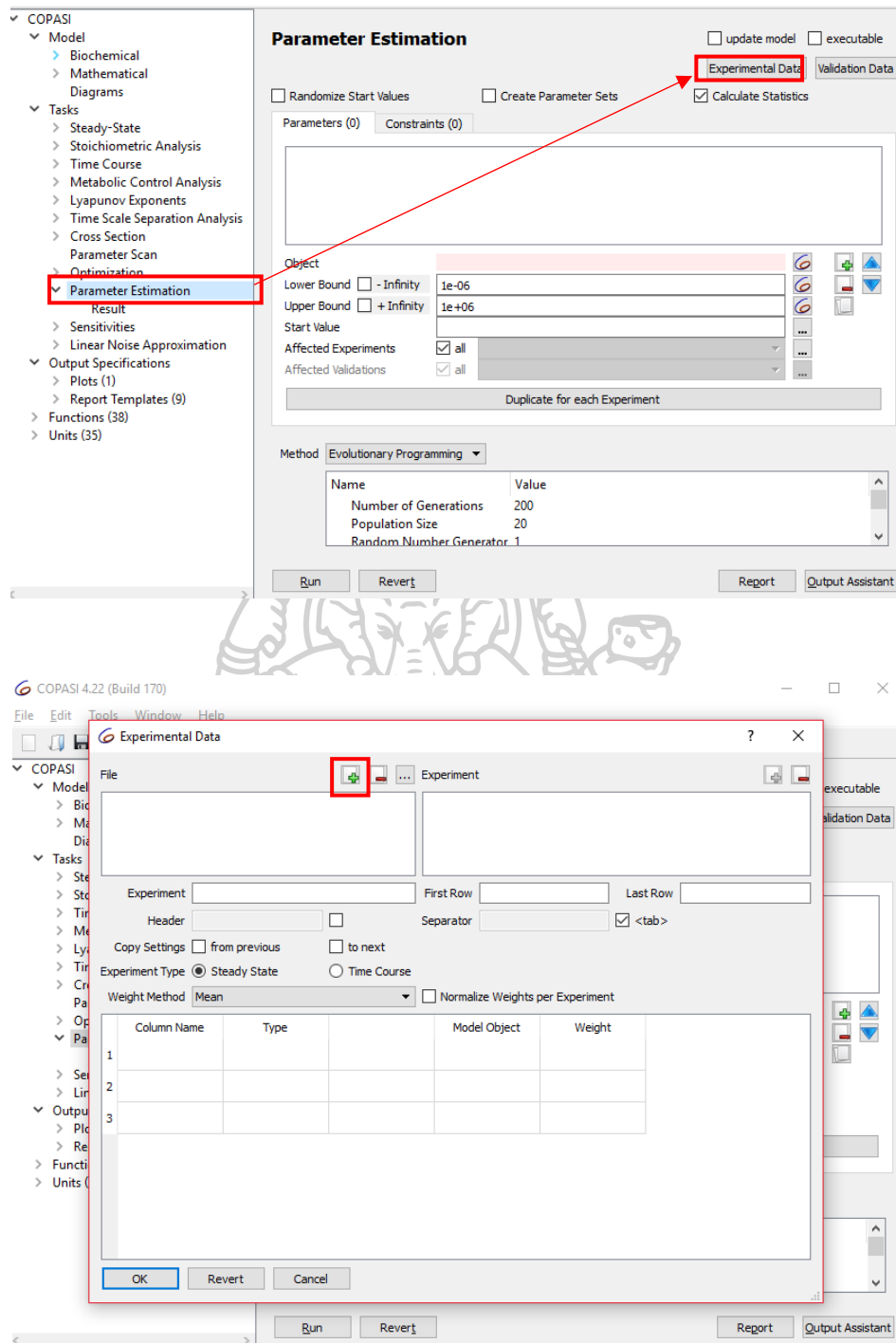
- ขั้นแรกเตรียมข้อมูลผลการทดลองใส่ Notepad แล้วบันทึกไฟล์เป็น  
 ประเภท Text Documents (\*.txt)



time	x2_3000	x2_6000	N_3000	x1_3000	x3_3000	x3_6000	asta_3000	asta_6000
0		20000	750	0	0	0	0	0
20	36883.7		690	0	1000		0	
24		47500				0		0
44	78000		650	4000	1500			
48		153500				0	0	
68	126000		610	2000	2000			0
72		180000				0		0
91		220500						0
92	170000		600	8000	4000		0	2
93						5000	0	5
95		211500				4500	0	8
115		76500				93500	3	15
116	282000		600	6000	14000		4	20
123		29500				150500	6	35
139		500				208000	18	43
140	274000	0	600	6000	82000		19	49
147		0					26	55
163						151500	34	64
165	164000		570	0	182000		37	70
171		0		0		139000	43	83
189	18000		570	0	236000			

ภาพที่ 58 การเตรียมข้อมูลผลการทดลองใส่ Notepad

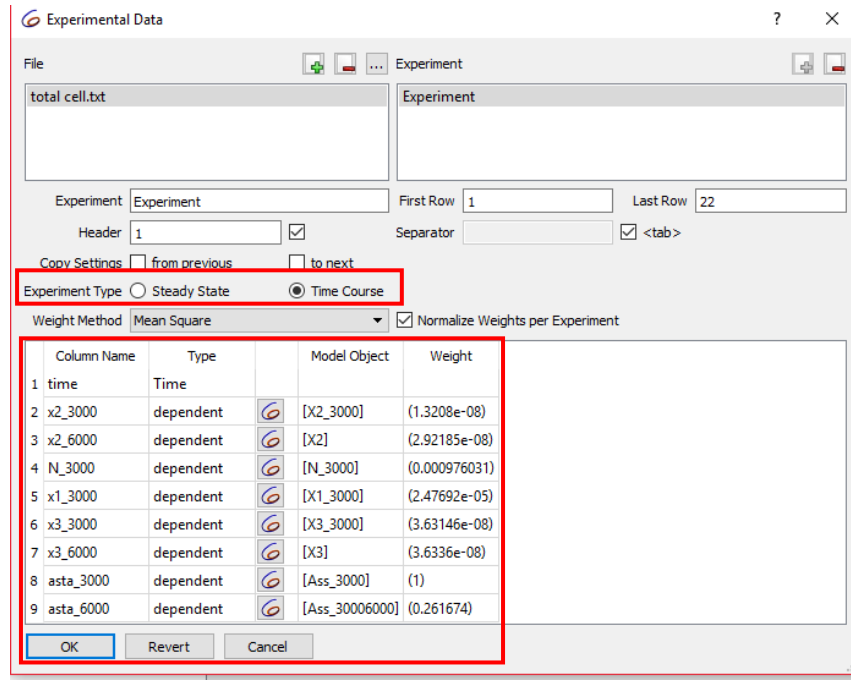
- จากนั้นคลิกเข้าในหัวข้อ Task เลือกหัวข้อ Parameter Estimation แล้ว  
 คลิก Experimental Data เพื่อนำผลการทดลองเข้าสู่โปรแกรม



ภาพที่ 59 การนำข้อมูลจาก Notepad เข้าสู่โปรแกรม Copasi

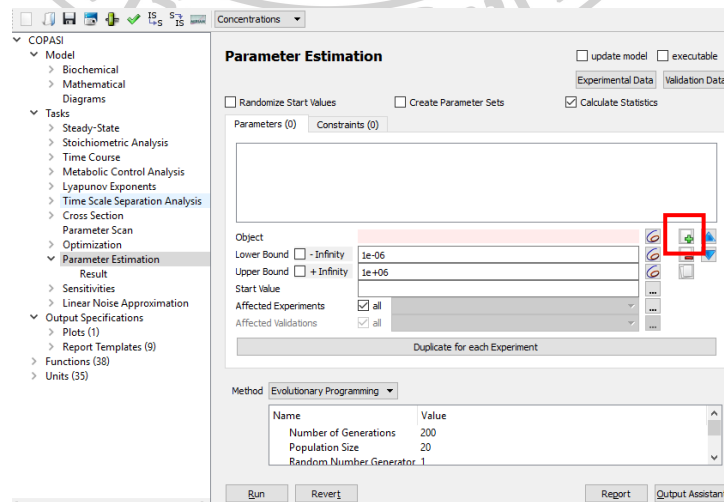
- หลังจากเปิดหน้าต่าง Experimental Data นำข้อมูลจาก Notepad เข้า โดยการคลิกที่สัญลักษณ์เครื่องหมายบวกสีเขียว

- นำข้อมูลผลการทดลองมาใส่ ปรับ Experimental Type เป็นแบบ Time course และกำหนดผลการทดลองที่ได้ใส่เข้ามาให้ขึ้นกับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้น เมื่อทำการเสร็จให้กด OK



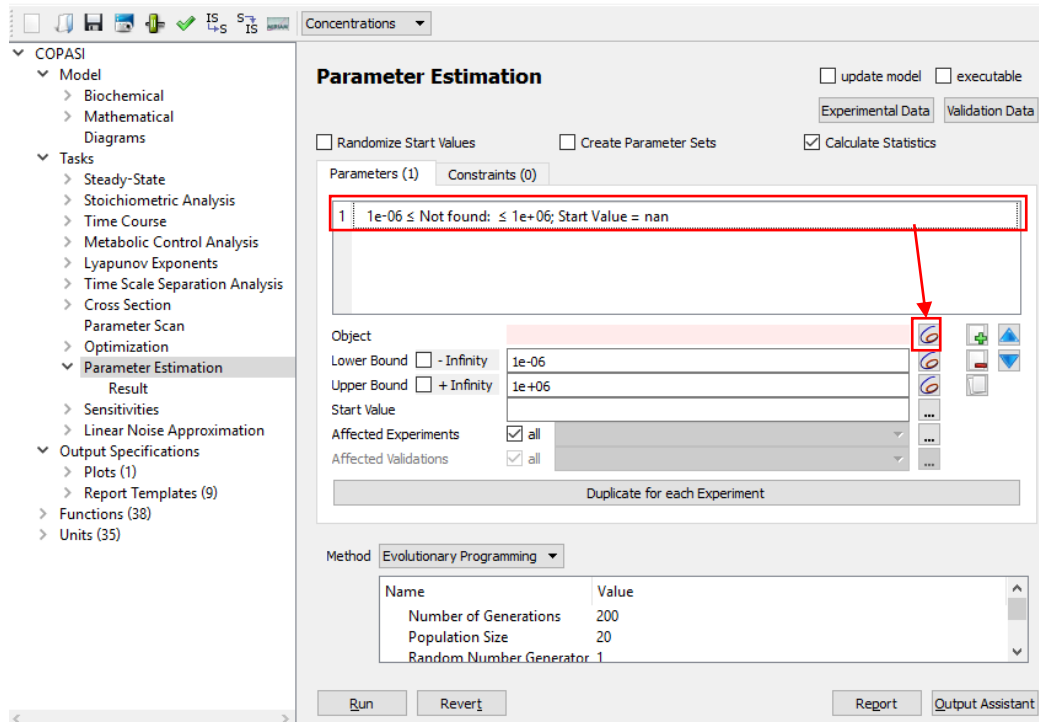
ภาพที่ 60 การกำหนดผลการทดลองที่ได้ใส่เข้ามาให้ขึ้นกับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้น

- หลังจากใส่ข้อมูลเรียบร้อยแล้ว คลิกไปที่สัญลักษณ์เครื่องหมายบวก เพื่อทำการเพิ่มค่าพารามิเตอร์ที่ได้กำหนดขึ้น



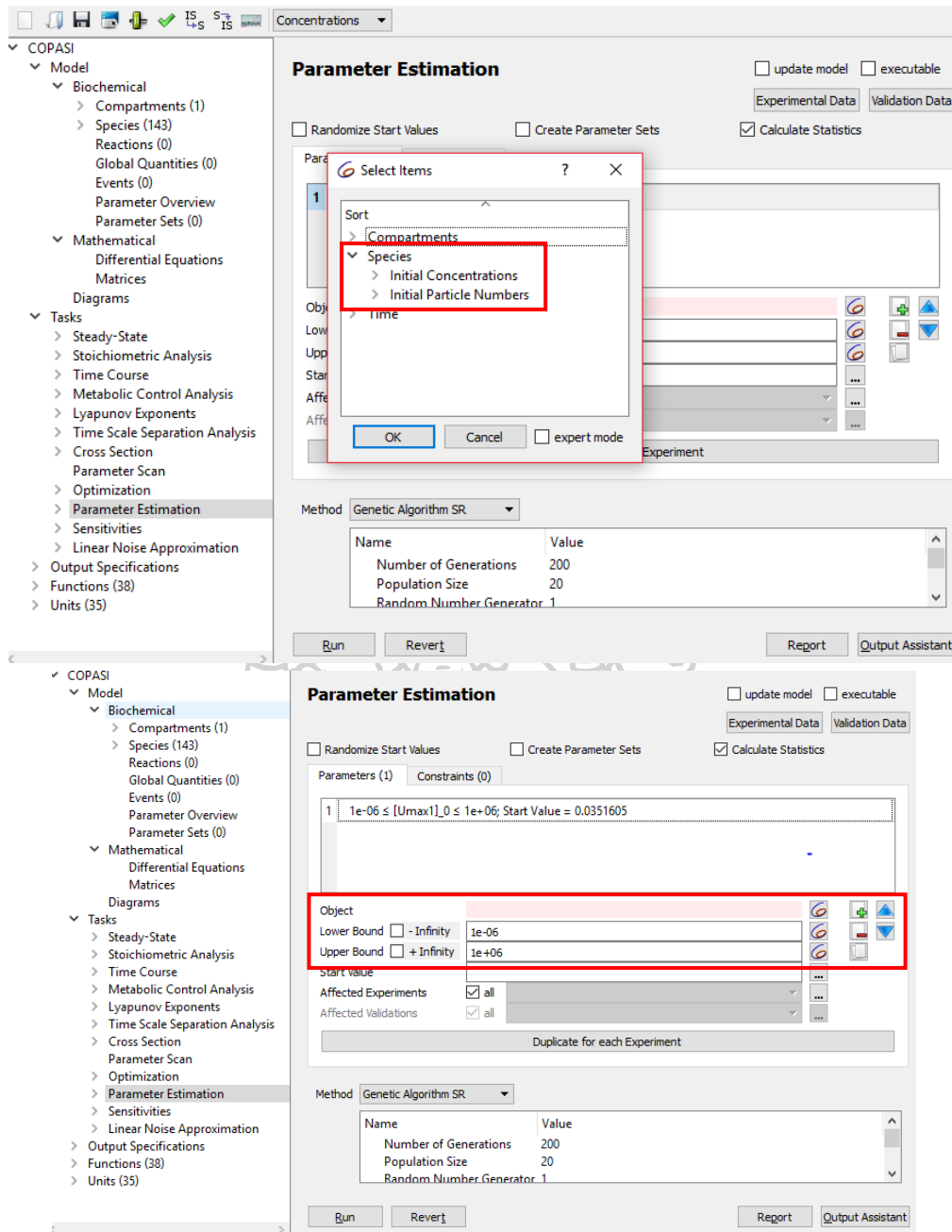
ภาพที่ 61 การเพิ่มค่าพารามิเตอร์

- คลิกไปที่ Not found แล้วไปคลิกที่สัญลักษณ์ Copasi เพื่อทำการใส่ค่าตัวแปรที่ต้องการประมาณ



ภาพที่ 62 การกำหนดค่าตัวแปร

- เลือกหัวข้อ species แล้วกดที่หัวข้อ Initial Concentrations ในการเลือกค่าตัวแปร
- เมื่อใส่ค่าพารามิเตอร์จนครบทุกตัวแล้วจึงกำหนดค่าเริ่มต้นที่จะใส่ลงไป เพื่อให้กราฟในแบบจำลองมีความคลาดเคลื่อนระหว่างกับผลการทดลองที่ได้ป้อนลงไปยังโปรแกรมให้น้อยที่สุด โดยกำหนดค่า Lower Bound และ Upper Bound เพื่อเป็นขอบเขตของค่าพารามิเตอร์และกำหนดค่า Start Value เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ที่ดีที่สุด



ภาพที่ 63 การปรับเปลี่ยนค่าตัวแปร

- หลังจากใส่ข้อมูลเรียบร้อยแล้ว คลิกไปที่ Output Assistant เพื่อทำการสร้างกราฟระหว่างผลการทดลองและแบบจำลองที่สร้างขึ้น
- จากนั้นกด Run เพื่อทำการประมาณค่าพารามิเตอร์



The image displays two screenshots of the COPASI software interface, specifically the **Parameter Estimation** window. The left sidebar shows the model hierarchy, including **Model**, **Biochemical**, **Mathematical**, and **Tasks**.

**Top Screenshot:** Shows the **Parameter Estimation** window with one parameter constraint defined:  $1 \quad 1e-06 \leq [U_{max1}_0] \leq 1e+06; \text{ Start Value} = 0.0351605$ . The **Output Assistant** button is highlighted in red.

**Bottom Screenshot:** Shows the **Parameter Estimation** window with four parameter constraints defined:

- $1 \quad 1e-06 \leq [U_{max1}_0] \leq 1e+06; \text{ Start Value} = 0.0351605$
- $2 \quad 1e-06 \leq [U_{max11}_0] \leq 1e+06; \text{ Start Value} = 0.0013391$
- $3 \quad 1e-06 \leq [U_{max2}_0] \leq 1e+06; \text{ Start Value} = 0.0662222$
- $4 \quad 1e-06 \leq [U_{max33}_0] \leq 1e+06; \text{ Start Value} = 0.0157386$

The **Run** button is highlighted in red.

ภาพที่ 64 หน้าต่างก่อนเริ่มการประมาณค่าพารามิเตอร์

## รายการอ้างอิง

Aflalo, C., et al. (2007). "On the relative efficiency of two-vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*." Biotechnology and Bioengineering 98(1): 300-305.

Aiba, S. (1982). Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. Microbial reactions, Springer: 85-156.

Akiba, Y., et al. (2001). "Meat color modification in broiler chickens by feeding yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin." Journal of Applied Poultry Research 10(2): 154-161.

Alori, E. T., et al. (2017). "Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture." Frontiers in microbiology 8: 971.

Ambati, R. R., et al. (2014). "Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review." Marine drugs 12(1): 128-152.

Armstrong, F. (1963). "Determination of Nitrate in Water Ultraviolet Spectrophotometry." Analytical chemistry 35(9): 1292-1294.

Banerjee, K., et al. (2009). "Biochemical composition of marine macroalgae from Gangetic Delta at the apex of Bay of Bengal." African Journal of Basic and Applied Sciences 1(5-6): 96-104.

Barredo, J.-L. (2012). "Microbial carotenoids from bacteria and microalgae." Methods and

Protocols; Humana Press: New York, NY, USA: 5.

Baudelet, P.-H., et al. (2017). "A new insight into cell walls of Chlorophyta." Algal Research 25: 333-371.

Bowen, J., et al. (2002). "Utilization of (3S, 3' S)-astaxanthin acyl esters in pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Aquaculture nutrition 8(1): 59-68.

Calo, P., et al. (1995). "Ketocarotenoids in halobacteria: 3-hydroxy-echinenone and trans-astaxanthin." Journal of applied bacteriology 79(3): 282-285.

Ebisawa, M., et al. (2008). "Supplementary ultraviolet radiation B together with blue light at night increased quercetin content and flavonol synthase gene expression in leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.)." Environmental Control in Biology 46(1): 1-11.

Gao, X., et al. (2017). "Parameterization of a light distribution model for green cell growth of microalgae: *Haematococcus pluvialis* cultured under red LED lights." Algal Research 23: 20-27.

Gao, Z., et al. (2013). "Analysis of mRNA expression profiles of carotenogenesis and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under exogenous 2, 4-epibrassinolide (EBR)." Biological Research 46(2): 201-206.

García-Ferris, C., et al. (1996). "CORRELATED BIOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN NITROGEN-STARVED EUGLENA GRACILIS 1." Journal of phycology 32(6): 953-963.

Glemser, M., et al. (2016). "Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives." Applied microbiology and biotechnology 100(3): 1077-1088.

Grunewald, K., et al. (2000). "Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae)." Plant Physiology 122(4): 1261-1268.

Higuera-Ciapara, I., et al. (2006). "Astaxanthin: a review of its chemistry and applications." Critical reviews in food science and nutrition 46(2): 185-196.

Holtin, K., et al. (2009). "Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI) MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy." Analytical and bioanalytical chemistry 395(6): 1613-1622.

Hong, M.-E., et al. (2016). "Effect of red cyst cell inoculation and iron (II) supplementation on autotrophic astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under outdoor summer conditions." Journal of biotechnology 218: 25-33.

Jin, E.-S., et al. (2006). "Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): biosynthesis, regulation, and biotechnology." Journal of microbiology and biotechnology 16(6): 821-831.

Johnson, M. P. (2017). "Correction: Photosynthesis." Essays in Biochemistry 61(4): 429.

Kang, C., et al. (2005). "Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on

astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*." Applied microbiology and biotechnology 68(2): 237-241.

Kobayashi, M., et al. (1992). "Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions." Journal of fermentation and Bioengineering 74(1): 17-20.

Lorenz, R. T. and G. R. Cysewski (2000). "Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin." Trends in biotechnology 18(4): 160-167.

Miki, W. (1991). "Biological functions and activities of animal carotenoids." Pure and applied chemistry 63(1): 141-146.

Milledge, J. J. (2011). "Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review." Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 10(1): 31-41.

Olaizola, M. (2003). "Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace." Biomolecular engineering 20(4-6): 459-466.

Oplatowska-Stachowiak, M. and C. T. Elliott (2017). "Food colors: Existing and emerging food safety concerns." Critical reviews in food science and nutrition 57(3): 524-548.

Orosa, M., et al. (2005). "Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*." Bioresource Technology 96(3): 373-378.

Orosa, M., et al. (2000). "Production and analysis of secondary carotenoids in green algae." Journal of Applied Phycology 12(3): 553-556.

Pan-utai, W., et al. (2017). "Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: organic and inorganic." Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 12: 152-158.

Paniagua-Michel, J., et al. (2012). "Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae." Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-879-5>.

Pinkeaw, C. J. a. N. (2017). "Wavelength Measuring Technique of LED Grow Lights by using Android Application." Engineering Journal Chiang Mai University 24(3): 62-68.

Ranga, R., et al. (2009). "Identification of carotenoids from green alga *Haematococcus pluvialis* by HPLC and LC-MS (APCI) and their antioxidant properties." Journal of microbiology and biotechnology 19(11): 1333-1341.

Santos, M. F. and M. JF (1984). "Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis." Cytologia 49(1): 215-228.

Sarada, R., et al. (2002). "Optimization of culture conditions for growth of the green alga *Haematococcus pluvialis*." World Journal of Microbiology and Biotechnology 18(6): 517-521.

Sasso, S., et al. (2012). "Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products." FEMS microbiology reviews 36(4): 761-785.

Schroeder, S. R., et al. (1996). "Brief report: A life-span perspective on the development

of individuals with autism." Journal of Autism and Developmental Disorders 26(2): 251-255.

Seon-Jin, L. (2003). "Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I $\kappa$ B kinase-dependent NF- $\kappa$ B activation." Mol Cells 16: 97-105.

Simpson, D., et al. (1981). "Fatal injuries of the head and spine: Epidemiological studies in New South Wales and South Australia." Medical Journal of Australia 2(12): 660-664.

Steinbrenner, J. and H. Linden (2001). "Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*." Plant Physiology 125(2): 810-817.

Suganuma, K., et al. (2010). "Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation." Leukemia & lymphoma 51(11): 2112-2119.

Tamiya, H., et al. (1953). "Kinetics of growth of *Chlorella*, with special reference to its dependence on quantity of available light and on temperature." Algal culture from laboratory to pilot plant: 204-232.

Torzillo, G., et al. (2003). "Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* during the shift from the green to red stage." Journal of Applied Phycology 15(2): 127-136.

Tran, H.-L., et al. (2015). "Effects of LED irradiation on the growth and Astaxanthin Production of *Haematococcus lacustris*." Biosciences Biotechnology Research Asia 12(2): 1167-1173.

Tripathi, U., et al. (1999). "Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media." Bioresource Technology 68(2): 197-199.

van Oorschot, J. L. P. (1955). Conversion of light energy in algal culture, Veenman.

Wang, J., et al. (2013). "Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor." Journal of Applied Phycology 25(1): 253-260.

Wang, Y. and K. M. Folta (2013). "Contributions of green light to plant growth and development." American Journal of Botany 100(1): 70-78.

Wang, Y. and J. Peng (2008). "Growth-associated biosynthesis of astaxanthin in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta)." World Journal of Microbiology and Biotechnology 24(9): 1915-1922.

Wayama, M., et al. (2013). "Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*." PloS one 8(1): e53618.

Weber, R. W., et al. (2007). "Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi)." Journal of Chromatography A 1145(1-2): 118-122.

Xi, T., et al. (2016). "Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy." Applied microbiology and biotechnology 100(14): 6231-6238.



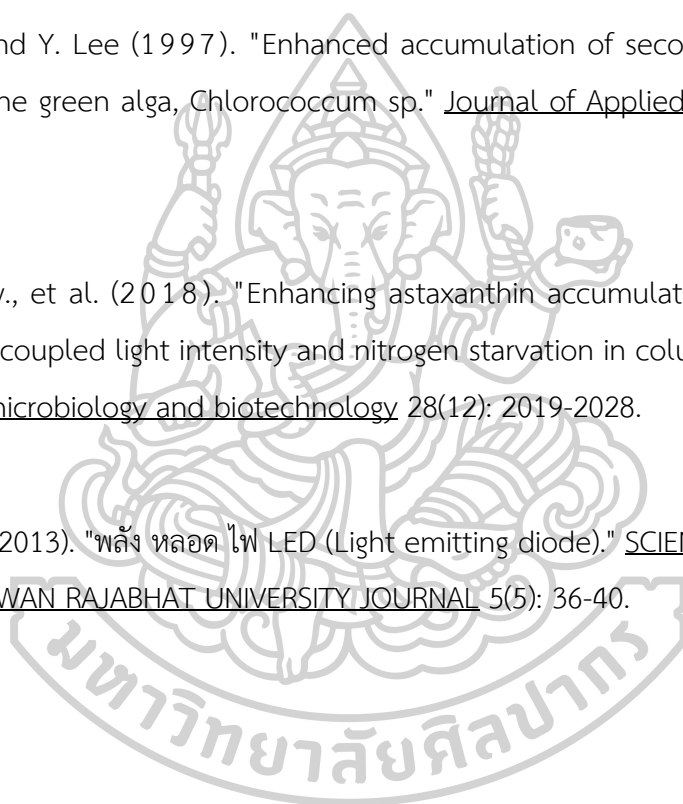
Yarish, C., et al. (2012). "Gracilaria culture handbook for new England."

Yuan, J.-P. and F. Chen (2000). "Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*." Food Chemistry 68(4): 443-448.

Zhang, D. and Y. Lee (1997). "Enhanced accumulation of secondary carotenoids in a mutant of the green alga, *Chlorococcum* sp." Journal of Applied Phycology 9(5): 459-463.

Zhang, W.-w., et al. (2018). "Enhancing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* by coupled light intensity and nitrogen starvation in column photobioreactors." Journal of microbiology and biotechnology 28(12): 2019-2028.

หมื่นกล้า, ท. (2013). "พลัง หลอด ไฟ LED (Light emitting diode)." SCIENCE AND TECHNOLOGY NAKHON SAWAN RAJABHAT UNIVERSITY JOURNAL 5(5): 36-40.





## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	กานดา พลจร
วัน เดือน ปี เกิด	4 มีนาคม 2538
สถานที่เกิด	นครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	28/396 ม.11 ต.ไร่จีน อ.สามพราน จ.นครปฐม 73000

