รายงานโครงการวิจัย

การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

Research and development products form microalgae

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย
นราทร สุขวิเสส
Narathorn Sukwises

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2565

รายงานโครงการวิจัย

การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

Research and development products form microalgae

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย
นราทร สุขวิเสส
Narathorn Sukwises

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2565

คำปรารภ (Foreword หรือ Preface)

ประเทศไทยมีทรัพยากรสาหร่ายมากมายทั้งสาหร่ายทะเลและสาหร่ายน้ำจืด ซึ่งในที่นี้รวมถึงสาหร่ายขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สามารถเจริญเติบโตได้ดีในทุกพื้นที่ทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย หรือน้ำเค็ม แม้ว่านักวิจัยที่ทำการศึกษาและพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยง รวมถึงหาองค์ประกอบของสารในรูปแบบต่างๆ ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กเพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดมาเป็นเวลานานหลายปี แต่กิจกรรมการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กยังคงอยู่ในวงจำกัดด้านการวิจัยเป็นหลักและมีการนำมาใช้ประโยชน์ด้านการค้าน้อยมาก อย่างไรก็ตามจากกระแสความนิยมบริโภคอาหารสุขภาพ การอนุรักษ์พลังงานและสิ่งแวดล้อม ด้วยการส่งเสริมจากทั้งภาครัฐและเอกชน ซึ่งกำลังเป็นค่านิยมหลักอันหนึ่งของสังคมไทยในยุคปัจจุบัน นับเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้ผู้คนหันมาเห็นความสำคัญของผลผลิต วัตถุดิบ และธุรกิจการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กขึ้นมาในที่สุด เอกสารงานวิจัยฉบับนี้ ได้รวบรวมกระบวนการทางเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก เพื่อผลิตวัตถุดิบสาหร่ายขนาดเล็ก พร้อมด้วยองค์ความรู้ในการทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ เวชสำอาง พลังงานและวัสดุชีวภาพ เพื่อให้เกษตรกรเข้าถึงเทคโนโลยีโดยง่ายและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง อย่างทั่วถึงและยั่งยืน นำไปสู่การเป็นผู้ประกอบการวิสาหกิจการเกษตรหรือผู้ประกอบการมีความมั่งคงทางธุรกิจต่อไป

นราทร สุขวิเสส
หัวหน้าโครงการวิจัยฯ
กุมภาพันธุ์ 2565

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
ผู้วิจัย	2
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	3
บทนำ	4
บทคัดย่อ	6
1. กิจกรรม การพัฒนาสาหร่ายขนาดเล็กที่มีสารสำคัญสูง	8
2. กิจกรรม การใช้ประโยชน์จากสาหร่ายขนาดเล็ก	37
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	96
บรรณานุกรม	98
ภาคผนวก	105

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความร่วมมือของคณะผู้วิจัย การบริหารจัดการ การจัดสรรงบประมาณ การให้คำแนะนำ กลั่นกรอง และช่วยเหลือแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ จากคณะกรรมการที่ปรึกษาวิชาการ คณะกรรมการบริหารงานวิจัย กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร คณะกรรมการที่ปรึกษาด้านวิชาการกรมวิชาการเกษตร คณะกรรมการบริหารงานวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตร และการสนับสนุนให้ดำเนินการจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ(วช.) และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณหัวหน้าการทดลองและผู้ร่วมดำเนินงานวิจัยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและทำงานวิจัยอย่างมุ่งมั่น ดำเนินงานวิจัยให้บรรลุวัตถุประสงค์ สนับสนุนให้งานวิจัยสามารถถ่ายทอดองค์ความรู้ และนำไปใช้ประโยชน์ได้ ตลอดจนรวบรวมและจัดทำรายงานผลการทดลองเสร็จสิ้นภายในระยะเวลาที่กำหนด

ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยและวิเคราะห์ทางสถิติงานวิจัยเกษตร กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้ความรู้ทางสถิติ ทำให้ผู้วิจัยสามารถนำความรู้ที่ได้รับมาใช้ในการวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติของการทดลองในโครงการวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบุคลากรภายในกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรที่ช่วยเหลือสนับสนุน ทั้งกำลังกายและกำลังใจ และหน่วยงานภายนอกทุกหน่วยงาน ที่มีส่วนช่วยในสนับสนุนการดำเนินงานโครงการวิจัยฯ นี้ให้เป็นผลสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดียิ่ง

นราทร สุขวิเสส

กุมภาพันธ์ 2565

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัย

นายนราทร สุขวิเสส	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นางสาวสุรีย์รัตน์ รักเหลือ	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นางสาวจารุวรรณ์ รัตนสกุลธรรม	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นางสาวอกนิษฐ์ พิศาลวัชรินทร์	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นางสาววิมลวรรณ วัฒนวิจิตร	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นางสาวปาริชาติ อยู่แพทย์	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นางสาวศิริพร เต็งรัง	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นายกนกศักดิ์ ลอยเลิศ	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นางสาวสุปรียา ศุขเกษม	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นายวุฒิพล จันทร์สระคู	วิศวกรการเกษตรชำนาญการพิเศษ	สถาบันเกษตรวิศวกรรม

กรมวิชาการเกษตร

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

DCW Dry cell weight

DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy

FAME Fatty acid methyl ester

IC_{50} 50% Inhibitory Concentration

NaOCl Sodium hypochlorite

NaCl Sodium chloride

PHB Poly-β-hydroxybutyrate

PVA Poly vinyl alcohol หรือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์

SDS Sodium dodecyl sulphate

SFE Supercritical fluid extraction

TLC Thin layer chromatography

TPE Total polysaccharides extract

TS Tensile strength

mg/100g มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัวอย่าง 100 กรัม

rpm รอบต่อนาที

ug/ml microgram per milliliter

w/v weight per volume

w/w weight per weight

v/w/w volume per weight per weight

%wt. percent by weight

°C องศาเซลเซียส

มก./ก. มิลลิกรัมต่อกรัม

มก./กก. มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

BG-11 (NFree) = สูตรอาหารมาตรฐาน BG-11 ที่ไม่มีการเติมธาตุอาหารไนโตรเจน

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมีโครงสร้างอย่างง่าย การจัดเรียงตัวของเซลล์ไม่ซับซ้อนประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ ไม่มีเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เฉพาะ ไม่มีท่อลำเลียง ราก ลำต้น และใบที่แท้จริง สาหร่ายขนาดเล็กสามารถสร้างอาหารได้เองโดยการสังเคราะห์ด้วยแสงเช่นเดียวกับพืชชั้นสูง แต่มีความพิเศษที่แตกต่างคือ ต้นทุนการเพาะเลี้ยงต่ำเนื่องจากมีอัตราการให้ผลผลิตต่อพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงสูง และไม่มีผลกระทบต่อการเพาะปลูกพืชการเกษตรอื่น โดยสามารถนำพื้นที่ที่เสื่อมโทรมมาดัดแปลงเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ได้ อีกทั้งยังให้ผลพลอยได้มูลค่าสูง วิทวัส (2553) ได้อธิบายกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายขนาดเล็กแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ ออโตโทรฟิค (Autotrophic) เป็นพวกที่สามารถสร้างอาหารเองได้โดยการสังเคราะห์ด้วยแสง และใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างอาหาร เช่น ไซยาโนแบคทีเรีย ที่มีการสังเคราะห์ด้วยแสงคล้ายพืชชั้นสูง สาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีแดง และสาหร่ายสีน้ำตาล เป็นต้น และเฮเทอโรโทรฟิค (Heterotrophic) เป็นพวกที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ด้วยการเปลี่ยนคาร์บอนอนินทรีย์ให้เป็นสารอินทรีย์ (โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน) จึงต้องมีการบริโภคสารอินทรีย์เข้าสู่เซลล์ โดยใช้คาร์บอนจากสารประกอบคาร์บอน เป็นสารประกอบอินทรีย์ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียสีม่วง (purple bacteria), green sulfur bacteria และ Heliobacteria เป็นต้น

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กให้ได้ผลผลิตชีวมวลสูง จะต้องคำนึงถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณชีวมวลสาหร่าย ได้แก่ ระบบการเพาะเลี้ยง ทั้งการเพาะเลี้ยงแบบระบบเปิดและในถังปฏิกรณ์แบบปิด องค์ประกอบของอาหาร เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน กำมะถัน และฟอสฟอรัส รวมถึงจุลธาตุอื่น ๆ เป็นต้น (Microalgae biotechnology, 2014) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กควรมีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง เนื่องจากมีอิทธิพลต่อความหลากหลายของสารอนินทรีย์คาร์บอนในรูปต่าง ๆ ได้แก่ CO_2 และ HCO_3^- รวมทั้งค่าสัดส่วนระหว่างไนโตรเจนและฟอสฟอรัส อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีผลแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก และปริมาณออกซิเจนที่ละลายสะสมอยู่ในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หากมีปริมาณสูงเกินไปจะส่งผลต่อการอยู่รอดของสาหร่ายขนาดเล็ก

แนวทางการใช้ประโยชน์ของสารสำคัญจากสาหร่ายขนาดเล็ก

1. อาหารเพื่อสุขภาพและเวชสำอาง

1.1 การผลิตสารแคโรทีนอยด์สำหรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

สารแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ซึ่งเป็นรงควัตถุอินทรีย์ มีสีอยู่ในช่วงตั้งแต่สีเหลืองถึงสีแดง เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ตามธรรมชาติ จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายกันมากขึ้น เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยพื้นที่ในระดับสูง แคโรทีนอยด์แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มแคโรทีน (Carotene) โมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้าแคโรทีน (β-carotene) และ ไลโคปีน (Lycopene) เป็นต้น และกลุ่มแซนโทฟิลล์ (Xanthophylls) ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ได้แก่ แอสตาแซนธิน (Astraxanthin) ลูทีน (Lutein) และ ซีแซนธิน (Zeaxanthin) เป็นต้น กลุ่มแคโรทีน (Carotene) ประกอบด้วยเบต้าแคโรทีน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งเป็นรงควัตถุที่มีสีส้ม สีเหลือง เป็นแคโรทีนอยด์ที่เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ ไลโคปีน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์มากกว่าเบต้าแคโรทีน 2 เท่า และมากกว่าวิตามินอี 10 เท่า ช่วยปกป้อง บำรุง และฟื้นฟูผิวพรรณและเส้นผม ช่วยลดการทำงานของเม็ดสีเมลานินทำให้เสริมความขาวใส ช่วยลดความรุนแรงจากรังสี UVA และ UVB ทำให้ผิวทนต่อแดดมากขึ้น ไม่คล้ำเสียง่าย ลดมะเร็งผิวหนัง และช่วยต่อต้านริ้วรอยแห่งวัย ลดริ้วรอยให้ดูตื้นขึ้น ช่วยลดการอักเสบของผิวหนัง ลดผื่น

แดง ทำให้ผิวแข็งแรงขึ้นไม่แพ้ง่าย เรียบเนียน และเปล่งปลั่ง ช่วยในการสร้างเซลล์ผิวใหม่แทนผิวหนังชั้นเดิมที่เสื่อมแล้ว (มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, 2564)

1.2 พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์ เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลของน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์หลายโมเลกุลเชื่อมต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ด้วยพันธะไกลโคสิดิก ซึ่งชนิดที่พบมากในพืชทั่วไปคือ สตาร์ช (starch) เซลลูโลส และเพกติน พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นการเชื่อมต่อกันของโมโนเมอร์ชนิดเดียวกันเรียกว่า โฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น สตาร์ช เดกซ์ทริน เซลลูโลส และเพกติน แต่ถ้าเป็นคนละชนิดกันเรียกว่า เฮทเทอร์โรพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น เฮมิเซลลูโลส อัลจินิก (alginic) และกัม (gums) พอลิแซ็กคาไรด์ที่น้ำย่อยในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้เรียกว่า ใยอาหาร (fiber) ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถสกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็กได้แก่ เอการ์หรือวุ้น (agar) อัลจิเนต (alginate) และคาราจีแนน (carageenan) ได้มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นสารที่ให้ความข้น (thickening) ทำให้เกิดความคงตัว (stabilizing) และทำให้เกิดลักษณะเป็นเจล (gelling)

2. ผลิตเป็นพลังงานทดแทน

ไขมันจากเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กมีองค์ประกอบและคุณสมบัติใกล้เคียงกับพืชน้ำมันทั่วไป เช่น ถั่วเหลือง และปาล์มน้ำมัน เป็นต้น แต่ราคาของวัตถุดิบที่เป็นพืชน้ำมันเหล่านี้มีความผันผวนเป็นอย่างมากและข้อจำกัดในหลายๆ ด้าน เช่น ต้องการพื้นที่ในการเพาะปลูกมาก มีระยะเวลาในการเพาะปลูกที่ยาวนาน และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นพืชอาหาร จึงกลายเป็นประเด็นเรื่องการใช้พืชน้ำมันเหล่านี้เพื่อผลิตอาหารและพลังงานทดแทนหากมีการจัดการที่ไม่ถูกต้องอาจจะส่งผลกระทบต่อความมั่นคงทางอาหารในอนาคตได้ ทำให้สาหร่ายขนาดเล็กได้รับความสนใจที่จะนำมาพัฒนาเป็นวัตถุดิบทางเลือกใหม่ในการผลิตเป็นพลังงานชีวภาพ อนึ่งประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิประเทศในเขตร้อนชื้น มีปริมาณแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเป็นอย่างดี สามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ตลอดทั้งปี โดยข้อมูลจากการศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อพื้นที่ขนาดเท่ากับพื้นที่ปลูกสบู่ดำ 1 ต้น เป็นเวลา 7 ปี สบู่ดำจะให้น้ำมันร้อยละ 25 ในขณะที่สาหร่ายให้น้ำมันมากถึงร้อยละ 1,000 ปริมาณน้ำมันนี้อาจเพียงพอกระทั่งผลิตเพื่อส่งออกต่างประเทศได้ (ประเวศ, 2553)

3. ผลิตพอลิเมอร์และพลาสติกชีวภาพ

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพแบ่งตามแหล่งกำเนิดวัตถุดิบได้ 2 ประเภทคือ พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี และพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบมวลชีวภาพ (bomass) ปัจจุบันพลาสติกประเภทหลังกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง โดยนักวิทยาศาสตร์ตลอดจนนักธุรกิจและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกำลังตื่นตัวในการคิดค้นหาวัตถุดิบมวลชีวภาพในการผลิตพลาสติกชนิดใหม่เช่น กลุ่มพอลิแลคติก (PLA) หรือพอลิแลคไทด์ กลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHAs) และกลุ่มพอลิไฮดรอกซีบิวไทเรต (PHB) เป็นต้น สาหร่ายขนาดเล็กมีการสะสมสาร Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) (ศิริวิมลและวสุ, 2555) สารนี้สามารถพบได้ในเซลล์ชั้นในของสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอตเป็นส่วนใหญ่ โดยคุณสมบัติที่สำคัญของ PHB คือมีความสามารถทนความร้อนได้สูงไม่ละลายน้ำและสามารถย่อยสลายได้ ส่วนใหญ่ผลิตได้จากกระบวนการหมักจากแบคทีเรีย และไซยาโนแบคทีเรียหรือที่รู้จักกันในชื่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae)

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้ มุ่งเน้นการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก เพื่อให้ได้สายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพในการผลิตสารสำคัญได้แก่ สารแคโรทีนอยด์ พอลิแซ็กคาไรด์ ไขมัน และพอลิเมอร์ชีวภาพ ที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆได้ ตลอดจนการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและสภาวะในการชักนำ (stress condition) ที่เหมาะสมเพื่อให้สาหร่ายขนาดเล็กเกิดการสะสมสารสำคัญไว้ในเซลล์เพิ่มขึ้น โดยปัจจัยในการกระตุ้นที่ทำการศึกษาคือระดับความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยง เพื่อนำไปสู่การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมทำให้ได้ผลผลิตชีวมวลสาหร่ายที่มีปริมาณที่สามารถนำไปพัฒนาสู่การใช้ประโยชน์ต่อไป

บทคัดย่อ

สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่ภายในเซลล์มีการสะสมสารสำคัญที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มสารแคโรทีนอยด์ พอลิแซ็กคาไรด์ ไขมัน และพลาสติกชีวภาพ จากผลการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 6 สายพันธุ์ ที่สามารถนำไปผลิตสารสำคัญได้แตกต่างกันคือ สายพันธุ์ที่ผลิตสารแคโรทีนอยด์ได้แก่ *Coelastrella* sp. (SK-QSGMF6) และ *Coelastrum* sp. (SK-KhY6) สายพันธุ์ที่ผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์ได้คือ *Coelastrum microporum* (A052) สายพันธุ์ที่ผลิตไขมันได้คือ *Botryococcus* sp. (CM01-4) และ *Desmodesmus* sp. (KK20) และสายพันธุ์ที่ผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพได้คือ *Nostoc* sp. (Sm6-3) ผลการศึกษาสูตรอาหารมาตรฐานที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและผลการชักนำการสะสมสารสำคัญด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร Modified Chu-13 และการชักนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ เหมาะสมกับสาหร่าย SK-QSGMF6 แต่ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะเหมาะสมกับสาหร่าย CM01-4 และ KK20 การเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BG-11 และการชักนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ เหมาะสมกับสาหร่าย SK-KhY6 และ A052 และการเพาะเลี้ยงด้วยสูตร BG-11 (N-free) และการชักนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย Sm6-3 ผลการใช้ปุ๋ยเคมีเพื่อทดแทนสูตรอาหารมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงแบบบ่อเปิดขยายขนาด พบว่าปุ๋ย 16-8-8 เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-QSGMF6, SK-KhY6 และ A052 ปุ๋ย 15-15-15 เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย CM01-4 และ KK20 และปุ๋ย 8-24-24 เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย Sm6-3 ผลการศึกษาวิธีการสกัดสารจากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์มีดังนี้ การสกัดสาหร่าย SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 ด้วยเทคนิค SFE ความดัน 500 บาร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้ SK-QSGMF6 ที่มีสารแอสตาแซนทินสูงที่สามารถใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวได้ 0.02 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย SK-KhY6 ที่มีสารไลโคปีนเป็นองค์ประกอบที่สามารถใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์แผ่นมาส์กหน้าที่ใช้เจลว่านหางจระเข้เป็นเบสในปริมาณ 0.015 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาการผลิตสีผงจากเซลล์สาหร่ายเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจำนวน 3 สารสีได้แก่ สารสีคลอโรฟิลล์ (เขียว) และสารสีไฟโคบิลิน (ฟ้า) จากสาหร่าย A052 และสารสีแคโรทีนอยด์ (ส้ม) จากสาหร่าย SK-QSGMF6 ได้วิธีการสกัดสารสีและวิธีผสมกับมอลโตเด็กซ์ทริน และการทำแห้งแบบพ่นฝอยในสภาวะที่เหมาะสม จนได้สีผงแต่ละชนิดที่มีปริมาณสารคลอโรฟิลล์ 38.75 mg/100g สารแคโรทีนอยด์ 19.39 mg/100g และสารไฟโคบิลิน 36.96 mg/100g ตามลำดับ ผลการศึกษาวิธีการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์และใยอาหารจากสาหร่าย A052 ที่เหมาะสมจนได้ปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ 3.97 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สามารถใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ซุปข้าวโพดเพื่อเพิ่มความข้นหนืดได้ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณใยอาหารทั้งหมดที่สกัดได้ 82.16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง หลังการใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้า 3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีปริมาณใยอาหารเพิ่มขึ้น 0.84 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาวิธีการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่าย CM01-4 และ KK20 พบว่าการสกัดชีวมวลสาหร่ายแห้งด้วยตัวทำละลายอะซีโตนสามารถสกัดไขมันได้ 0.1034 และ 0.0942 กรัมต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ หลังการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้ความบริสุทธิ์ของไบโอดีเซล 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่าการทำปฏิกิริยาโดยตรงกับชีวมวลสาหร่ายสด ผลการศึกษาการผลิตพลาสติกชีวภาพจากสาหร่าย Sm6-3 พบว่าหลังการพรีทรีตเมนต์สามารถนำชีวมวลสาหร่ายดังกล่าว มาใช้เป็นส่วนผสมหลักร่วมกับสารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ 30-40 เปอร์เซ็นต์ และแป้งสตาร์ช 20 เปอร์เซ็นต์ ในการขึ้นรูปเป็นแผ่นพลาสติกชีวภาพที่สามารถพับและซีลด้วยความร้อนทำเป็นถุงเพาะชำได้

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Microalgae are low-level organisms in which the cells accumulate important useful substances. From the selection of 6 microalgae strains, the microalgae with identified as follow by bioactive substances *Coelastrella* sp. (SK-QSGMF6) and *Coelastrum* sp. (SK-KhY6), polysaccharides from *Coelastrum* sp. (A052), lipid from *Botryococcus* sp. (CM01-4) and *Desmodesmus* sp. (KK20) and biopolymer from *Nostoc* sp. (Sm6-3). The results of the study of culture media formulas suitable and induction of active metabolites by sodium chloride salt at laboratory scale. Cultured with Modified Chu-13 formula and induction with NaCl 0.3 molar were suitable for SK-QSGMF6, but at NaCl 0.2 molar were appropriated for CM01-4 and KK20. CM01-4 and KK20. Cultured with BG-11 formula and induction with NaCl 0.3 molar were suitable for SK-KhY6 and A052. Cultured with BG-11 (N-free) formula and induction with NaCl 0.1 molar were suitable for Sm6-3. The results of the use of fertilizers to replace the standard formula in the open pond cultivation showed that fertilizer 16-8-8 was suitable for cultivating SK-QSGMF6, SK-KhY6 and A052. Fertilizer 15-15-15 was suitable for cultivating CM01-4 and KK20. Fertilizer 8-24-24 was suitable for cultivating Sm6-3. The application of important substances extracted from each of microalgae are as follows: The extraction of SK-QSGMF6 and SK-KhY6 by SFE technique, pressure 500 bar, temperature 60 °C obtained carotenoids at 5.2 and 4.28 mg/g DW, respectively. Application of carotenoid extract form SK-QSGMF6 with high astaxanthin can be added at 0.02% in skin care serum products. Carotenoid extract form SK-KhY6 with lycopene was used as an ingredient in a 0.015% of mask sheet. Production of powder paints for use in the food industry total of 3 pigments were studied: chlorophyll (green) and phycobilin (blue) from A052, carotenoid pigment (orange) from SK-QSGMF6. Extraction of chlorophyll or carotenoid used 95% ethanol, the extract was mixed with maltodextrin and water at a ratio of 1:1:1 (v/w/w). After drying, the pigment powder content chlorophyll 38.75 mg/100g and carotenoid 19.39 mg/100g, respectively. Phycobilin was extracted by mixing microalgae with water at ration of 1:1 (w/w). After drying, the pigment powder content Phycobilin 36.96 mg/100g. The extraction of polysaccharides and dietary fibers from A052 and using them as ingredients in food products. It was found that the extraction of microalgae in solid insoluble in alcohol with water in ratio of 1: 1 at 70°C for 70 min yielded of polysaccharides at 3.97 % (dry basis). It can be used as a thickening agent in corn soup products at 1.5 percent. Dietary fiber content from microalgae extracted by alcohol yielded 89.35 % (dry basis). The total dietary fiber content was 82.16 % (dry basis). After adding 3% of dietary fiber in pasta products, the fiber content was increased by 0.84%. The results of the study on biodiesel production from microalgae CM01-4 and KK20 showed that extraction from dried algae with acetone was extracted lipids at 0.1034 and 0.0942 g/g DW, respectively. After the transesterification reaction, the purity of biodiesel was 80 percent, which was higher than the direct reaction with fresh algae biomass. A study on the production of bioplastics from algae Sm6-3 showed that wet biomass was pretreated using the main ingredient in mixing with 30-40% polyvinyl alcohol and 20% starch to form a bio-plastic sheet. It can be folded, molded and heat sealed to make a planting bag.

มรภ.บุรีรัมย์

กิจกรรมที่ 1
การพัฒนาสาหร่ายขนาดเล็กที่มีสารสำคัญสูง
The Development of Microalgae with High Content of Active Substances

นราทร สุขวิเสส[1]* วิมลวรรณ วัฒนวิจิตร[1] จารุวรรณ์ รัตนสกุลธรรม[1] ปาริชาติ อยู่แพทย์[1]
สุปรียา ศุขเกษม[1] และ วุฒิพล จันทร์สระคู[2]

คำสำคัญ
สาหร่ายขนาดเล็ก การเพาะเลี้ยง แคโรทีนอยด์ ไขมัน พอลิแซ็กคาไรด์ และพอลิเมอร์ชีวภาพ

Keywords
Microalgae Cultivation Carotenoid, Lipid, Polysaccharides, Biopolymer

กรมวิชาการเกษตร

[1] กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
[2] สถาบันเกษตรวิศวกรรม

บทคัดย่อ

การพัฒนาสาหร่ายขนาดเล็กที่มีสารสำคัญสูงดำเนินการทดลองที่กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ระหว่างปี 2560 – 2562 โดยวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารสำคัญที่มีประโยชน์ สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตชีวมวลสูง การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสะสมสาระสำคัญ และพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาดแบบบ่อเปิด (open raceway pond) โดยผลการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพในการให้สารสำคัญที่มีประโยชน์เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ ได้แก่ สายพันธุ์ *Coelastrella* sp. (SK-QSGMF6) และ *Coelastrum* sp. (SK-KhY6) ให้สารแคโรทีนอยด์ สายพันธุ์ *Coelastrum microporum* (A052) ให้สารพอลิแซ็กคาไรด์ สายพันธุ์ B*otryococcus* sp. (CM01-4) ให้ไขมันหรือน้ำมัน และ สายพันธุ์ *Nostoc* sp. (Sm6-3) ให้สารพอลิเมอร์ชีวภาพได้ จากผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กทั้งหมด 4 สูตร คือ BBM, C-medium, BG-11 และ Modified Chu-13 ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ พบว่าสูตร Modified Chu-13 เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-QSGMF6 และ CM01-4 สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ $2.31x10^6$ และ $6.20x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และใช้ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 15 และ 25 วันตามลำดับ สูตรอาหารมาตรฐาน BG-11 เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-KhY6 และ A052 สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ $1.29x10^6$ และ $1.28x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 15 วันเท่ากัน และสูตรอาหารมาตรฐาน BG-11 (N-free) เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย Sm6-3 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด $2.45x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 15 วัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอิทธิพลในการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 โมลาร์ พบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ สาหร่าย Sm6-3 มีการสะสมสารพอลิเมอร์ชีวภาพสุงสุดที่ 1.62 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สาหร่าย CM01-4 มีการสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ได้สูงสุด 39 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ สาหร่าย SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 มีการสะสมแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ได้สูงสุด 3.45 และ 3.56 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง และสาหร่าย A052 มีการสะสมพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด 6.51 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง การใช้ปุ๋ยเคมีทางการเกษตรแทนสูตรอาหารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-QSGMF6, SK-KhY6 และ A052 เจริญเติบโตได้ดีด้วยอาหารปุ๋ย 16-8-8 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ $7.12x10^5$, $1.26x10^6$ และ $1.24x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และผลการกระตุ้นด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ สาหร่าย SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 ให้ปริมาณสารสกัดแคโรทีนอยด์ 3.65 และ 3.56 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนสาหร่าย A052 ให้สารพอลิแซ็กคาไรด์ 6.51 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง สาหร่ายไอโซเลท CM01-4 เจริญเติบโตได้ดีด้วยอาหารปุ๋ย 15-15-15 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 6.76×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีปริมาณไขมันในเซลล์ 41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก หลังการถูกกระตุ้นด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และสาหร่าย Sm6-3 เจริญเติบโตได้ดีด้วยอาหารปุ๋ย 8-24-24 มีอัตราการให้ผลผลิตเท่ากับ 0.53 กรัมต่อลิตร หลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ได้ปริมาณสารสกัดพอลิเมอร์ชีวภาพ 0.33 กรัมต่อกรัมสาหร่ายสด

กรมวิชาการเกษตร

Abstracts

The development of microalgae with high active substances was carried out by experiments at Postharvest and Processing Research and Development Division during 2017-2019. The objective was to identify microalgae species with high potential to produce useful active substances. The study of culture medium formula for culturing for high biomass yield, appropriate factors to stimulate the accumulation of essence and develop a system for cultivating microalgae at the open raceway pond. The important substances can be extracted from the microalgae cells with strain identified isolate by sequence as follows bioactive substances *Coelastrella* sp. (SK-QSGMF6) and *Coelastrum* sp. (SK-KhY6), polysaccharide from *Coelastrum microporum* (A052), lipid from *Botryococcus* sp. (CM01-4) and biopolymer from *Nostoc* sp. (Sm6-3). The results of 4 standard culture media formulas as BBM, C-medium, BG-11 and Modified Chu-13, cultured under laboratory conditions. The results revealed that Modified Chu-13 formula is suitable for culture of isolate SK-QSGMF6 and CM01-4. The highest growth rate of each isolate is 2.31×10^6 and 6.20×10^5 CFU with 15 and 25 cultivation days, respectively. The BG-11 formula is suitable for culture of isolate SK-KhY6 and A052. The highest growth rate of each isolate 1.29×10^6 and 1.28×10^6 CFU with 15 days cultivation same. In BG-11 (N-free) formula suitable for isolate Sm6-3 give the highest growth rate of 2.45×10^6 CFU with 15days cultivation. In addition, studies induce to accumulate of important substances in microalgae cells by adding NaCl at the concentration of 0.1, 0.2 and 0.3 molar. The results showed that the addition of NaCl 0.1 molar is suitable for the isolate Sm6-3 the biopolymer maximum biomass was 1.62 %wt. The concentration of NaCl 0.2 molar is suitable for isolate CM01-4 Maximum lipid accumulation in cells is 39 %wt. The concentration of NaCl 0.3 molar isolate SK-QSGMF6 and SK-KhY6 has accumulated carotenoids within the cells up to 3.45 and 3.56 mg/g_{dried} and isolate A052 had the highest accumulation of polysaccharide 6.51 % dry weight. Therefore, this study was conducted to study the impacts of chemical fertilizer usage compared with standard culture media formulas. The results showed that culture media of microalgae isolate SK-QSGMF6, SK-KhY6 and A052 with chemical fertilizer formula 16-8-8 had the highest growth rate of 7.12×10^5, 1.26×10^6 and 1.24×10^6 cells/ml, respectively. The effect of salinity in culture media from concentration of sodium chloride at 0.3 molar, SK-QSGMF6 and SK-KhY6 gave carotenoid extracts 3.65 and 3.56 mg/g_{dried}. Isolate A052 gave total polysaccharides at 6.51%wt. Microalgae isolate CM01-4 with chemical fertilizer formula 15-15-15 had the highest growth rate of 6.76×10^5 cells/ml. The effect of salinity in culture media from concentration of sodium chloride at 0.2 molar, CM01-4 gave lipid at 41 %wt. Microalgae isolate Sm6-3 using fertilizer formula 8-24-24 gave yield 0.53 g/L. The effect of salinity in culture media from concentration of sodium chloride at 0.1 molar gave biopolymer by 0.33 %wt.

บทนำ (Introduction)

สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมีโครงสร้างอย่างง่าย การจัดเรียงตัวของเซลล์ไม่ซับซ้อนประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ ไม่มีเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เฉพาะ ไม่มีท่อลำเลียง ราก ลำต้น และใบที่แท้จริง สาหร่ายขนาดเล็กสามารถสร้างอาหารได้เองโดยการสังเคราะห์ด้วยแสงเช่นเดียวกับพืชชั้นสูง แต่มีความพิเศษที่แตกต่างคือ ต้นทุนการเพาะเลี้ยงต่ำเนื่องจากมีอัตราการให้ผลผลิตต่อพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงสูง และไม่มีผลกระทบต่อการเพาะปลูกพืชการเกษตรอื่น โดยสามารถนำพื้นที่ที่เสื่อมโทรมมาดัดแปลงเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ได้ อีกทั้งยังให้ผลพลอยได้มูลค่าสูง วิทวัส (2553) ได้อธิบายกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายขนาดเล็กแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

- ออโตโทรฟิค (Autotrophic) เป็นพวกที่สามารถสร้างอาหารเองได้โดยการสังเคราะห์ด้วยแสงและใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างอาหาร เช่น ไซยาโนแบคทีเรียที่มีการสังเคราะห์ด้วยแสงคล้ายพืชชั้นสูง สาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีแดง และสาหร่ายสีน้ำตาล เป็นต้น
- เฮเทอโรโทรฟิค (Heterotrophic) เป็นพวกที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ด้วยการเปลี่ยนคาร์บอนอนินทรีย์ให้เป็นสารอินทรีย์ (โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน) จึงต้องมีการบริโภคสารอินทรีย์เข้าสู่เซลล์ โดยใช้คาร์บอนจากสารประกอบคาร์บอน เป็นสารประกอบอินทรีย์ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียสีม่วง (purple bacteria), green sulfur bacteria และ Heliobacteria เป็นต้น

การใช้ประโยชน์ของสาหร่ายขนาดเล็ก มี 2 รูปแบบ คือ ใช้ผลิตเป็นอาหารและใช้ในเชิงพาณิชย์ โดยสาหร่ายขนาดเล็กที่นำมาผลิตเป็น ผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภค ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว ในตระกูล *Chlorella*, *Scenedesmus* และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในตระกูล *Spirulina* เป็นต้น สำหรับสาหร่ายขนาดเล็กที่เป็นที่สนใจในการนำ มาใช้ในทางการค้า โดยจากการรวบรวมข้อมูลของ นุชนาถ แชมช้อย (2557) การนำผลผลิตจากสาหร่ายขนาดเล็กมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว (flagellate) ในตระกูล *Dunaliella* สาหร่ายสีแดงในตระกูล *Porphyridium* และ สาหร่ายสีเขียวในตระกูล *Botryococcus* นอกจากนี้ ยังมีการทดลองนำสาหร่ายขนาดเล็ก มาทดลองเพื่อสกัดโปรตีนและแคโรทีนอยด์ เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นในอาหารเลี้ยง ปลาดุกบิ๊กอุย และพบว่า สาหร่ายขนาดเล็ก *Aphanothece saxicola* มีประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนได้ถึง 330.62 µg/mL โดยกระบวนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กให้ได้ผลผลิตชีวมวลสูงๆ นั้นขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัย ดังนี้

1) รูปแบบของการเพาะเลี้ยง ได้แก่ การเพาะเลี้ยงในบ่อเปิด และการเพาะเลี้ยงโดยใช้ถังปฏิกรณ์

2) อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ประกอบด้วย ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ โปตัสเซียม และธาตุอาหารอื่นๆ

3) แหล่งของคาร์บอน (คาร์บอนไดออกไซด์)

นอกจากนั้น ยังมีปัจจัยอื่นอีก ได้แก่ แสง ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ออกซิเจน ค่าสัดส่วนระหว่างไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ทั้งนี้ กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายขนาดเล็ก จะเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดในช่วงความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่าง 1-5% (โดยปริมาตร) และในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ควรมีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง เนื่องจาก มีอิทธิพลต่อความหลากหลายของสารอนินทรีย์คาร์บอนในรูปต่างๆ ได้แก่ CO_2 และ $HCO3^-$ รวมทั้ง อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีผลแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก ส่วนปริมาณออกซิเจนที่ละลายสะสมอยู่ในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หากมีปริมาณสูงเกินไป จะส่งผลต่อการอยู่รอดของสาหร่ายขนาดเล็ก

โดยรูปแบบการเพาะเลี้ยงและปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยรูปแบบของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กแบบบ่อเปิดและการเพาะเลี้ยงโดยใช้ถังปฏิกรณ์ มีข้อดีและข้อจำกัดของการ

กรมวิทยาศาสตร์

เพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ผู้ที่สนใจการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเชิงพาณิชย์จึงต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยง ชนิดของสาหร่าย และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ รวมทั้งสภาพแวดล้อมของพื้นที่ที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยง ยกตัวอย่างเช่น การเพาะเลี้ยงระบบเปิดกลางแจ้งแบบบ่อจะเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงในเชิงธุรกิจ เนื่องจากจะสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตชีวมวลได้ในปริมาณมาก ทำความสะอาดพื้นที่เพาะเลี้ยงได้ง่ายภายหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต และราคาก่อสร้างและการเลี้ยงถูกว่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบปิด (Photobioreactor) ซึ่งจากงานวิจัยของ Karthikeyan et al. (2016) ได้ออกแบบบ่อเพาะเลี้ยงแบบเปิดปริมาตร 1,000 ลิตร (ขนาดกว้าง 4.26 ม. ยาว 1.8 ม. ความลึก 0.44 ม.) เพื่อใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Chroococcus turgidus* ด้วยสูตรอาหาร CFTRI medium พบว่าในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 15-20 วัน เหมาะสำหรับการเก็บเกี่ยวชีวมวลสาหร่าย และมีความคุมค่าทางเศรษฐศาสตร์ โดยในระยะเวลา 10 ถึง 15 วัน หลังการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตสูงสุดและจะเริ่มสะสมปริมาณคลอโรฟิล, β-carotene, โปรตีน, ระดับคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดอะมิโน และเพื่อเป็นการลดต้นทุนด้านอาหารเพาะเลี้ยงยังมีการศึกษาการใช้ปุ๋ยทางการเกษตรของ Shankha *et al.* (2019) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus accuminatus* ในแบบบ่อเปิด (raceway ponds) โดยใช้อาหารปุ๋ยที่มีต้นทุนต่ำและทำการเพาะเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิห้องและสภาพอากาศภายนอกตามฤดูกาล (ฤดูร้อน ฝน และหนาว) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วง 26–39°C, ความชื้น 57–90%, ความเข้มของแสงอาทิตย์ (อุณหภูมิห้อง: 44–65, ภายนอก: 28–41 k lux), ค่า pH ของน้ำเพาะเลี้ยง (6.5–10.6) และค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ (5.5–13.1) ตลอดฤดูกาล พบว่า *S. accuminatus* ให้มวลชีวภาพสูง 1.2 และ 1.11 gL^{-1} ตามลำดับ ที่ความลึกของน้ำ 30 ซม. ความเร็วใบพัด 65 รอบต่อนาที และแวมารือนี มะดีเยาะ (2561) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* ในเชิงพาณิชย์จากโรงเรือน โดยเลี้ยงในถังพลาสติก ขนาด 200 ลิตร เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ ซึ่งมีสูตรอาหาร 3 สูตร ได้แก่ 1) โซเดียมไนเตรทกับไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2) ปุ๋ยสูตรเสมอ 16-16-16 และ 3) ยูเรียร่วมกับแอมโมเนียมไนเตรทและไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่าสาหร่ายไส้ไก่ที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยสูตร 16-16-16 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยของสาหร่ายไส้ไก่ที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 27,694.52±48.59 รองลงมาเป็นสูตรโซเดียมไนเตรทผสมกับไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ส่วนปุ๋ยยูเรียร่วมกับแอมโมเนียมไนเตรทและไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต มีการเจริญเติบโตต่ำที่สุด และสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยสูตร 16-16-16 ยังมีปริมาณสารคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี แคโรทีนอยด์ และเซนโทฟิลล์สูงกว่าสูตรอื่นๆด้วย

แนวทางการใช้ประโยชน์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีการสะสมสารสำคัญแต่ละชนิด

1. อาหารเพื่อสุขภาพและเวชสำอาง

1.1 การผลิตสารแคโรทีนอยด์สำหรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

สาหร่ายสีเขียวทุกชนิดมีรงควัตถุหลักที่พบ 3 ชนิด คือ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน โดยรงควัตถุที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงคือ แคโรทีนอยด์ (carotenoid) สามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมด้านอาหาร เครื่องสำอาง และเวชภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ โดยสารแคโรทีนอยด์นั้นสามารถแบ่งได้ออกเปน 2 กลุม คือ กลุมแคโรทีน (carotene) เปนโมเลกุลที่ประกอบดวยสายไฮโดรคารบอน ทำใหเปนสารไมมีขั้ว และละลายไดในไขมัน ไดแก เบต้า-แคโรทีน และไลโคพีน เปนตน และกลุมแซนโทฟล (xanthophyll) มีอะตอมของออกซิเจนอยูในโมเลกุล จึงมีขั้วมากกวาและละลายในไขมันไดนอยกวาแคโรทีนอยดกลุมแรก ไดแก ลูทีน (lutein) ซีแซนทิน (zeaxanthin) และแอสตาแซนทิน (astaxanthin) เป็นต้น โดยสารนี้พบได้มากในกลุ่มสาหร่ายสีแดง (*Haematococcus Pluvialis*) (Kim *et al.*, 2011) ปัจจุบันสาหร่ายชนิดนี้จึงกลายเป็นแหล่งวัตถุดิบสำคัญในการผลิตสารแอสตาแซนทินเชิงพาณิชย์

Abe *et al.* (2007) ได้ศึกษาผลของ inorganic nitrogen ในสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Coelastrella striolata* พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) เท่ากับ 0.3 ต่อวัน สาหร่ายมีการสะสมแคโรทีนอยด์สูงถึง 56 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง Qin *et al.* (2008) ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดการสะสมสารแอสตาแซนทินของสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus obliquus* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน โดยสภาวะแรกทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการให้อากาศ 0.6 $L.min^{-1}$ ที่ความเข้มแสง 80 $mmol.m^{-2}.s^{-1}$ และสภาวะที่สองทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพิ่มความเข้มแสงเป็น 180 $mmol.m^{-2}.s^{-1}$ ใช้เวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง พบว่าสาหร่ายมีการสะสมสารแอสตาแซนทินเพิ่มสูงขึ้นถึง 44.66 เปอร์เซ็นต์ และผลการทดสอบการใช้แคโรทีนอยดชนิดต่าง ๆ ในการกำจัดอนุมูลอิสระ พบว่าแอสตาแซนทินมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ในปริมาณการใช้น้อยที่สุด

1.2 พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์ เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลของน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์หลายโมเลกุลเชื่อมต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ด้วยพันธะไกลโคสิดิก ซึ่งชนิดที่พบมากในพืชทั่วไปคือ สตาร์ช (starch) เซลลูโลส และเพกติน พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นการเชื่อมต่อกันของโมโนเมอร์ชนิดเดียวกันเรียกว่า โฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น สตาร์ช เดกซ์ทริน เซลลูโลส และเพกติน แต่ถ้าเป็นคนละชนิดกันเรียกว่า เฮทเทอร์โรพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น เฮมิเซลลูโลส อัลจินิก (alginic) และกัม (gums) พอลิแซ็กคาไรด์ที่น้ำย่อยในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้เรียกว่า ใยอาหาร (fiber) ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถสกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็กได้แก่ เอการ์หรือวุ้น (agar) อัลจิเนต (alginate) และคาราจีแนน (carageenan) ได้มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารเป็นสารที่ให้ความข้น (thickening) ทำให้เกิดความคงตัว (stabilizing) และทำให้เกิดลักษณะเป็นเจล (gelling)

สายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีการสะสมพอลิแซ็กคาไรด์นั้น มีทั้งที่เป็นกลุ่มสาหร่ายสีเขียวและสาหร่ายสีแดง โดยวงศ์เทวัญ และคณะ (2559) ได้ศึกษาวิธีการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) ด้วยน้ำร้อนร่วมกับการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิค พบว่าสามารถสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 401.54 มิลลิกรัมต่อกรัมสาหร่าย หรือ 40.15 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดงนั้น เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถควบคุมอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ (Li *et. al.*, 2011) และสามารถเสริมสร้างหรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ (Schaeffer and Krylov, 2000) ศิริลักษณ์ และคณะ (2557) ได้ศึกษาวิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดงสายพันธุ์ *Gracilaria fisheri* ด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ปริมาณ 5.41 และ 9.66 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้งตามลำดับ โดยมีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบหลักและมีปริมาณซัลเฟตอยู่ 6.86 และ 8.95 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การศึกษาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากปริมาณฟีนอลิค พบว่าสารสกัดที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณฟีนอลิคสูงถึง 10.06 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของสารสกัด นอกจากนี้สารสกัดที่อุณหภูมิห้องยังมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DPPH

2. ผลิตเป็นพลังงานทดแทน

สาหร่ายขนาดเล็กบางสายพันธุ์มีการสะสมอาหารไว้ในรูปของไขมันเป็นจำนวนมาก ซึ่งไขมันดังกล่าวจะมีมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ โดยพบว่ามีหลายสายพันธุ์มีไขมันเป็นองค์ประกอบสูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง เช่น สาหร่าย *Botryococcus braunii* มีปริมาณน้ำมัน25-80 เปอร์เซ็นต์ *Neochloris oleoabundans* มีปริมาณน้ำมัน 35-65 เปอร์เซ็นต์ หรือ *Schizochytrium* sp. มีปริมาณน้ำมัน 50-77 เปอร์เซ็นต์เป็นต้น (Chisti, 2007) ซึ่งจะเห็นได้ว่าสาหร่ายขนาดเล็กมีศักยภาพในการพัฒนาสู่การผลิตไบโอ

ดีเซล เพราะมีอัตราการให้น้ำมันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปริมาณน้ำมันกับชีวมวลที่ผลิตได้ เนื่องมาจากสาหร่ายขนาดเล็กมีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้มากกว่าพืชน้ำมันอื่น ๆ ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคด้านต่าง ๆ ดังรายงานบางส่วนต่อไปนี้

Qin (2005) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus braunii* ในอาหารสูตร Modified Chu 13 ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 0.15 โมลาร์ และความเข้มข้นแสง 60 วัตต์ต่อตารางเมตร ทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตดีที่สุด และ Dayananda *et al*. (2007) ได้ศึกษาชนิดของสูตรอาหารที่มีต่อการเจริญและสะสมน้ำมันของสาหร่าย โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะแบบให้แสงในอัตราการให้แสง : ไม่ให้แสง เป็น 16:8 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า modified Chu 13 medium และ BG11 ให้ปริมาณการสะสมน้ำมันสูง โดยพบว่าโพแทสเซียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด สามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ชีวมวล 1.2 กรัมต่อลิตร และสะสมน้ำมันได้ 30-35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในขณะเดียวกันเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ชีวมวลของสาหร่าย 0.9 กรัมต่อลิตร และสะสมน้ำมันได้ 28-35 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าสาหร่ายจะผลิตกรดไขมันที่มีสายคาร์บอนยาวขนาดน้อยกว่า C_{20}

Miao and Wu (2006) ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella protothecoides* โดยใช้อาหารสูตร Basal medium ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค และเฮทเทอโรโทรฟิค พบว่าในสภาวะเฮทเทอโรโทรฟิค สาหร่ายมีการสะสมน้ำมันสูงถึง 55.2 เปอร์เซ็นต์ โดยมากกว่าสภาวะออโตโทรฟิคประมาณ 4 เท่า (14.57 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นนำไปศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน ที่มีกรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล คือ เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันที่ 56:1 โมลาร์ ทำให้ได้ crude lipid ออกมาจากเซลล์สาหร่ายเป็นปริมาณสูงถึง 55.2 เปอร์เซ็นต์

จากผลการวิจัยของ Rao *et al.* (2007) ได้ใช้อาหารสูตร Modified Chu 13 ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยให้คาร์บอนไดออกไซด์ตลอดระยะการเพาะเลี้ยงพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ให้ผลผลิตชีวมวลสูงถึง 2 กรัมต่อลิตร มีน้ำมันสะสมสูงถึง 14-28 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณกรดไขมันชนิดปาลมิติกและโอเลอิกเพิ่มขึ้น 2.5-3 เท่า Hossain *et al*. (2008) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Oedogonium* sp. และ *Spirogyra* sp. ผลการสกัดน้ำมันจากเซลล์สาหร่ายโดยใช้ เฮกเซน:อีเทอร์ อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เปอร์เซ็นต์น้ำมันเท่ากับ 9.2 และ 7.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันพบว่าสาหร่าย *Oedogonium* sp. สามารถผลิตน้ำมันไบโอดีเซลที่มีความบริสุทธิ์เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่าที่ผลิตได้จากสาหร่าย *Spirogyra* sp. ที่ได้เท่ากับ 92 เปอร์เซ็นต์

3. ผลิตพอลิเมอร์และพลาสติกชีวภาพ

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพแบ่งตามแหล่งกำเนิดวัตถุดิบได้ 2 ประเภทคือ พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี และพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบมวลชีวภาพ (biomass) ปัจจุบันพลาสติกประเภทหลังกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง โดยนักวิทยาศาสตร์ตลอดจนนักธุรกิจและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกำลังตื่นตัวในการคิดค้นหาวัตถุดิบมวลชีวภาพในการผลิตพลาสติกชนิดใหม่เช่น กลุ่มพอลิแลคติก (PLA) หรือพอลิแลคไทด์ กลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHAs) และกลุ่มพอลิไฮดรอกซีบิวไทเรต (PHB) เป็นต้น สาหร่ายขนาดเล็กมีการสะสมสาร Poloy-3-hydroxybutyrate (PHB) (ศิริวิมลและวสุ, 2555) สารนี้สามารถพบได้ในเซลล์ชั้นในของสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอตเป็นส่วนใหญ่ โดยคุณสมบัติที่สำคัญของ PHB คือมีความสามารถทนความร้อนได้สูงไม่ละลายน้ำและสามารถย่อยสลายได้ ส่วนใหญ่ผลิตได้จากกระบวนการหมักจากแบคทีเรีย และไซยาโนแบคทีเรียหรือที่รู้จักกันในชื่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) โดยผลการศึกษาสายพันธุ์สาหร่ายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียของ Sabbir and Tasneem (2016) พบว่าสายพันธุ์ *Nostoc muscorum* NCCU-442 มีการสะสมสาร PHB สูงสุด 6.44 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

กรมวิทยาศาสตร์

และสายพันธุ์สาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina platensis* NCCU-S5) มีการสะสมสาร PHB เพียง 0.51 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่สายพันธุ์ *Cylindrospermum* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Plectonema* sp. ไม่พบการสะสมสาร PHB การมีอยู่ของเม็ด PHB ใน *Nostoc muscorum* NCCU- 442 นั้นได้รับการยืนยันด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีการย้อมสีดำซูดานและไนล์เรดเอ และผลศึกษาการกระตุ้นภายใต้ความเครียดจากการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 – 2 กรัมต่อลิตร หลังการเพาะเลี้ยงครบ 7 วัน พบว่าเซลล์สาหร่ายมีการสะสม PHB เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่ากับ 7.74 และ 8.15 เปอร์เซ็นต์ ที่ปริมาณเกลือ 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีการสะสม PHB เท่ากับ 7.63 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้ มุ่งเน้นการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่ได้จากการรวบรวมตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติตามรายภาคของประเทศไทยของประยูร และคณะ (2557) เพื่อให้ได้สายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพในการผลิตสารสำคัญได้แก่ สารแคโรทีนอยด์ พอลิแซ็กคาไรด์ ไขมัน และพอลิเมอร์ ตลอดจนการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและสภาวะในการชักนำ (stress condition) ที่เหมาะสมเพื่อให้สาหร่ายขนาดเล็กเกิดการสะสมสารสำคัญไว้ในเซลล์เพิ่มขึ้น โดยปัจจัยในการกระตุ้นที่ทำการศึกษาคือระดับความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยง เพื่อนำไปสู่การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมทำให้ได้ผลผลิตชีวมวลสาหร่ายที่มีปริมาณที่สามารถนำไปพัฒนาสู่การใช้ประโยชน์ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สายพันธุ์สาหร่าย

สายพันธุ์สาหร่ายบริสุทธิ์จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ SK-QSGMF6, NM-PM1-3, SK-KhY6, A052, CM01-4, KK20, BR52-1 และ Sm6-3 จากห้องปฏิบัติการสาหร่าย กลุ่มวิจัยและพัฒนาการแปรรูปผลิตผลเกษตร กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

2. อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารอาหารมาตรฐานสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ Modified chu 13, BG-11, BBM และ C medium (ภาคผนวก ก)
2. สารเคมีสำหรับการสกัดไขมันได้แก่ เมทานอล กรดซัลฟูริก เฮกเซน เอทานอล
3. สารเคมีสำหรับการสกัดพอลิเมอร์ชีวภาพ ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ คลอโรฟอร์ม และกรดซัลฟูริก
4. สารเคมีสำหรับย้อมเซลล์ ได้แก่ สีซูดาน แบล็กบี และสีไนโกรซิน
5. ปุ๋ยเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงได้แก่ สูตร 15-15-15, 16-8-8, 12-6-30, 8-24-24 และ 12-24-12
6. ถังพลาสติกสำหรับขยายหัวเชื้อขนาด 100 ลิตร
7. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
8. ตู้อบลมร้อน KOTTERMANN 2736
9. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง Mettler Toledo ME204
10. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง Mettler RM480 DeltaRange
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง พีเอช Meter UB-10, Denver Instrument
12. เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer, Shinadzu: รุ่น UV-2600
13. เครื่องสกัดสารโดยใช้ความดัน (Supercritical fluid extraction, SFE: รุ่น
14. หม้อนึ่งฆ่าเชื้ออัดความดัน (ยี่ห้อ: HIRAYAMA, รุ่น HICLAVE HVA-110)
15. กล้องจุลทรรศน์ (ยี่ห้อ: OLYMPUS รุ่น: BX40)
16. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (ยี่ห้อ: HETTICH ZENTRIFUGEN รุ่น: MIKRO 22R)
17. เครื่องปั่นแยกกากเซลล์จุลินทรีย์อัตโนมัติ (ยี่ห้อ: GEA Westfalia รุ่น: SSE10-06-007)

วิธีการ

1. การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารสำคัญ และการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญ

1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีการสะสมสารสำคัญชนิดต่าง ๆ

นำหัวเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์จากหลอดอาหารเหลวกลุ่มสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ได้แก่ SK-QSGMF6, NM-PM1-3, SK-KhY6, A052, CM01-4, KK20 และ BR52-1 มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตร Modified Chu 13 และสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ ได้แก่ Sm6-3 มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตร BG-11 ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณอาหารเหลว 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง และให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เป็นเวลา 30 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสาหร่ายในการทดลองขั้นต่อไป ดังนี้

1.1.1 การตรวจสอบการสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มสารแคโรทีนอยด์ที่มีอยู่ในเซลล์สาหร่าย

นำเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กมาตรวจสอบลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงสีของเซลล์จากสีเขียวจนเป็นสีส้มหรือแดง และการสกัดสารแคโรทีนอยด์ทั้งหมดออกจากชีวมวลแห้งของสาหร่าย

กรมวิชาการเกษตร

ขนาดเล็กด้วยเทคนิค Supercritical fluid extraction (SFE) ด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้สภาวะวิกฤติยิ่งยวด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 300 บาร์ มาวิเคราะห์หาค่าความเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) โดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Kim and Lee (2002) ด้วยการปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร และสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลต่อลิตร ปริมาตร 5.8 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด 30 นาที จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณค่าการจับกับอนุมูล DPPH มาคำนวณค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยสมมูลกับสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox)

1.1.2 การตรวจสอบการสะสมสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ในเซลล์สาหร่าย

นำเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กมาตรวจสอบลักษณะทางสรีระวิทยาของเซลล์สาหร่าย เพื่อดูลักษณะวงใส (capsule) ที่เกิดจากการสะสมสารพอลิแซ็กคาไรด์อยู่รอบนอกของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย และยืนยันผลด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์สาหร่ายแบบเนกาทีฟ โดยใช้สีไนโกรซิน เพื่อดูลักษณะวงใสรอบนอกของเซลล์

1.1.3 การตรวจสอบการสะสมไขมันที่อยู่ในเซลล์สาหร่าย

นำเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กมาตรวจสอบการสะสมไขมันภายในเซลล์ด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์สาหร่าย ด้วยสีซูดาน แบล็กบี เพื่อดูการย้อมติดสีของหยดไขมันที่มีอยู่ภายในเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดลองนำไปสกัดน้ำมันด้วยวิธี *In-situ* acidic transesterification จากเซลล์สาหร่ายแบบเปียก (wet algal biomass) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Liu *et al*. (2008) แล้วนำมาศึกษาลักษณะโครมาโตแกรมของไขมันที่สกัดได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC)

1.1.4 การตรวจสอบการสะสมสารพอลิเมอร์ชีวภาพที่อยู่ในเซลล์สาหร่าย

นำเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ Sm6-3 มาตรวจสอบการสะสมสารพอลิเมอร์ชีวภาพภายในเซลล์ด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์สาหร่าย ด้วยการย้อมสีซูดาน แบล็กบี ดัดแปลงจากวิธีของ Burdon (1946) โดยเตรียมแผ่นฟิล์มของเซลล์สาหร่ายไซยาโนแบคทีเรียบนแผ่นสไลด์ดังนี้

1) หยดเซลล์ลงบนแผ่นสไลด์และรอจนเซลล์แห้งจึงตรึงรอยแผ่นฟิล์มหรือรอยเสมียร์ด้วยเปลวไฟ
2) จุ่มแผ่นสไลด์ในสารละลาย 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซูดาน แบล็กบี ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที
3) ล้างสีในส่วนที่เกินออกด้วยน้ำสะอาดหรือจุ่มใน xylene หลายๆครั้ง แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง
4) ย้อมทับด้วยสารละลาย 0.5 เปอร์เซ็นต์ safranin ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาที
5) ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำสะอาดแล้วซับให้แห้ง แล้วหาเม็ดสีน้ำเงินเข้มหรือจุดดำภายในเซลล์สาหร่าย (สารพอลิเมอร์ที่มีภายในเซลล์) ด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.1.5 การระบุชนิดของสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

นำโคโลนีของแต่ละสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.1 ถึง 1.4 เพียง 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณอาหารเหลว 250 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้หัวเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สำหรับสกัดดีเอ็นเอและทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ 18S rDNA แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ของ National Center for Biotechnology Information โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (NCBI BLAST)

1.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

ทำการคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยนำหัวเชื้อสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่ผ่านการคัดเลือกการสะสมสารสำคัญชนิดต่าง ๆ จากข้อ 1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทั้งหมด 4 ชนิด โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ 4 กรรมวิธี คือ

กรมวิทยาศาสตร์

กรรมวิธีที่ 1 สูตรอาหารมาตรฐาน Modified Chu-13
กรรมวิธีที่ 2 สูตรอาหารมาตรฐาน BG-11 (หรือ BG-11 N Free สำหรับสาหร่าย SM6-3)
กรรมวิธีที่ 3 สูตรอาหารมาตรฐาน BBM
กรรมวิธีที่ 4 สูตรอาหารมาตรฐาน C-Medium

ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะแบบออโตโทรฟิค ที่มีอัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง 16 ต่อ 8 ชั่วโมง ความเข้มแสงประมาณ 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้องเฉลี่ยประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส โดยทุกกรรมวิธีจะเก็บตัวอย่างเพื่อติดตามการเจริญเติบโตทุก 2 วัน นำไปวิเคราะห์การเจริญโดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 400 เท่า แล้วคำนวณจำนวนเซลล์ของสาหร่าย (ยุวดี และฉมาภรณ์, 2546) จนกระทั่งสาหร่ายเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) เพื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง

1.3 การศึกษาอิทธิพลในการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์จากข้อ 2 มาใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อศึกษาอิทธิพลในการสะสมสารสำคัญภายในเซลล์ โดยการกระตุ้นด้วยสภาวะความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยงสาหร่ายจากการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เพื่อดูผลการสะสมสารสำคัญ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์
กรรมวิธีที่ 2 เติมโซเดียมคลอไรด์ในน้ำเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
กรรมวิธีที่ 3 เติมโซเดียมคลอไรด์ในน้ำเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์
กรรมวิธีที่ 4 เติมโซเดียมคลอไรด์ในน้ำเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้น 0.3 โมลาร์

โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสมและจำนวนวันในการเพาะเลี้ยงที่ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุดจากผลข้อ 2 จากนั้นเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เพื่อปรับสภาพความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นของเกลือตามกรรมวิธีข้างต้น ติดตามผลการเพาะเลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 15 วัน โดยมีการเก็บตัวอย่างทุก 5 วัน นำมาปั่นแยกเก็บตัวอย่างสาหร่ายด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และทำการวัดปริมาณสารสำคัญชนิดต่าง ๆ ที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์

การสกัดสารสำคัญชนิดต่าง ๆ จากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์ มีดังนี้

- ปริมาณสารสกัดแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ใช้เซลล์สาหร่ายแห้ง 1 กรัม มาสกัดด้วยเทคนิค SFE ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 300 บาร์
- ปริมาณไขมัน ดัดแปลงจากวิธีการของ Liu *et al.* (2008) ใช้เซลล์สาหร่ายสด 10 กรัม เติมเมทานอล 30 มิลลิลิตร และกรดซัลฟูริก 1 กรัม ทำปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายไประเหยเมทานอลออก ชั่งน้ำหนักปริมาณสารที่ได้
- ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด ดัดแปลงจากวิธีการของ Kuda *et al*. (2005) และ Qi *et al.* (2005) ใช้เซลล์สาหร่ายแห้ง 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เพื่อทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำร่วมกับการใช้ autoclave (assisted by autoclaving) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกเอาส่วนสารละลายใส มาตกตะกอนด้วยเอทานอล จะได้ตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์ (Total polysaccharides extract, TPE)
- ปริมาณพอลิเมอร์ชีวภาพทั้งหมด ดัดแปลงจากของ John and Ralph (1960) ใช้เซลล์สาหร่ายแห้ง 1 กรัม เติมคลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แล้วนำบ่มอีกครั้งในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการ

กรมวิชาการเกษตร

ดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณของพอลิเมอร์ด้วยกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

2. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาด

2.1 การออกแบบบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

ออกแบบบ่อเพาะเลี้ยงแบบเปิดนอกห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาด (ดัดแปลงจาก Karthikeyan *et al.,* 2016) ได้แก่ บ่อปริมาตร 500 ลิตร จำนวน 6 บ่อ ปริมาตร 5,000 ลิตร จำนวน 2 บ่อ และปริมาตร 10,000 ลิตร จำนวน 1 บ่อ มีรายละเอียดดังนี้

2.1.1 บ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดความจุ 500 ลิตร มีรายละเอียดดังนี้

1) บ่อคอนกรีตเสริมเหล็ก ขนาด 1.3 x 2.8 x 0.6 เมตร จำนวน 6 บ่อ

2) ใบพัดสแตนเลส (Paddle Wheel) จำนวน 6 ชุด

3) มอเตอร์ไฟฟ้าขนาด 1.5 kw. ทดรอบเฟืองโซ่ 30-50 rpm. จำนวน 6 ชุด

2.1.2 บ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดความจุ 5,000 ลิตร มีรายละเอียดดังนี้

1) บ่อคอนกรีตเสริมเหล็ก ขนาด 2.4 x 6.9 x 0.6 เมตร จำนวน 2 บ่อ

2) ใบพัดสแตนเลส (Paddle Wheel) จำนวน 2 ชุด

3) มอเตอร์ไฟฟ้าขนาด 1.5 kw. ทดรอบเฟืองโซ่ 30-50 rpm. จำนวน 2 ชุด

2.1.3 บ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดความจุ 10,000 ลิตร มีรายละเอียดดังนี้

1) บ่อคอนกรีตเสริมเหล็ก ขนาด 2.4 x 13.0 x 0.6 เมตร จำนวน 1 บ่อ

2) ใบพัดสแตนเลส (Paddle Wheel) จำนวน 2 ชุด

3) มอเตอร์ไฟฟ้าขนาด 1.5 kw. ทดรอบเฟืองโซ่ 30-50 rpm. จำนวน 2 ชุด

2.2 พัฒนาการใช้ปุ๋ยแทนสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระดับห้องปฏิบัติการ

นำสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์มาเพียง 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐานในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค ที่มีอัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง 16 ต่อ 8 ชั่วโมง ความเข้มแสงประมาณ 2,500 ลักซ์ เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายจนได้หัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 1 ลิตร จึงนำมาวัดการเจริญเติบโตสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เมื่อมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.3 สำหรับใช้หัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็ก

2.2.1 การหาอัตราการใช้ปุ๋ยเคมีต่อน้ำเพาะเลี้ยงเพื่อทดแทนสูตรอาหารมาตรฐาน

นำหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็ก SK-QSGMF6 และ CM01-4 มาศึกษาอัตราการใช้ปุ๋ยเคมีต่อน้ำเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 สูตรอาหารมาตรฐาน Modified Chu-13

กรรมวิธีที่ 2 สูตรอาหารปุ๋ย 16-8-8 อัตราส่วนปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยง 1/100

กรรมวิธีที่ 3 สูตรอาหารปุ๋ย 16-8-8 อัตราส่วนปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยง 1/500

กรรมวิธีที่ 4 สูตรอาหารปุ๋ย 15-15-15 อัตราส่วนปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยง 1/100

กรรมวิธีที่ 5 สูตรอาหารปุ๋ย 15-15-15 อัตราส่วนปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยง 1/500

โดยทำการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ในห้องปฏิบัติการภายใต้สภาวะแบบออโตโทรฟิค ที่มีอัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง 16 ต่อ 8 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้องเฉลี่ยประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส โดยทุกกรรมวิธีจะเก็บตัวอย่างเพื่อติดตามการเจริญเติบโตต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน แล้วเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายในแต่ละกรรมวิธี เพื่อหาอัตราส่วนการใช้ปุ๋ยเคมีต่อน้ำเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก

กรมวิชาการเกษตร

2.2.2 การพัฒนาสูตรอาหารจากปุ๋ยเคมีที่เหมาะสมการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก

คัดเลือกอัตราการใช้ปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2.1 เพื่อนำไปพัฒนาการใช้อาหารจากปุ๋ยเคมีที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและเปรียบเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐานที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-KhY6 และ A052 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ 3 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 สูตรอาหารมาตรฐาน BG-11

กรรมวิธีที่ 2 สูตรอาหารปุ๋ย 16-8-8 โดยคัดเลือกอัตราส่วนปุ๋ยต่อน้ำจากข้อ 2.1

กรรมวิธีที่ 3 สูตรอาหารปุ๋ย 15-15-15 โดยคัดเลือกอัตราส่วนปุ๋ยต่อน้ำจากข้อ 2.1

และพัฒนาการใช้อาหารจากปุ๋ยเคมีที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย Sm6-3 และใช้อัตราส่วนปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยงที่คัดเลือกจากการทดลองข้อ 2.1 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 สูตรอาหารมาตรฐาน BG-11 (NFree)

กรรมวิธีที่ 2 สูตรอาหารปุ๋ย 15-15-15

กรรมวิธีที่ 3 สูตรอาหารปุ๋ย 12-6-30,

กรรมวิธีที่ 4 สูตรอาหารปุ๋ย 12-24-12

กรรมวิธีที่ 5 สูตรอาหารปุ๋ย 8-24-24

2.3 การทดสอบขยายผลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในบ่อขยายขนาดแบบบ่อเปิด

2.3.1 ขยายหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์ต่อน้ำเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายในอัตราส่วน 1 ต่อ 100 (ประยูร เอ็นมาก และคณะ, 2558) ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 100 ลิตร และวัดการเจริญเติบโตสาหร่ายขนาดเล็กด้วยครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เมื่อมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.3 สำหรับใช้เลี้ยงในบ่อขยายขนาด

2.3.2 เติมน้ำประปาลงในบ่อเพาะเลี้ยงขยายขนาดแบบบ่อเปิด (Raceway ponds) ให้ได้ปริมาตร 500 ลิตร

2.3.3 เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกสูตรอาหารปุ๋ยและอัตราการใช้ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์จากการทดลองในข้อ 2 และปรับค่ากรด-ด่าง ด้วยสารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ของน้ำเพาะเลี้ยงให้อยู่ในช่วง 6.8 – 7.0

2.3.4 เติมหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กในอัตราส่วน 1 ลิตรต่อน้ำเพาะเลี้ยง 100 ลิตร เพาะเลี้ยงโดยใช้แสงจากธรรมชาติ ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ และมีการใช้ใบพัดในการหมุนเวียนการไหลของน้ำและสัมผัสอากาศ

2.3.5 เติมโซเดียมคลอไรด์หลังวันที่สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด หรือเข้าสู่ช่วงแรกของระยะพักตัว (Early stationary phase) โดยใช้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อสายพันธุ์จากการทดลองข้อ 1.2 และ 1.3

2.3.6 หลังครบกำหนดการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์ภายหลังการเติม NaCl ทำการเก็บเกี่ยวด้วยเครื่องปั่นแยกกากเซลล์จุลินทรีย์อัตโนมัติ

- ระยะเวลา (เริ่มต้น-สิ้นสุด) ตุลาคม 2559 ถึง กันยายน 2562
- สถานที่ดำเนินงาน กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

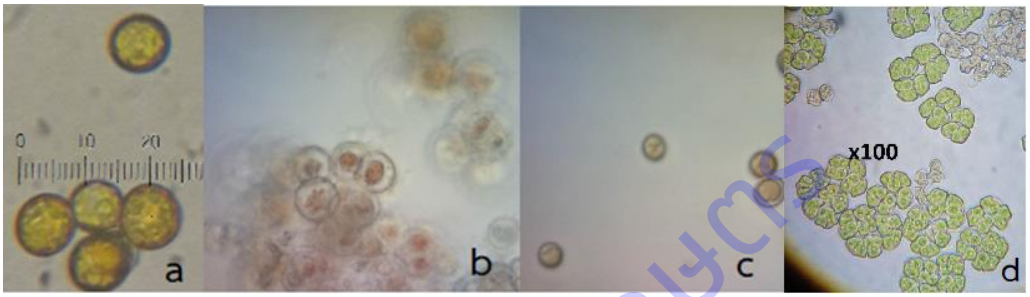
ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Results and Discussion)

1. การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารสำคัญ และการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญ

1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีการสะสมสารสำคัญชนิดต่าง ๆ

1.1.1 การตรวจสอบการสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มสารแคโรทีนอยด์ที่มีอยู่ในเซลล์สาหร่าย

จากนำเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่ได้คัดแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์จากทั้งหมด 8 สายพันธุ์ พบสาหร่าย 4 สายพันธุ์ ที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงสีได้แก่ SK-QSGMF6, NM-PM1-3, SK-KhY6 และ CM01-4 ภายหลังการเพาะเลี้ยงไว้ระยะเวลาหนึ่งเซลล์สาหร่ายจะมีการสะสมสารแคโรทีนอยด์ไว้ภายในเซลล์มากขึ้น ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีส้มหรือแดง โดยการส่องดูสรีระวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะสังเกตเห็นโคโลนีที่เกิดการเปลี่ยนสีดังตัวอย่างที่แสดงในภาพที่ 1

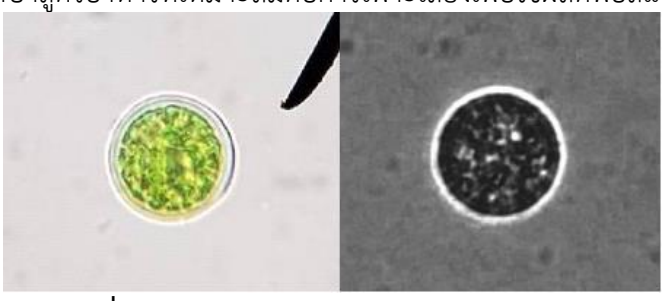


ภาพที่ 1 ลักษณะสรีระวิทยาของเซลล์สาหร่าย a) SK-QSGMF6 b) NM-PM1-3 c) SK-KhY6 และ d) CM01-4

หลังการนำชีวมวลแห้งของสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 4 สายพันธุ์ มาทำการสกัดสารแคทีนอยด์ทั้งหมด ด้วยเครื่องสกัด SFE และนำสารสกัดไปทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) โดยวิธี DPPH assay โดยใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสาหร่าย SK-QSGMF6, NM-PM1-3, SK-KhY6 และ CM01-4 มีค่าการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 10.60, 9.63, 13.78 และ 5.00 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 จึงคัดเลือกสายพันธุ์นี้ไปศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ผลิตสารแคโรทีนอยด์ต่อไป

1.1.2 การตรวจสอบการสะสมสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ในเซลล์สาหร่าย

ผลการตรวจสอบลักษณะทางสรีระวิทยาของเซลล์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่ภายนอกเซลล์มีลักษณะวงใสๆ (capsule) ที่เกิดจากการสะสมสารพอลิแซ็กคาไรด์อยู่รอบนอกของเซลล์ และผลการยืนยันด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์สาหร่ายแบบเนกาทีฟ โดยใช้สีไนโกรซิน ผลการย้อมสีเซลล์สาหร่าย พบว่ามีเพียงสาหร่าย A052 มีลักษณะของวงใส อยู่รอบเซลล์ในปริมาณสูง ดังแสดงในภาพที่ 2 จึงคัดเลือกสายพันธุ์นี้ไปศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

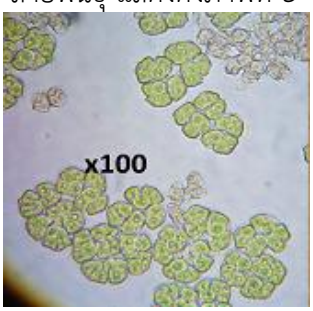


ภาพที่ 2 ลักษณะสรีระวิทยาของเซลล์สาหร่าย A052

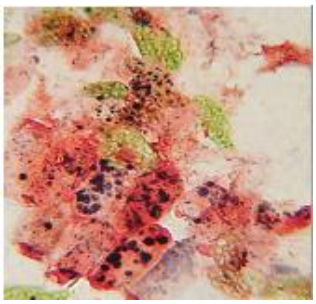
1.1.3 การตรวจสอบการสะสมไขมันที่อยู่ในเซลล์สาหร่าย

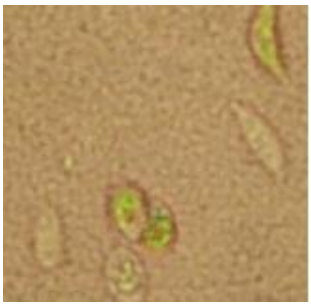
กรมวิทยาศาสตร์

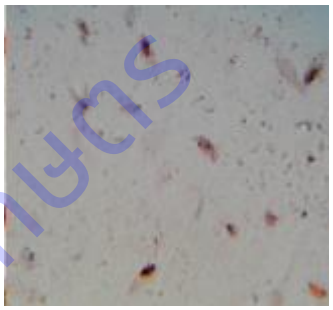
ผลการตรวจสอบลักษณะทางสรีระวิทยาของเซลล์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่เม็ดไขมันสะสมไว้ภายในเซลล์พบว่ามีสาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ CM01-4, KK20 และ BR52-1 ที่เห็นลักษณะของเม็ดไขมันภายในเซลล์และผลการยืนยันด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์สาหร่ายด้วยสีซูดาน แบล็กบี เพื่อดูปริมาณหยดไขมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบจุดสีดำอยู่ภายในเซลล์ของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ แสดงดังภาพที่ 3

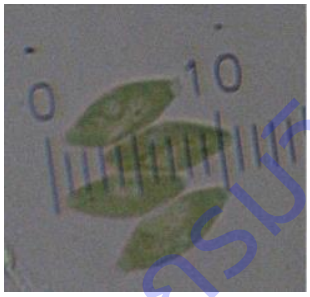


เซลล์สาหร่าย CM01-4

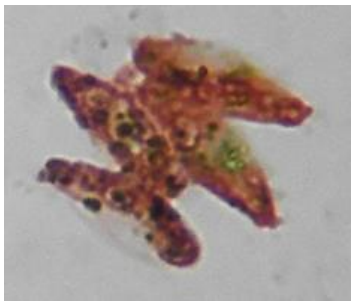

เซลล์สาหร่าย CM01-4 หลังย้อมสี


เซลล์สาหร่าย BR52-1


เซลล์สาหร่าย BR52-1 หลังย้อมสี



เซลล์สาหร่าย KK20


เซลล์สาหร่าย KK20 หลังย้อมสี

ภาพที่ 3 สรีระวิทยาของเซลล์สาหร่ายก่อนและหลังการย้อมสีเซลล์ด้วยสีซูดาน แบล็กบี ของแต่ละสายพันธุ์

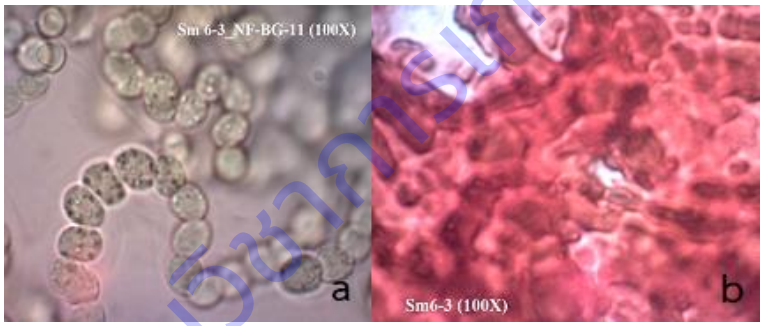
หลังทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวลภายใต้สภาวะแบบออโตโทรปิกและนำไปสกัดน้ำมันด้วยวิธี *In-situ* acidic transesterification จากเซลล์สาหร่ายแบบเปียก (wet algal biomass) แล้วนำมาศึกษาลักษณะของโครมาโตแกรมของไขมันที่สกัดได้ด้วยแผ่น TLC แสดงดังภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์พบว่าน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่าย CM01-4 และ KK20 มีความใกล้เคียงกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน FAME (Fatty acid methylester) โดยที่ผลของสาหร่าย CM01-4 ใกล้เคียงที่สุด จากข้อมูลดังกล่าวจึงเลือกสายพันธุ์นี้ เป็นตัวแทนในการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ผลิตไขมันต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 4 (a) ชีวมวลของสาหร่ายที่ปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง
(b) ลักษณะชั้นน้ำมันและเซลล์ของสาหร่ายหลังจากการสกัดน้ำมันด้วยกรดซัลฟูริค
(c) โครมาโตแกรมของกรดไขมันจากสาหร่าย BR52-1 KK20 และ CM01-4

1.1.4 การตรวจสอบการสะสมสารพอลิเมอร์ชีวภาพที่อยู่ในเซลล์สาหร่าย

ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์สาหร่าย Sm6-3 ที่ได้จากรากคอรัลลอยด์ของปรง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าเซลล์มีการเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย trichome ประกอบด้วย vegetative cell และ heterocyst cell เรียงสลับหรืออยู่ปลายสุดของเส้นสาย ซึ่งเป็นลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Nostoc* sp. หลังการย้อมด้วยสีซูดาน แบล็กบี และดูลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าภายในเซลล์มีเม็ดสีน้ำเงินเข้มหรือสีดำภายในเซลล์เป็นจำนวนมากแสดงดังภาพที่ 5 จึงนำสายพันธุ์นี้มาศึกษาขยายผลด้วยสูตรอาหารอื่นที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อใชผลิตสารพอลิเมอร์ชีวภาพต่อไป



ภาพที่ 5 สรีระวิทยาของเซลล์สาหร่าย Sm6-3 (a) เซลล์ปกติ และ (b) การย้อมเซลล์ด้วยสีซูดาน แบล็กบี

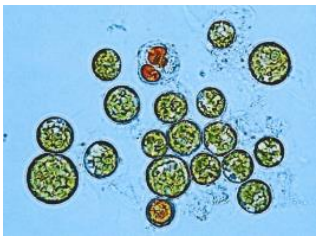
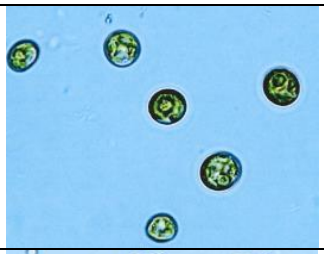
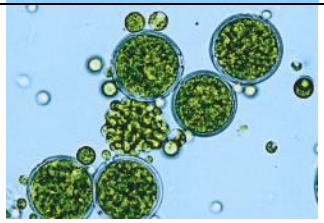
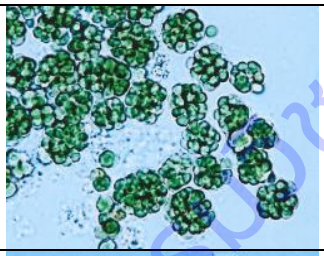
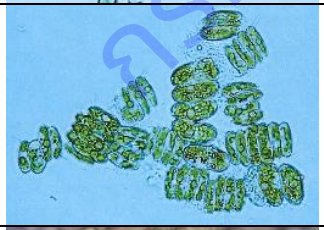
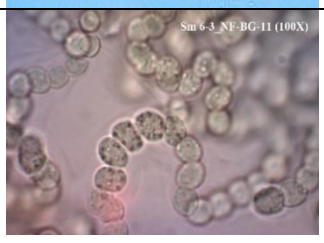
1.1.5 การจัดจำแนกสายพันธุ์สาหร่าย

ผลจากการนำสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ SK-QSGMF6 ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำบริเวณป่าชายเลนของศูนย์สิริกิติ์ จ.สมุทรสงคราม, SK-KhY6 ที่คัดแยกได้จากอ่างเก็บน้ำคลองยาง จ.สระแก้ว, A052 ที่คัดแยกได้จากอ่างเก็บน้ำบึงเสือไฟ จังหวัดพิจิตร, CM01-4 ที่คัดแยกได้จากอ่างเก็บน้ำแม่เหียะ จ.เชียงใหม่ และ Sm6-3 ที่คัดแยกได้จากรากอากาศของปรง ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส 18S rRNA SEQUENCING โดยศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับของนิวคริโอไทด์กับฐานข้อมูลใน Gen Bank ด้วยโปรแกรม NCBI Blast ร่วมกับภาพถ่ายทางสรีระวิทยาของเซลล์สาหร่าย สามารถระบุสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก พบว่าสาหร่าย SK-QSGMF6 ที่จำแนกได้มีขนาดของเซลล์ 5 - 10 ไมโครเมตร และมีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกับ *Coelastrella* sp. สาหร่าย SK-KhY6 ที่จำแนกได้มีขนาดของเซลล์ประมาณ 5 ไมโครเมตร และมีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Coelastrum* sp., สาหร่าย A052 ที่จำแนกได้มีขนาดของเซลล์ประมาณ 10-20 ไมโครเมตร และมีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกับ *Coelastrum microporum*, CM01-4 ที่จำแนกได้เซลล์จะมีการเกาะเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ประมาณ 20-30 ไมโครเมตร และมีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกับ *Botryococcus* sp. และสายพันธ์สุดท้ายสาหร่าย Sm6-3 ที่จำแนกได้

กรมวิชาการเกษตร

เป็นสาหร่ายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษะเซลล์ต่อกันเป็นสายมีขนาดความยาวไม่แน่นอน และมีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกับ *Nostoc* sp. ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดสายพันธุ์สาหร่าย ภาพถ่ายเซลล์ และสถานที่เก็บตัวอย่าง

ไอโซเลท	สรีระวิทยาของเซลล์	รายละเอียด
SK-QSGMF6		สถานที่เก็บตัวอย่าง : ป่าชายเลนของศูนย์สิริกิติ์ จ. สมุทรสงคราม กลุ่มสาหร่ายสีเขียว Division: Chlorophyta Family: *Coelastrella* sp. ขนาดเซลล์ : 5 – 10 µm
SK-KhY6		สถานที่เก็บตัวอย่าง : อ่างเก็บน้ำคลองยาง จ.สระแก้ว กลุ่มสาหร่ายสีเขียว Division: Chlorophyta Family: *Coelastrum* sp. ขนาดเซลล์ : 5 µm
A052		สถานที่เก็บตัวอย่าง : อ่างเก็บน้ำบึงเสือไฟ จังหวัดพิจิตร กลุ่มสาหร่ายสีเขียว Division: Chlorophyta Family : *Coelastrum microporum* Size of cell: 10-20 µm
CM01-4		สถานที่เก็บตัวอย่าง : อ่างเก็บน้ำแม่เหียะ จ.เชียงใหม่ กลุ่มสาหร่ายสีเขียว Division: Chlorophyta Family: *Botryococcus* sp. เซลล์เกาะเป็นกลุ่มขนาด : 20 – 30 µm
KK20		สถานที่เก็บตัวอย่าง : อ่างเก็บน้ำแก่งละว้า จังหวัดขอนแก่น กลุ่มสาหร่ายสีเขียว Division: Chlorophyta Family: *Desmodesmus* sp. เซลล์เกาะเป็นกลุ่มขนาด : 10 - 20 µm
SM6-3		สถานที่เก็บตัวอย่าง : รากอากาศของปรง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Division: Cyanophyta Family: *Nostoc* sp. เซลล์เรียงต่อกันเป็นเส้นสาย

1.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

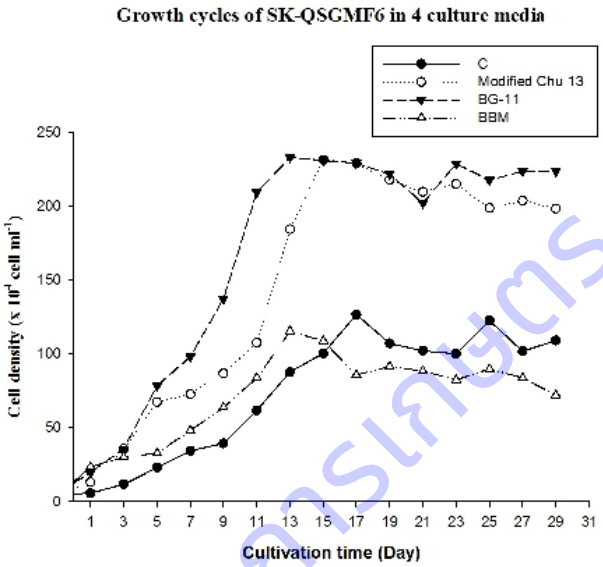
ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายกลุ่มที่มีการสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พอลิแซ็กคาไรด์ ไขมัน และพอลิเมอร์ชีวภาพ ด้วยสูตรอาหารมาตรฐาน 4 สูตรได้แก่ Modified chu 13, BG-11, BBM และ C

กรมวิชาการเกษตร

medium ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบออโตโทรปิกที่มีอัตราการให้แสง : ไม่ให้แสง เป็น 16: 8 ชั่วโมงต่อวัน โดยแบ่งตามกลุ่มสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารสำคัญ ดังนี้

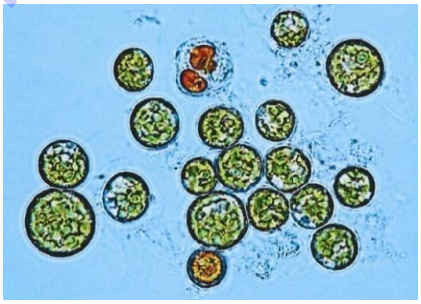
1.2.1 สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มที่มีการสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มสารแคโรทีนอยด์

ผลจากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย SK-QSGMF6 (ภาพที่ 6) มี 2 สูตรด้วยกันคือ สูตร BG-11 และ Modified Chu 13 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดใกล้เคียงกันเท่ากับ 2.33×10^6 และ 2.31×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 13 และ 15 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ C medium และ BBM มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงมาคือ 1.27×10^6 และ 1.15×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาเวลา 17 วัน และ 13 วันตามลำดับ



ภาพที่ 6 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย SK-QSGMF6 ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ

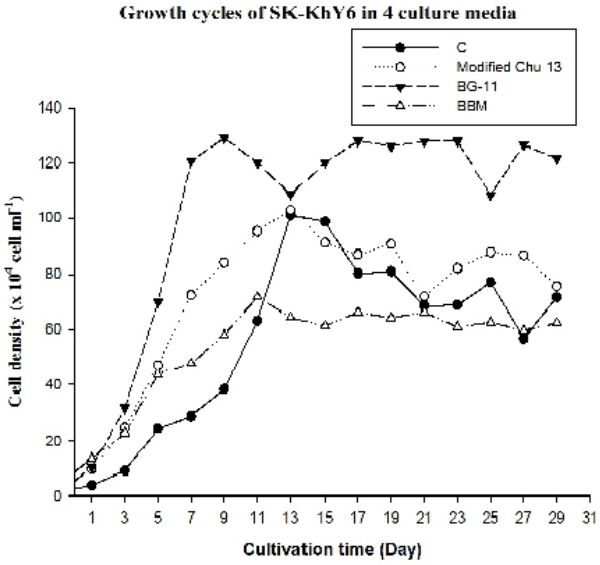
ทั้งนี้จากการสังเกตสีของเซลล์สาหร่ายสีเขียวตลอดระยะการเพาะเลี้ยง 30 วันพบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตร BG-11 เซลล์สาหร่ายไม่มีการเปลี่ยนแปลงสี ซึ่งต่างกับเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตร Modified Chu 13 ที่สีของเซลล์เริ่มมีการเปลี่ยนเป็นสีส้มที่บ่งบอกถึงการสะสมของสารแคโรทีนอยด์ได้ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ลักษณะเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก SK-QSGMF6 ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Modified Chu 13

ส่วนผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-KhY6 (ภาพที่ 8) พบว่าสูตรที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมากที่สุดคือ BG-11 มีอัตราการเจริญที่สูงที่สุดคือ 1.29×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 9 วัน ส่วนอาหารสูตร Modified Chu 13 และ C medium สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันที่ประมาณ 1.03×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลาเพาะเลี้ยง 13 วันเท่ากัน ในขณะที่อาหารสูตร BBM มีอัตราการเจริญต่ำที่สุดคือ 0.72×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 11 วัน ส่วนผลการตรวจสอบสีของเซลล์หลังการเลี้ยง 30 วัน พบว่าเซลล์สาหร่ายยังมีการเปลี่ยนแปลงสีไม่มาก จึงนำผลการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BG-11 ไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

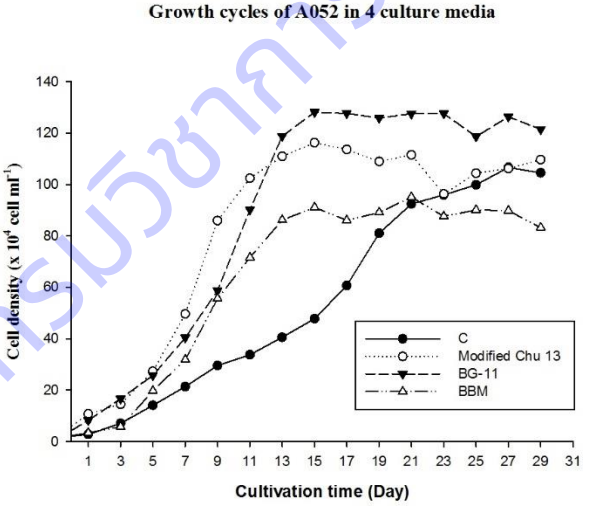
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 8 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย SK-Khy6 ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ

1.2.2 สาหร่ายขนาดเล็กที่มีการสะสมสารพอลิแซ็กคาไรด์

ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย A052 แสดงดังภาพที่ 9 พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงคือ BG-11 มีอัตราการเจริญที่สูงที่สุดคือ 1.28×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 15 วัน ในขณะที่ Modified Chu 13, BBM และ C medium มีอัตราการเจริญที่สูงที่สุดคือ 1.18×10^6, 0.97×10^6 และ 1.08×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15, 21 และ 27 วันตามลำดับ

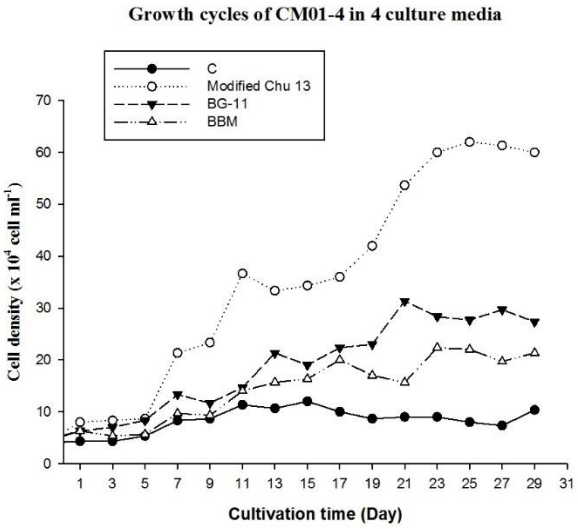


ภาพที่ 9 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย A052 ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ

1.2.3 สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มที่มีการสะสมไขมัน

ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย CM01-4 แสดงดังภาพที่ 10 พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงคือ Modified Chu 13 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 6.02×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 25 วัน รองลงมาคือสูตร BG-11 และ BBM มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 3.13×10^5 และ 2.23×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 และ 23 วันตามลำดับ ในขณะที่สูตร C medium มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด

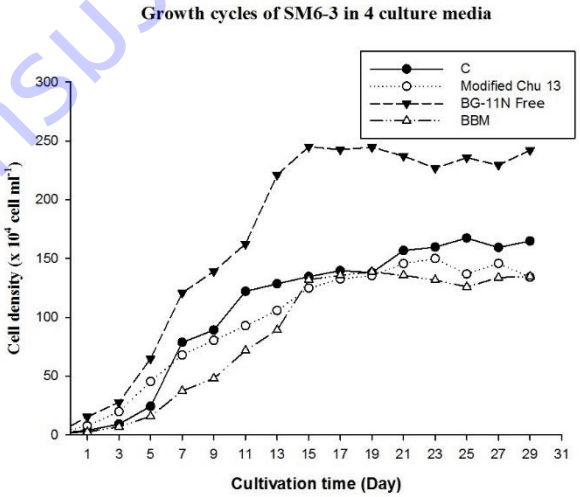
ศูนย์วิชาการเกษตร



ภาพที่ 10 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย CM01-4 ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ

1.2.4 สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มที่มีการสะสมสารพอลิเมอร์ชีวภาพ

จากลักษณะเซลล์ของสาหร่ายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เป็นชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกันในรากปรงแบบเอนโดไฟต์ (endophyte) ทำให้สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (N_2-fixation) (อานนท์ และคณะ, 2558) และผลการศึกษาของประยูรและคณะ (2558) ที่มีการเปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร BG-11 เปรียบเทียบสูตรอาหาร BG-11 N Free จากการปรับปรุงสูตรด้วยการไม่เติมธาตุอาหารไนโตรเจนลงไป พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันเท่ากับ 1.03×10^7 และ 9.96×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากปัจจัยด้านต้นทุนอาหารในการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมธาตุอาหารไนโตรเจนสามารถลดต้นทุนค่าอาหารเพาะเลี้ยงลงได้มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการทดลองจึงเปลี่ยนสูตรอาหารในกรรมวิธีเปรียบเทียบจาก BG-11 เป็น BG-11 N Free ร่วมกับสูตรอาหารอีก 3 สูตรได้แก่ Modified Chu 13, BBM และ C medium ที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นส่วนผสมในปริมาณน้อยกว่าจากสูตรอาหาร BG-11 สูตรปกติ



ภาพที่ 11 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย SM6-3 ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ

ผลการทดลองดังภาพที่ 11 พบว่า สูตรอาหาร BG-11 (NFree) สามารถทำให้สาหร่ายขนาดเล็กไอโซเลท SM6-3 มีอัตราการเจริญที่สูงที่สุดคือ 2.45×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 15 วัน ในขณะที่ BBM, C medium และ Modified Chu 13 มีอัตราการเจริญสูงสุดที่น้อยกว่าคือ 1.75×10^6, 1.67×10^6 และ 1.50×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 19, 25 และ 23 วันตามลำดับ แสดงว่าธาตุไนโตรเจนที่

กรมวิทยาศาสตร์

มีอยู่ในสูตรอาหารไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญของสาหร่ายกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ เพราะในสูตรอาหารทั้ง 3 สูตรที่อัตราการเจริญเติบโตมีค่าน้อยกว่าสูตรอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน

1.3 การศึกษาอิทธิพลในการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

ผลการศึกษาการกระตุ้นเซลล์สาหร่ายให้มีการสะสมสารแต่ละชนิดไว้ภายในเซลล์ ด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในน้ำเพาะเลี้ยงหลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ในวันที่สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุดแล้วหรือเข้าสู่ช่วงแรกของระยะพักตัว (Early stationary phase) โดยการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 โมลาร์ ในสูตรอาหารที่เหมาะสมกับสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ โดยสูตรอาหาร Modified chu 13 เหมาะสมกับสาหร่าย SK-QSGMF6 และ CM01-4 ส่วนสูตรอาหาร BG-11 เหมาะสมกับสาหร่าย SK-KhY6 และ A052 และ BG-11 (NFree) เหมาะสมกับสาหร่าย Sm6-3 ได้ผลดังนี้

1.3.1 การกระตุ้นการสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มสารแคโรทีนอยด์

ผลการนำชีวมวลสาหร่าย SK-QSGMF6 หลังการเพาะเลี้ยงครบ 15 วัน และสาหร่าย SK-KhY6 หลังการเพาะเลี้ยงครบ 9 วัน มาสกัดสารแคโรทีนอยด์ที่เซลล์สาหร่ายมีการสะสมไว้ก่อนการเติมเกลือ NaCl พบว่าสาหร่าย SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 มีปริมาณสารแคโรทีนอยด์สะสมเท่ากับ 2.62 และ 2.86 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ภายหลังการชักนำด้วยสภาวะความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยงจากการเติมเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเพาะเลี้ยงต่อเนื่องอีก 15 วัน พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการสะสมแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ได้สูงสุด 3.45 และ 3.56 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ หรือเพิ่มขึ้นมากกว่า 31 และ 24 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารสกัดที่ได้ก่อนการเติมเกลือและมีความแตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ ของแต่ละสายพันธุ์ดังตารางที่ 2 ทั้งนี้ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาณสารสกัดที่ได้ยังมากกว่า 13 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปริมาณสารที่สกัดได้จากชีวมวลสาหร่ายก่อนเติมเกลือ NaCl

ตารางที่ 2 ปริมาณสารสกัดแคโรทีนอยด์ทั้งหมดจากชีวมวลสาหร่าย SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 หลังการเติมเกลือ NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ NaCl	สารสกัดแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (mg/g_{dried})	
	SK-QSGMF6	SK-KhY6
0 โมลาร์	1.89d	2.55d
0.1 โมลาร์	2.63c	2.81c
0.2 โมลาร์	2.97b	3.18b
0.3 โมลาร์	3.45a	3.56a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

จากผลการศึกษาการสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มสารแคโรทีนอยด์นั้นของสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ SK-QSGMF6 (*Coelastrella* sp.) และ SK-Khy6 (*Coelastrum* sp.) พบว่าสาหร่าย SK-Khy6 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถให้ปริมาณสารสกัดแคโรทีนอยด์และค่าความเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สูงกว่า รวมทั้งระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่รวมระยะเวลาในการกระตุ้นด้วยเกลือก็น้อยกว่ากันถึง 6 วัน โดยศักยภาพในการผลิตสารแคโรทีนอยด์ทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับผลของ Ganesh *et al.* (2015) พบว่าสายพันธุ์ *Coelastrella oocystiformis* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร BG11 และกระตุ้นการเพาะเลี้ยงด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 10 วัน สามารถสกัดสารแคโรทีนอยด์จากชีวมวลสาหร่ายได้ 1.97 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง โดยองค์ประกอบของสารแคโรทีนอยด์นั้นประกอบด้วย เบต้าแคโรทีน, ลิวทีน, แอสตาแซนธิน, แคนทาแซนธิน และไฟโตฟลูอีน และผลการศึกษาองค์ประกอบของสารแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย

กรมวิชาการเกษตร

สายพันธุ์ *Coelastrum* sp. ของ Monrawat *et. al.* (2019) พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร BG-11 เป็นเวลา 14 วัน ภายใต้สภาวะความเค็มของเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิโมล สารแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้มีแอสตาแซนธิน แคนทาแซนธิน และลูทีน เป็นส่วนประกอบหลัก

1.3.2 การกระตุ้นการสะสมสารพอลิแซ็กคาไรด์

ผลการนำชีวมวลสาหร่าย A052 หลังการเพาะเลี้ยงครบ 15 วัน มาสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด (Total polysaccharides extract, TPE) ที่เซลล์สาหร่ายมีการสะสมไว้ก่อนการเติมเกลือ NaCl พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์นี้มีปริมาณ TPE เท่ากับ 4.12 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ภายหลังการชักนำด้วยสภาวะความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยงจากการเติมเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเพาะเลี้ยงต่อเนื่องอีก 15 วัน พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายมีการสะสม TPE ได้สูงสุด 6.51 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ดังตารางที่ 3 และที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 0.1 โมลาร์ ยังมีการสะสมสารเพิ่มขึ้น 5.02 และ 4.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หรือเพิ่มขึ้นมากกว่า 58 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณสารที่ได้จากชีวมวลสาหร่ายก่อนเติมเกลือ

ตารางที่ 3 ปริมาณสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากชีวมวลสาหร่าย A052 หลังการเติมเกลือ NaCl ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ NaCl	สารพอลิแซ็กคาไรด์ (%DCW)
0 โมลาร์	4.11d
0.1 โมลาร์	4.75c
0.2 โมลาร์	5.02b
0.3 โมลาร์	6.51a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

จากผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย A052 สายพันธุ์ *Coelastrella* sp. ที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ลักษณะวงใสๆ ที่ห่อหุ้มเซลล์ (capsule) ในอาหาร BG-11 เป็นเวลา 15 วัน และการกระตุ้นอีก 15 วัน พบว่าปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดที่สกัดได้มีปริมาณน้อยกว่าที่ได้จากสายพันธุ์ *Chlorococcum* sp. และ *Chlorella* sp. ในการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายน้ำจืดที่มีศักยภาพในการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ของทวีทรัพย์ และคณะ (2559) พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร N-8 สาหร่าย *Chlorococcum* sp. AB1 เป็นเวลา 8 วัน ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำที่เป็นสารสกัดหยาบสูงที่สุดเท่ากับ 29.18±1.65 เปอร์เซ็นต์ และสาหร่าย *Chlorella* sp. A หลังเพาะเลี้ยง 6 วัน มีปริมาณสารสกัดหยาบสูงที่สุดเท่ากับ 26.39±9.19 เปอร์เซ็นต์

1.3.3 การกระตุ้นการสะสมไขมัน

ผลการนำชีวมวลสาหร่าย CM01-4 หลังการเพาะเลี้ยงครบ 25 วัน มาทำการสกัดไขมันจากเซลล์สาหร่ายแบบเปียกด้วยวิธี *In-situ* acidic transesterification ก่อนการเติม NaCl พบว่าได้ปริมาณไขมันเท่ากับ 23 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ภายหลังการชักนำด้วยสภาวะความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยงจากการเติมเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเพาะเลี้ยงต่อเนื่องอีก 15 วัน พบว่าที่ระดับความเข้มข้น NaCl 0.2 โมลาร์ สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายมีการสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ได้สูงสุด 39 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งมีค่าแตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ รองลงมาคือกรรมวิธีที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และที่ไม่เติม NaCl สามารถสกัดไขมันได้ 31 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 ปริมาณสารสกัดไขมันจากชีวมวลสาหร่าย CM01-4 หลังการเติมเกลือ NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ NaCl	สารสกัดไขมัน (%wt)
0 โมลาร์	29bc
0.1 โมลาร์	31b
0.2 โมลาร์	39a
0.3 โมลาร์	25c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

จากผลการเปรียบเทียบกับปริมาณไขมันที่สกัดได้จากชีวมวลสาหร่ายก่อนการเติม NaCl พบว่าสาหร่ายมีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้นมากกว่า 69 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่าสาหร่าย *Botryococcus* sp. (25.8 เปอร์เซ็นต์) ของ Chittra and Benjamas (2010) ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำในภาคใต้ของประเทศไทย และมากกว่า *Chlorella* sp. (25 เปอร์เซ็นต์) ของ ภัทระ และคณะ (2555) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงด้วยการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เวลาในการเพาะเลี้ยง 11วัน

1.3.4 การกระตุ้นการสะสมสารพอลิเมอร์ชีวภาพ

เมื่อศึกษาการกระตุ้นการเพิ่มพอลิเมอร์ชีวภาพในสาหร่ายสายพันธุ์ SM6-3 หลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร BG-11 (NFree) เป็นเวลา 15 วัน โดยการเติมเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตลดลงจนไม่สามารถเก็บผลการทดลองได้ที่ระยะเวลา 15 วัน จึงได้ลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเป็น 10 วัน หลังการเติมเกลือ ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของ NaCl 0.1 โมลาร์ สาหร่ายมีการเจริญเติบโตต่อเนื่องได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน สามารถสกัดสารพอลิเมอร์ชีวภาพได้ปริมาณสูงสุดที่ 1.62 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสด ดังตารางที่ 5 ซึ่งสูงกว่าปริมาณที่สกัดได้จากชีวมวลสาหร่ายก่อนการเติม NaCl ที่สามารถสกัดได้เพียง 1.13 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสด หรือเพิ่มขึ้น 43.36 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งมีปริมาณพอลิเมอร์ที่สูงกว่ากรรมวิธีที่ไม่ได้เติม NaCl และเติมที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.3 โมลาร์ ที่ได้ปริมาณสารสกัด 1.50 1.23 และ 1.34 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสด ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ปริมาณสารสกัดพอลิเมอร์ชีวภาพจากชีวมวลสาหร่าย SM6-3 หลังการเติมเกลือ NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ

ระดับความเข้มข้นของ NaCl	สารสกัดพอลิเมอร์ (%wt)
0 โมลาร์	1.50b
0.1 โมลาร์	1.62a
0.2 โมลาร์	1.23d
0.3 โมลาร์	1.34c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

จากผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย SM6-3 (*Nostoc* sp.) 15 วัน รวมกับระยะเวลาการกระตุ้นอีก 10 วัน สอดคล้องกับผลการทดลองในสายพันธุ์ *Nostoc muscorum* NCCU-442 ของ Sabbir and Tasneem (2016) พบว่าสายพันธุ์นี้ให้พอลิเมอร์ชนิด PHB โดยเซลล์จะมีการสะสม PHB ตลอดระยะการเจริญเติบโต และมีปริมาณการสะสมสูงสุดเท่ากับ 6.44 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณ PHB ที่สะสมไว้จะมีปริมาณลดลง เนื่องจากถูกนำมาใช้ในการทำงานของเซลล์ และผลการกระตุ้นภายใต้ความเครียดจากการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัมต่อลิตร หลังการเพาะเลี้ยงครบ 7 วันสามารถเพิ่มการชักนำให้มีการสะสมสารเพิ่มขึ้นมากกว่า 7 เปอร์เซ็นต์

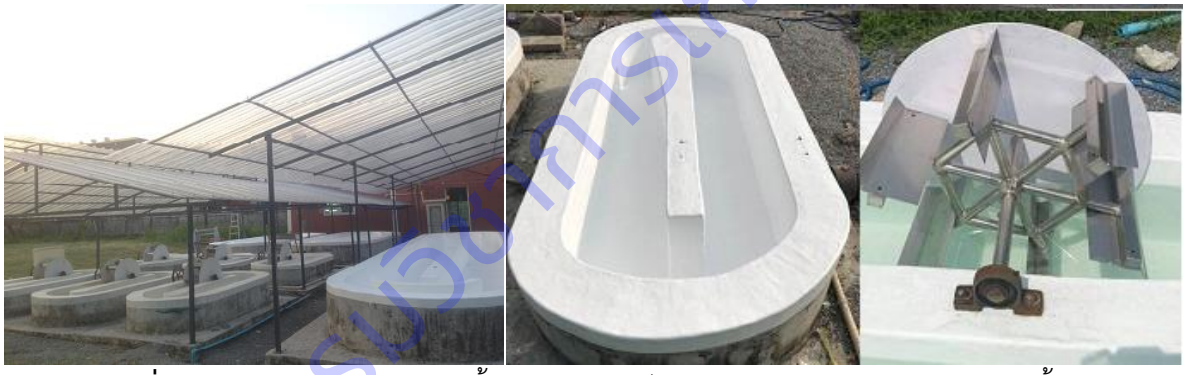
กรมวิทยาศาสตร์

2. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาด

2.1 รูปแบบบ่อเพาะเลี้ยงขยายขนาดแบบเปิดนอกห้องปฏิบัติการ

รูปแบบบ่อเพาะเลี้ยงแบบเปิดนอกห้องปฏิบัติการ (Raceway pond) และใบพัดมอเตอร์ (paddle wheel) ที่มีความเร็วรอบในการหมุน 30-50 rpm เพื่อให้เกิดการไหลเวียนน้ำบ่อเพื่อให้สาหร่ายได้รับแสงและอากาศอย่างสม่ำเสมอ และป้องกันการตกตะกอนของเซลล์สาหร่ายในระหว่างการเพาะเลี้ยง และเนื่องจากวัสดุผิวของบ่อซีเมนต์จะมีรูพรุนอาจทำให้การเพาะเลี้ยงเกิดการปนเปื้อนของสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์ จึงแก้ไขด้วยการเคลือบไฟเบอร์กลาสที่ผิวบ่อด้านในเพิ่มเติม พร้อมทั้งติดตั้งวัสดุคลุมบ่อชนิดโปร่งแสง (ภาพที่ 12-13) เพื่อหลีกเลี่ยงปริมาณน้ำฝนซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่เป็นอุปสรรคต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

ภาพที่ 12 บ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบเปิด (Raceway open pond) ขนาดต่างๆ

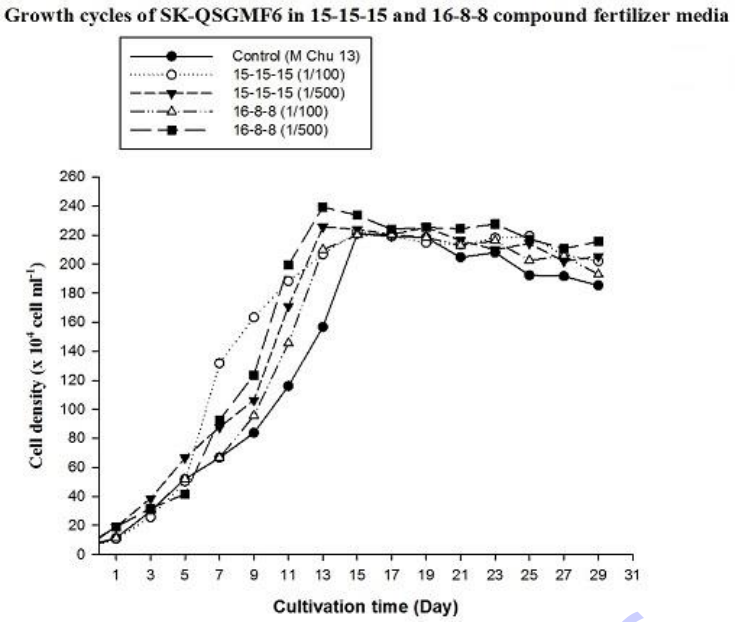


ภาพที่ 13 การเคลือบผิวบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยไฟเบอร์กลาสแผ่นโปร่งแสงป้องกันน้ำฝน

2.2 การพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระดับห้องปฏิบัติการ

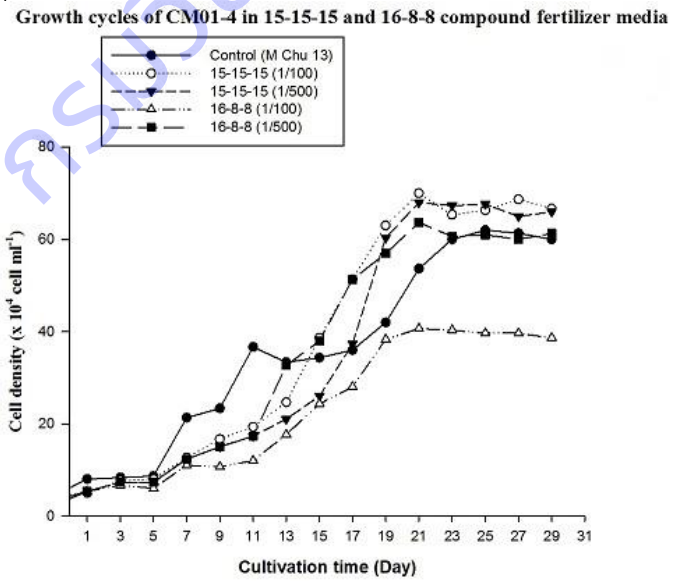
2.2.1 การพัฒนาสูตรอาหารจากปุ๋ยเคมีและอัตราการใช้เพื่อทดแทนสูตรอาหารมาตรฐาน

ผลการทดลองใช้ปุ๋ยเคมีทั่วไป 2 สูตร คือ 16-8-8 และ 15-15-15 เป็นอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายและปรับอัตราส่วนการให้ปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยงคือ 1/100 และ 1/500 เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตกับสูตรอาหารมาตรฐาน Modified Chu 13 ที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-QSGMF6 โดยหลังการเก็บตัวอย่างเพื่อติดตามการเจริญเติบโตต่อเนื่องตลอด 30 วัน ได้กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายดัง ภาพที่ 14 พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารปุ๋ยสูตร 16-8-8 และสูตร 15-15-15 ที่อัตราการใช้ปุ๋ยต่อน้ำเลี้ยง 1/500 สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากันในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง สามารถตรวจนับจำนวนเซลล์ได้ 2.39×10^6 และ 2.26×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารมาตรฐาน Modified Chu 13 พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยปุ๋ยทั้ง 2 สูตรในอัตราส่วนการให้ปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยง 1/500 เซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตมากกว่าในจำนวนวันของการเพาะเลี้ยงที่น้อยกกว่า



ภาพที่ 14 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย SK-QSGMF6 ด้วยสูตรอาหารปุ๋ยและอัตราส่วนการใช้

ส่วนผลการศึกษาการเจริญเติบโตกับสาหร่าย CM01-4 ด้วยกรรมวิธีเดียวกันได้กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายดังภาพที่ 15 พบว่าในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยงการให้อาหารปุ๋ยสูตร 15-15-15 ทั้งอัตราการใช้ปุ๋ยต่อน้ำเลี้ยง 1/100 และ 1/500 มีค่าใกล้เคียงกันสามารถตรวจนับจำนวนเซลล์ได้ 7.0x10^5 และ 6.68 x10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารมาตรฐาน Modified Chu 13 และปุ๋ยสูตร 16-8-8 ทั้ง 2 อัตราส่วนให้ปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยง เซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าในจำนวนของการเพาะเลี้ยงที่ 21 วันเท่ากัน โดยจากผลการศึกษาอัตราส่วนการให้ปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ข้างต้น จึงเลือกอัตราส่วนอัตราการใช้ปุ๋ยต่อน้ำเลี้ยง 1/500 เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการใช้ปุ๋ยเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์อื่นต่อไป



ภาพที่ 15 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย CM01-4 ด้วยสูตรอาหารปุ๋ยและอัตราส่วนการใช้

2.2.2 การพัฒนาสูตรอาหารจากปุ๋ยเคมีที่เหมาะสมการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กอัตราส่วนอัตราการใช้ปุ๋ยต่อน้ำเลี้ยง 1/500

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองจากการใช้ปุ๋ยเคมี 2 สูตร คือ 16-8-8 และ 15-15-15 ด้วยอัตราส่วนการใช้ปุ๋ยต่อน้ำเลี้ยง 1/500 มาศึกษาการเพาะเลี้ยงกับสาหร่าย SK-KhY6 และ A052 เพื่อเปรียบเทียบค่าการเจริญเติบโตกับสูตรอาหารมาตรฐาน BG-11 ที่เหมาะสมกับสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ โดยผลการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 6) พบว่าการใช้ปุ๋ยเคมี 16-8-8 ที่อัตราส่วนอัตราการใช้ปุ๋ยต่อน้ำเลี้ยง 1/500 ให้ผลการเจริญเติบโตได้ดีทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยสาหร่าย SK-KhY6 เซลล์มีค่าการเจริญเติบโตของเซลล์สูงสุดสามารถตรวจนับเซลล์สาหร่ายได้ 1.26×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 11 วัน ในขณะที่สาหร่าย A052 มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดเช่นเดียวกัน คือ 2.54×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 17 วัน

ตารางที่ 6 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย SK-KhY6 และ A052 ที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BG-11 กับปุ๋ยเคมี 16-8-8 และ 15-15-15

สายพันธุ์สาหร่าย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	จำนวนวันเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
SK-KhY6	BG-11	9	1.29×10^6a
	16-8-8	13	1.26×10^6a
	15-15-15	15	1.05×10^6b
A052	BG-11	15	1.28×10^6a
	16-8-8	17	1.24×10^6a
	15-15-15	17	0.98×10^6b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SM6-3 (ตารางที่ 7) ด้วยการใช้สูตรอาหารจากปุ๋ยเคมีทั้งหมด 4 สูตร ได้แก่ 12-6-30, 15-15-15, 8-24-24 และ 12-24-12 เปรียบเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐาน BG-11 N Free ที่เหมาะสมกับสาหร่ายสายพันธุ์นี้ โดยใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 15 วัน ซึ่งผลของการให้อาหารปุ๋ยแต่ละสูตรได้ปริมาณเซลล์สาหร่ายสดไม่แตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) อยู่ในช่วง 5.45-6.19 กรัมต่อลิตร โดยที่การเพาะเลี้ยงด้วยปุ๋ย 8-24-24 ให้ผลผลิตสาหร่ายสดสูงสุดเท่ากับ 6.19 กรัมต่อลิตร และจากการสกัดสารโพลิเมอร์ชีวภาพจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยปุ๋ยเคมี 3 สูตร ได้แก่ 8-24-24, 12-6-30 และ BG-11 N Free ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) อยู่ในช่วง 1.46-1.84 %wt. ดังนั้นจึงเลือกการเพาะเลี้ยงอาหารปุ๋ย 8-24-24 เพราะให้ผลผลิตสาหร่ายสดสูงสุดเท่ากับ 6.19 กรัมต่อลิตร และได้สารโพลิเมอร์ชีวภาพสูงสุด 1.84 %wt. ไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 7 ปริมาณสาหร่าย Sm6-3 และสารสกัดพอลิเมอร์ชีวภาพ จากการเปรียบเทียบสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 15 วัน

สูตรอาหาร	ชีวมวลสดสาหร่ายสด (กรัม/ลิตร)	สารสกัดพอลิเมอร์ชีวภาพ (%wt.)
BG-11 N Free	3.62b	1.46ab
15-15-15	5.45a	0.97b
12-24-12	5.47a	0.88b
12-6-30	6.01a	1.50ab
8-24-24	6.19a	1.84a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

2.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาดแบบบ่อเปิด (Open raceway pond)

จากผลการเพาะเลี้ยงด้วยการให้อาหารปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยง 1 ต่อ 500 และใช้หัวเชื้อสาหร่ายเริ่มต้นที่ระดับค่าความขุ่น 0.3 ปริมาณการใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรน้ำเพาะเลี้ยง 100 ลิตร ในบ่อเพาะเลี้ยงแบบเปิด

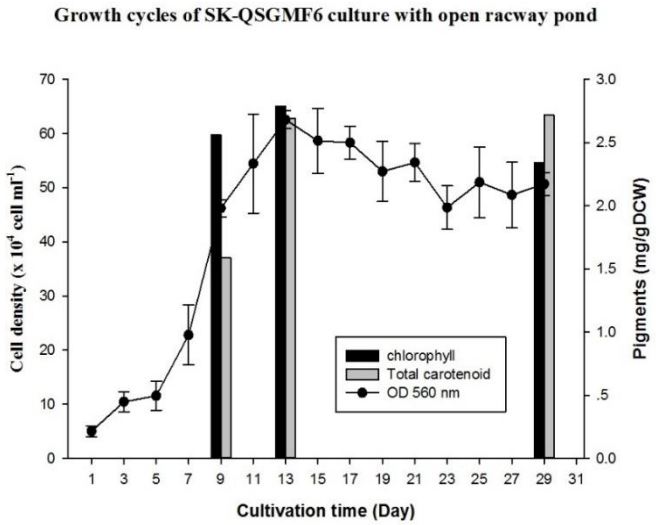
กรมวิชาการเกษตร

ขนาด 500 ลิตร โดยตลอดระยะเวลาในการศึกษาในครั้งนี้ มีปริมาณความเข้มของแสงแดดอยู่ในช่วง 10-17 kLux และอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ในช่วง 28-37 องศาเซลเซียส เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายระหว่างสูตรมาตรฐานและปุ๋ยเคมีสูตรที่เหมาะสม กับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแต่ละไอโซเลท ดังนี้

2.3.1 ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-QSGMF6 เพื่อผลิตสารคลอโรฟิลล์และสารแคโรทีนอยด์

เนื่องจากสารสีคลอโรฟิลล์จะเป็นลักษณะสีของเซลล์สารสาหร่ายโดยปกติและสารแคโรทีนอยด์จะมีการสะสมในระหว่างการเจริญเติบโต 3 ช่วงระยะ คือระยะเพิ่มจำนวน (log phase), ระยะเริ่มคงที่หรือหลังการเพิ่มจำนวน (late log phase) และระยะสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง (late stationary phase) โดยระยะการเพิ่มจำนวนของสาหร่ายจะสังเกตุเห็นลักษณะทางกายภาพของน้ำเพาะเลี้ยงมีสีเขียวจากปริมาณเซลล์สาหร่ายที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนหลังการเพาะเลี้ยง 7 วัน ดังภาพที่ 16 โดยผลการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร Modified Chu 13 พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญที่สูงที่สุดในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง มีความหนาแน่นของเซลล์ 6.26×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และได้ผลผลิตชีวมวล 2.05 กรัมต่อลิตร ซึ่งในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้วิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีการของ (Lichtenthaler and Buschmann, 2005) พบว่าเมื่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายอยู่ในระยะ log phase และ late log phase เซลล์จะมีสีเขียวเข้มมีค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ 2.56 และ 2.79 mg/g ของสาหร่ายแห้งตามลำดับ ในขณะที่ระยะ late stationary phase มีปริมาณเพียงคลอโรฟิลล์ 2.34 mg/g ของสาหร่ายแห้ง (ภาพที่ 17) ดังนั้นในการเพาเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อการผลิตสารคลอโรฟิลล์สามารถทำการเก็บชีวมวลสาหร่ายได้ภายในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง และจากการหาปริมาณแคโรทีนอยด์ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชุดเดียวกัน โดยพบว่าในระยะ log phase มีปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.59 mg/g ของสาหร่ายแห้ง ส่วนในระยะ late log phase และระยะ late stationary phase มีปริมาณแคโรทีนอยด์ 2.69 และ 2.72 mg/g ของสาหร่ายแห้ง

ภาพที่ 16 ลักษณะของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-QSGMF6 ในบ่อแบบเปิด (Open raceway pond)



ภาพที่ 17 อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย SK-QSGMF6 โดยใช้อาหาร Modified Chu 13

กรมวิชาการเกษตร

ส่วนการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารปุ๋ยสูตร 16-8-8 จะเน้นไปในการสะสมสารแคโรทีนอยด์หรือสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ SK-QSGMF6 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 7.12 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงทำการชักนำให้เซลล์สาหร่ายด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยเพาะเลี้ยงต่อเนื่องอีก 15 วัน หลังการเก็บเกี่ยวได้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.95 กรัมต่อลิตร สามารถสกัดสารจากเซลล์สาหร่ายได้ปริมาณสารแคโรทีนอยด์สูงสุด 5.20 mg/g ของสาหร่ายแห้ง

2.3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-KhY6 ด้วยสูตรอาหารปุ๋ย 16-8-8 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 5.37 x 105 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.75 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องหลังเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ อีก 15 วัน หลังการเก็บเกี่ยวได้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.75 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณสารแคโรทีนอยด์สูงสุด 4.28 mg/g ของสาหร่ายแห้ง

2.3.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท A052 ด้วยสูตรอาหารปุ๋ย 16-8-8 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 7.03x105 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงหลังชักนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์เป็นเวลา 15 วัน หลังการเก็บเกี่ยวได้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.69 กรัมต่อลิตร ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ (total polysaccharides extract, TPE) ได้สูงสุด 3.97%wt.

2.3.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย CM01-4 ด้วยสูตรอาหารปุ๋ย 15-15-15 อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 6.76x105 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงทำการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในน้ำเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์และเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง 10 วัน หลังการเก็บเกี่ยวได้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.05 กรัมต่อลิตร มีการสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ได้สูงสุด 5.65%wt.

2.3.5 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย Sm6-3 ด้วยสูตรอาหารจากปุ๋ยเคมี 8-24-24 ทำการเพาะเลี้ยงจนสาหร่ายเจริญเข้าสู่ช่วงแรกของระยะพักตัว (Early stationary phase) ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 15 วัน หลังการกระตุ้นด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ และเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง 10 วัน หลังการเก็บเกี่ยวได้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.22 กรัมต่อลิตร และผลการสกัดสารพอลิเมอร์ชีวภาพได้ 0.33 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสด

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

จากการศึกษาสาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 8 สายพันธุ์ ได้สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารสำคัญจำนวน 6 สายพันธุ์คือ สาหร่าย SK-QSGMF6 สายพันธุ์ *Coelastrella* sp. และสาหร่าย SK-KhY6 สายพันธุ์ *Coelastrum* sp. มีศักยภาพในการผลิตสารแคโรทีนอยด์ สาหร่าย A052 สายพันธุ์ *Coelastrella microporum* มีศักยภาพผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์ สาหร่าย CM01-4 สายพันธุ์ *Botryococcus* sp. และสาหร่าย KK20 สายพันธุ์ *Desmodesmus* sp. มีศักยภาพผลิตไขมัน และสาหร่าย SM6-3 สายพันธุ์ *Nostoc* sp. มีศักยภาพผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อผลิตสารสำคัญต่าง ๆ ดังนี้ การเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-QSGMF6 ด้วยอาหาร Modified Chu 13 ระยะเวลา 15 วัน และสาหร่าย SK-KhY6 ด้วยอาหาร BG-11 ระยะเวลา 9 วัน จากนั้นเติมเกลือเข้มข้น 0.3 โมลาร์ และเพาะเลี้ยงต่อ 15 วัน สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 3.45 และ 3.56 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งตามลำดับ การเพาะเลี้ยงสาหร่าย A052 ด้วยอาหาร BG-11 ระยะเวลา 15 วัน จากนั้นเติมเกลือเข้มข้น 0.3 โมลาร์ และเพาะเลี้ยงต่อ 15 วัน สาหร่ายจะสามารถผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 6.51 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง การเพาะเลี้ยงสาหร่าย CM01-4 ด้วยอาหาร Modified Chu 13 ระยะเวลา 25 วัน

กรมวิชาการเกษตร

จากนั้นเติมเกลือเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และเพาะเลี้ยงต่อ 15 วัน สาหร่ายจะสามารถผลิตไขมันได้สูงสุด 39 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง และการเพาะเลี้ยงสาหร่าย Sm6-3 ด้วยอาหาร BG-11 (NFree) เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นเติมเกลือเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และเพาะเลี้ยงต่อ 10 วัน สาหร่ายจะสามารถผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพได้สูงสุดที่ 1.62 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสด

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาดแบบบ่อเปิด (open raceway pond) ปริมาตร 500 ลิตร เพื่อผลิตสารสำคัญด้วยการพัฒนาสูตรอาหารจากปุ๋ยเคมีทางการเกษตรทดแทนสูตรอาหารมาตรฐาน และการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญด้วยสภาวะความเค็มจากเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 โมลาร์ โดยตลอดระยะเวลาในการศึกษาในครั้งนี้มีปริมาณความเข้มของแสงแดดอยู่ในช่วง 10-17 kLux และอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ในช่วง 28-37 องศาเซลเซียส โดยสูตรปุ๋ย 16-8-8 ให้ผลการเจริญเติบโตได้ดีกับสาหร่าย SK-QSGMF6, SK-KhY6 และ A052 สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุด 7.13×10^5 1.26×10^6 และ 1.24×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยหลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ได้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.95 1.75 และ 1.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการสกัดชีวมวลสาหร่าย SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 ให้ปริมาณสารสกัดแคโรทีนอยด์ 3.65 และ 3.56 mg/g_{dried} ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท A052 ให้สารพอลิแซ็กคาไรด์ 6.51 %wt. สาหร่ายไอโซเลท CM01-4 เจริญเติบโตได้ดีด้วยอาหารปุ๋ย 15-15-15 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 6.755×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.05 กรัมต่อลิตร หลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สกัดไขมันได้ 5.65%wt. และสาหร่ายไอโซเลท Sm6-3 เจริญเติบโตได้ดีด้วยอาหารปุ๋ย 8-24-24 มีอัตราการให้ผลผลิตเท่ากับ 1.22 กรัมต่อลิตร หลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ได้ปริมาณสารสกัดพอลิเมอร์ชีวภาพ 0.33 กรัมต่อกรัมสาหร่ายสด

จากข้อมูลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์ที่ได้ ทั้งสูตรอาหารมาตรฐานที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ปัจจัยด้านสภาวะความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยงเพื่อการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญเพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตแล้ว และการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงขยายขนาดแบบบ่อเปิดด้วยการใช้ใบพัดเพื่อการหมุนเวียนน้ำและเติมอากาศ รวมทั้งการใช้สูตรอาหารปุ๋ยเคมีที่มีธาตุอาหารหลักเช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแตสเซียม ทดแทนสูตรอาหารมาตรฐาน ยังมีแนวทางในการดัดแปลงสูตรอาหารดังกล่าวด้วยการปรับอัตราส่วนฐานอาหารเฉพาะบางตัวเช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแตสเซียม หรือธาตุอาหารเสริมที่สำคัญเพื่อเพิ่มอัตราการให้ผลิต รวมทั้งระบบการเพาะเลี้ยงที่มีการกระตุ้นแสงสีต่าง ๆ และก๊าซคาร์บอนไดร์ออกไซด์ เป็นต้น เพื่อกระตุ้นให้เซลล์สาหร่ายขนาดเล็กมีการสังเคราะห์สารสำคัญบางตัวที่นักวิจัยสนใจต่อไป

กรมวิทยาศาสตร์

กิจกรรมที่ 2
การใช้ประโยชน์จากสาหร่ายขนาดเล็ก
Application from Microalgae

นราทร สุขวิเสส สุรีย์รัตน์ รักเหลือ จารุวรรณ์ รัตนสกุลธรรม อกนิษฐ์ พิศาลวัชรินทร์
วิมลวรรณ วัฒนวิจิตร ศิริพร เต็งรัง และ กนกศักดิ์ ลอยเลิศ

คำสำคัญ

สาหร่ายขนาดเล็ก แคโรทีนอยด์ ไขมัน พอลิแซ็กคาไรด์ พอลิเมอร์ชีวภาพ การเพาะเลี้ยง แอสตาแซนธิน
เครื่องสกัดคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะยิ่งยวด สีผงคลอโรฟิลล์ สีผงแคโรทีนอยด์ สีผงไฟโคบิลิน
สารให้ความคงตัว ใยอาหาร ซุปข้าวโพด พาสต้า ไขมัน ไบโอดีเซล เมทิลเอสเตอร์
พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ สตาร์ช

Keywords

Microalgae, Carotenoid, Lipid, Polysaccharides, Biopolymer, Cultivation, Astaxanthin, CO_2 supercritical fluid extraction, Chlorophyll powder, Carotenoid powder, Phycobilin powder, Stabilizer, Fiber, Corn soup, Pasta, Lipid, Biodiesel, Methyl ester, Poly-β-hydroxybutyrate, Biopolymer, Polyvinyl alcohol, Starch

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การใช้ประโยชน์จากสาหร่ายขนาดเล็กดำเนินการทดลองที่กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ระหว่างปี 2560 – 2562 โดยวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารสำคัญจากสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์ดังนี้ สายพันธุ์ที่ผลิตสารแคโรทีนอยด์ได้แก่ *Coelastrella* sp. (SK-QSGMF6) และ *Coelastrum* sp. (SK-KhY6) สายพันธุ์ที่ผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์ได้คือ *Coelastrum microporum* (A052) สายพันธุ์ที่ผลิตไขมันได้คือ *Botryococcus* sp. (CM01-4) และ *Desmodesmus* sp. (KK20) และสายพันธุ์ที่ผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพได้คือ *Nostoc* sp. (Sm6-3) ซึ่งได้มีการศึกษาสูตรอาหารและวิธีการเพาะเลี้ยงจนสาหร่ายขนาดเล็กมีการสะสมสารสำคัญในปริมาณสูง ผลการศึกษาวิธีการสกัดสารสำคัญแต่ละชนิดและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในแต่ละสายพันธุ์พบว่า การสกัดสาหร่าย SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 ด้วยเทคนิค SFE ความดัน 500 บาร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย SK-QSGMF6 ที่มีสารแอสตาแซนทินสูง สามารถใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวได้ 0.02 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย SK-KhY6 ที่มีสารไลโคปีนเป็นองค์ประกอบ สามารถใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์แผ่นมาส์กหน้าที่ใช้เจลว่านหางจระเข้เป็นเบสในปริมาณ 0.015 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาการผลิตสีผงจากเซลล์สาหร่ายเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจำนวน 3 สารสีได้แก่ สารสีคลอโรฟิลล์ (เขียว) และสารสีไฟโคบิลิน (ฟ้า) จากสาหร่าย A052 และสารสีแคโรทีนอยด์ (ส้ม) จากสาหร่าย SK-QSGMF6 ได้วิธีการสกัดสารสีและวิธีผสมกับมอลโตเด็กซ์ทริน และการทำแห้งแบบพ่นฝอยในสภาวะที่เหมาะสม จนได้สีผงแต่ละชนิดที่มีปริมาณสารคลอโรฟิลล์ 38.75 mg/100g สารแคโรทีนอยด์ 19.39 mg/100g และสารไฟโคบิลิน 36.96 mg/100g ตามลำดับ ผลการศึกษาวิธีการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์และใยอาหารจากสาหร่าย A052 ที่เหมาะสมจนได้ปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ 3.97 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สามารถใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ซุปข้าวโพดเพื่อเพิ่มความข้นหนืดได้ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณใยอาหารทั้งหมดที่สกัดได้ 82.16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง หลังการใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้า 3 เปอร์เซ็นต์ทำให้มีปริมาณใยอาหารเพิ่มขึ้น 0.84 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาวิธีการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่าย CM01-4 และ KK20 พบว่าการสกัดชีวมวลสาหร่ายแห้งด้วยตัวทำละลายอะซีโตนสามารถสกัดไขมันได้ 0.1034 และ 0.0942 กรัมต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ หลังการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้ความบริสุทธิ์ของไบโอดีเซล 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่าการทำปฏิกิริยาโดยตรงกับชีวมวลสาหร่ายสด ผลการศึกษาการผลิตพลาสติกชีวภาพจากสาหร่าย Sm6-3 พบว่าหลังการพรีทรีตเมนต์สามารถนำชีวมวลสาหร่ายดังกล่าว มาใช้เป็นส่วนผสมหลักร่วมกับสารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ 30-40 เปอร์เซ็นต์ และแป้งสตาร์ช 20 เปอร์เซ็นต์ ในการขึ้นรูปเป็นแผ่นพลาสติกชีวภาพที่สามารถพับและซีลด้วยความร้อนทำเป็นถุงเพาะชำได้

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Application from microalgaehe was carried out by experiments at Postharvest and Processing Research and Development Division during 2017-2019. The objectives were to study the methods of extracting important substances from each species of microalgae as follows: the microalgae with identified as follow by bioactive substances *Coelastrella* sp. (SK-QSGMF6) and *Coelastrum* sp. (SK-KhY6), polysaccharides from *Coelastrum* sp. (A052), lipid from *Botryococcus* sp. (CM01-4) and *Desmodesmus* sp. (KK20) and biopolymer from *Nostoc* sp. (Sm6-3). The results of the study of culture media formulas suitable and induction of active metabolites. The results of the study of methods for extracting each important substance and developing it into the product of each species. The extraction of SK-QSGMF6 and SK-KhY6 by SFE technique, pressure 500 bar, temperature 60 ℃ obtained carotenoids at 5.2 and 4.28 mg/g DW, respectively. Application of carotenoid extract form SK-QSGMF6 with high astaxanthin can be added at 0.02% in skin care serum products. Carotenoid extract form SK-KhY6 with lycopene was used as an ingredient in a 0.015% of mask sheet. Production of powder paints for use in the food industry total of 3 pigments were studied: chlorophyll (green) and phycobilin (blue) from A052, carotenoid pigment (orange) from SK-QSGMF6. Extraction of chlorophyll or carotenoid used 95% ethanol, the extract was mixed with maltodextrin and water at a ratio of 1:1:1 (v/w/w). After drying, the pigment powder content chlorophyll 38.75 mg/100g and carotenoid 19.39 mg/100g, respectively. Phycobilin was extracted by mixing microalgae with water at ration of 1:1 (w/w). After drying, the pigment powder content Phycobilin 36.96 mg/100g. The extraction of polysaccharides and dietary fibers from A052 and using them as ingredients in food products. It was found that the extraction of microalgae in solid insoluble in alcohol with water in ratio of 1: 1 at 70°C for 70 min yielded of polysaccharides at 3.97 % (dry basis). It can be used as a thickening agent in corn soup products at 1.5 percent. Dietary fiber content from microalgae extracted by alcohol yielded 89.35 % (dry basis). The total dietary fiber content was 82.16 % (dry basis). After adding 3% of dietary fiber in pasta products, the fiber content was increased by 0.84%. The results of the study on biodiesel production from microalgae CM01-4 and KK20 showed that extraction from dried algae with acetone was extracted lipids at 0.1034 and 0.0942 g/g DW, respectively. After the transesterification reaction, the purity of biodiesel was 80 percent, which was higher than the direct reaction with fresh algae biomass. A study on the production of bioplastics from algae Sm6-3 showed that wet biomass was pretreated using the main ingredient in mixing with 30-40% polyvinyl alcohol and 20% starch to form a bio-plastic sheet. It can be folded, molded and heat sealed to make a planting bag.

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ (Introduction)

สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่มีคลอโรฟิลล์ที่มีลักลักษณะเซลล์เดียวหรือกลุ่มโคโลนี แต่ไม่มีส่วนที่เป็นลำต้น รากและใบที่แท้จริง สามารถสร้างอาหารได้เองโดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชทั่วไปมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วโดยสามารถเจริญได้ในทุกพื้นที่ไม่ว่าจะเป็นน้ำจืด น้ำกร่อย หรือน้ำเค็ม โครงสร้างภายในเซลล์ของสาหร่ายมีอาหารสะสมเป็นสารประกอบในรูปแบบต่างๆ มากมาย ได้แก่ โปรตีนคาร์โบไฮเดรตซึ่งจะอยู่ในรูปของพอลิแซ็กคาไรด์ หรือแป้ง (Starch) ไขมันหรือน้ำมัน (Oils) ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) รวมทั้งสารสีหรือรงควัตถุ (pigment) เป็นองค์ประกอบ เช่น คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และไฟโคบิลิน (phycobilin) เป็นต้น

แนวทางการใช้ประโยชน์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีการสะสมสารสำคัญแต่ละชนิด

1. **อาหารเพื่อสุขภาพและเวชสำอาง**

1.1 การผลิตสารแคโรทีนอยด์สำหรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

รงควัตถุของกลุ่มแคโรทีนอยด์ เป็นรงควัตถุอินทรีย์ มีสีอยู่ในช่วงตั้งแต่สีเหลืองถึงสีแดง ปัจจุบันมีการพบโครงสร้างมากกว่า 750 รูปแบบ (Takaichi, 2011) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ตามธรรมชาติ จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายกันมากขึ้น เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยพื้นที่ในระดับสูง โดยใช้เพียงธาตุอาหารหลัก แสง และคาร์บอนไดออกไซด์เท่านั้น (Krinsky, 1989) แคโรทีนอยด์แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มแคโรทีน (Carotene) โมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้าแคโรทีน (β-carotene) และ ไลโคปีน (Lycopene) เป็นต้น และกลุ่มแซนโทฟิลล์ (Xanthophylls) ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ได้แก่ แอสตาแซนธิน (Astaxanthin) ลูทีน (Lutein) และ ซีแซนธิน (Zeaxanthin) เป็นต้น (Goodwin, 2012)

กลุ่มแคโรทีน (Carotene) ประกอบด้วยเบต้าแคโรทีน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งเป็นรงควัตถุที่มีสีส้ม สีเหลือง เป็นแคโรทีนอยด์ที่เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ ไลโคปีน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์มากกว่าเบต้าแคโรทีน 2 เท่า และมากกว่าวิตามินอี 10 เท่า ช่วยปกป้อง บำรุง และฟื้นฟูผิวพรรณและเส้นผม ช่วยลดการทำงานของเม็ดสีเมลานินทำให้เสริมความขาวใส ช่วยลดความรุนแรงจากรังสี UVA และ UVB ทำให้ผิวทนต่อแดดมากขึ้น ไม่คล้ำเสียง่าย ลดมะเร็งผิวหนัง และช่วยต่อต้านริ้วรอยแห่งวัย ลดริ้วรอยให้ดูตื้นขึ้น ช่วยลดการอักเสบของผิวหนัง ลดผื่นแดง ทำให้ผิวแข็งแรงขึ้นไม่แพ้ง่าย เรียบเนียน และเปล่งปลั่ง ช่วยในการสร้างเซลล์ผิวใหม่แทนผิวหนังชั้นเดิมที่เสื่อมแล้ว (มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, 2564)

กลุ่มแซนโทฟิลล์ ประกอบด้วย ลูทีนและซีแซนธิน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีสีเหลือง หากรับประทานจะเป็นประโยชน์ต่อดวงตา บำรุงตา ทำให้จอประสาทตาไม่เสื่อมเร็ว ในร่างกายจะพบลูทีนได้มากบริเวณเซลล์รับภาพภายในจอประสาทตา ทำหน้าที่กรองแสงสีฟ้าซึ่งเป็นอันตรายต่อจอประสาทตา ส่วนซีแซนธินจะเป็นองค์ประกอบสำคัญในจอตา ทำหน้าที่กรองแสงที่จะผ่านเข้าสู่จอตาและช่วยลดการสะท้อนของแสง ป้องกันรังสีจากแสงแดดที่เป็นอันตรายต่อดวงตา (กฤติยา, 2018) แอสตาแซนธิน เป็นรงควัตถุที่ให้สีชมพูถึงแดง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมาก โดยสูงกว่าวิตามินอีประมาณ 500 เท่า และสูงกว่าวิตามินซีประมาณ 6,000 เท่า มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันซึ่งเป็นสาเหตุของมะเร็งผิวหนัง มีประสิทธิภาพในการป้องกันการอักเสบ ทำให้ผิวมีสุขภาพดี ลดเลือนริ้วรอยได้ทั้งริ้วรอยลึกและตื้น ลดจุดด่างดำ ทำให้ผิวเรียบเนียนเต่งตึงและผิวกระชับ ให้ความชุ่มชื่นแก่ผิว ทำให้ผิวมีความยืดหยุ่นดีขึ้นแลดูอ่อนกว่าวัย (วรรณวิมล และมารุจ, 2552) ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถผลิตเองได้

สาหร่ายที่นิยมนำมาสกัดแอสตราแซนธินและให้ร้อยละผลผลิตสูงคือ *Haematococcus pluvialis* เป็นสาหร่ายน้ำจืดเซลล์เดียวขนาดเล็กมีสีเขียว อยู่ใน Phylum Chlorophyta เป็นสาหร่ายสายพันธุ์เฉพาะที่มี

ความสามารถในการปรับตัวและมีชีวิตรอดอยู่ได้นานถึง 20 ปี แม้จะอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเติบโต เช่น ขาดน้ำ ขาดอาหาร เผชิญกับความร้อน แสงแดด และอุณหภูมิที่หนาวเย็นมากเกินไป โดยจะปรับตัวให้มีผนังเซลล์หนาขึ้น เพื่อสะสมสารต้านอนุมูลอิสระแอสตาแซนธินเพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปกป้องตนเองให้อยู่รอดได้ จึงเปลี่ยนสีกลายเป็นสีแดงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* นี้ สามารถพบได้ในประเทศแถบสแกนดิเนเวีย เช่น ประเทศสวีเดน มีงานวิจัยจากหลายประเทศในโลกระบุตรงกันว่า แอสตราแซนธินจากสาหร่ายนี้มีส่วนช่วยปกป้องร่างกายและผิวพรรณให้คงความอ่อนเยาว์ได้นานยิ่งขึ้น โดยปกติจะสกัดแอสตราแซนธินจากสาหร่ายได้ถึง 4-5% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (กัญญา, 2560) เนื่องจากสารสกัดแอสตาแซนธินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมาก มีประสิทธิภาพในการปกป้องดูแลผิวจึงนิยมนำมาเป็นองค์ประกอบในเครื่องสำอางอย่างกว้างขวาง เช่น ครีมกันแดด ครีมบำรุงผิว ผลิตภัณฑ์ลดเลือนริ้วรอย ผลิตภัณฑ์เพื่อผิวขาวกระจ่างใส และผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผม เป็นต้น (Maria *et al*., 2017) นอกจากนี้ Farahin *et al*. (2018) ได้ผลิตนาโนอิมัลชั่นโลชั่น จากสารสกัดสาหร่าย *Tetraselmis tetrathele* 1% โดยใช้ Tween 80 ที่ 10 15 และ 20% เป็นอิมัลซิไฟเออร์ สารสกัดจากสาหร่ายสามารถใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับผลิตภัณฑ์นาโนเวชสำอางได้ โดยมีความสม่ำเสมอและความคงตัวสูง

ทั้งนี้เครื่องสำอางที่เหมาะสมกับผิวของมนุษย์จะมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ 3.5-5.5 เครื่องสำอางส่วนมากจึงมีการเติมสาร Alpha Hydroxy acids (AHAs) เพื่อให้ได้ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมกับผิว เนื่องจากสาร AHAs จะกระตุ้นให้มีการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก ซึ่งจะช่วยทำให้ผิวหนังอุ้มน้ำได้ดีขึ้น และคงความชุ่มชื้นให้กับผิวหนัง AHAs ในธรรมชาติ เช่น กรดไกลโคลิค สกัดจากอ้อย สับปะรด และองุ่น กรดมาลิกเป็นผงสีขาวสกัดได้จากแอปเปิล กรดซิตริกได้จากมะนาว และกรดทาร์ทาริคซึ่งสกัดได้จากมะขาม โดยทั่วไปกำหนดให้ใช้ได้ไม่เกิน 10% (กองเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย, 2551) อย่างไรก็ตามการสกัดสารสำคัญจากสาหร่ายขนาดเล็กส่วนใหญ่ใช้ตัวทำละลายในการสกัด เช่น ตัวทำละลายอินทรีย์ ไอโซโพรพานอล เอทานอล ตัวทำละลายที่มีขั้ว เป็นต้น สารสกัดที่ได้ต้องผ่านกระบวนการแยกตัวทำละลายออก ซึ่งในกระบวนการนี้หากแยกตัวทำละลายไม่หมด สารสกัดที่ได้จะมีตัวทำละลายหลงเหลืออยู่อาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้

1.2 สารสีจากรงควัตถุของสาหร่ายขนาดเล็ก

รงควัตถุหลักที่พบในสาหร่ายขนาดเล็กมี 3 ชนิด คือ คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุสีเขียว แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง และไฟโคบิลินเป็นรงควัตถุสีน้ำเงิน (ลิ่วมโนมนต์, 2527) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากรงควัตถุของสาหร่ายในการผลิตสีเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม

คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) เป็นรงควัตถุหลักในคลอโรพลาสต์ มีคุณสมบัติในการดูดแสงสีแดงและน้ำเงิน และสะท้อนแสงสีเขียว มีความสำคัญในการสังเคราะห์แสง คลอโรฟิลล์มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ คลอโรฟิลล์มีหลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ บี ซี ดี และอี คลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเนื้องอก (Antimutagenic) ยังยั้งสารก่อมะเร็ง (Anticarcinogenic) รักษาสภาวะนิ่วชนิดหินปูน (Calcium oxalate stone) ช่วยกระตุ้นการสร้างฮีโมโกบินที่มีออกซิเจนอยู่และจะสามารถนำไปสร้างพลังงานให้ร่างกาย ป้องกันการเกิดปฏิกิริยา ออโต้-ออกซิเดชัน ได้ โดยคลอโรฟิลล์จะต้องทำงานร่วมกับวิตามินอี เพื่อป้องกันการเกิดกกลิ่นหืน การบริโภคคลอโรฟิลล์สามารถช่วยในเรื่องระบบขับถ่าย (ขนิจศากรณ์, 2553)

แคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นรงควัตถุที่ดูดแสงสีน้ำเงินและสะท้อนแสงสีเหลืองและส้ม เป็นสารที่ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ ปกติสาหร่ายและสาหร่ายทะเลจะพบแคโรทีนอยด์อยู่ในคลอโรพลาสต์ แต่บางครั้งอาจพบอยู่ภายนอกคลอโรพลาสต์ สาหร่ายสีเขียวบางชนิดอาจสะสม astaxanthin ไว้ภายนอกในกรณีที่อยู่ในสภาวะขาดแร่ธาตุหรือไนโตรเจน (Britton, 1983) แคโรทีนอยด์ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ได้แก่ ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพื่อให้ xanthophylls เข้าไปสะสมในสัตว์และไข่แดง และเน้นในด้านการให้โปรตีนและ

กรมวิทยาศาสตร์

วิตามินแก่สัตว์ ด้านการเป็นสารตั้งต้นวิตามินเอ แคโรทีนอยด์จะให้วิตามินเอเพียง 1 โมเลกุล ยกเว้น β-carotene จะให้วิตามินเอ 2 โมเลกุล ซึ่งวิตามินเอมีความสำคัญต่อการมองเห็นของมนุษย์และสัตว์ จากคุณสมบัติในการเป็นสารตั้งต้นวิตามินเอ แคโรทีนอยด์จึงถูกใช้ในการป้องกันและปรับสภาพการขาดวิตามินเอของร่างกาย และยังใช้เป็นสารป้องกันอาการคัน ไหม้ เป็นผื่นเนื่องจากการถูกแสงแดด สำหรับในด้านอุตสาหกรรมอาหารแคโรทีนอยด์จะถูกใช้เป็นสีผสมอาหาร โดยเติม β-carotene ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทไขมันต่างๆ เช่น เนยเหลว เนยเทียม น้ำสลัด และมักกะโรนี เป็นต้น ซึ่งแคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่ายมีสารไม่กี่ชนิดที่สามารถนำมาผลิตในเชิงการค้า ได้แก่ β-carotene lycopene zeaxanthin astaxanthin และ lutein (Becker, 1994)

ไฟโคบิลิน (phycobillin) เป็นรงควัตถุที่พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายสีแดง ไฟโคบิลินจะรวมอยู่กับโปรตีนเป็นสารประกอบที่เรียกว่า ไฟโคบิลิโปรตีน สามารถละลายได้ดีในน้ำ แบ่งออกเป็นกลุ่มตามความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ ไฟโคเออริธริน : เป็นรงควัตถุที่มีสีแดง ไฟโคไซยานิน : เป็นรงควัตถุสีน้ำเงิน และ อัลโลไฟโคไซยานิน : เป็นรงควัตถุสีน้ำเงิน

ไฟโคบิลินที่พบมากในสาหร่ายได้แก่ ไฟโคไซยานินซึ่งเป็นรงควัตถุสีน้ำเงิน เป็นแหล่งสะสมไนโตรเจน ซึ่งจะทำหน้าที่ให้ธาตุไนโตรเจนแก่เซลล์สาหร่ายในยามที่ขาดแคลนธาตุอาหารไนโตรเจน ในการสกัดไฟโคไซยานินมวลของสาหร่ายจะถูกแยกออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งคือ ไฟโคไซยานินที่ใช้เป็นสีผสมอาหาร ส่วนที่เหลือจะเป็นส่วนที่มีโปรตีนสูง ใช้เป็นอาหารของสัตว์น้ำ ประเทศที่มีการผลิตไฟโคไซยานินบริสุทธิ์มากกว่าประเทศอื่น ๆ คือ ประเทศอเมริกา จากข้อมูลของ Legault, Grysole และ Associes, Inc. ได้รายงานราคาขายของไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่ายเกลียวทองดังนี้คือ ไฟโคไซยานินที่ทำเป็นระดับอาหาร (ใช้เป็นสีผสมอาหาร) ซึ่งมีปริมาณ 20% ของน้ำหนักแห้ง มีราคาขาย 130 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ส่วนไฟโคไซยานินที่เป็นเกรดวิเคราะห์มีปริมาณ 7% ของน้ำหนักแห้ง มีราคาขาย 1,000-5,000 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม (บ้านจอมยุทธ, ม.ป.ป.)

สีมีความสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจาก สีเป็นคุณลักษณะแรกที่ผู้บริโภคได้รับทางประสาทสัมผัสและเป็นปัจจัยที่ดึงดูดให้ผู้บริโภคตัดสินใจเลือกและยอมรับอาหารชนิดนั้นๆ ดังนั้นอาหารหลายชนิดจึงมีการปรุงแต่งสีลงไปซึ่งสีที่ใช้มักเป็นสีสังเคราะห์ ซึ่งการบริโภคสีผสมอาหารที่เป็นสีสังเคราะห์ในปริมาณมากเกินไปหรือบริโภคบ่อยๆ สีจะสะสมอยู่ในร่างกายมากขึ้นเมื่อสะสมอยู่ในร่างกายปริมาณมากพอจะก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค โดยสีบางชนิดอาจทำให้เกิดอาการแพ้ เช่น เป็นลมพิษ หรือเป็นสาเหตุของโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ เช่น หืด เยื่อบุจมูกอักเสบ นอกจากอันตรายจากตัวสีเองแล้วยังอาจมีอันตรายจากโลหะหนักที่ปนเปื้อนมา เช่น สารหนู ตะกั่ว แคดเมียม เป็นต้น สีผสมอาหารที่นิยมใช้ได้แก่ สีสังเคราะห์ เป็นสีที่สังเคราะห์ขึ้นจากสารเคมีต่างๆ ซึ่งค่อนข้างคงตัว เช่น แอโซรูบี เออริทโทรซิน และทาร์ทราซิน สีอินทรีย์ เช่น ผงถ่านที่ได้จากการเผาพืช และสีธรรมชาติ เป็นสีที่สกัดได้จากพืชหรือสัตว์ที่บริโภคได้ เช่น แอนโธไซยานิน แคโรทีนอยด์ และคลอโรฟิลล์ เป็นต้น

1.3 พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์ เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลของน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์หลายโมเลกุลเชื่อมต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ด้วยพันธะไกลโคสิดิก ซึ่งชนิดที่พบมากในพืชทั่วไปคือ สตาร์ช (starch) เซลลูโลส และเพกติน พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นการเชื่อมต่อกันของโมโนเมอร์ชนิดเดียวกันเรียกว่า โฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น สตาร์ช เดกซ์ทริน เซลลูโลส และเพกติน แต่ถ้าเป็นคนละชนิดกันเรียกว่า เฮทเทอร์โรพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น เฮมิเซลลูโลส อัลจินิก (alginic) และกัม (gums) พอลิแซ็กคาไรด์ที่น้ำย่อยในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้เรียกว่า ใยอาหาร (fiber) ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถสกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็กได้แก่ เอการ์หรือวุ้น (agar) อัลจิเนต (alginate) และคาราจีแนน (carageenan) นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ผลิตเป็นสีผสมอาหาร ตัวยารักษาโรคต่างๆ (ยุวดี, 2549) พอลิแซ็กคาไรด์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของอาหารตามคุณสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิด ที่นิยมใช้กันมาก คือ สารเพิ่มความคงตัว สารเพิ่มความหนืด อิมัลซิไฟอิง

เอเจนต์ สารช่วยให้เกิดเจล และสารที่ทำให้เกิดฟิล์ม การนำโพลีแซ็กคาไรด์ไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ จะมีการค้นคว้าและรายงานผลการวิจัยใหม่ๆ อยู่เสมอ และยังมีการพัฒนาการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดใหม่ๆ ขึ้นมาด้วย โดยเฉพาะจากวัตถุดิบทางการเกษตรต่างๆ นอกจากนี้สาหร่ายยังมีคาร์โบไฮเดรตและใยอาหารในปริมาณสูง เมื่อเปรียบเทียบใยอาหารของสาหร่ายกับพืชอาหาร พบว่าสาหร่ายมีใยอาหารที่ละลายน้ำ (suluble fiber) และใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble fiber) สูงกว่าพืชอาหารทั่วไปหลายชนิด (Burtin, 2003 และ MacArtain *et al*., 2007)

2. ผลิตเป็นพลังงานทดแทน

ไขมันจากเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กมีองค์ประกอบและคุณสมบัติใกล้เคียงกับพืชน้ำมันทั่วไป เช่น ถั่วเหลือง และปาล์มน้ำมัน เป็นต้น แต่ราคาของวัตถุดิบที่เป็นพืชน้ำมันเหล่านี้มีความผันผวนเป็นอย่างมากและข้อจำกัดในหลายๆ ด้าน เช่น ต้องการพื้นที่ในการเพาะปลูกมาก มีระยะเวลาในการเพาะปลูกที่ยาวนาน และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นพืชอาหาร จึงกลายเป็นประเด็นเรื่องการใช้พืชน้ำมันเหล่านี้เพื่อผลิตอาหารและพลังงานทดแทนหากมีการจัดการที่ไม่ถูกต้องอาจจะส่งผลกระทบต่อความมั่นคงทางอาหารในอนาคตได้ ทำให้สาหร่ายขนาดเล็กได้รับความสนใจที่จะนำมาพัฒนาเป็นวัตถุดิบทางเลือกใหม่ในการผลิตเป็นพลังงานชีวภาพ อนึ่งประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิประเทศในเขตร้อนชื้น มีปริมาณแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเป็นอย่างดี สามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ตลอดทั้งปี โดยสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพในการผลิตไขมันส่วนใหญ่ยกตัวอย่างเช่น สายพันธุ์ *Chlorella* sp. *Botryococcus* sp. และ *Scenedesmus* sp. เป็นต้น ข้อมูลจากการศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อพื้นที่ขนาดเท่ากับพื้นที่ปลูกสบู่ดำ 1 ต้น เป็นเวลา 7 ปี สบู่ดำจะให้น้ำมันร้อยละ 25 ในขณะที่สาหร่ายให้น้ำมันมากถึงร้อยละ 1,000 ปริมาณน้ำมันนี้อาจเพียงพอกระทั่งผลิตเพื่อส่งออกต่างประเทศได้ (ประเวศ, 2553) และหากเปรียบเทียบศักยภาพของสาหร่ายกับและพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ เช่น ถั่วเหลือง จากปริมาณน้ำมันจากชีวมวลสาหร่ายที่ได้ร้อยละ 30 (Mata, 2010) สาหร่ายขนาดเล็กบางสายพันธุ์มีการสะสมอาหารไว้ในรูปของไขมันเป็นจำนวนมาก ซึ่งไขมันดังกล่าวจะมีมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ โดยพบว่ามีหลายสายพันธุ์มีไขมันเป็นองค์ประกอบสูงกว่า35 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง เช่น สาหร่าย Botryococcus braunii มีปริมาณน้ำมัน 25-80 % Neochloris oleoabundans มีปริมาณน้ำมัน 35-65 % หรือ *Schizochytrium* sp. มีปริมาณน้ำมัน 50-77 % เป็นต้น (Chisti, 2007) กระบวนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กให้ได้ผลผลิตชีวมวลสูงๆ จึงต้องคำนึงถึงองค์ประกอบของอาหารได้แก่ ไฮโดรเจน ออกซิเจน คาร์บอน ไนโตรเจน กำมะถันและฟอสฟอรัส กับจุลธาตุอื่น ๆ (Microalgae biotechnology, 2014) และระบบการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้การเลี้ยงสาหร่ายจะช่วยให้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง เพราะสาหร่ายต้องใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในการสังเคราะห์แสง ทำให้เป็นการช่วยลดภาวะโลกร้อนได้อีกทางหนึ่ง

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อผลิตไบโอดีเซล ประกอบด้วยหน่วยปฏิบัติการหลัก 4 ขั้นตอน คือ การเพาะเลี้ยงสาหร่าย การเก็บเกี่ยวสาหร่าย การสกัดน้ำมันจากสาหร่าย และการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่าย ประมาณการเบื้องต้นของการคำนวณต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายคือ 38.85 บาท/ลิตร (ผกามาศ และคณะ, 2559) โดยระบบการเพาะเลี้ยงมีอยู่ 2 แบบใหญ่ คือ บ่อเปิด (open pond) และระบบปิด ที่เรียกว่า photobioreactor ระบบทั้งสองมีข้อดีข้อด้อยต่างกันคือ ระบบบ่อเปิดมีข้อดีคือ มีต้นทุนต่ำกว่า แต่ประสิทธิภาพการให้ผลผลิตต่ำเพราะการกระจายของแสงไม่ทั่วถึง มีการสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์ เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นได้ง่าย ทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ต่ำประมาณ 0.1-0.2 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ระบบปิดนั้นมีประสิทธิภาพการให้ผลผลิตมีความเข้มข้นของเซลล์สูงถึง 2-8 กรัมต่อลิตร แต่จะเกิดการเจริญของสาหร่ายที่ผนัง reactor (wall growth) และอาจมีปัญหาเรื่องการขยายขนาดได้

กรมวิชาการเกษตร

การสกัดน้ำมันจากสาหร่ายมีหลายวิธีด้วยกัน คือ 1) การบีบ (oil press method) เป็นวิธีที่ง่ายและเป็นที่นิยม หลักการเหมือนกับการบีบน้ำมันมะกอกการสกัดน้ำมันโดยวิธีนี้จะได้น้ำมันประมาณ 75 % ของปริมาณสาหร่ายที่นำมาบีบ 2) การสกัดโดยใช้สารละลายเฮกเซน (hexane solvent method) เป็นการรวมการบีบและใช้สารละลายเฮกเซนเข้าด้วยกัน โดยขั้นตอนแรกจะทำการบีบสาหร่ายเพื่อเอาน้ำมันก่อนหลังจากนั้น นำสาหร่ายที่บีบเสร็จมาผสมกับเฮกเซนเพื่อสกัดเอาน้ำมันที่เหลือออก การสกัดโดยวิธีนี้จะได้น้ำมันประมาณ 95% ของปริมาณสาหร่ายที่นำมาสกัด และ 3) ซุปเปอร์คริติคอลฟลูอิด (supercritical fluids method) (อุรัจฉวี อุณหเลขกะ, 2555)

การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายด้วยปฏิกิริยาที่เรียกว่า ทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นด้วยเมทานอลเป็นหลัก และมีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดหรือด่างเข้ามาช่วยอย่างเช่น Miao and Wu (2006) ที่ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่มีกรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากไขมันที่สกัดจากสาหร่าย *Chlorella protothecoides* โดยใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันที่ 56:1 โมลาร์ ทำให้ได้ Crude lipid ออกมาจากเซลล์สาหร่ายเป็นปริมาณสูงถึง 55.2 % และ Hossain *et al*.(2008) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Oedogonium* sp. และ *Spirogyra* sp. ทำการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายโดยใช้เฮกเซน:อีเทอร์ อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสาหร่าย*Oedogonium* sp. มีน้ำมันมากกว่าสาหร่าย *Spirogyra*sp. คือ 9.2 % และ 7.3 % ตามลำดับ จากนั้นทำการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันพบว่าสาหร่าย *Oedogonium* sp. สามารถผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้เท่ากับ 97 % มากกว่าผลได้ของไบโอดีเซลจากสาหร่าย *Spirogyra* sp. 92 %

3. ผลิตพอลิเมอร์และพลาสติกชีวภาพ

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เป็นทางเลือกใหม่ด้านพลาสติกเพื่อสิ่งแวดล้อมที่มีความสำคัญและได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง เมื่อทำการจำแนกพบว่า ส่วนใหญ่เป็นความต้องการพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพในกลุ่มที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบพื้นฐาน (Starch Base) คิดเป็นร้อยละ 66 รองลงมาคือ พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพในกลุ่ม Polyester Base เช่น PLA, PBS และ PBAT เป็นต้น คิดเป็นร้อยละ 27 โดยถูกนำไปใช้งานในด้านบรรจุภัณฑ์มากที่สุด ถึงร้อยละ 70 ผลิตเป็นเส้นใยและสิ่งทอร้อยละ 16 และใช้ในด้านการเกษตรเพื่อเป็นถุงเพาะชำและฟิล์มคลุมดินร้อยละ 7 ตามลำดับ สำหรับประเทศไทยที่เป็นประเทศเกษตรกรรม มีการเพาะปลูกพืชจำนวนมาก ทำให้ประสบปัญหาปริมาณขยะพลาสติกจากภาคการเกษตรที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การใช้พลาสติกชีวภาพสำหรับการเกษตร เช่น ฟิล์มคลุมดิน ฟิล์มคลุมโรงเรือน ถาดเพาะเมล็ด และกระถางปลูกต้นไม้ได้ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งของการจัดการเชิงรุกเพื่อลดปริมาณขยะพลาสติก ลดค่าใช้จ่ายของการกำจัดขยะและป้องกันปัญหาสิ่งแวดล้อมต่างๆ โดยตัวอย่างผลิตภัณฑ์พลาสติกสำหรับการเกษตรที่นิยมใช้เป็นอันดับแรกอย่างเช่น ถุงเพาะชำ ซึ่งประเทศไทยมีการใช้ถุงเพาะปลูกพืชจำนวนมากปีละประมาณ 100 ล้านใบ ทำให้ประสบปัญหาปริมาณขยะพลาสติกจากภาคการเกษตรที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ถุงเพาะชำที่มีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด เป็นถุงพลาสติกที่ใช้เวลาย่อยสลาย ประมาณ 600 ปี ขึ้นไป ทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นขยะที่มีมลพิษทั้งบนพื้นดิน และบางครั้งไหลลงสู่ทะเลเป็นมลพิษต่อสัตว์น้ำ เกิดเป็นไมโครพลาสติกที่กลับมาเป็นอันตรายต่อมนุษย์ ดังนั้นการใช้ถุงเพาะชำที่ผลิตจากพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งของการแก้ปัญหานี้

การผลิตถุงเพาะชำย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ที่สามารถนำไปปลูกพร้อมกับต้นกล้าในแปลงปลูกได้ทันทีโดยไม่ต้องฉีกถุง ทำให้ไม่เกิดการกระทบกระเทือนต่อระบบรากของพืช และจะย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติภายในระยะเวลาที่เหมาะสม จากพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีอยู่ในเซลล์สาหร่ายและด้วยคุณลักษณะของเซลล์ที่มีส่วนช่วยในการตรึงไนโตรเจนได้นั้น องค์ประกอบพื้นฐานในการผลิต การปรับปรุงคุณสมบัติ สูตรผสม และกระบวนการสารเติมแต่งลงในส่วนผสมได้ในปริมาณที่เหมาะสม ช่วยให้ไม่เกิดการกระจายตัวของสารที่ดี ได้ถุงที่มี

กรมวิชาการเกษตร

เนื้อเรียบเนียน และแข็งแรง สามารถนำไปใช้ทดแทนหรือแทนที่ถุงเพาะชำที่ผลิตจากพลาสติกปิโตรเคมีซึ่งย่อยสลายได้ยากได้ด้วย โดยงานวิจัยด้านการปรับปรุงคุณสมบัติฟิล์มชีวภาพจากแป้ง เช่น Bourtoom (2008) ได้ศึกษาผลของไคโตซาน ที่เป็นพลาสติไซเซอร์ต่อคุณสมบัติของฟิล์มจากแป้งข้าวมีความต้านทานแรงดึงขาดลดลง มีเปอร์เซ็นต์การยืดตัว WVTR และการละลายเพิ่มขึ้น สารซอบิ-ทอลนั้นจะทำให้ฟิล์มเปราะที่สุดแต่มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงสุด ส่วนกลีเซอรอลและพอลิเอทิลีนไกลคอลให้ฟิล์มที่มีคุณสมบัติยืดหยุ่นได้ดี Chillo *et al.,* (2008) ศึกษาผลของกลีเซอรอลและไคโตซานต่อคุณสมบัติของแป้งมัน พบว่าไคโตซานช่วยทำให้ฟิล์มมีคุณสมบัติต้านแรงดึงขาดดีขึ้น แต่มี WVTR ลดลง ส่วนกลีเซอรอลให้ฟิล์มที่มีคุณสมบัติกลับกัน โดยปริมาณที่เหมาะสมของไคโตซานและกลีเซอรอลคือ 0.55 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ และสารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol: PVA) เป็นเทอร์โมพลาสติกที่มีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถย่อยสลายได้โดยวิธีชีวภาพและติดไฟได้คล้ายกระดาษ นอกจากนี้ยังสามารถละลายในน้ำได้

ดังนั้นในกิจกรรมวิจัยส่วนนี้ จึงมุ่งเน้นศึกษาวิธีการสกัดสารสำคัญจากสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพในการผลิตสารสำคัญได้แก่ สารแคโรทีนอยด์ พอลิแซ็กคาไรด์ ไขมัน และพอลิเมอร์ชีวภาพ เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณสารสกัดสูงสุดและสารสกัดที่ได้มีคุณสมบัติที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องสำอาง พลังงานชีวภาพ และพลาสติกชีวภาพ

กรมวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. สายพันธุ์สาหร่าย

สายพันธุ์สาหร่ายบริสุทธิ์จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Coelastrella* sp. (SK-QSGMF6), *Coelastrum* sp. (SK-KhY6), *Coelastrella microporum* (A052), *Botryococcus* sp. (CM01-4), *Desmodesmus* sp. (KK20) และ *Nostoc* sp. (SM6-3) จากห้องปฏิบัติการสาหร่าย กลุ่มวิจัยและพัฒนาการแปรรูปผลิตผลเกษตร กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

2. อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารอาหารมาตรฐานสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ Modified chu 13, BG-11 และ BG-11 (NFree) (ภาคผนวก ก)
2. ปุ๋ยสูตร 16-8-8, 15-15-15 และ 8-24-24
3. สารเคมีสำหรับเตรียมผลิตภัณฑ์เซรั่ม ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยดอกคาโมมายล์ ไฮดรอกซี่เอธิลเซลลูโลส กลีเซอรีน ไกลแดนท์ ทวีน 80
4. สารเคมีสำหรับเตรียมผลิตภัณฑ์แผ่นมาร์กหน้า ได้แก่ สารสกัดว่านหางจระเข้เข้มข้นแบบผง คาร์โบพอล 940 ไตรเอททาโนลาไมล์ น้ำมันหอมระเหยกุหลาบ ยูนิเจริม จี ทู วิตามินอี อะซิเตท กรดมาลิก
5. สารสำหรับเตรียมผลิตภัณฑ์ไอศกรีม ได้แก่ น้ำตาล นม กลิ่นวานิลลา แป้งข้าวโพด ไข่ไก่
6. สารเคมีสำหรับการสกัดไขมันได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซีโตน เฮกเซน กรดซัลฟูริก และโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์
7. สารเคมีสำหรับการสกัดสารพอลิเมอร์ชีวภาพ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม กรดซัลฟูริค โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl)
8. มอลโตเด็กซ์ทริน เกรดอาหาร
9. เอทานอล เกรด AR (Ethanol, RCI Labscan)
10. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride, Ajax)
11. บ่อเลี้ยงสาหร่ายแบบเปิด พร้อมมอเตอร์
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกกากเซลล์จุลินทรีย์แบบอัตโนมัติ (GEA Westfalia, Model SSE10-06-007)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich Zentrifugen, Model Mikro 22 R)
14. เครื่องสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะยิ่งยวด (Spe-ed SFE, Model Prime)
15. เครื่องวัดสี (Chroma meter, Minolta CR 400)
16. เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (วอเตอร์แอกทิวิตี: Water activity: aw) (Novasina, TH200)
17. เครื่องวัดความเป็นกรดด่างแบบพกพา (Hand pH meter Testo, Model 206 pH 1)
18. เครื่องวัดความหนืด (Brookfield, Model DV-111+)
19. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer)
20. เครื่อง GC-MS, Perkin Elmer Clarus SQ8
21. เครื่อง Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectrometer
22. หม้อนึ่งฆ่าเชื้ออัดความดัน (ยี่ห้อ: HIRAYAMA, รุ่น HICLAVE HVA-110)
23. เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer)
24. เครื่องวัดความหนา Dial Thickness Gauge, MOORE & WEIRHT
25. เครื่องวัดความชื้น Sartorius ME Model
26. เครื่องระเหยสาร (Buchi, R - 124/S)

กรมวิชาการเกษตร

27. เครื่องปั่นไอศกรีม (TAYLOR, U.S.A)
28. เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Labplant, SD-06AG)
29. เครื่องทดสอบคุณสมบัติเชิงกล (INSTRON, 3300 Series)
30. บรรจุภัณฑ์ เช่น ถ้วยพลาสติก เป็นต้น
31. อุปกรณ์เครื่องครัวสแตนเลส
32. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น หลอดแก้ว บีกเกอร์ แท่งแก้วคนสาร เป็นต้น
33. เครื่องกวนผสม (IKA, Model C-Mag HS 7)
34. เครื่องกวนผสมด้วยกระแสนำวน (Vortex-Genie2, Model G-560E)
35. แผ่นมาส์กหน้าสำเร็จรูป (Mask sheet, Nicia)
36. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Ohaus, Model PA2102)
37. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Model ME204)
38. ตู้อบลมร้อน (Binder, Model ED53)

วิธีการ

1. การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากสาหร่ายขนาดเล็ก

1.1 การผลิตชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็ก (Biomass production)

นำสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Coelastrella* sp. (SK-QSGMF6) และ *Coelastrum* sp. (SK-KhY6) ซึ่งมีศักยภาพสูงในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (นราทร และคณะ, 2562) มาเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดแบบบ่อเปิด (Raceway pond) ขนาด 10,000 ลิตร ใช้สูตรปุ๋ย 16-8-8 อัตราส่วน 1/500 เป็นเวลา 15 วัน และเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ เลี้ยงต่อเป็นเวลา 15 วัน โดยใช้ใบพัดมอเตอร์ (paddle wheel) ที่มีความเร็วรอบในการหมุน 30-50 rpm เมื่อครบกำหนดจึงเก็บเกี่ยวชีวมวลสาหร่ายด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกกากเซลล์จุลินทรีย์แบบอัตโนมัติและอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์เพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเครื่องสำอาง

1.2 การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีมูลค่าสูงจากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

ศึกษาวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากเซลล์สาหร่าย โดยใช้วิธีการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะยิ่งยวด ที่ความดันและอุณหภูมิต่างๆ โดยใช้ตัวอย่างสาหร่ายแห้งจำนวน 40 กรัม บดพอหยาบ เข้าเครื่องสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตราการไหล 3 ลิตร/นาที ระยะเวลาในการสกัด 3 ชั่วโมง วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่สกัดได้ ด้วยการวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) โดยคอลัมน์ VertiSepTM Bio C30, 4.6 x 250 mm, 5 µm ใช้เฟสเคลื่อนที่ A = methanol:methyl tert-butyl ether:1.5% ammonium acetate ในน้ำอัตราส่วน 95:3:2 (v/v/v) B = methanol:methyl tert-butyl ether:1.0% ammonium acetate ในน้ำอัตราส่วน 8:90:2 (v/v/v) ที่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 mL/min เทียบกับของสารมาตรฐาน 5 ชนิด คือ เบต้าแคโรทีน ไลโคปีน ลูทีน ซีแซนธิน และแอสตาแซนธิน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ 3x3 Factorial in Randomized Complete Block Design จำนวน 3 ซ้ำ

ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ ความดันในการสกัดสารที่ระดับ 300 400 และ 500 บาร์

ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ อุณหภูมิในการสกัดสารที่ระดับ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส

1.3 การศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสำคัญที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก

กรมวิชาการเกษตร

1) ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีววิทยาเบื้องต้นหรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงตามวิธีของ Cotelle *et al.* (1996))

2) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง โดยใช้ Kojic acid เป็นสารมาตรฐาน (ดัดแปลงวิธีของ Kubo *et al.* (2000) และ Saewan *et al.* (2011))

บันทึกข้อมูล

- ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงค่าเป็น IC_{50} โดยเตรียมสารสกัด 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ที่มีสารละลายอนุมูล DPPH ปริมาตร 900 µL ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลเป็นแบลงค์จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณ % Free radical scavenging activity เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่าย กับ % FRSA เทียบกับวิตามินซี

- ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง แสดงค่าเป็น IC_{50} โดยผสมสาร L-DOPA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมล กับ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมล (pH 6.8) บ่มเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่าง เติมเอนไซม์ไทโรซิเนส (138 units) บ่มไว้นาน 10 นาที วัดปฏิกิริยาโดยวัดการเกิดสาร dopachrome วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า % Tyrosinase inhibition

1.4 การศึกษาการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายขนาดเล็กไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

1.4.1 การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่าย SK-QSGMF6 ในผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิว

1) นำสารสกัดที่ได้มาละลายในน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์ ที่ความเข้มข้นสารสกัดสาหร่าย 2% โดยน้ำหนัก ปั่นกวนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนผสมกระแสน้ำวน (vortex mixer)

2) นำเซรั่มบำรุงผิวสูตรพื้นฐานที่ขายทั่วไปมาประยุกต์โดยการปรับลักษณะเนื้อสัมผัสของเซรั่มเพื่อให้ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 3.5-5.5 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะกับผิว แปรปริมาณของไฮดรอกซี่เอธิลเซลลูโลสเป็น 4 ระดับ คือ 0.6 0.8 1.0 และ 1.2% ร่วมกับการใช้ทวีน 80 จำนวน 2 ระดับ คือ 2.0 และ 4.0% เติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายขนาดเล็กที่ละลายในน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์ ดังตารางที่ 8 โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ Randomized Complete Block Design 8 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ และมีกรรมวิธีที่ 1 เป็นกรรมวิธีควบคุม ดังนี้

ตารางที่ 8 ส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวสูตรพื้นฐานและสูตรประยุกต์เพิ่มสารสกัดจากสาหร่าย

กรรมวิธี	รหัสตัวอย่าง	ส่วนผสมที่ 1 (%) (สารสกัด 2%wt. ในน้ำมันหอมระเหยคาโมมาย)	ส่วนผสมที่ 2				ทวีน 80 (%)
			HEC	กลีเซอรีน (%)	ไกลเดนท์ (%)	น้ำ (%)	
1	Serum base	0	1.2	3	0.5	95.3	0
2	H0.6T2	1	0.6	3	0.5	92.9	2
3	H0.6T4	1	0.6	3	0.5	90.9	4
4	H0.8T2	1	0.8	3	0.5	92.7	2
5	H0.8T4	1	0.8	3	0.5	90.7	4
6	H1.0T2	1	1.0	3	0.5	92.5	2
7	H1.0T4	1	1.0	3	0.5	90.5	4
8	H1.2T2	1	1.2	3	0.5	92.3	2
9	H1.2T4	1	1.2	3	0.5	90.3	4

กรมวิทยาศาสตร์

การเตรียมผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวจะแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมส่วนที่ 1 โดยผสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายขนาดเล็กละลายในน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์ที่ความเข้มข้น 2 % โดยน้ำหนัก กวนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องกวนผสมกระแสน้ำวน

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมส่วนที่ 2 เป็นส่วนของเบสเซรั่ม เตรียมโดยละลายไฮดรอกซี่เอธิลเซลลูโลสในน้ำกลั่น ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กวนผสมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน 30 นาที จะได้เป็นสารละลายลักษณะข้นหนืดและใส จากนั้นทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิห้อง เติมกลีเซอรีน และ ไกลแดนท์ กวนผสมต่อจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน

ขั้นตอนที่ 3 เติมทวีน 80 และสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็กในน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์ลงในเบสเซรั่ม กวนผสมต่อจนเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิว

3) วิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวผสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายขนาดเล็ก โดยวิเคราะห์ค่าสี ความเป็นกรดด่าง ความหนืด ความคงตัวหลังการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที (Farahin *et al.,* 2018)

4) ทดสอบความชอบทางด้านประสาทสัมผัสผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวหลังการทาเซรั่ม ได้แก่ สี ความหนืด การซึมสู่ผิว ความเหนียว กลิ่นหลังทา และความชุ่มชื่นหลังทาโดย ผู้ทดสอบจำนวน 27 คน โดยให้ผู้ทดสอบแบ่งช่องที่ท้องแขน และทาผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวใต้ท้องแขนแต่ละกรรมวิธีลงในช่องที่แบ่งไว้ที่ละกรรมวิธี และให้คะแนนความชอบในด้านต่างๆที่ระดับคะแนน 1-7 คะแนน และคัดเลือกสูตรกรรมวิธีที่ได้คะแนนความชอบสูงสุด

5) ศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่ระยะเวลา 3 เดือน โดยวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพทุกเดือน บันทึกข้อมูล

- ข้อมูลทางกายภาพของเซรั่มบำรุงผิวในแต่ละกรรมวิธี ได้แก่ ค่าสี ความเป็นกรดด่าง ความหนืดความคงตัวหลังการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4000 รอบ/นาที
- ข้อมูลด้านประสาทสัมผัสของเซรั่มบำรุงผิวในแต่ละกรรมวิธี ได้แก่ สี ความหนืด การซึมสู่ผิว ความเหนียว กลิ่นหลังทา และความชุ่มชื่นหลังทา
- ข้อมูลการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ค่าสี ความเป็นกรดด่าง ความหนืด ที่ระยะเวลา 1 2 และ 3 เดือน

1.4.2 การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่าย SK-KhY6 ในผลิตภัณฑ์แผ่นมาส์กหน้า

1) นำสารสกัดที่ได้มาละลายในน้ำมันหอมระเหยกุหลาบความเข้มข้น 5% จากนั้นแช่ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้สารสกัดละลายในน้ำมันหอมระเหย หลังจากนั้นนำมากวนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนผสมกระแสน้ำวน

2) เตรียมเนื้อเจลสำหรับแผ่นมาส์กหน้า โดยใช้เบสเจลว่านหางจระเข้มาปรับปรุงสูตร โดยแปรปริมาณของเบสเจลว่านหางจระเข้ เป็น 2 ระดับ คือ 80 และ 90% และแปรปริมาณสารสกัดจากสาหร่ายในน้ำมันหอมระเหยกุหลาบ เป็น 2 ระดับ คือ 0.3 และ 0.6%

การเตรียมเบสเจลว่านหางจระเข้สำหรับผลิตภัณฑ์แผ่นมาส์กหน้า

ส่วนประกอบของเบสว่านหางจระเข้ปริมาณ 1,000 กรัม

- สารสกัดว่านหางจระเข้เข้มข้นแบบผง จำนวน 10 กรัม
- คาร์โบพอล 940 จำนวน 5 กรัม
- ไตรเอททาโนลาไมล์ จำนวน 20 กรัม
- ยูนิเจิร์ม จีทู จำนวน 10 กรัม
- น้ำสะอาด จำนวน 955 กรัม

ขั้นตอนการผลิต:

- เติมยูนิเจริ์ม จีทู ในน้ำสะอาด 855 กรัม คนให้เข้ากัน จากนั้นค่อยๆ เติมคาร์โบพอล คนให้กระจายตัว ปิดฝาให้สนิท พักไว้ 1 คืนเพื่อให้คาร์โบพอลพองตัว
- ละลายสารสกัดว่านหางจระเข้เข้มข้นแบบผง 10 กรัม ในน้ำสะอาด 100 กรัม คนให้ละลายจนใส
- เทสารละลายว่านหางจระเข้ลงในสารละลายคาร์โบพอลที่พักค้างคืนไว้ กวนผสมให้เข้ากัน
- ค่อยๆ หยดไตรเอททาโนลาไมล์ทีละน้อยๆ และคนผสมเรื่อยๆ สารละลายจะเริ่มหนืดมากขึ้น ผสมให้เข้ากันจะได้เบสเจลว่านหางจระเข้ที่มีลักษณะหนืดใส

3) วิธีเตรียมแผ่นมาส์กหน้าจากสารสกัดสาหร่ายขนาดเล็ก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ Completely Randomized Design 4 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ

ตารางที่ 9 ส่วนผสมในการเตรียมเนื้อเจลสำหรับทำแผ่นมาร์กหน้าในแต่ละกรรมวิธี

กรรมวิธีที่	กลีเซอรีน (%)	วิตามินอี (%)	เบสว่านหางจระเข้ (%)	ปริมาณสารสกัดในน้ำมันหอมระเหย (%)	กรดมาลิก (%)	น้ำกลั่น (%)
1	5	2	80	0.3	0.4	12.3
2	5	2	80	0.6	0.4	12
3	5	2	90	0.3	0.4	2.3
4	5	2	90	0.6	0.4	2

1. ชั่งเบสว่านหางจระเข้ตามกรรมวิธีต่างๆ (ตารางที่ 9)
2. เติมกลีเซอรีน วิตามินอี และสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็กในน้ำมันหอมระเหยกุหลาบความเข้มข้น 5 % ตามกรรมวิธี และกวนผสมให้ทุกอย่างเข้ากัน
3. เติมน้ำกลั่นตามกรรมวิธี กวนผสมจนส่วนผสมทั้งหมดกลายเป็นเนื้อเจล
4. เติมกรดมาลิกลงในเนื้อเจล และกวนผสมให้เข้ากัน เนื้อเจลจะหนืดน้อยลง สาเหตุที่ต้องเติมกรดมาลิก เนื่องจากเบสเจลว่านจระเข้เป็นมีค่าความเป็นด่าง จึงไม่เหมาะกับผิว
5. ชั่งเนื้อเจลสำหรับแผ่นมาส์กหน้าจำนวน 30 กรัม นำแผ่นมาส์กหน้าใส่ในถุงอลูมิเนียมจากนั้นนำเนื้อเจลมาส์กหน้าใส่ลงไป ค่อยๆไล่ให้เจลไหลเต็มแผ่นมาส์กหน้า
6. ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้เจลซึมเคลือบแผ่นมาส์กหน้า
7. ทดสอบสมบัติทางกายภาพของเนื้อเจลและลักษณะของแผ่นมาส์กหน้า ได้แก่ ค่าสี ค่าความเป็นกรดด่าง ความหนืด และลักษณะการซึมสู่แผ่นมาส์กหน้า

4) ทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

1. เพื่อทดสอบสมบัติด้านกายภาพ ด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น ความชุ่มชื้นหลังมาส์ก ความเหนียวเหนอะหนะ การซึมสู่ผิว โดยเตรียมแผ่นมาส์กดังนี้

- เตรียมตัดแผ่นมาส์กหน้าเป็นชิ้น ที่มีขนาดเท่ากัน ดังภาพที่ 18 โดยคำนวณมาจากน้ำหนักแผ่นมาส์กหน้าแผ่นใหญ่ จะได้แผ่นมาส์กหน้าขนาดเล็กสำหรับการทดสอบ โดยจะทดสอบที่ท้องแขน

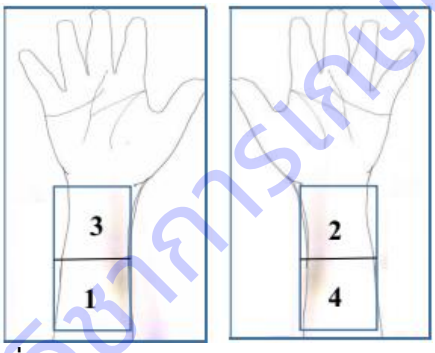
ภาพที่ 18 การตัดแผ่นมาร์กหน้าสำหรับทดสอบทางประสาทสัมผัส

กรมวิชาการเกษตร

- เตรียมเนื้อเจลสำหรับแผ่นมาส์กหน้าทั้ง 4 กรรมวิธี โดยใส่เนื้อเจลจำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในแผ่นมาส์กหน้าที่ตัดสำหรับการทดสอบ (ภาพที่ 19)

ภาพที่ 19 แผ่นมาร์กสำหรับการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส (บริเวณท้องแขน)

- ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 20 คน โดยให้ผู้ทดสอบล้างท้องแขนทั้ง 2 ข้าง ให้สะอาดและเช็ดให้แห้ง จากนั้นแบ่งท้องแขน 2 ข้างเป็น 4 ช่อง และเขียนหมายเลขผลิตภัณฑ์ แปะไว้ทั้ง 4 ช่อง โดยการสุ่ม แปะแผ่นมาส์กลงในช่องที่เลือกไว้ ทิ้งไว้นิ่งๆ 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด ติดตามการแพ้หลังจากผ่านไป 1 ชั่วโมง ดังภาพที่ 20 โดยทดสอบความชอบด้านสี การซึมสู่ผิว ความเหนียวเหนอหนะ กลิ่นหลังมาส์ก ความชุ่มชื่นหลังมาส์ก และความชอบโดยรวม



ภาพที่ 20 ตัวอย่างการทดสอบทางประสาทสัมผัส

2. ทดสอบชนิดสารที่แพ้ในแผ่นมาส์กหน้าผสมสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็ก

ทดสอบการแพ้โดยใช้แผ่นมาส์กหน้าจำนวน 4 สูตรแปะที่ท้องแขน เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างออก ประกอบด้วย

- แผ่นมาส์กหน้าเคลือบเบสว่านหางจระเข้ เพื่อทดสอบการแพ้เบสว่านหางจระเข้
- แผ่นมาส์กหน้าเคลือบเบสว่านหางจระเข้และปรับกรดด้วย AHAs คือกรดมาลิก เพื่อทดสอบการแพ้ AHAs คือกรดมาลิก
- แผ่นมาส์กหน้าเคลือบเบสว่านหางจระเข้ผสมน้ำมันหอมระเหยกุหลาบ (ไม่ใส่สารสกัดและกรดมาลิก) เพื่อทดสอบการแพ้น้ำมันหอมระเหยกุหลาบ
- แผ่นมาส์กหน้าเคลือบเบสว่านหางจระเข้ผสมสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์ในน้ำมันหอมระเหยกุหลาบ (ไม่ปรับกรดมาลิก) เพื่อทดสอบการแพ้สารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก ซึ่งต้องวิเคราะห์ร่วมกับข้อ 1. 2. และ 3.

บันทึกข้อมูล

- ข้อมูลทางกายภาพของแผ่นมาส์กหน้าในแต่ละกรรมวิธี ได้แก่ ค่าสี ค่าความเป็นกรดด่าง ความหนืด การเคลือบของเจลบนแผ่นมาส์กหน้า
- ข้อมูลด้านประสาทสัมผัสของแผ่นมาส์กหน้าในแต่ละกรรมวิธี ได้แก่ ความชอบด้านสี การซึมสู่ผิว ความเหนียวเหนอหนะ กลิ่นหลังมาส์ก ความชุ่มชื่นหลังมาส์ก และความชอบโดยรวม

กรมวิชาการเกษตร

- ข้อมูลจำนวนผู้แพ้เซรั่มบำรุงผิว และชนิดขององค์ประกอบที่แพ้

5) เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 เดือน ศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์แผ่นมาส์กหน้าที่ระยะเวลา 3 เดือน โดยเก็บรักษามาส์กหน้าในถุงอลูมิเนียม วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพทุกเดือน โดยสุ่มวิเคราะห์ ค่าสี ค่าความเป็นกรดด่าง

1.5 ต้นทุนการผลิตของผลิตภัณฑ์

คำนวณต้นทุนการผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้ง 2 ผลิตภัณฑ์ คือ เซรั่มบำรุงผิวและแผ่นมาส์กหน้าผสมสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็ก

2. การผลิตสีผงจากสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

2.1 ศึกษาการผลิตสีผงจากสาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว (สารสี chlorophyll)

2.1.1 ศึกษาการสกัดสารสีเขียว (chlorophyll) จากสาหร่ายขนาดเล็ก โดยนำสาหร่ายขนาดเล็กสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 0-95% อัตราส่วน 1:25 (w/v) นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงแยกของเหลว สกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญได้แก่ ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ปริมาณคลอโรฟิลล์บี เพื่อเลือกความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัด วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ มี 11 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 เอทานอลความเข้มข้น 0% (น้ำ)
กรรมวิธีที่ 2 เอทานอลความเข้มข้น 10%
กรรมวิธีที่ 3 เอทานอลความเข้มข้น 20%
กรรมวิธีที่ 4 เอทานอลความเข้มข้น 30%
กรรมวิธีที่ 5 เอทานอลความเข้มข้น 40%
กรรมวิธีที่ 6 เอทานอลความเข้มข้น 50%
กรรมวิธีที่ 7 เอทานอลความเข้มข้น 60%
กรรมวิธีที่ 8 เอทานอลความเข้มข้น 70%
กรรมวิธีที่ 9 เอทานอลความเข้มข้น 80%
กรรมวิธีที่ 10 เอทานอลความเข้มข้น 90%
กรรมวิธีที่ 11 เอทานอลความเข้มข้น 95%

2.1.2 ศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยและอายุการเก็บรักษาของสีผง ทำการระเหยสารสกัดให้มีความเข้มข้นมากขึ้น จากนั้นผสมมอลโตเด็กซ์ทรินอัตราส่วน สารสกัด:มอลโตเด็กซ์ทริน:น้ำ เป็น 1:1:1 (v/w/w) นำเข้าเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิลมร้อนเข้า 130 °C และเปิดแก๊สไนโตรเจนให้ไหลผ่านระบบการทำแห้งแบบพ่นฝอย ตรวจคุณภาพของสีผง ได้แก่ ความชื้น ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี ค่าสี การละลาย ปริมาณคลอโรฟิลล์ นำตัวอย่างสีผงศึกษาอายุการเก็บรักษา โดยบรรจุสีผงในถุงพลาสติกซิปและบรรจุลงในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน สุ่มเก็บตัวอย่างทุก 2 เดือน เพื่อวิเคราะห์คุณภาพ ได้แก่ ความชื้น ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี ค่าสี การละลาย ปริมาณคลอโรฟิลล์ (คำนวณตามสมการของ Lichtenthaler and Buschmann, 2005) และคุณภาพด้านจุลินทรีย์ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ มี 4 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 อายุการเก็บรักษา 0 เดือน
กรรมวิธีที่ 2 อายุการเก็บรักษา 2 เดือน
กรรมวิธีที่ 3 อายุการเก็บรักษา 4 เดือน
กรรมวิธีที่ 4 อายุการเก็บรักษา 6 เดือน

กรมวิชาการเกษตร

2.1.3 ศึกษาการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมนม โดยแปรระดับปริมาณสีผง 5 ระดับ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ปริมาณสีผง 0%
กรรมวิธีที่ 2 ปริมาณสีผง 1%
กรรมวิธีที่ 3 ปริมาณสีผง 2%
กรรมวิธีที่ 4 ปริมาณสีผง 3%
กรรมวิธีที่ 5 ปริมาณสีผง 4%

ตรวจคุณภาพผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ค่าสี ค่า pH ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ และปริมาณคลอโรฟิลล์

2.2 ศึกษาการผลิตสีผงจากสาหร่ายขนาดเล็กสีเหลือง (สารสี carotenoid)

2.2.1 ศึกษาการสกัดสารสีเหลือง (carotenoid) จากสาหร่ายขนาดเล็ก โดยนำสาหร่ายขนาดเล็กสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 60-95% อัตราส่วน 1:25 (w/v) นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงแยกของเหลว จากนั้นนำสารสกัดที่ได้วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญได้แก่ ปริมาณแคโรทีนอยด์ เพื่อเลือกความเข้มข้นเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัด วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ มี 6 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 เอทานอลความเข้มข้น 0% (น้ำ)
กรรมวิธีที่ 2 เอทานอลความเข้มข้น 60%
กรรมวิธีที่ 3 เอทานอลความเข้มข้น 70%
กรรมวิธีที่ 4 เอทานอลความเข้มข้น 80%
กรรมวิธีที่ 5 เอทานอลความเข้มข้น 90%
กรรมวิธีที่ 6 เอทานอลความเข้มข้น 95%

2.2.2 ศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอย ระเหยสารสกัดให้มีความเข้มข้นมากขึ้น จากนั้นผสมมอลโตเด็กซ์ทริน อัตราส่วน สารสกัด:มอลโตเด็กซ์ทริน:น้ำ เป็น 1:1:1 (v/w/w) จากนั้นนำเข้าเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิลมร้อนเข้า 130 °C และเปิดแก๊สไนโตรเจนให้ไหลผ่านระบบการทำแห้งแบบพ่นฝอย ตรวจคุณภาพของสีผง ได้แก่ ความชื้น ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี ค่าสี การละลาย ปริมาณแคโรทีนอยด์ และทำการศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สีผง โดยบรรจุสีผงในพลาสติกซิปและบรรจุลงในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน สุ่มเก็บตัวอย่างทุก 2 เดือน เพื่อวิเคราะห์คุณภาพ ได้แก่ ความชื้น ค่าสี ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี การละลาย ปริมาณแคโรทีนอยด์ (คำนวณตามสมการของ Lichtenthaler and Buschmann, 2005) และคุณภาพด้านจุลินทรีย์ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ มี 3 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 อายุการเก็บรักษา 0 เดือน
กรรมวิธีที่ 2 อายุการเก็บรักษา 2 เดือน
กรรมวิธีที่ 3 อายุการเก็บรักษา 4 เดือน

2.2.3 ศึกษาการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมนม โดยแปรระดับปริมาณสีผง 5 ระดับ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ปริมาณสีผง 0%
กรรมวิธีที่ 2 ปริมาณสีผง 1%
กรรมวิธีที่ 3 ปริมาณสีผง 2%
กรรมวิธีที่ 4 ปริมาณสีผง 3%
กรรมวิธีที่ 5 ปริมาณสีผง 4%

ตรวจคุณภาพผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ค่าสี ค่า pH ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ ปริมาณแคโรทีนอยด์

กรมวิชาการเกษตร

2.3 ศึกษาการผลิตสีผงจากสาหร่ายขนาดเล็กที่ให้สีฟ้า (สารสี phycobilin)

2.3.1 ศึกษาการสกัดสารสีฟ้า (phycobilin) จากสาหร่ายขนาดเล็ก ทำการสกัดสารสีจากสาหร่ายขนาดเล็กด้วยวิธีทางกายภาพ คือ นำเซลล์สาหร่ายผสมกับน้ำ อัตราส่วน 1:1 นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C ประมาณ 16 ชั่วโมง นำออกมาละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นแยกเซลล์สาหร่าย เก็บสารละลายส่วนใสสีน้ำเงิน วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ (สุริยา และคณะ, 2543)

2.3.2 ศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยแปรระดับปริมาณมอลโตเด็กซ์ทริน 3 ระดับ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ปริมาณมอลโตเด็กซ์ทริน 10% โดยน้ำหนัก

กรรมวิธีที่ 2 ปริมาณมอลโตเด็กซ์ทริน 20% โดยน้ำหนัก

กรรมวิธีที่ 3 ปริมาณมอลโตเด็กซ์ทริน 30% โดยน้ำหนัก

โดยผสมสารสกัดกับมอลโตเด็กซ์ทรินให้เข้ากัน นำไปทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิลมร้อนเข้า 110 °C (Purnamayati *et al*., 2017) ตรวจคุณภาพของสีผง ได้แก่ ความชื้น ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี ค่าสี การละลาย ปริมาณสารไฟโคบิลิน (คำนวณตามสมการของ Bennett and Bogorad, 1973)

2.3.3 ศึกษาการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมนม โดยแปรระดับปริมาณสีผง 5 ระดับ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ปริมาณสีผง 0%

กรรมวิธีที่ 2 ปริมาณสีผง 1%

กรรมวิธีที่ 3 ปริมาณสีผง 2%

กรรมวิธีที่ 4 ปริมาณสีผง 3%

กรรมวิธีที่ 5 ปริมาณสีผง 4%

ตรวจคุณภาพผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ค่าสี ค่า pH ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ และปริมาณไฟโคบิลิน

3. การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กและวิธีการเตรียมเซลล์เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบ

สาหร่ายที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์คือ สาหร่าย A052 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3.2 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก มีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 การสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

1) นำสาหร่ายขนาดเล็กปั่นผสมกับเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของน้ำหนักสาหร่ายด้วยเครื่องปั่นผสม จากนั้นให้ความร้อนส่วนผสมที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส กวนส่วนผสมด้วยใบพัดกวนที่ความเร็ว 400 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นบีบแยกเอทานอลออก ได้ส่วนของแข็งที่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ (alcohol-insoluble solid, AIS)

2) นำ AIS ที่ได้มาสกัดด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี กำหนดปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 คือ อัตราส่วน AIS: น้ำ 2 ระดับ คือ 1:1 และ 1:1.5 (w/v)

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการสกัด 2 ระดับ คือ 50 และ 70 นาที

3) นำสารสกัดที่ได้ไปแยกกากโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 9,500 rpm. เป็นเวลา 45 นาที เก็บส่วนใสไประเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศและนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำ

กรมวิชาการเกษตร

แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) หลังจากนั้นนำผงสารสกัดที่ได้ไปบดให้ละเอียดจะได้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กในรูปของแห้ง

4) หาปริมาณผลผลิต (Yield) ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้

3.2.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก ดังนี้

- ปริมาณความชื้น คาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ AOAC (2005)
- ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ด้วยวิธีของ Dubois et al. (1956)
- ปริมาณกรดยูโรนิก (Uronic acid) ด้วยวิธีของ Melton and Smith (2001

3.2.3 การศึกษาโครงสร้างของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเครื่อง (Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectrometer)

3.2.4 การศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก ดังนี้

- ความหนืด ด้วยเครื่องวัดความหนืด (Brookfield Viscometer)
- ความแข็งแรงของเจล (gel strength) ด้วยเครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer) โดยพิจารณาปัจจัยที่มีผลเกี่ยวข้อง คือ ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์และความเป็นกรด-ด่าง (pH)

3.2.5 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กในผลิตภัณฑ์อาหาร

ศึกษาการใช้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กเป็นสารให้ความหนืดในผลิตภัณฑ์ซุปข้าวโพด โดยเปรียบเทียบกับสารให้ความหนืดที่ใช้ในอุตสาหกรรม คือ แซนแทนกัม วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 7 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 คือ ไม่เติมสารให้ความหนืด
กรรมวิธีที่ 2 คือ พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก 0.5 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 3 คือ พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก 1.0 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 4 คือ พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก 1.5 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 5 คือ แซนแทนกัม 0.5 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 6 คือ แซนแทนกัม 1.0 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 7 คือ แซนแทนกัม 1.5 เปอร์เซ็นต์

วิเคราะห์คุณภาพทางด้านความคงตัวโดยวัดการแยกชั้น (percent serum loss, SL) ตามวิธีของ Hardeep *et al.* (2002) และความข้นหนืดของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ซุปข้าวโพดเครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer) ทุก 30 วัน เป็นระยะเวลาการเก็บรักษา 3 เดือน

3.3 การผลิตใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก

3.3.1 การสกัดใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก

1) นำเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กมาสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2 เท่าของน้ำหนักสาหร่ายด้วยเครื่องปั่นผสม จากนั้นให้ความร้อนส่วนผสมที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส กวนส่วนผสมด้วยใบพัดกวนที่ความเร็ว 400 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นบีบแยกเอทานอลออก วางทิ้งไว้เพื่อให้เอทานอลระเหยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อสารสกัดแห้งแล้วบดละเอียดด้วยเครื่องบดและบรรจุในถุงปิดสนิท

2) วิเคราะห์คุณสมบัติของใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก ดังนี้ ปริมาณกากใย (crude fiber) ปริมาณใยอาหารทั้งหมด (total dietary fiber) โดยวิธี AOAC Official Method (AOAC, 2000)

3.3.2 การผลิตผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้าเสริมใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก

กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาการผลิตผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้าเสริมใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 7 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 คือ ไม่เติมใยอาหาร

กรรมวิธีที่ 2 คือ ใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก 1 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 3 คือ ใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก 2 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 4 คือ ใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก 3 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 5 คือ ใยอาหารจากบุก 1 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 6 คือ ใยอาหารจากบุก 2 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 7 คือ ใยอาหารจากบุก 3 เปอร์เซ็นต์

วิเคราะห์ปริมาณใยอาหารในผลิตภัณฑ์พาสต้าเสริมใยอาหาร โดยวิธี AOAC Official Method (AOAC, 2000)

4. การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็กแบบระบบเปิดในระดับขยายขนาด

4.1 การผลิตชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็กแบบบ่อเปิด (open raceway pond)

1) เพาะขยายหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็ก CM01-4 และ KK20 ในอัตราส่วนหัวเชื้อต่อน้ำอาหาร 1:100 ในขวดปริมาตร 5 ลิตร และ ให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.3 วัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

2) เตรียมน้ำอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Modified Chu-13 (เกรดอุตสากรรม) ในบ่อเปิดปริมาตร 500 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง 6.8-7

3) หลังการเพาะเลี้ยงครบ 22 วัน เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในน้ำเพาะเลี้ยงให้มีค่าความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และเพาะเลี้ยงต่อเนื่องอีก 10 วัน

4) เก็บเกี่ยวชีวมวลสาหร่ายด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงโดยปั่นตกตะกอนตัวอย่างสาหร่ายด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกกากที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ด้วยอัตราการไหล 500 ลิตร/ชั่วโมง

4.2 การผลิตไบโอดีเซลจากชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็ก

4.2.1 วิธีการผลิตไบโอดีเซลจากชีวมวลสาหร่าย

1) นำชีวมวลสาหร่ายจากขั้นตอนที่ 1 มาศึกษาวิธีการสกัดไขมันจากชีวมวลสาหร่ายสดและแห้ง ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ เอทานอล เมทานอล อะซิโตน และเฮกเซน โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 3 ซ้ำ

2) ทำการแช่ชีวมวลสาหร่ายแห้งทิ้งไว้ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

3) กรองส่วนที่เป็นของเหลวและนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

4) นำไขมันที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันกับเมทานอล 25 % และใช้โพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 % เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที

5) จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ เพื่อทำความสะอาด

6) เติมโซเดียมไบคาบอเนต 10% แล้วผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที

7) ปั่นให้แยกชั้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

8) ดูดสารละลายชั้นบนซึ่งจะเป็นส่วนที่มีไบโอดีเซล (FAME) ละลายอยู่ไปวิเคราะห์องค์ประกอบและคุณสมบัติเบื้องต้นของน้ำมันไบโอดีเซล

กรมวิชาการเกษตร

4.2.2 วิธีการผลิตไบโอดีเซลจากชีวมวลสาหร่ายสด ดัดแปลงจากวิธีของ Panida (2015)

1) นำชีวมวลสาหร่ายสดมาสกัดน้ำมันด้วยวิธี acidic transesterification กับเมทานอลในอัตราส่วนสาหร่าย 1 กรัม ต่อเมทานอล 3 มิลลิลิตร และใช้กรดซัลฟูริค 10 % เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชั่วโมง

2) ทำการกรองและนำส่วนที่เป็นของเหลวไประเหย

3) จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ เพื่อทำความสะอาด

4) เติมโซเดียมไบคาบอเนต 10% แล้วผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที

5) ปั่นให้แยกชั้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

6) ดูดสารละลายชั้นบน (Organic layer) ซึ่งจะเป็นส่วนที่มีไบโอดีเซล (FAME) ละลายอยู่ไปวิเคราะห์องค์ประกอบและคุณสมบัติเบื้องต้นของน้ำมันไบโอดีเซล

5. การผลิตพลาสติกชีวภาพจากสาหร่ายขนาดเล็ก

5.1 การผลิตชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็กแบบบ่อเปิด (open raceway pond)

1) เพาะขยายหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็ก Sm6-3 ในอัตราส่วนหัวเชื้อต่อน้ำอาหาร 1:100 ในขวดปริมาตร 5 ลิตร และ ให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.3 วัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

2) เตรียมน้ำอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก (จากกิจกรรมที่ 1) และปรับค่ากรด-ด่าง ด้วยสารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ของน้ำเพาะเลี้ยงให้อยู่ในช่วง 6.8 – 7.0 ในบ่อเพาะเลี้ยงแบบบ่อเปิดปริมาตร 500 ลิตร

3) เติมหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็ก Sm6-3 ที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน 1 ลิตรต่อน้ำเพาะเลี้ยง 100 ลิตร เพาะเลี้ยงโดยใช้แสงจากธรรมชาติ ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ และมีการใช้ใบพัดในการหมุนเวียนการไหลของน้ำ

4) เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์หลังวันที่สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และเพาะเลี้ยงต่ออีก 10 วัน

5) หลังครบกำหนดการเพาะเลี้ยง ทำการเก็บเกี่ยวด้วยเครื่องปั่นแยกกากเซลล์จุลินทรีย์อัตโนมัติ

5.2 การสกัดพอลิเมอร์ชีวภาพออกจากชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็ก

นำผลิตผลเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กจากขั้นตอนที่ 1 มาทำการพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 6 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นสกัดสารพอลิเมอร์ชีวภาพออกจากเซลล์และหาปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอคซีบิวไทเรต (PHB) โดยนำชีวมวลสาหร่ายที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ 1 กรัม เติมคลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้น 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และนำชีวมวลสาหร่ายที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ และสารสกัดที่ได้ไปศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพ

5.3 การเตรียมแผ่นฟิล์มเบื้องต้นโดยใช้เซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

ในการทดสอบการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มด้วยสารก่อฟิล์มชนิดต่างๆ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ สารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) สตาร์ช แป้งมันสำปะหลัง และกลีเซอรอล (ประยูร และคณะ, 2558) เพื่อหาสารก่อฟิล์มที่เหมาะสมต่อการขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม โดยนำเซลล์ของสาหร่าย Sm6-3 9 กรัม มาเติมสารก่อฟิล์มแต่ละชนิด 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ต้มกับน้ำสะอาดปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที เทส่วนผสมลงในแผ่นเพลทแก้วแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้

5.4 การเตรียมฟิล์มและทดสอบคุณสมบัติของฟิล์มเซลล์สาหร่าย

กรมวิทยาศาสตร์

ศึกษาอัตราส่วนระหว่างเซลล์ชีวมวลสาหร่ายกับสารพลาสติไซเซอร์ โดยนำชีวมวลสาหร่ายที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ 12 กรัม มาเติมสารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) และสตาร์ช ปริมาณตามกรรมวิธี โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ จำนวน 12 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 คือ เซลล์สาหร่าย 12 กรัม ต่อสาร PVA 2.4 กรัม แป้ง 0.6 กรัม ($AP_{2.4}S_{0.6}$)
กรรมวิธีที่ 2 คือ เซลล์สาหร่าย 12 กรัม ต่อสาร PVA 2.4 กรัม แป้ง 1.2 กรัม ($AP_{2.4}S_{1.2}$)
กรรมวิธีที่ 3 คือ เซลล์สาหร่าย 12 กรัม ต่อสาร PVA 3.0 กรัม แป้ง 0.6 กรัม ($AP_{3.0}S_{0.6}$)
กรรมวิธีที่ 4 คือ เซลล์สาหร่าย 12 กรัม ต่อสาร PVA 3.0 กรัม แป้ง 1.2 กรัม ($AP_{3.0}S_{1.2}$)
กรรมวิธีที่ 5 คือ เซลล์สาหร่าย 12 กรัม ต่อสาร PVA 3.6 กรัม แป้ง 0.6 กรัม ($AP_{3.6}S_{0.6}$)
กรรมวิธีที่ 6 คือ เซลล์สาหร่าย 12 กรัม ต่อสาร PVA 3.6 กรัม แป้ง 1.2 กรัม ($AP_{3.6}S_{1.2}$)
กรรมวิธีที่ 7 คือ เซลล์สาหร่าย 12 กรัม ต่อสาร PVA 4.2 กรัม แป้ง 0.6 กรัม ($AP_{4.2}S_{0.6}$)
กรรมวิธีที่ 8 คือ เซลล์สาหร่าย 12 กรัม ต่อสาร PVA 4.2 กรัม แป้ง 1.2 กรัม ($AP_{4.2}S_{1.2}$)
กรรมวิธีที่ 9 คือ เซลล์สาหร่าย 12 กรัม ต่อสาร PVA 4.2 กรัม แป้ง 1.8 กรัม ($AP_{4.2}S_{1.8}$)
กรรมวิธีที่ 10 คือ เซลล์สาหร่าย 12 กรัม ต่อสาร PVA 4.8 กรัม แป้ง 1.2 กรัม ($AP_{4.8}S_{1.2}$)
กรรมวิธีที่ 11 คือ เซลล์สาหร่าย 12 กรัม ต่อสาร PVA 4.8 กรัม แป้ง 1.8 กรัม ($AP_{4.2}S_{1.8}$)
กรรมวิธีที่ 12 คือ เซลล์สาหร่าย 12 กรัม ต่อสาร PVA 4.8 กรัม แป้ง 2.4 กรัม ($AP_{4.2}S_{2.4}$)

เตรียมสารละลาย PVA ด้วยการต้มน้ำกลั่นให้เดือด จากนั้นค่อยๆ เติมสาร PVA กวนจนละลาย ค่อยๆเติมแป้งและกวนจนแป้งสุกเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์จากขั้นตอนที่ 1 ลงในสารละลายปริมาณตามกรรมวิธี กวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทส่วนผสมลงบนแบบอะคริลิคเพื่อขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม อบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นจึงแกะแผ่นฟิล์มออก ดึงแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้ออกจากแผ่นเพลทแล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆของแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้ ตามมาตรฐานดังนี้

1) ความหนา (Thickness) วัดด้วยเครื่องวัดความหนา

2) ปริมาณความชื้น (Moisture Content) วัดด้วยเครื่องวัดความชื้น

3) การละลายน้ำ (Water solubility) ตามวิธีของ Su, *et al.*(2010) และ Tongdeesoontorn, *et al.* (2011) ดังนี้ ตัดแผ่นฟิล์มขนาด 50x50 ตร.มม. ตัวอย่างละ 3 ชิ้น อบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักก่อนการละลาย (W_0) แช่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิดปากบีกเกอร์ด้วยพาราฟิล์ม วางที่ RT เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักหลังการละลาย (W_1) นำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การละลายน้ำ ดังนี้

$$\%\ Solubility = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100$$

4) อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ: ทดสอบโดยศูนย์การบรรจุหีบห่อไทย วว. ตาม ASTM E 96-00 Water Vapor transmission of Materials

5) อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ ตามวิธีของ กนกศักดิ์ และคณะ (2556)

- ระยะเวลา (เริ่มต้น-สิ้นสุด) ตุลาคม 2560 ถึง กันยายน 2563
- สถานที่ดำเนินงาน กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

กองวิจัยการเกษตร

ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Results and Discussion)

1. การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากสาหร่ายขนาดเล็ก

1.1 การผลิตชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็ก (Biomass production)

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-QSGMF6 ในบ่อเปิด ด้วยอาหารปุ๋ยสูตร 16-8-8 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง (Early stationary phase) โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 7.12 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังการชักนำด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 15 วัน เก็บเกี่ยวได้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.95 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลแดง

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ SK-KhY6 ในบ่อเปิด ด้วยสูตรอาหารปุ๋ย 16-8-8 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 5.37 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังการชักนำด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 15 วัน หลังการเก็บเกี่ยวได้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.75 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีลักษณะเป็นสีเขียวเข้มออกน้ำตาล

1.2 การผลิตสารสำคัญที่มีมูลค่าสูงจากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

ผลการสกัดด้วยเทคนิค Supercritical fluid extraction (SFE) ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลายภายใต้สภาวะวิกฤติยิ่งยวด ที่ความดัน 300 400 และ 500 บาร์ ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง) จากสาหร่าย SK-QSGMF6 ที่สกัดด้วยเทคนิค SFE

อุณหภูมิ (°C)	ความดัน (Bar)		
	300	400	500
40	2.89d	2.84d	3.28c
50	3.37c	3.55c	3.97b
60	3.15cd	4.21b	5.20a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

หลังการสกัดด้วยเทคนิค Supercritical fluid extraction (SFE) ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลายภายใต้สภาวะวิกฤติยิ่งยวด พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยในแต่ละอุณหภูมิศึกษาผลของความดันในการสกัดที่ 300 400 และ 500 บาร์ พบว่าการสกัดที่ความดัน 500 บาร์ ได้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่าที่ 300 และ 400 บาร์ โดยได้สารสกัดคือ 3.28-5.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง สารสกัดที่ได้มีสีเหลืองเข้มไปทางน้ำตาล และเมื่อเทียบกับการสกัดของ ประยูรและคณะ (2558) ซึ่งใช้ตัวทำละลาย Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 50 วัตต์ เวลา 5 นาที และสกัดด้วยซอกเลทที่ระยะเวลา 60 นาที เมื่อแยกสารให้บริสุทธิ์แล้วได้สารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์ 2.72 และ 2.45 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งการสกัดด้วย SFE ที่ความดัน 500 บาร์ ได้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่าการใช้ตัวทำละลาย DMSO ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟและซอกเลท การสกัดด้วย SFE ได้สารสกัดที่เป็นแคโรทีนอยด์บริสุทธิ์ เทคนิคที่ต้องใช้ตัวทำละลายจะต้องผ่านการแยกสารให้บริสุทธิ์ซึ่งใช้เวลานานและยุ่งยากกว่าเทคนิค SFE จึงได้เปรียบวิธีการอื่นเพราะสามารถสกัดสารได้ง่าย มีปริมาณและความบริสุทธิ์สูง สามารถนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้ได้ทั้งในอาหาร และผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ดังนั้นจึงเลือกการสกัดด้วย SFE ที่ความดัน 500 บาร์ในการสกัดสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ จากนั้นแปรระดับอุณหภูมิในการสกัดเป็น 3 ระดับ คือ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยวิเคราะห์หาองค์ประกอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ เพื่อศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการสกัดต่อปริมาณสารสำคัญที่ได้ โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (HPLC-MS) พบว่าปริมาณสารสำคัญสูงสุดในสารสกัดแคโรทีนอยด์ประกอบด้วย เบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) ลูทีน (Lutein) ซีแซนธิน

กรมวิชาการเกษตร

(Zeaxanthin) และ แอสตาแซนธิน (Astaxanthin) ดังตารางที่ 11 โดยได้ปริมาณแอสตราแซนธินสูงสุดเท่ากับ 265.77 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสารสกัด คิดเป็น 0.027% เมื่อสกัดในขณะที่สาหร่ายมีสีเขียวที่อุณหภูมิสกัด 40 องศาเซลเซียส แต่ปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดจะมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้น

ตารางที่ 11 ปริมาณสารสำคัญ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสารสกัด) จากสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่สกัดจากสาหร่าย SK-QSGMF6 สกัดด้วยเทคนิค SFE

สารแคโรทีนอยด์	อุณหภูมิในการสกัด (°C) ที่ความดัน 500 บาร์		
	40	50	60
เบต้าแคโรทีน	132.44	107.77	92.60
ลูทีน	178.01	134.16	131.88
ซีแซนธิน	252.84	212.84	188.32
แอสตาแซนธิน	265.77	205.14	202.33

เมื่อคำนวณเป็นปริมาณแอสตราแซนธินที่ผลิตได้ในแต่ละสภาวะของการสกัด แม้ว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจะสกัดแอสตาแซนธินได้สูงถึง 265.77 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสารสกัด แต่ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ คือ 3.28 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง คิดเป็นปริมาณแอสตาแซนธินทั้งหมด 0.872 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สกัดแอสตาแซนธินได้ต่ำกว่าคือ 202.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสารสกัด และได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ 5.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง คิดเป็นปริมาณแอสตาแซนธินทั้งหมด 1.052 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ดังนั้นการสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจึงได้ปริมาณแอสตาแซนธินในการสกัดแต่ละครั้งสูงกว่า จึงเลือกการสกัดด้วย SFE ที่ความดัน 500 บาร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในการสกัดสารสำคัญกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อทำการทดลองต่อไป โดยสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้แสดงดังภาพที่ 21 เมื่อเทียบกับ วรภา (2540) ซึ่งเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสายพันธุ์ *Haematococcus pluvialis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตแอสตาแซนธินสูงสุด ภายใต้สภาวะควบคุม ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส โดยให้แสงสว่าง 24 ชั่วโมง ภายใต้ความเข้มแสง 100 kLux และบังคับให้สะสมแอสตาแซนธิน โดยเติมโซเดียมอะซิเตต 21.9 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสกัดแอสตาแซนธินในช่วงสาหร่ายสีแดงและสีเขียวได้ 1.27% และ 0.7% มากกว่าสายพันธุ์ *Coelastrella* sp. ถึง 47 และ 25.9 เท่าตามลำดับ แต่เป็นการเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการในระบบปิดต้องควบคุมอุณหภูมิ สภาวะความเข้มของแสง จึงไม่สามารถเลี้ยงได้ทั่วไป เนื่องจากต้องลงทุนโรงเรือนราคาสูง และหากต้องการเลี้ยงปริมาณมาก ต้องใช้พื้นที่มากประกอบกับสูตรอาหาร และการบังคับให้สะสมแอสตาแซนธินด้วยโซเดียมอะซิเตตมีต้นทุนสูงกว่ามาก แต่สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Coelastrella* sp. สามารถเลี้ยงได้ในระบบเปิด และกระจายพื้นที่เลี้ยงได้กว้างขวาง ด้วยต้นทุนโรงเรือนและการดูแลรักษาที่ถูกกว่า เพียงใช้ปุ๋ยเป็นอาหาร ในสภาวะแสงและอุณหภูมิตามธรรมชาติ และบังคับให้สาหร่ายสะสมแอสตาแซนธินด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ (เกลือแกง) เพียง 0.3 mol/L (0.012 kg/L) จึงสะดวกต่อการเลี้ยงและมีต้นทุนในการเลี้ยงต่ำกว่า

ภาพที่ 21 สารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายเล็กด้วยเครื่องสกัด SFE

กรมวิชาการเกษตร

ประยุกต์ใช้สภาวะการสกัดที่ความดัน 500 บาร์ โดยใช้อุณหภูมิในการสกัด 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส กับสาหร่าย SK-KhY6 ด้วยเทคนิค SFE โดยเลือกใช้ความดัน 500 บาร์ ซึ่งเป็นสภาวะเดียวกับสาหร่าย SK-QSGMF6 แสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่าย SK-KhY6 ด้วยเทคนิค SFE ความดัน 500 บาร์

อุณหภูมิในการสกัด (°C)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (mg/g $_{dried\ solid}$)	ปริมาณสารประกอบแคโรทีนอยด์ (mg/g $_{dried\ solid}$)				
		เบต้าแคโรทีน	ไลโคปีน	ลูทีน	ซีแซนธิน	แอสตาแซนธิน
40	2.38	30.56	44.24	24.32	118.67	54.23
50	3.60	34.24	24.76	88.32	106.77	88.37
60	4.28	27.74	32.77	84.47	266.37	137.22

จากสภาวะการสกัดแคโรทีนอยด์จากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กด้วยเทคนิค SFE ที่ความดัน 500 บาร์ พบว่าที่สภาวะอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สามารถสกัดแคโรทีนอยด์ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 4.28 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งกลุ่มสารแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้มีปริมาณสารสำคัญประกอบด้วย เบต้าแคโรทีน ไลโคปีน (Lycopene) ลูทีน ซีแซนธิน และแอสตาแซนธิน โดยได้ปริมาณซีแซนธิน สูงสุดเท่ากับ 266.37 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสารสกัด และแอสตราแซนธิน สูงสุดเท่ากับ 137.22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสารสกัด นอกจากนี้ยังพบไลโคปีน 32.77 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสารสกัด ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่สำคัญด้วย จึงเลือกใช้การสกัดด้วย SFE ที่ความดัน 500 บาร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในการสกัดสารสำคัญเพื่อทำการทดลองต่อไป

1.3 การศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสำคัญที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก

1) ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีววิทยาเบื้องต้นหรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

นำสารสกัดในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่ได้ไปศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยการวิเคราะห์ค่าความสามารถในการเป็นสารต้านการออกซิเดชัน (antioxidant) โดยใช้วิธี DPPH assay พบว่าสาหร่าย SK-QSGMF6 มีค่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ IC_{50} = 0.01035 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสาหร่าย SK-KhY6 มีค่า IC_{50} = 0.01364 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสาหร่าย SK-QSGMF6 มีค่าความสามารถในการเป็นสารต้านการออกซิเดชันสูงกว่า SK-KhY6 เล็กน้อย สาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ยังมีค่าความสามารถในการเป็นสารต้านการออกซิเดชันสูงกว่าวิตามินซี ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน มีค่า IC_{50} = 0.02315 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง จึงเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไป

2) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง

นำสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย SK-QSGMF6 ที่สกัดได้จาก SFE ละลายในตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเอทานอล ศึกษาฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง โดยฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลองของสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย SK-QSGMF6 มีค่า IC_{50} = 16.706 mg/ml โดยใช้กรดโคจิกเป็นสารละลายมาตรฐาน มีค่า IC_{50} = 0.187 mg/ml ซึ่งสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย SK-QSGMF6 แม้มีฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลองน้อยกว่ากรดโคจิก แต่ยังมีฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี โดยเมื่อเทียบกับสารสกัดมะเม่ามีค่า IC_{50} = 0.65 mg/ml ซึ่งกรดโคจิก มีค่า IC_{50} = 0.029 mg/ml (ประไพพิศ, 2561)

1.4 การศึกษาการนำสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็กไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

1.4.1 ศึกษาการประยุกต์ใช้สารสำคัญที่สกัดจากสาหร่ายในผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิว

โดยเลือกใช้สารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ SK-QSGMF6 ซึ่งมีปริมาณแอสตาแซนธินในปริมาณสูง จึงเหมาะกับการนำมาผลิตเซรั่มบำรุงผิวหน้า เนื่องจากคุณสมบัติในการลดเลือนริ้วรอยได้ทั้งริ้วรอยลึกและตื้น ลดจุดด่างดำ ทำให้ผิวเรียบเนียนเต่งตึงและผิวกระชับ ให้ความชุ่มชื่นแก่ผิว นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยับยั้ง

กรมวิทยาศาสตร์

เอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีส่วนช่วยกระตุ้นการผลิตเม็ดสีด้วย โดยนำเซรั่มบำรุงผิวสูตรพื้นฐานทั่วไปมาประยุกต์ เนื่องจากเบสเซรั่มมีค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 จึงไม่เหมาะกับผิว ซึ่งค่าความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะกับผิวคือ 3.5-5.5 จึงปรับลักษณะของเซรั่ม และเติมสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็กที่ละลายในน้ำมันหอมระเหย คาโมมายล์ที่ความเข้มข้น 2% เนื่องจากแคโรทีนอยด์จาก SK-QSGMF6 สามารถละลายได้ดีในน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์ ประกอบกับน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์ยังใช้แต่งกลิ่นอาหาร เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่างๆ รวมถึงใช้ในสุคนธบำบัดด้วย (ณัฏฐินี, 2559) โดยมีสรรพคุณช่วยผ่อนคลายความเครียด ปวดศรีษะ หรือไมเกรน มีความอ่อนโยนกับผิวหนัง ช่วยในการบรรเทาอาการอักเสบ แพ้และระคายเคืองผิวหนัง นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อราแบคทีเรีย และไวรัสก่อโรคหลายชนิด เช่น ไวรัสเริม (herpes simplex virus) *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* และยังไม่พบรายงานผู้แพ้น้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์ในอัตราการใช้ 1-30% (ฐาปนีย์, 2550) ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์จึงช่วยเสริมฤทธิ์ของแอสตาแซนธินให้ดียิ่งขึ้น เมื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ด้านสี และความเป็นกรดด่างของสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์ในน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์ความเข้มข้น 2% พบว่า มีค่าความสว่าง (L*) 27.82 ค่าความเป็นสีแดง (+a*) 3.20 และค่าความเป็นสีน้ำเงิน (-b*) -3.02 สารสกัดสาหร่ายในน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์จึงมีสีน้ำตาลเข้มออกแดง มีค่าความเป็นกรดด่าง 5.68 อัตราการเติมสารสกัดในน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์คือ 1% ผลิตเซรั่มบำรุงผิวผสมสารสกัดจากสาหร่ายตามกรรมวิธี จากนั้นวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของเซรั่มทั้ง 9 กรรมวิธี ได้แก่ ค่าสี ความเป็นกรดด่าง ความหนืด และวิเคราะห์ค่าความคงตัวของเซรั่มโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบ/นาที ระยะเวลา 15 นาที เพื่อดูความคงตัวของเนื้อเซรั่ม

ตารางที่ 13 สมบัติเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวจากสารสกัดสาหร่ายขนาดเล็ก

กรรมวิธี	รหัสตัวอย่าง	ค่าสี			pH	ความหนืด	ความคงตัว*
		L*	a*	b*		(cP)	
1	Serum base	30.40a	4.71b	-5.66	6.03b	60.50e	คงตัว
2	H0.6T2	28.14ab	5.44ab	-6.24	5.17a	16.67a	ไม่มีความคงตัว
3	H0.6T4	28.69ab	5.17b	-5.93	5.29a	18.03a	ไม่มีความคงตัว
4	H0.8T2	29.76a	5.88a	-5.67	5.12a	23.40b	ไม่มีความคงตัว
5	H0.8T4	27.98b	5.31b	-6.27	5.25a	40.47c	ไม่มีความคงตัว
6	H1.0T2	27.87b	5.28b	-6.45	5.09a	39.28c	ไม่มีความคงตัว
7	H1.0T4	27.60b	5.44ab	-6.38	5.23a	51.37d	คงตัว
8	H1.2T2	27.00b	5.50ab	-6.70	5.11a	62.33e	คงตัว
9	H1.2T4	27.19b	5.47ab	-6.43	5.21a	77.63f	คงตัว

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT *

จากตารางที่ 13 ลักษณะเซรั่มบำรุงผิวที่ได้เป็นของเหลวสีเหลืองอ่อนจากสีของสารสกัดดังภาพที่ 22 มีความหนืดที่แตกต่างกันไปตามกรรมวิธี ค่าความเป็นกรดด่าง ของเซรั่มบำรุงผิวอยู่ในช่วง 5.09 – 5.29 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะกับผิวหนังซึ่งอยู่ในช่วง 3.5 - 5.5 (กองเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย, 2551) โดยค่าความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะสมจะช่วยรักษาความอ่อนนุ่มชุ่มชื่นให้ผิว ลดปัญหาหน้ามัน ปกป้องผิวจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา สาเหตุของการเกิดสิว หากค่าความเป็นกรดด่างสูงเกินไปทำให้เกราะปกป้องผิวตามธรรมชาติจะถูกทำลาย สูญเสียน้ำและผิวแห้งเสีย เพราะชั้นผิวที่ปกคลุมด้านนอกไม่สามารถทำงานเป็นเกราะปกป้องผิวได้ ทำให้ผิวบอบบาง แพ้ง่าย

กรมวิชาการเกษตร

เมื่อทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที พบว่า กรรมวิธี 2-6 มีการแยกชั้นของสารสกัดสาหร่ายขนาดเล็กในน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์ออกเป็นหยดเล็กๆ กระจายในเนื้อเซรั่ม จึงคัดเลือกกรรมวิธีที่มีความคงตัวหลังการปั่นเหวี่ยง ได้แก่กรรมวิธี 7-9 เพื่อทดสอบความชอบด้านประสาทสัมผัสหลังการทาเซรั่ม เพื่อคัดเลือกสูตรและความหนืดที่เหมาะสมต่อไป

ภาพที่ 22 เซรั่มผสมสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสารสกัดขนาดเล็ก

ทดสอบความชอบทางด้านประสาทสัมผัส ด้วย 7-point hedonic scale โดยนำผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิว ทดสอบความชอบด้านประสาทสัมผัสหลังการทาเซรั่ม ได้แก่ สี ความหนืด การซึมสู่ผิว ความเหนียว กลิ่นหลังทา และความชุ่มชื่นหลังทาโดยผู้ทดสอบจำนวน 27 คน โดยให้ผู้ทดสอบแบ่งท้องแขนเป็น 3 ช่อง และทาผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวแต่ละกรรมวิธีลงในช่องที่แบ่งไว้ที่ใต้ท้องแขน และให้คะแนนความชอบในด้านต่าง ๆ ที่ระดับคะแนน 1-7 คะแนน และให้ผู้ทดสอบเลือกสูตรที่ชอบที่สุดจำนวน 1 สูตร ทำการคัดเลือกสูตรกรรมวิธีที่ได้คะแนนความชอบสูงสุด และเป็นที่นิยมของผู้ทดสอบมากที่สุด

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบความชอบด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวจากสารสกัดสาหร่ายขนาดเล็ก

กรรมวิธี	ตัวอย่าง	สี	ความหนืด	การซึมสู่ผิว	ความเหนอะหนะ	กลิ่น	ความชุ่มชื่น	ความพึงพอใจ (%)
7	H1.0T4	4.74 c	3.81 c	3.89 c	3.59 c	3.78 a	4.19 b	14.8
8	H1.2T2	4.89 b	4.44 a	4.41 a	3.96 b	3.67 b	4.67 a	63.0
9	H1.2T4	5.07 a	4.08 b	4.11 b	4.04 a	3.78 a	4.19 b	22.2

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

จากผลการทดสอบความชอบทางประสาทสัมผัสในตารางที่ 14 โดยการให้คะแนนความชอบในด้านต่าง ๆ ที่ระดับคะแนนความชอบ 1-7 คะแนน และให้ผู้ทดสอบเลือกกรรมวิธีที่ชอบมากที่สุดจำนวน 1 สูตร พบว่า กรรมวิธีที่ 8 H1.2T2 เป็นที่ชื่นชอบมากที่สุด โดยมีผู้ทดสอบเลือกกรรมวิธีที่ 8 เป็นที่ชื่นชอบมากที่สุดจำนวน 63% มีคะแนนความชอบด้านสี 4.89 คะแนน ความหนืด 4.44 คะแนน การซึมสู่ผิว 4.41 คะแนน ความเหนอะหนะ 3.96 คะแนน กลิ่น 3.67 คะแนน และความชุ่มชื่นหลังทา 4.67 คะแนน จะเห็นได้ว่าความชอบด้านกลิ่นมีค่าน้อยที่สุด เนื่องจากสารสกัดสาหร่ายขนาดเล็กในน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์มีกลิ่นฉุน

ศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวที่ระยะเวลา 3 เดือน โดยวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพทุกเดือน วิเคราะห์ ค่าสี ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าความหนืด ดังตารางที่ 15 พบว่า เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นเซรั่มบำรุงผิวจะมีค่าความสว่าง (L*) สูงขึ้น ค่าความเป็นสีน้ำเงิน (-b*) และค่าความเป็นสีแดง (+a*) มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง ทำให้เซรั่มมีสีดูซีดลง เนื่องจากการเก็บรักษานี้ต้องการเห็นความเปลี่ยนแปลงของเซรั่มจึงเก็บในขวดแก้วใส ซึ่งได้รับแสงและความร้อนจากอุณภูมิห้องปกติ ทำให้สีเปลี่ยนไป ซึ่งการเก็บรักษาเซรั่มบำรุงผิวควรเก็บในบรรจุภัณฑ์ป้องกันแสงเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยากับความร้อนและแสงแดด สำหรับค่าความเป็นกรดด่างของเซรั่มเมื่อระยะการเก็บนานขึ้น เซรั่มมีค่าความเป็นกรดมากขึ้น เมื่อเก็บรักษานานขึ้นที่ระยะเวลา 9 เดือน เซรั่มบำรุงผิวยังคงมีสมบัติที่ดี คือ มีค่าความสว่าง (L*) 28.35 ค่าความเป็นสีแดง (+a*) 3.64 และค่าความเป็นสีน้ำเงิน (-b*) 3.95 ค่าความเป็นกรดด่าง 3.98 ยังอยู่ในช่วงที่สามารถใช้กับผิวหน้าได้และยังอยู่ในลักษณะปกติไม่มีการแยกชั้น จากผล

กรมวิชาการเกษตร

ของข้อมูลการเก็บรักษาที่ได้สามารถสรุปได้ว่าเซรั่มบำรุงผิวที่ผสมสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายขนาดเล็กมีอายุการเก็บรักษาอย่างน้อย 9 เดือน

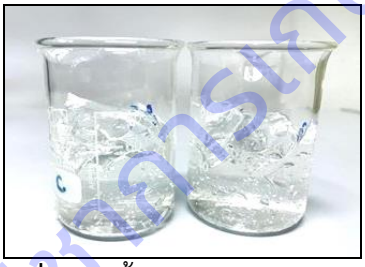
ตารางที่ 15 ผลการเก็บรักษาเซรั่มผสมสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสหร่ายขนาดเล็ก

ตัวอย่าง	ระยะเวลา	ค่าสี			ค่า pH	ความหนืด
	(เดือน)	L*	a*	b*		(cP)
กรรมวิธีที่ 8	0	26.90c	3.54	-4.09	4.59a	95.16
H1.2T2	1	26.73c	3.76	-4.29	4.16b	94.36
	2	27.36b	3.60	-4.23	4.05b	94.47
	3	28.01a	3.75	-4.41	3.87b	94.69

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

1.4.2. ศึกษาการประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสกัดจากสาหร่ายในผลิตภัณฑ์แผ่นมาส์กหน้า

โดยเลือกใช้สารสกัดจากสาหร่าย SK-KhY6 ซึ่งนอกจากจะมีแอสตาแซนธินแล้วยังมีไลโคปีนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งไลโคปีนมีสมบัติช่วยลดการอักเสบของผิวหนัง ลดผื่นแดง ทำให้ผิวแข็งแรงขึ้น ไม่แพ้ง่าย ผิวเรียบเนียน และเปล่งปลั่ง ช่วยในการสร้างเซลล์ผิวใหม่แทนผิวหนังชั้นเดิมที่เสื่อมแล้ว (มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, 2564) โดยนำสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย SK-KhY6 มาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์แผ่นมาส์กหน้า โดยใช้เบสเจลว่านหางจระเข้ตามวิธีปฏิบัติเป็นเนื้อน้ำเคลือบแผ่นมาส์กหน้า ดังภาพที่ 23



ภาพที่ 23 เนื้อเบสเจลว่านหางจระเข้

สมบัติเบื้องต้นของสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายขนาดเล็กในน้ำมันหอมระเหยกุหลาบ

เมื่อนำสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็กมาละลายในน้ำมันหอมระเหยกลิ่นกุหลาบที่ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักแล้ว พบว่า มีสีน้ำตาลเข้มออกแดงเล็กน้อย มีค่าความสว่าง (L*) อยู่ที่ 27.18 ค่าความเป็นสีแดง (+a*) อยู่ที่ 4.35 และค่าความเป็นสีเหลือง (+b*) อยู่ที่ 0.93 มีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ 6.46 สาเหตุที่เลือกใช้น้ำมันหอมระเหยกุหลาบ เนื่องจากสารสกัดสามารถละลายได้ แม้จะช้ากว่าน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์ แต่น้ำมันหอมระเหยกุหลาบมีกลิ่นหอมหวานละมุนในระดับ Middle note มากกว่าน้ำมันหอมระเหยคาโมมายล์ จึงเหมาะกับแผ่นมาส์กหน้ามากกว่า เนื่องจากจะต้องสัมผัสกับผิวเป็นเวลานาน นอกจากนั้นน้ำมันหอมระเหยกุหลาบยังมีสรรพคุณทางสุคนธบำบัดช่วยผ่อนคลายความเครียด กังวล ทำให้โลหิตไหลเวียนดีขึ้น ช่วยกระชับรูขุมขน ลดอาการระคายเคืองและต้านการอักเสบจากการติดเชื้อที่ผิวหนังได้อย่างดีเยี่ยม และยังไม่พบรายงานว่ามีผู้แพ้น้ำมันหอมระเหยกุหลาบในอัตราการใช้ 1-30% (ฐาปนีย์, 2550) ซึ่งสามารถเสริมฤทธิ์กับไลโคปีนได้อย่างดี เมื่อผสม สารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็กกับเบสเจลว่านหางจระเข้แล้วทำให้ได้เนื้อเจลที่มีค่าเป็นด่าง จึงต้องเติมกรดมาลิกซึ่งเป็น AHAs ธรรมชาติในการช่วยปรับกรดในเครื่องสำอางเพื่อให้เหมาะกับผิว โดยกรดมาลิกสามารถใส่ในเครื่องสำอางได้ปริมาณ 1% (CIR, 2001)

เมื่อทดสอบสมบัติทางกายภาพของเบสว่านหางจระเข้มีลักษณะใสและหนืด มีค่าสีดังนี้ ค่าความสว่าง (L*) 27.24 ค่าความเป็นสีแดง (+a*) 3.05 ค่าความเป็นน้ำเงิน (-b*) -2.92 และค่าความเป็นกรดด่าง 8.24 ซึ่งมีความเป็นด่างสูงไปไม่เหมาะกับผิวหน้า จึงต้องพิจารณาการปรับกรดให้อยู่ในช่วงที่เหมาะกับผิวหน้า

สำนักวิทยบริการฯ

สมบัติของแผ่นมาส์กหน้าเคลือบสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสารสกัดสาหร่ายขนาดเล็ก

เตรียมเนื้อเจลสำหรับผลิตแผ่นมาส์กหน้าที่เติมสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็กในน้ำมันหอมระเหยกุหลาบความเข้มข้น 5 % ในแต่ละกรรมวิธีตามตารางที่ 9 ได้เนื้อเจลมาส์กหน้ามีลักษณะเป็นเจลสีเหลืองสว่าง จากนั้นเตรียมแผ่นมาส์กหน้าใส่ลงในถุงอลูมิเนียม เติมเจลมาส์กหน้าผสมสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสารสกัดสาหร่ายขนาดเล็กลงในถุง จำนวน 30 กรัม ค่อยๆ เกลี่ยเนื้อเจลให้เต็มแผ่นมาส์กหน้า ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้เนื้อเจลซึมลงสู่แผ่นมาส์กหน้าดัง ภาพที่ 24 การใส่เนื้อเจลเต็มแผ่นและใส่ถุงซิบล็อคใส เพื่อสังเกตุลักษณะการซึม สี และลักษณะของแผ่นมาส์กหน้า ในการเก็บรักษาพับแผ่นมาส์กหน้าและใส่ในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ซีลปิดสนิทซึ่งกันแสงและออกซิเจนได้

ภาพที่ 24 (ซ้าย) ลักษณะเนื้อเจลสาหร่ายสำหรับแผ่นมาร์กหน้า (ขวา) ตัวอย่างแผ่นมาร์กหน้า

ผลการทดสอบสมบัติทางกายภาพของเนื้อเจลและลักษณะของแผ่นมาส์กหน้าจากตารางที่ 16 พบว่าทุกกรรมวิธีเนื้อเจลสามารถซึมเข้าสู่แผ่นมาส์กหน้าได้ โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ 3 และ 4 ที่มีส่วนประกอบของเบสว่านหางจระเข้มากที่สุด โดยค่าความสว่างของเนื้อเจลมีความสว่างในช่วง 30.0 – 31.77 ส่วนค่าความเป็นสีแดง (+a*) มีค่าอยู่ในช่วง 2.44 – 3.0 ซึ่งมีค่าลดลงเมื่อใส่เบสว่านหางจระเข้เพิ่มขึ้น ในส่วนค่าความเป็นสีน้ำเงิน (-b*) นั้น มีค่าในช่วง -1.71 ถึง - 2.4 โดยมีความเป็นสีน้ำเงินเพิ่มขึ้น เมื่อเติมเบสว่านหางจระเข้ที่มากขึ้นตามสูตร ค่าความเป็นกรดด่างของทุกกรรมวิธี มีค่า 5.79-6.11 แม้จะเกินค่าความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะกับผิวหนังมากที่สุดคือ 3.5-5.5 แต่ยังคงอยู่ในมาตรฐาน มอก เอส 15-2561 คือค่าความเป็นกรดด่าง ในช่วง 3.5-7.5 เป็นค่าที่เข้ากับผิวได้

ตารางที่ 16 สมบัติของเนื้อเจลและลักษณะของแผ่นมาร์กหน้า

ตัวอย่าง	ค่าสี			ค่า pH	ความหนืด (cP)	ลักษณะแผ่นมาร์กหน้า
	L*	a*	b*			
1	30.00b	3.00c	-2.14b	5.71a	13.68b	เนื้อเจลซึมกระจายตัวดี มีลักษณะค่อนข้างเหลว เมื่อดึงแผ่นมาร์กหน้าออกมามีน้ำเจลหยดเล็กน้อย
2	30.75ab	2.68ab	-0.92a	5.76a	14.54b	เนื้อเจลซึมกระจายตัวดี มีลักษณะค่อนข้างเหลว เมื่อดึงแผ่นมาร์กหน้าออกมามีน้ำเจลหยดเล็กน้อย
3	30.81ab	2.84bc	-1.71b	6.10b	32.03a	เนื้อเจลซึมกระจายตัวดีกว่าตัวอย่างที่ 1 และ 2 เมื่อดึงแผ่นมาร์กหน้าออกมา เจลยังคงเคลือบบนหน้ากากอย่างสม่ำเสมอ
4	31.77a	2.44a	-0.30a	6.11b	32.10a	เนื้อเจลซึมกระจายตัวดีกว่าตัวอย่างที่ 1 และ 2 เมื่อดึงแผ่นมาร์กหน้าออกมา เจลยังคงเคลือบบนหน้ากากอย่างสม่ำเสมอ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

กรมวิทยาศาสตร์

การทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 20 คน เพื่อทดสอบสมบัติด้านกายภาพ ด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น ความชุ่มชื้นหลังมาส์ก ความเหนียวเหนอะหนะ การซึมสู่ผิว ความชอบโดยรวม โดยให้ผู้ทดสอบเลือกสูตรที่ชอบมากที่สุด จำนวน 1 สูตร คัดเลือกกรรมวิธีที่ผู้ทดสอบส่วนใหญ่ชอบที่สุด ได้ผลดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ผลทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของแผ่นมาร์กหน้า

กรรมวิธี	สี	การซึมสู่ผิว	ความเหนียวเหนอะหนะ	กลิ่นหลังมาร์ก	ความชุ่มชื่นหลังมาร์ก	ความชอบโดยรวม	ความพึงพอใจ (%)
1	5.62a	4.81ab	4.57a	4.33a	5.19ab	4.81b	35
2	4.95b	4.05b	4.00b	4.10b	5.24a	4.81b	5
3	**5.57a**	**5.48a**	**4.86a**	**4.38a**	**5.48a**	**5.38a**	**40**
4	5.00b	5.00a	4.48a	4.19b	4.71b	4.81b	20

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

จากการทดสอบด้านความชอบในทุกด้านของแผ่นมาส์กหน้า พบว่าผู้ทดสอบชอบกรรมวิธีที่ 3 มากที่สุดคิดเป็นจำนวน 40 % และชอบกรรมวิธีที่ 1 รองลงมาคิดเป็น 35 % ซึ่งคะแนนความชอบในด้านสี การซึมสู่ผิว ความเหนียวเหนอะหนะ กลิ่นความชุ่มชื้น ของกรรมวิธีที่ 3 และ กรรมวิธีที่ 1 มีค่าใกล้เคียงกัน แต่กรรมวิธีที่ 3 มีคะแนนความชอบโดยรวมสูงกว่า โดยความชอบด้านต่าง ๆ ของกรรมวิธีที่ 3 ดังนี้ ด้านสี การซึมสู่ผิว ความเหนอะหนะ กลิ่น ความชุ่มชื่น และความชอบโดยรวม คือ 5.57 5.48 4.86 5.48 และ 5.38 ซึ่งคะแนนความชอบโดยรวมอยู่ในช่วงชอบเล็กน้อยถึง ปานกลาง ดังนั้นจึงเลือกกรรมวิธีที่ 3 เป็นกรรมวิธีในการผลิตแผ่นมาส์กหน้าผสมสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็ก แต่สำหรับการทดสอบผลิตภัณฑ์แผ่นมาส์กหน้าจากสารสกัดขนาดเล็กนี้มีจำนวนผู้แพ้มีอาการแดงและคันเล็กน้อยจำนวน 4 คน จากผู้ทดสอบ 20 คน จึงทำการทดสอบชนิดสารที่อาจก่อให้เกิดการแพ้ได้แก่ เบสว่านหางจระเข้ กรดมาลิก น้ำมันหอมระเหยกุหลาบ และสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก โดยให้ผู้ที่เกิดอาการ แพ้ทดสอบกับแผ่นมาส์กหน้า 4 สูตร คือ แผ่นมาส์กหน้าเคลือบเบสว่านหางจระเข้ แผ่นมาส์กหน้าเคลือบเบสว่านหางจระเข้ผสมกรดมาลิก แผ่นมาส์กหน้าเคลือบเบสว่านหางจระเข้ผสมน้ำมันหอมระเหยกุหลาบ และแผ่นมาส์กหน้าเคลือบเบสว่านหางจระเข้ผสมสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์ในน้ำมันหอมระเหยกุหลาบ ได้ผลการทดสอบดังนี้

ผู้ทดสอบคนที่ 1 มีอาการระคายเคืองเล็กน้อยทุกกรรมวิธี อาจเนื่องมาจากส่วนประกอบของเบสเจลว่านหางจระเข้ เช่น สารก่อเจลคาร์โบพอล ด่างไตรเอทาโนลาไมน์ หรือสารกันเสีย แต่มีอาการแพ้เป็นรอยแดงจุดเล็กๆ ในแผ่นมาส์กหน้าเคลือบเบสว่านหางจระเข้ผสมกรดมาลิกมากที่สุด ซึ่งเป็นการแพ้กรดมาลิกซึ่งเป็น AHAs มากกว่าตัวอย่างอื่นๆ

ผู้ทดสอบคนที่ 2 มีอาการแพ้ มีรอยแดงเป็นจุดเล็กๆ ในแผ่นมาส์กหน้าเคลือบเบสว่านหางจระเข้ผสมกรดมาลิกเพียงชนิดเดียว ซึ่งอาการแพ้มาจากกรดมาลิกซึ่งเป็น AHAs ตามธรรมชาติ

ผู้ทดสอบคนที่ 3 มีอาการแพ้ เป็นรอยแดง และมีจุดแดงเล็กๆ มีอาการแสบเล็กน้อย ในแผ่นมาส์กหน้าเคลือบเบสว่านหางจระเข้ผสมกรดมาลิกเพียงชนิดเดียวซึ่งอาการแพ้มาจากกรดมาลิกซึ่งเป็น AHAs ตามธรรมชาติ

ผู้ทดสอบคนที่ 4 มีอาการแพ้เป็นรอยแดงเล็กๆ ในแผ่นมาส์กหน้าเคลือบเบสว่านหางจระเข้ผสม กรดมาลิก และอาการแพ้มีรอยแดงเล็กน้อย ในแผ่นมาส์กหน้าเคลือบเบสว่านหางจระเข้ผสมสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์ในน้ำมันหอมระเหยกุหลาบ (ไม่ปรับกรดมาลิก) ซึ่งเป็นอาการแพ้ AHAs คือ กรดมาลิก และสารสกัดสาหร่ายกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

สรุปผลการทดสอบการแพ้แผ่นมาส์กชีทจากผู้ทดสอบทั้งหมด 20 คน มีผู้แพ้สารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 1 คน

กรมวิทยาศาสตร์

ศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์แผ่นมาส์กหน้าที่ระยะเวลา 3 เดือน โดยเก็บรักษามาส์กหน้าในถุงอลูมิเนียม วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพทุกเดือน โดยสุ่มวิเคราะห์ ค่าสี ค่าความเป็นกรดด่าง ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ผลการเก็บรักษาแผ่นมาส์กหน้าผสมสารสกัดสาหร่ายขนาดเล็ก

ตัวอย่าง	ระยะเวลา (เดือน)	ค่าสี			ค่า pH
		L*	a*	b*	
กรรมวิธีที่ 3	0	30.81b	2.84	-1.71	6.10
	1	31.02b	2.91	-1.79	6.06
	2	32.17a	3.13	-2.03	5.87
	3	32.63a	3.15	-2.11	5.61

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

จากตารางที่ 18 พบว่าแผ่นมาส์กหน้าจะมีค่าความสว่าง (L*) สูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น ค่าความเป็นสีน้ำเงิน (-b*) และค่าความเป็นสีแดง (-a*) มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง ทำให้เซรั่มแผ่นมาส์กหน้ามีสีดูซีดลง เนื่องจากสีของสารสกัดเปลี่ยนแปลงไป สำหรับค่าความเป็นกรดด่างของแผ่นมาส์กหน้าที่ระยะเวลาเก็บ 3 เดือน ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ค่าความเป็นกรดยังอยู่ในช่วงที่สามารถใช้กับผิวหน้าได้และยังอยู่ในลักษณะปกติ ไม่มีการแยกชั้น จากผลของข้อมูลการเก็บรักษาที่ได้สามารถสรุปได้ว่าแผ่นมาส์กหน้าที่ผสมสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายขนาดเล็กมีอายุการเก็บรักษาอย่างน้อย 3 เดือน

1.5 ต้นทุนการผลิตของผลิตภัณฑ์

คำนวณต้นทุนการผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้ง 2 ชนิด คือ เซรั่มบำรุงผิวผสมสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็ก และแผ่นมาส์กหน้าผสมสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็ก โดยไม่คิดค่าไฟฟ้าและค่าบรรจุภัณฑ์ พบว่าผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวขนาด 300 กรัม มีต้นทุนรวม 269.30 บาท สำหรับผลิตภัณฑ์แผ่นมาส์กหน้า จำนวน 10 แผ่น คิดเป็นปริมาณน้ำเคลือบ แผ่นมาส์กหน้า 300 กรัม มีต้นทุนอยู่ที่ 127.81 บาท คิดเป็น 12.78 บาทต่อแผ่น ซึ่งเป็นราคาที่ไม่สูงเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 ต้นทุนของการผลิตของผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิว และแผ่นมาร์กหน้า

ลำดับ	เซรั่มบำรุงผิว 300 กรัม		แผ่นมาร์กหน้า 10 แผ่น (300 กรัม)	
	ส่วนประกอบ	ราคา (บาท)	ส่วนประกอบ	ราคา (บาท)
1	สาหร่ายแห้ง	0.80	สาหร่ายแห้ง	4.50
2	คาร์บอนไดออกไซด์	80.10	คาร์บอนไดออกไซด์	73.00
3	น้ำมันหอมระเหยคาโมมาย	176.16	น้ำมันหอมระเหยกุหลาบ	0.86
4	HEC	2.67	กลีเซอรีน	2.70
5	กลีเซอรีน	1.44	วิตามินอี	21.60
6	ไกลเดนท์	0.36	เบสว่านหางจระเข้	5.46
7	ทวีน 80	2.04	กรดมาลิก	0.18
8	น้ำกลั่น	5.73	น้ำกลั่น	0.01
9	-	-	แผ่นมาร์กหน้า 10 แผ่น	19.50
	รวมราคา	269.30	รวมราคา	127.81
			ราคาต่อแผ่น	12.78

*ไม่รวมค่าหัวเชื้อสาหร่าย ไม่รวมค่าไฟฟ้าและค่าเสื่อมราคาของอุปกรณ์จากการใช้งานเครื่องมือ และไม่รวมค่าบรรจุภัณฑ์

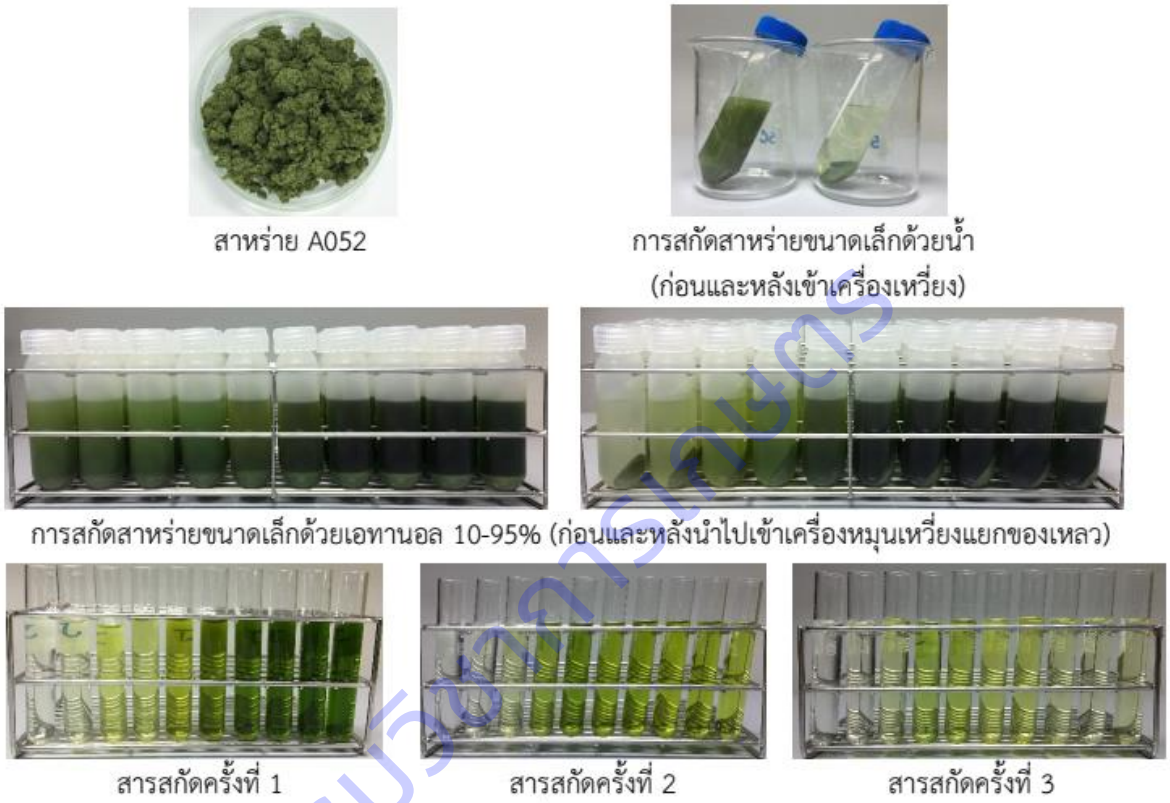
กรมวิชาการเกษตร

2. การผลิตสีผงจากสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

2.1 การผลิตสีผงคลอโรฟิลล์ (สีเขียว) จากสาหร่ายขนาดเล็ก

การผลิตสีผงจากสาหร่ายขนาดเล็กที่ให้สีเขียว ใช้สาหร่ายสายพันธุ์ A052 (*Coelastrum microporum*) เลี้ยงในอาหารคือปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตราส่วนปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็น 1:500 ทำการเพาะเลี้ยงในบ่อเปิดขยายขนาด ได้สาหร่ายที่มีสีเขียว (ภาพที่ 25) สาหร่ายที่ได้มีกลิ่นไม่พึงประสงค์และมีสิ่งปนเปื้อน เช่น เศษหญ้ายูกลีนา และหนอนแดง

2.1.1 การศึกษาความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัดสารสีจากสาหร่าย



ภาพที่ 25 การสกัดสาหร่ายขนาดเล็กด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 10-95% (ระดับความเข้มข้นเรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ)

ผลการสกัดด้วยเอทานอล 95% (ตารางที่ 20 และ 21) พบว่า สารสกัดที่ได้มีปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุด ($p \leq 0.05$) โดยการสกัดสาหร่ายขนาดเล็กด้วยน้ำ สังเกตได้ว่าสารสกัดมีลักษณะสีใสและเมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ 0.769 ug/g และปริมาณคลอโรฟิลล์บี 0.883 ug/g ซึ่งมีปริมาณสารสำคัญน้อยจึงไม่ได้ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง การสกัดสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเอทานอลความเข้มข้น 10-95% พบว่า การสกัดครั้งที่ 1 ด้วยเอทานอล 95% สารสกัดมีปริมาณสารสำคัญมากที่สุด คือ มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ 53.211 ug/g ปริมาณคลอโรฟิลล์บี 21.346 ug/g สำหรับการสกัดครั้งที่ 2 พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล 50% มีปริมาณสารสำคัญมากที่สุด คือ มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ 16.879 ug/g ปริมาณคลอโรฟิลล์บี 7.523 ug/g สำหรับการสกัดครั้งที่ 3 ได้ปริมาณสารสำคัญน้อยเมื่อเทียบกับครั้งที่ 1 และ 2 เมื่อพิจารณาปริมาณสารสำคัญที่ได้ พบว่า การสกัดครั้งที่ 1 ได้ปริมาณสารสำคัญมากกว่า 80% ของปริมาณสารสำคัญที่ได้รวมกัน 3 ครั้ง ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกสภาวะการสกัดด้วยเอทานอล 95% และทำการสกัด 1 ครั้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตารางที่ 20 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของสารสกัดสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น	คลอโรฟิลล์เอ (ug/g)			
เอทานอล (%)	สกัดครั้งที่ 1	สกัดครั้งที่ 2	สกัดครั้งที่ 3	รวม
0	0.769 f	-	-	0.769 g
10	1.576 f	0.355 e	0.423 g	2.354 fg
20	1.594 f	0.648 e	0.657 fg	2.899 fg
30	3.230 f	1.647 e	1.437 d	6.315 f
40	4.658 f	7.703 cd	4.932 a	17.293 e
50	10.558 e	16.879 a	5.237 a	32.675 d
60	25.444 d	12.684 b	2.519 b	40.647 c
70	37.465 c	12.277 b	1.822 c	51.564 b
80	44.595 b	8.035 c	0.975 ef	53.605 b
90	48.026 b	6.206 d	1.100 de	55.332 b
95	53.211 a	7.456 cd	0.804 ef	61.470 a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 21 ปริมาณคลอโรฟิลล์บีของสารสกัดสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น	คลอโรฟิลล์บี (ug/g)			
เอทานอล (%)	สกัดครั้งที่ 1	สกัดครั้งที่ 2	สกัดครั้งที่ 3	รวม
0	0.883 g	-	-	0.883 g
10	2.700 f	0.429 g	0.569 f	3.698 f
20	1.557 gf	0.586 g	0.667 ef	2.810 fg
30	2.231 gf	1.484 f	1.241 c	4.956 f
40	2.917 f	4.598 c	2.591 a	10.105 e
50	6.079 e	7.523 a	2.430 a	16.032 d
60	12.330 d	5.660 b	1.646 b	19.636 c
70	15.842 c	6.041 b	1.250 c	23.133 b
80	18.119 b	4.350 cd	0.899 de	23.368 b
90	18.920 b	3.077 e	1.051 cd	23.048 b
95	21.346 a	3.752 de	0.801 def	25.898 a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

2.1.2 การศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยและอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สีผง โดยนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเอทานอล 95% ระเหยภายใต้ความดันเพื่อลดปริมาตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสารสกัดมีค่า 5.43 mg/ml นำสารสกัดที่ได้ผสมมอลโตเด็กซ์ทริน พบว่ามอลโตเด็กซ์ทรินไม่ละลายในสารสกัดเอทานอล จึงทดลองหาวิธีการละลายมอลโตเด็กซ์ทรินเพื่อนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยพบว่ามอลโตเด็กซ์ทรินสามารถละลายในสารสกัดเอทานอลได้ในอัตราส่วนสารสกัดต่อมอลโตเด็กซ์ทรินต่อน้ำเป็น 1:1:1 จากนั้นนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย เนื่องจากการทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นกระบวนการทำแห้งที่ใช้อุณหภูมิสูงมากกว่า 100°C ในขณะที่เอทานอลเป็นสารที่มีจุดเดือด 78.5°C ซึ่งตามคำแนะนำการใช้เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย มีข้อควรระวังคือ

กรมวิชาการเกษตร

ต้องใช้ก๊าซไนโตรเจนผ่านเข้าในระบบระหว่างการทำแห้งเพื่อความปลอดภัยในการใช้เครื่องมือ จากการทำแห้งแบบพ่นฝอยได้สีผงที่มีสีเขียวอ่อน และยังคงมีกลิ่นไม่พึงประสงค์ ผลผลิตสีผงที่ได้ (yield) เท่ากับ 15.72% ทำการเก็บรักษาสีผงเป็นเวลา 6 เดือน ตรวจคุณภาพได้ผลดัง ภาพที่ 26 และ ตารางที่ 22

ภาพที่ 26 สีผงคลอโรฟิลล์หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 2 4 และ 6 เดือน ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 22 คุณภาพของสีผงคลอโรฟิลล์หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 2 4 และ 6 เดือน ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง

คุณภาพ	อายุการเก็บรักษา (เดือน)				ข้อกำหนด*
	0	2	4	6	
ค่าสี L*	52.21	55.32	57.01	57.48	
a*	-1.28	-1.20	-1.18	-0.96	
b*	8.16	8.93	7.07	7.22	
ΔE	0.00	3.20	4.92	5.36	
ความชื้น (%)	3.66 a	3.98 a	4.37 a	6.59 b	
ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี	0.205 a	0.215 a	0.229 a	0.237 a	
ค่าการละลายน้ำ (%)	89.07 a	91.00 a	88.48 a	90.36 a	
คลอโรฟิลล์ (mg /100 g)	38.75 a	26.64 b	15.26 c	10.52 c	
สารหนู (mg/kg)	ND	-	-	-	<2.0
ตะกั่ว (mg/kg)	ND	-	-	-	<1.0
ปรอท (mg/kg)	0.01	-	-	-	-
Salmonella spp. (per 25 g)	ND	ND	ND	ND	ND
Clostridium perfringen (per 0.01 g)	ND	ND	ND	ND	ND
Escherichia coli (MPN/g)	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
Staphylococcus aureus (CFU/g)	<10	<10	<10	<10	<100

หมายเหตุ; ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

ND = Not Detected

* กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของสารสกัดให้สีจากส่วนของพืชหรือสัตว์

จากการพิจารณาค่าความแตกต่างของค่าสีโดยรวมระหว่างตัวอย่างกับตัวอย่างมาตรฐาน (ΔE) ถ้า ΔE มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 2.3 ถือว่าตัวอย่างมีความแตกต่างกับตัวอย่างมาตรฐาน (Sharma, 2003) พบว่า การเก็บรักษาสีผงที่อายุการเก็บรักษา 2 4 และ 6 เดือน มีค่า ΔE มากกว่า 2.3 แสดงว่า ค่าสีของสีผงมีความแตกต่างจากสีผงเริ่มต้น (0 เดือน) การเปลี่ยนแปลงของความชื้น พบว่า เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้นสีผงมีความชื้นเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าวอเตอร์แอกทิวิตีและการละลายของสีผงที่อายุการเก็บรักษา 0 2 4 และ 6 มีค่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) สำหรับปริมาณคลอโรฟิลล์ของสีผง พบว่า การเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้น มีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง โดย

กรมวิชาการเกษตร

สีผงที่อายุการเก็บรักษา 2 เดือน มีปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงแตกต่างจากสีผงเริ่มต้น สีผงที่ผลิตได้ไม่พบ สารหนู และตะกั่ว ตลอดอายุการเก็บรักษา 6 เดือน สีผงมีคุณภาพด้านจุลินทรีย์อยู่ในเกณฑ์ข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานสำหรับสารสกัดให้สีจากส่วนของพืชหรือสัตว์ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, ม.ป.ป.)

2.1.3 การประยุกต์ใช้สีผงคลอโรฟิลล์ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมนม ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ได้มีลักษณะดัง ภาพที่ 27 มีคุณภาพดัง ตารางที่ 23 พบว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำและค่า pH ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผง 0 1 2 3 และ 4% มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำอยู่ในช่วง 25.60 ถึง 26.73 และ ค่า pH อยู่ในช่วง 6.62 ถึง 6.67 การใส่สีผงปริมาณที่ต่างกันมีผลทำให้ค่าสีและปริมาณสารคลอโรฟิลล์ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมมีค่าแตกต่างกัน โดยค่าสีของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงปริมาณ 1 2 3 และ 4% มีค่า ΔE มากกว่า 2.3 แสดงว่าผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงมีสีแตกต่างกับผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ไม่ใส่สีผง และผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงปริมาณ 4% มีปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุด แตกต่างกับไอศกรีมที่ใส่สีผง 3 2 และ 1% ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ไม่ใส่สีผงตรวจไม่พบปริมาณคลอโรฟิลล์

0 1 2 3 4

ภาพที่ 27 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงคลอโรฟิลล์ 0 - 4%

ตารางที่ 23 คุณภาพของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงคลอโรฟิลล์ 0 - 4%

คุณภาพ	สีผงคลอโรฟิลล์ (%)				
	0	1	2	3	4
ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (°B)	25.73	25.60	26.73	26.67	26.63
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	6.67	6.66	6.66	6.67	6.62
ค่าสี L*	50.18	46.53	44.71	43.10	41.99
a*	-0.75	-2.84	-3.44	-3.49	-3.76
b*	5.57	9.16	10.26	10.73	10.91
ΔE	0.00	5.55	7.70	9.17	10.21
คลอโรฟิลล์ A (mg/100g)	0.00	2.99	6.08	9.41	13.13
คลอโรฟิลล์l B (mg/100g)	0.00	0.09	0.24	0.42	0.59
คลอโรฟิลล์ทั้งหมด (mg/100 g)	0.00 e	3.08 d	6.32 c	9.83 b	13.72 a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

จากการทดลองไม่ได้ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสเนื่องจากผลิตภัณฑ์ไอศกรีมมีกลิ่นไม่พึงประสงค์ของสาหร่าย ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์ไอศกรีมจะมีกลิ่นนมและเติมกลิ่นวานิลลาแล้วก็ตาม

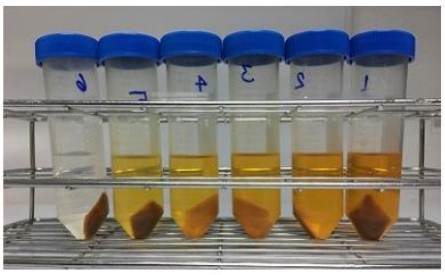
2.2 การผลิตสีผงแคโรทีนอยด์ (สีเหลือง) จากสาหร่ายขนาดเล็ก

ทำการทดลองเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่ให้สีส้ม คือ สายพันธุ์ SK-QSGMF6 (*Coelastrella* sp.) โดยทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ใช้อาหาร Modified Chu 13 ใส่ขวดรูปชมพู่ ในสภาวะที่ให้แสงและการเขย่า 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 15 วัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เซลล์สาหร่ายมีการสะสมสารแคโรทีนอยด์ไว้ภายในเซลล์จนเซลล์เปลี่ยนเป็นสีส้ม (ภาพที่ 28) นำสาหร่ายเข้าเครื่องเหวี่ยงแยกกากเพื่อให้ได้เซลล์สาหร่ายสำหรับนำไปสกัดสารสี

กรมวิชาการเกษตร

2.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัดสารสีจากสาหร่าย (ภาพที่ 28 และตารางที่ 24) โดยนำสาหร่ายขนาดเล็กที่เลี้ยงได้ในระดับห้องปฏิบัติการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 60-95% พบว่า การสกัดด้วยเอทานอล 95% สารสกัดที่ได้มีปริมาณแคโรทีนอยด์มากที่สุด 6.93 ug/ml และสารสกัดมีสีแตกต่างกัน โดยสารสกัดจากเอทานอล 95% มีสีเข้มมากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกเอทานอลความเข้มข้น 95% ในการสกัดสารสีจากสาหร่าย

สาหร่าย SK-QSGMF6



สารสกัดสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอล

ภาพที่ 28 สาหร่าย SK-QSGMF6 และการสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 0, 60, 70, 80, 90 และ 95%

ตารางที่ 24 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายด้วยเอทานอลความเข้มข้น 60-95%

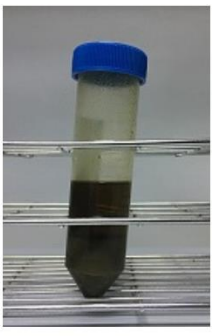
คุณภาพ		ความเข้มข้นของเอทานอล (%)					
		0	60	70	80	90	95
แคโรทีนอยด์ (ug/ml)		0.02 f	1.66 e	2.02 d	3.05 c	4.97 b	6.93 a
ค่าสี	L*	29.91	29.87	29.83	29.55	29.38	28.96
	a*	2.70	2.42	2.48	2.76	3.20	3.50
	b*	-2.15	0.58	1.43	2.20	3.21	3.73
	ΔE	0.00	2.74	3.59	4.37	5.41	6.01

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

จากการเลี้ยงสาหร่ายในระดับห้องปฏิบัติการได้สาหร่ายปริมาณน้อย จึงทำการเพาะเลี้ยงขยายขนาดจากระดับห้องปฏิบัติการขยายสู่บ่อแบบเปิด โดยใช้อัตราหัวเชื้อสาหร่าย 1 ต่อ 100 และอาหารมาตรฐาน Modified Chu 13 (เกรดอุตสาหกรรม) ต่อน้ำเพาะเลี้ยงสาหร่าย 1:500 ผลจากการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระบบเปิด พบว่า สาหร่ายที่ได้มีสีน้ำตาลและมีกลิ่นไม่พึงประสงค์ (น้อยกว่าสาหร่ายสีเขียว) เมื่อนำไปสกัดด้วยเอทานอล 95% ได้สารสกัดสีน้ำตาล มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ลดลง (ภาพที่ 29)

การเพาะเลี้ยงในบ่อเปิด

ลักษณะเซลล์สาหร่าย



สารสกัดสาหร่าย

ภาพที่ 29 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบบ่อเปิดและสารสกัดจากสาหร่าย

2.2.2 การศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยและอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สีผง โดยนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล 95% ระเหยภายใต้ความดันเพื่อลดปริมาตร ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสารสกัดมีค่า 43.19 ug/ml เนื่องจากมอลโตเด็กซ์ทรินไม่ละลายในสารสกัดเอทานอล จึงทำการผสมสารสกัดต่อ

กรมวิทยาศาสตร์

มอลโตเด็กซ์ทรินต่อน้ำ อัตราส่วน 1:1:1 เช่นเดียวกับการผสมสารสกัดคลอโรฟิลล์ และนำไปทำแห้งที่สภาวะเดียวกัน จากการทำแห้งแบบพ่นฝอยได้สีผงสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นไม่พึงประสงค์เล็กน้อย ผลผลิตสีผงที่ได้ (yield) เท่ากับ 15.88% ทำการเก็บรักษาสีผงเป็นเวลา 4 เดือน ตรวจคุณภาพได้ผลดัง ตารางที่ 25 และ ภาพที่ 30 พบว่า สีผงที่เก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน มีค่าสีไม่แตกต่างกับสีผงเริ่มต้น (0 เดือน) (ค่า ΔE น้อยกว่า 2.3) แต่สีผงที่เก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือน มีค่าสีแตกต่างกับสีผงเริ่มต้น (ค่า ΔE มากกว่า 2.3) สีผงที่อายุการเก็บรักษา 0 2 และ 4 เดือน มีความชื้นและค่าวอเตอร์แอกทิวิตีเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) สำหรับปริมาณแคโรทีนอยด์ของสีผง พบว่า การเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้น มีผลทำให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ลดลง โดยสีผงที่อายุการเก็บรักษา 2 และ 4 เดือน มีปริมาณแคโรทีนอยด์ลดลงแตกต่างจากสีผงเริ่มต้น สีผงที่ผลิตได้ไม่พบสารตะกั่ว และตลอดอายุการเก็บรักษา 4 เดือน สีผงมีคุณภาพด้านจุลินทรีย์อยู่ในเกณฑ์ข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานสำหรับสารสกัดให้สีจากส่วนของพืชหรือสัตว์ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, ม.ป.ป.)

0 2 4

ภาพที่ 30 สีผงแคโรทีนอยด์หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 2 และ 4 เดือน ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 25 คุณภาพของสีแคโรทีนอยด์หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 2 และ 4 เดือน ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง

คุณภาพ	อายุการเก็บรักษา (เดือน)			ข้อกำหนด*
	0	2	4	
ค่าสี L*	57.89	58.43	60.26	
a*	0.10	-0.01	0.11	
b*	12.76	10.83	10.48	
ΔE	0.00	2.01	3.29	
ความชื้น (%)	3.83 a	4.02 a	4.48 a	
ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี	0.202 a	0.216 a	0.222 a	
ค่าการละลายน้ำ (%)	87.31 a	85.90 a	86.50 a	
carotenoid (mg /100 g)	19.39 a	15.32 b	12.64 c	
สารหนู (mg/kg)	0.05	-	-	<2.0
ตะกั่ว (mg/kg)	ND	-	-	<1.0
ปรอท (mg/kg)	0.01	-	-	-
Salmonella spp. (per 25 g)	ND	ND	ND	ND
Clostridium perfringen (per 0.01 g)	ND	ND	ND	ND
Escherichia coli (MPN/g)	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
Staphylococcus aureus (CFU/g)	<10	<10	<10	<100

หมายเหตุ; ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

ND = Not Detected

* กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของสารสกัดให้สีจากส่วนของพืชหรือสัตว์

กรมวิชาการเกษตร

2.2.3 การประยุกต์ใช้สีผงแคโรทีนอยด์ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมนม ได้ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่มีลักษณะดังภาพที่ 31 มีคุณภาพดังตารางที่ 26 พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำและค่า pH ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผง 0 1 2 3 และ 4% มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำอยู่ในช่วง 25.73 ถึง 26.73 และ ค่า pH อยู่ในช่วง 6.63 ถึง 6.77 การใส่สีผงปริมาณที่ต่างกันมีผลทำให้ค่าสีและปริมาณแคโรทีนอยด์ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมมีค่าแตกต่างกัน โดยค่าสีของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงปริมาณ 1 2 3 และ 4% มีค่า ΔE มากกว่า 2.3 แสดงว่าผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงมีสีแตกต่างกับผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ไม่ใส่สีผง และผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงปริมาณ 4% มีปริมาณแคโรทีนอยด์มากที่สุดแตกต่าง ($p \leq 0.05$) กับไอศกรีมที่ใส่สีผง 3 2 และ 1% สำหรับผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ไม่ใส่สีผงแต่ตรวจพบแคโรทีนอยด์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมมีไข่เป็นส่วนประกอบด้วย นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ได้ไม่มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ อาจเป็นเพราะกลิ่นนมและกลิ่นวานิลลาช่วยลดกลิ่นไม่พึงประสงค์นั้น

ภาพที่ 31 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงแคโรทีนอยด์ 0 - 4%

ตารางที่ 26 คุณภาพของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงแคโรทีนอยด์ 0 - 4%

คุณภาพ	สีผงแคโรทีนอยด์ (%)				
	0	1	2	3	4
ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (°B)	25.73	25.87	26.43	26.23	26.73
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	6.67	6.77	6.63	6.71	6.70
ค่าสี L*	50.07	48.28	46.81	46.16	45.44
a*	-0.81	-0.90	-0.47	-0.31	0.22
b*	5.40	13.34	16.84	18.60	19.60
ΔE	0.00	8.14	11.90	13.79	14.97
แคโรทีนอยด์ (ug/100 g)	59.11 e	74.95 d	82.90 c	94.82 b	102.08 a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

จากการทดลองไม่ได้ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสเนื่องจากมีตัวอย่างสาหร่ายจำนวนจำกัด จึงทำให้ผลิตสีผงได้ในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการทดลอง

2.3 การผลิตสีผงจากสาหร่ายขนาดเล็ก (สีฟ้า phycobilin)

การผลิตสีผงจากสาหร่ายขนาดเล็กที่ให้สีฟ้า ใช้สาหร่ายสายพันธุ์ A052 (*Coelastrum microporum*) เลี้ยงในอาหาร BG-11 ได้สาหร่ายที่มีสีเขียว

2.3.1 การสกัดสารสีฟ้า (phycobilin) จากสาหร่ายขนาดเล็กด้วยวิธีทางกายภาพ ได้สารสกัดสีฟ้า มีปริมาณไฟโคบิลิน 1.24 ug/ml (ภาพที่ 32) และมีกลิ่นไม่พึงประสงค์เล็กน้อย

กรมวิชาการเกษตร

การสกัดจากเซลล์สาหร่าย สารสกัดไฟโคบิลิน

ภาพที่ 32 สารสกัดจากเซลล์สาหร่ายด้วยน้ำ

2.3.2 การศึกษาปริมาณมอลโตเด็กซ์ทรินที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอย จากการทำแห้งแบบพ่นฝอย ได้ผงสีฟ้ามีกลิ่นไม่พึงประสงค์เล็กน้อย ลักษณะดัง ภาพที่ 33 และมีคุณภาพ ตารางที่ 27

10 20 30

ภาพที่ 33 สีผงไฟโคบิลินที่เตรียมจากปริมาณมอลโตเด็กซ์ทริน 10 – 30 %

ตารางที่ 27 คุณภาพของสีผงไฟโคบิลินที่เตรียมจากปริมาณมอลโตเด็กซ์ทริน 10 – 30 %

คุณภาพ	มอลโตเด็กซ์ทริน (%)		
	10	20	30
ความชื้น (%)	4.28 b	3.66 a	3.63 a
ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี	0.208	0.181	0.163
yield (%)	6.89	12.16	17.42
ค่าสี L*	46.68	48.75	50.78
a*	-4.40	-4.44	-4.68
b*	-8.08	-7.50	-7.57
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	5.99	5.87	5.76
ค่าการละลายน้ำ (%)	84.49 a	85.83 a	87.21 a
ไฟโคไซยานิน (mg/100 g)	25.68	10.67	7.78
อัลโลไฟโคไซยานิน (mg/100 g)	9.24	3.57	2.57
ไฟโคเออริธริน (mg/100 g)	2.04	0.96	0.62
ไฟโคบิลิน (mg/100 g)	36.96 a	15.20 b	10.97 c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

สีผงที่ผสมมอลโตเด็กซ์ทริน 10% มีความชื้นมากที่สุด ($p \leq 0.05$) แตกต่างกับสีผงที่ผสมมอลโตเด็กซ์ทริน 20 และ 30% โดยค่าสีของสีผงที่ผสมมอลโตเด็กซ์ทริน 10% มีสีเข้มกว่า สังเกตได้จากค่าสี L* (ความสว่าง) ของสีผงที่ผสมมอลโตเด็กซ์ทริน 10% มีค่าต่ำที่สุด และค่าสี b* (เหลือง-น้ำเงิน) มีค่าน้อยที่สุด นั่นคือแสดงความเป็นสีน้ำเงินเข้มมากกว่าสีผงที่ผสมมอลโตเด็กซ์ทริน 20 และ 30% การละลายน้ำของสีผงที่ผสมมอลโตเด็กซ์ทริน 10 20 และ 30% ไม่มีความแตกต่างกัน สำหรับปริมาณสารไฟโคบิลินพบว่า สีผงที่ผสมมอลโตเด็กซ์ทริน 10% มี

กรมวิชาการเกษตร

ปริมาณสารไฟโคบิลินมากที่สุด ($p \leq 0.05$) ถึงแม้ว่าสีผงที่ผสมมอลโตเด็กซ์ทริน 10% จะมีความชื้นมากที่สุด แต่มีค่าไม่เกิน 5.0% ซึ่งโดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ผง เช่น นมผง (กระทรวงสาธารณสุข, 2556) กาแฟสำเร็จรูป (กระทรวงสาธารณสุข, 2543) กำหนดให้มีความชื้นไม่เกิน 5.0% ดังนั้นจึงเลือกปริมาณมอลโตเด็กซ์ทริน 10% เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอย สารสกัดไฟโคบิลิน จากการตรวจสอบสารปนเปื้อนของสีผง (ตารางที่ 28) ไม่พบสารตะกั่ว และสีผงที่ผลิตได้มีคุณภาพด้านจุลินทรีย์ของสีผงอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

ตารางที่ 28 คุณภาพของสีผงไฟโคบิลินที่เตรียมจากมอลโตเด็กซ์ทริน 10 %

คุณภาพ	สีผงไฟโคบิลิน	ข้อกำหนด*
สารหนู (mg/kg)	<0.025	<2.0
ตะกั่ว (mg/kg)	ND	<1.0
ปรอท (mg/kg)	0.01	-
Salmonella spp. (per 25 g)	ND	ND
Clostridium perfringen (per 0.01 g)	ND	ND
Escherichia coli (MPN/g)	<3.0	<3.0
Staphylococcus aureus (CFU/g)	<10	<100

หมายเหตุ; ND = Not Detected

* กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของสารสกัดให้สีจากส่วนของพืชหรือสัตว์

2.3.3 การประยุกต์ใช้สีผงไฟโคบิลินในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมนม ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ได้มีลักษณะดังภาพที่ 34 มีคุณภาพดังตารางที่ 29 พบว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำและค่า pH ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผง 0 1 2 3 และ 4% มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำอยู่ในช่วง 25.73 ถึง 26.93 และ ค่า pH อยู่ในช่วง 6.61 ถึง 6.67 การใส่สีผงปริมาณที่ต่างกันมีผลทำให้ค่าสีและปริมาณไฟโคบิลินของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมมีค่าแตกต่างกัน โดยค่าสีของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงปริมาณ 1 2 3 และ 4% มีค่า ΔE มากกว่า 2.3 แสดงว่าผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงมีสีแตกต่างกับผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ไม่ใส่สีผง และผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงปริมาณ 4% มีปริมาณไฟโคบิลินมากที่สุดแต่ไม่แตกต่าง ($p>0.05$) กับไอศกรีมที่ใส่สีผง 3% ในขณะที่ ไอศกรีมที่ใส่สีผง 1% พบปริมาณไฟโคบิลินปริมาณน้อยมากไม่แตกต่างกับไอศกรีมที่ไม่ใส่สีผง นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ได้ไม่มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ อาจเป็นเพราะกลิ่นนมและกลิ่นวานิลลาช่วยลดกลิ่นไม่พึงประสงค์นั้น

0 1 2 3 4

ภาพที่ 34 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงไฟโคบิลิน 0 - 4%

กรมวิทยาศาสตร์

ตารางที่ 29 คุณภาพของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่ใส่สีผงไฟโคบิลิน 0 – 4 %

คุณภาพ	สีผงไฟโคบิลิน (%)				
	0	1	2	3	4
ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (°B)	25.73	26.90	26.87	26.10	26.93
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	6.67	6.61	6.62	6.63	6.62
ค่าสี L*	49.95	48.06	45.96	44.87	43.85
a*	-0.88	-0.82	-0.95	-0.84	-0.91
b*	5.20	3.56	1.60	0..34	-0.50
ΔE	0.00	2.73	5.60	7.26	8.57
ไฟโคไซยานิน (mg/100 g)	0.00	0.22	0.45	0.82	0.80
อัลโลไฟโคไซยานิน (mg/100 g)	0.00	0.11	0.27	0.52	0.58
ไฟโคเออริธรีน (mg/100 g)	0.00	0.08	0.19	0.23	0.27
ไฟโคบิลิน (mg/100 g)	0.00 c	0.41 c	0.91 b	1.57 a	1.65 a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

จากการทดลองไม่ได้ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสเนื่องจากมีตัวอย่างสาหร่ายจำนวนจำกัด จึงทำให้ผลิตสีผงได้ในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการทดลอง

3. การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กและวิธีการเตรียมเซลล์เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบ

สาหร่ายที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์คือ สาหร่าย A052 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ในการเพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์ในห้องปฏิบัติการ โดยเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายชุดที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐานกับชุดที่เพาะเลี้ยงด้วยแม่ปุ๋ยเคมีผสม 16-8-8 และ 15-15-15 ที่ใช้อัตราส่วนปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยงสาหร่าย 1:500 พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยแม่ปุ๋ยเคมีผสม 16-8-8 ให้ผลการเพาะเลี้ยงดีที่สุด โดยสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 17 วัน มีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ 2.54×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

จากนั้นศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงจากระดับฟลาสก์ในห้องปฏิบัติการสู่การเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดแบบบ่อเปิดขนาด 5,000 ลิตร โดยตลอดระยะเวลาในช่วงของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณความเข้มของแสงแดดอยู่ในช่วง 12-18 kLux และอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ในช่วง 33-39 องศาเซลเซียส พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 17 วัน โดยมีความหนาแน่นของเซลล์ 7.03×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 30) จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกกากเซลล์จุลินทรีย์อัตโนมัติ (High performance self-cleaning Separator) เพื่อแยกเซลล์สาหร่ายออกจากน้ำที่เพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย ซึ่งสามารถแยกเซลล์สาหร่ายออกจากน้ำที่เพาะเลี้ยงได้ปริมาณผลได้ 0.45 % Solid (สาหร่าย) ของปริมาตรน้ำเพาะเลี้ยงเริ่มต้นก่อนแยกเซลล์

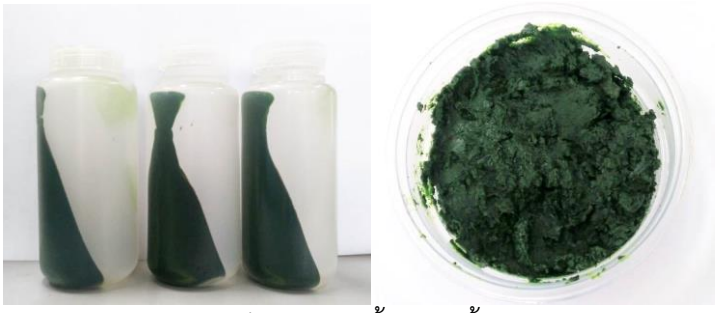
ตารางที่ 30 ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการและระดับขยายขนาด

ระดับการเพาะสี้ยง	ความหนาแน่นของเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
การเพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์ในห้องปฏิบัติการ	2.54×10^6
การเพาะเลี้ยงระดับขยายขนาดแบบบ่อเปิดขนาด 5,000 ลิตร	7.03×10^5

การเตรียมเซลล์สาหร่ายเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยนำเซลล์สาหร่ายที่ได้จากการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกกากเซลล์จุลินทรีย์อัตโนมัติซึ่งยังคงมีลักษณะเป็นเซลล์สาหร่ายที่แขวนลอยอยู่ในของเหลวอยู่มาทำการแยกเซลล์โดยชุดกรองสุญญากาศเปรียบเทียบกับการแยกเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง

กรมวิชาการเกษตร

ความเร็วสูง พบว่าการแยกเซลล์ผ่านเครื่องกรองสุญญากาศสามารถแยกเซลล์ได้ช้า แต่การแยกเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงสามารถแยกเซลล์สาหร่ายได้ปริมาณมากกว่าและเร็วกว่าการกรองสุญญากาศ ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์สาหร่าย คือ การแยกเซลล์สาหร่ายออกจากของเหลวโดยการนำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เวลาหมุนเหวี่ยง 30 นาที ที่สภาวะอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้เซลล์สาหร่ายที่มีลักษณะปรากฏเป็นสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 35)



ภาพที่ 35 เซลล์สาหร่ายขนาดเล็กหลังแยกน้ำเพาะเลี้ยงสำหรับใช้สกัดพอลิแซ็กคาไรด์

3.2 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

3.2.1 การสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

การสกัดสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 % เพื่อกำจัดรงควัตถุและไขมันต่างๆ ออกจากสาหร่ายจะได้ของแข็งที่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ (alcohol insoluble solid (AIS)) ของแข็งที่แยกได้มีลักษณะปรากฏเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน ขั้นตอนต่อไปทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จาก alcohol insoluble solid ด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่าการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้อัตราส่วน AIS : น้ำ เท่ากับ 1:1 และ 1:1.5 (w/v) ที่ระยะเวลาในการสกัดเท่ากันให้ปริมาณผลได้ของพอลิแซ็กคาไรด์ไม่แตกต่างกัน พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอมน้ำตาล (ภาพที่ 36) โดยการสกัดที่ใช้อัตราส่วน AIS : น้ำ เท่ากับ 1:1 เวลาสกัด 70 นาที ให้ปริมาณผลผลิตของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสูงสุดเท่ากับ 3.97 % (ตารางที่ 31)

ภาพที่ 36 สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

ตารางที่ 31 ปริมาณสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กที่ได้จากแต่ละสภาวะการสกัด

อัตราส่วนของแข็งที่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ : น้ำ (w/v)	ระยะเวลา (นาที)	ปริมาณผลได้ (เปอร์เซ็นต์)
1:1	50	2.93 b
1:1	70	3.97 a
1:1.5	50	2.86 b
1:1.5	70	3.90 a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

กรมวิชาการเกษตร

วิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กด้วยน้ำของการทดลองนี้สอดคล้องกับการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผมนาง สาหร่ายผักกาดทะเล และสาหร่ายขนนก ของ นพรัตน์ และคณะ (2553) ซึ่งทำการสกัดสาหร่ายผมนาง สาหร่ายผักกาดทะเล และสาหร่ายขนนกด้วยน้ำและเอทานอล พบว่าการสกัดสาหร่ายผมนางและสาหร่ายผักกาดทะเลด้วยน้ำต้มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ปริมาณสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอลในทุกชนิดของสาหร่าย ซึ่งอาจเนื่องจากน้ำตาลอิสระที่มีอยู่ในสาหร่ายสามารถละลายน้ำได้ดีกว่าเอทานอล

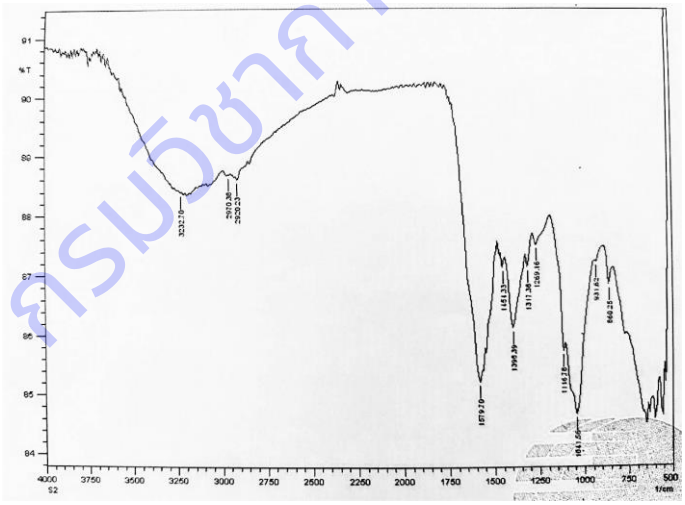
3.2.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กมีปริมาณความชื้น 7.59 % คาร์โบไฮเดรต 87.50 % ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 82.19 และมีปริมาณกรดยูโรนิคหรือน้ำตาลที่อยู่ในรูปของกรดซึ่งเป็นโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ 5.82 % (ตารางที่ 32) ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายขนาดเล็กในงานวิจัยนี้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงกับการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง (Gracilaria fisheri) ด้วยน้ำ ของ ศิริลักษณ์ และคณะ (2557) ที่ได้พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 86.79 %

ตารางที่ 32 คุณสมบัติทางเคมีของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณ (% โดยน้ำหนัก)
ความชื้น	7.59
คาร์โบไฮเดรต	87.50
น้ำตาลทั้งหมด	82.19
กรดยูโรนิค	5.82

3.2.3 การศึกษาโครงสร้างของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก



ภาพที่ 37 FTIR สเปกตรัมของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

การศึกษาโครงสร้างของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเครื่อง (Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectrometer) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารตัวอย่างเพื่อยืนยันโครงสร้างของตัวอย่างว่ามีโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ ผลการตรวจสอบพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กมีพีคเกิดขึ้นที่ช่วงความยาวคลื่น 860.25-3,232.70 cm^{-1} (ภาพที่ 37) โดยมีพีคที่บ่งบอกโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ (ตารางที่ 33) ได้แก่ หมู่ฟังก์ชั่น C-O ที่ความยาวคลื่นช่วง 1,041.50 และพันธะ O-H ของหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งบ่งบอกถึงพันธะไกลโคซิดิกซึ่งเป็นพันธะที่เป็นโครงสร้างทางเคมีของพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ช่วงความยาวคลื่น 3,232.70 cm^{-1} และยังมีโครงสร้างของหมู่เมทิล (C-H) ช่วง 2,970.38 และ 2,920.23 cm^{-1} เป็นองค์ประกอบด้วยแสดงว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กที่สกัดได้มีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์

สำนักวิชาการเกษตร

ตารางที่ 33 ค่าความยาวคลื่นของหมู่ฟังก์ชั่นต่างๆ ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

ค่าความยาวคลื่น (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชั่น
3232.70	O-H stretching
2970.38, 2920.23	C-H stretching
1579.70	C-C stretching
1398.39	CH_2 Bending
1041.56	C-O stretching
860.25	CH_2 Rocking

3.2.4 การศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

การศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กโดยการวิเคราะห์คุณสมบัติด้านความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืด และความแข็งแรงของเจลด้วยเครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส พิจารณาปัจจัยที่มีผลเกี่ยวข้อง คือ ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ และความเป็นกรด-ด่าง (pH) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กมีผลให้ค่าความหนืดและความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 34)

ตารางที่ 34 ผลของความเข้มข้นของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ต่อค่าความหนืดและความแข็งแรงของเจล

ความเข้มข้นของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ (%w/v)	ความหนืด (cPs)	ความแข็งแรงของเจล (N)
0.5	5.2	0.035
1.0	8.3	0.063
1.5	12.6	0.092
2.0	16.4	0.129

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

โดยเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มมากขึ้นทำให้พอลิแซ็กคาไรด์สามารถจับกับน้ำได้มากขึ้น ปริมาณน้ำอิสระจึงลดลงส่งผลให้ค่าความหนืดและความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้น ส่วนผลของค่า pH ของสารพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายต่อค่าความหนืดและความแข็งแรงของเจล พบว่าสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 1 % มีค่า pH เท่ากับ 6.4 เมื่อทำการลด pH ของสารละลายจาก 6.4 เป็น 6.0 และ 4.5 ทำให้ค่าความหนืดและความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเพิ่มค่า pH จาก 6.4 เป็น 7.0 และ 7.5 ทำให้ค่าความหนืดและความแข็งแรงของเจลลดลง (ตารางที่ 35) ซึ่งอาจเกิดจากในสภาวะที่เป็นด่าง $[OH]^-$ จะไปลดพันธะไฮโดรเจนภายในและระหว่างโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ ทำให้การขยายตัวระหว่างโมเลกุลเกิดได้น้อยลง ส่งผลให้ค่าความหนืดและความแข็งแรงของเจลลดลง (จิตรา และคณะ, 2550)

ตารางที่ 35 ผลของ pH ของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์เข้มข้น 1.0 (%w/v) ต่อค่าความหนืดและความเข็งแรงของเจล

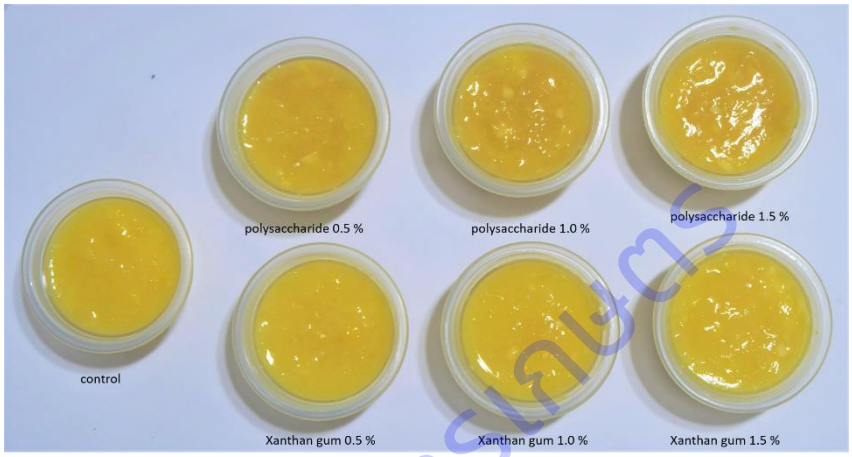
pH ของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์	ความหนืด (cPs)	ความแข็งแรงของเจล (N)
4.5	14.6a	0.125a
6.0	11.5b	0.098b
6.4	8.4c	0.067c
7.0	5.5d	0.053d
7.5	4.8e	0.046e

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

กรมวิชาการเกษตร

3.2.5 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กในผลิตภัณฑ์อาหาร

การใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กเป็นสารให้ความข้นหนืดในผลิตภัณฑ์ซุปข้าวโพดเปรียบเทียบกับสารให้ความหนืดทางการค้า คือ แซนแทนกัม (ภาพที่ 38) โดยวิเคราะห์ค่าความข้นหนืด (consistency) และการแยกชั้นของตัวอย่างซุปข้าวโพด (%Serum Loss) ซึ่งบ่งบอกความคงตัวของตัวอย่างซุป ถ้า % serum Loss มีค่าสูงแสดงว่าซุปมีความคงตัวต่ำ ผลการศึกษาพบว่าการเติมพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก และแซนแทนกัมในตัวอย่างซุปข้าวโพด มีผลทำให้ค่าความข้นหนืดของซุปเพิ่มขึ้นและ % serum Loss ลดลง โดยตัวอย่างซุปข้าวโพดที่เติมพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก ปริมาณ 1.5 % มีค่าความข้นหนืด และ % serum Loss ใกล้เคียงกับตัวอย่างซุปที่เติมแซนแทนกัม 1.0 % จึงสามารถใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กปริมาณ 1.5 % เป็นสารให้ความข้นหนืดในผลิตภัณฑ์ซุปข้าวโพดได้



ภาพที่ 38 ผลิตภัณฑ์ซุปข้าวโพดที่เติมพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก และแซนแทนกัม

ตารางที่ 36 ค่าความข้นหนืดและการแยกชั้นของตัวอย่างซุปข้าวโพดที่เติมพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กและแซนแทนกัม ระหว่างการเก็บรักษาในตู้เย็น (4±2°C) เป็นเวลา 90 วัน

ตัวอย่างซุปข้าวโพด	ค่าความข้นหนืด (g)				การแยกชั้น (%)			
	0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน	0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
ชุดควบคุม	6,245.29e	6,139.64e	6,054.48f	6,011.86f	62.81a	65.73a	67.42a	68.59a
สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ 0.5%	8,517.52d	8,419.54d	8,381.25e	8,376.42e	45.74b	48.54b	49.08b	49.92b
สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ 1.0%	11,046.80c	11,016.54c	10,545.38d	10,037.49d	23.27d	24.36d	24.85d	25.17d
สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ 1.5%	14,528.48b	14,165.37b	13,728.49b	13,168.62b	9.53e	9.94e	10.22e	10.65e
แซนแทนกัม 0.5%	11,840.56c	11,649.42c	11,475.82c	11,112.63c	27.34c	27.98c	28.52c	29.93c
แซนแทนกัม 1.0%	14,947.32b	14,695.74b	14,497.28b	14,219.38b	6.25f	6.36f	6.48f	6.59f
แซนแทนกัม 1.5%	17,832.74a	17,718.29a	17,594.42a	17,482.83a	2.38g	2.41g	2.54g	2.59g

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

เมื่อพิจารณาคุณสมบัติของซุปข้าวโพดที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน (ตารางที่ 36) พบว่าซุปข้าวโพดที่เติมพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กปริมาณ 1.5 % มีค่าความข้นหนืดลดลง 9.36 % และมีค่าการแยกชั้นของซุปข้าวโพดเพิ่มขึ้น 11.84 % ใกล้เคียงกับซุปข้าวโพดที่เติมแซนแทนกัม 1.0 % ที่มีค่าความข้นหนืดลดลง 4.87 % และมีค่าการแยกชั้นเพิ่มขึ้น 5.44 % ตามลำดับ

กรมวิทยาศาสตร์

3.3 การผลิตใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก

3.3.1 การสกัดใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก

การสกัดใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ได้ใยอาหารที่มีสีน้ำตาล (ภาพที่ 39) มีปริมาณผลได้เท่ากับ 89.35 % มีปริมาณใยอาหารรวม 82.16 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

ภาพที่ 39 ใยอาหารที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก

3.3.2 การผลิตผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้าเสริมใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก

การนำใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็กเติมในเส้นพาสต้าเพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้าเสริมใยอาหาร เปรียบเทียบกับใยอาหารทางการค้าคือ บุก (ภาพที่ 40)

ภาพที่ 40 ผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้าไม่เติมใยอาหาร เติมใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก และเติมใยอาหารจากบุกเส้นดิบ และเส้นพาสต้าที่ผ่านการลวก

โดยปริมาณที่เหมาะสมของใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็กในเส้นพาสต้า คือ 3 % เมื่อเปรียบเทียบกับใยอาหารทางการค้า คือ บุก พบว่าผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้าเสริมใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก มีปริมาณใยอาหารรวม 0.84 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้าเสริมใยอาหารจากบุก 3 เปอร์เซ็นต์ ที่มีปริมาณใยอาหารรวม 1.05 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 37) ดังนั้นใยอาหารที่สกัดจากพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กสามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มใยอาหารในผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้าได้

ตารางที่ 37 ปริมาณใยอาหารของผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้าไม่เติมใยอาหาร เติมใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก และเติมใยอาหารจากบุก

ตัวอย่างเส้นพาสต้า	ปริมาณใยอาหาร (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง)

กรมวิชาการเกษตร

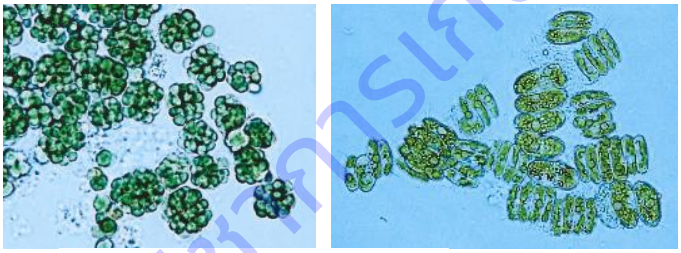
ไม่เติมใยอาหาร	0f
ใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก 1 เปอร์เซ็นต์	0.37e
ใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก 2 เปอร์เซ็นต์	0.62c
ใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก 3 เปอร์เซ็นต์	0.84b
ใยอาหารจากบุก 1 เปอร์เซ็นต์	0.45d
ใยอาหารจากบุก 2 เปอร์เซ็นต์	0.76b
ใยอาหารจากบุก 3 เปอร์เซ็นต์	1.05a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

4. การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็กแบบระบบเปิดในระดับขยายขนาด

4.1 การผลิตชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็กแบบบ่อเปิด

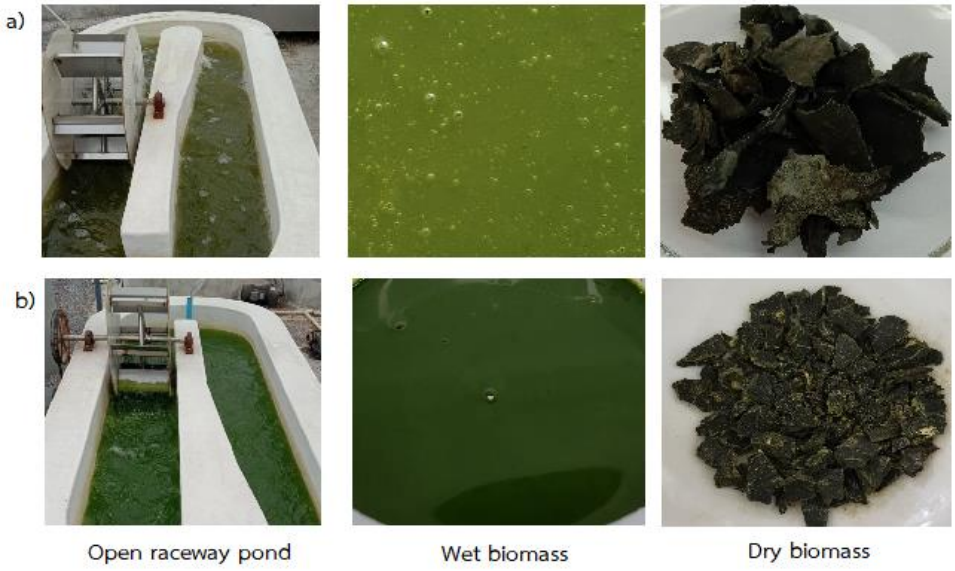
ผลการเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายตั้งต้น (Starter culture) โดยทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อสาหร่าย CM01-4 และ KK20 ในอาหารสูตรมาตรฐาน Modified Chu 13 เพื่อเพิ่มปริมาณจนได้ปริมาตร 5 ลิตร หลังการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ พบว่าสาหร่าย CM01-4 เป็นสายพันธุ์ *Botryococcus* sp. ส่วนสาหร่าย KK20 เป็นสายพันธุ์ *Desmodesmus* sp. (จำแนกและระบุชนิดของสายพันธุ์: ทดสอบโดย ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ (ศคช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)) โดยลักษณะเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กแสดงดังภาพที่ 41



ภาพที่ 41 ลักษณะเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก (ซ้าย) CM01-4 (ขวา) KK20

จากนั้นขยายการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ ในบ่อเปิดขนาด 500 ลิตร พร้อมกับการใช้ใบพัดเติมอากาศ ด้วยสูตรอาหาร Modified Chu 13 (เกรดการค้า) และปุ๋ยเคมี 15-15-15 ในอัตราส่วนอาหารต่อน้ำเลี้ยง 1/500 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 21 วัน และเพาะเลี้ยงต่อเนื่องหลังการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ อีก 10 วัน หลังการเก็บเกี่ยวได้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่ายสด CM01-4 1.85 และ 1.16 กรัมต่อลิตร สาหร่าย KK20 ได้ 1.95 และ 1.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 42) จากปริมาณชีวมวลสาหร่ายที่ได้จึงใช้ชีวมวลสาหร่ายจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Modified Chu 13 (เกรดการค้า) ในการศึกษาวิธีการสกัดและผลิตไบโอดีเซล

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 42 ชีวมวลสาหร่ายแห้งของสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์ a) CM01-4 และ b) KK20

4.2 การผลิตไบโอดีเซลจากชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็ก

4.2.1 วิธีการผลิตไบโอดีเซลจากชีวมวลสาหร่ายแห้ง

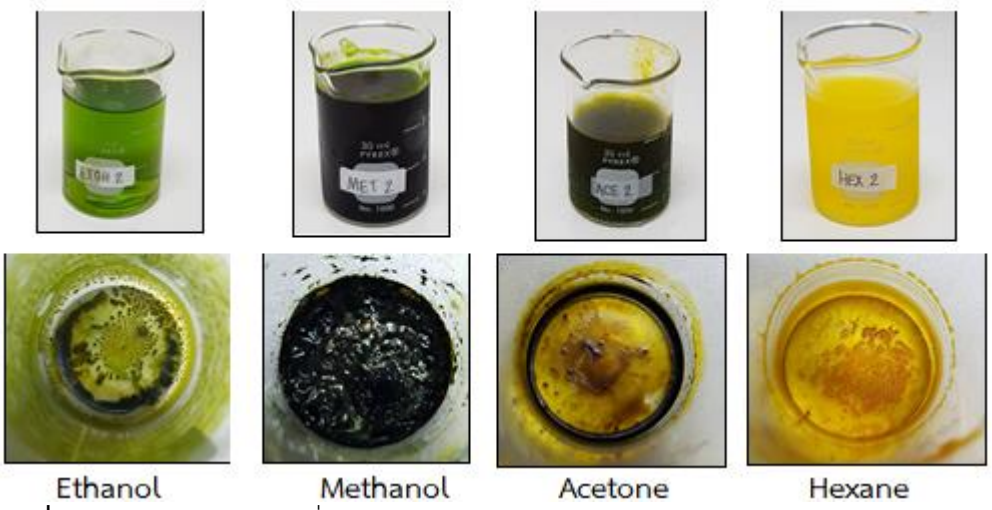
ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ เอทานอล (Ethanol) เมทานอล (Methanol) อะซิโตน (Acetone) และเฮกเซน (Hexane) ออกจากชีวมวลสาหร่ายแห้ง CM01-4 และ KK20 (ตารางที่ 38)

ตารางที่ 38 ปริมาณไขมันที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวทำละลายอินทรีย์	ไขมัน (กรัมต่อกรัมสาหร่ายแห้ง)	
	สาหร่าย CM01-4	สาหร่าย KK20
เอทานอล	0.0782b	0.0763b
เมทานอล	0.0829b	0.0785b
อะซิโตน	0.1034a	0.0942a
เฮกเซน	0.0637c	0.0515c

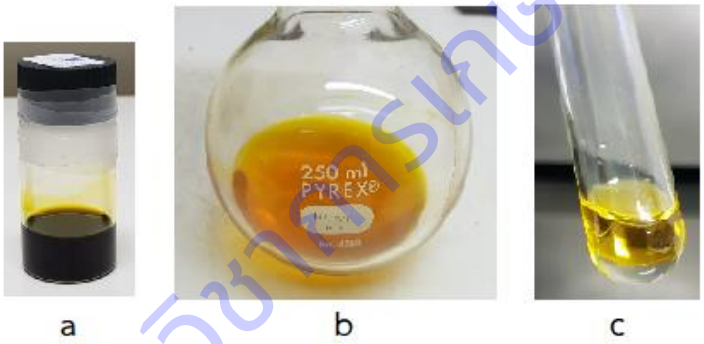
ผลจากด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด พบว่าอะซีโตนสามารถสกัดได้ไขมันจากชีวมวลสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้ปริมาณสูงสุดที่ 0.1034 และ 0.0942 กรัมต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ลักษณะไขมันที่ได้มีสีดำ (ภาพที่ 43) รองลงมาคือเมทานอลสกัดไขมันได้ 0.0829 และ 0.0785 กรัมต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ ส่วนเอทานอลนั้นสกัดได้ปริมาณใกล้เคียงกับเมทานอล โดยลักษณะไขมันที่ได้จะออกสีเขียว เนื่องจากตัวทำละลายกลุ่มแอลกอฮอล์จะสามารถสกัดสารคลอโรฟิล์ลออกมาจากชีวมวลสาหร่ายได้ด้วย และเฮกเซนนั้นมีความสามารถสกัดไขมันจากชีวมวลสาหร่ายได้น้อยสุดเท่ากับ 0.0637 และ 0.0515 กรัมต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ แต่ลักษณะไขมันมีสีเหลืองใสมากกว่า

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 43 ลักษณะของไขมันที่สกัดจากชีวมวลสาหร่ายแห้งด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด

จากไขมันที่สกัดได้จากชีวมวลแห้งนำมาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น หลังการทำปฏิริยากับเมทานอล และมีด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ภาพที่ 44) ได้น้ำมันหลังการล้างด้วยน้ำเพื่อทำความสะอาด 53.10% จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเตอร์ (FAME) ได้ประมาณ 80%

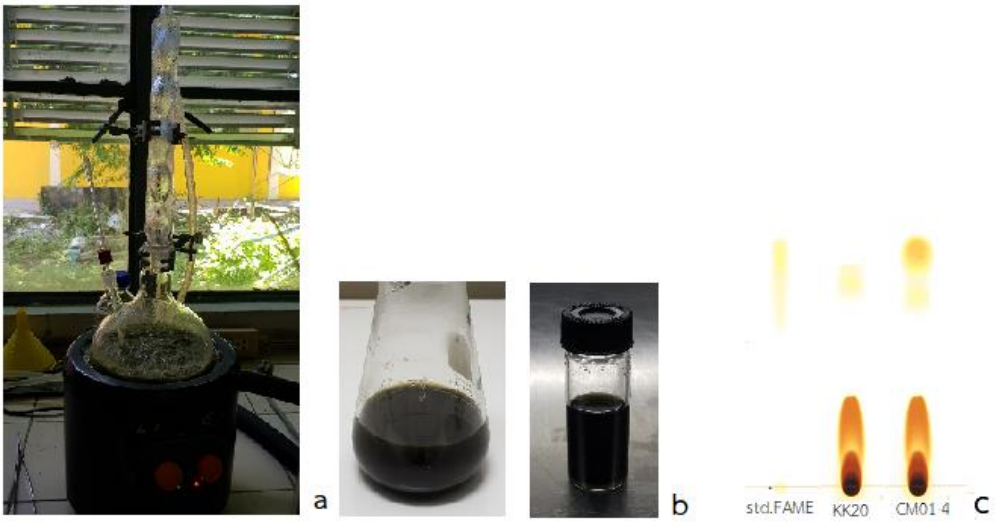


ภาพที่ 44 a) สารสกัดไขมันจากชีวมวลสาหร่าย
b) ส่วนผสมของไขมัน เมทานอล และด่าง จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น
c) ไบโอดีเซล

4.2.2 วิธีการผลิตไบโอดีเซลจากชีวมวลสาหร่ายเปียก

ผลการทำปฏิกิริยา acidic transesterification ของชีวมวลสาหร่ายสด CM01-4 และ KK20 กับเมทานอลในอัตราส่วน 1:3 โดยใช้กรดซัลฟิวริก 10 % เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าหลังการทำปฏิกิริยาและนำส่วนของเหลวมาระเหยเมทานอลออกเหลือปริมาณสารสกัด 29.17 % และ 28.08 % ตามลำดับ เป็นของเหลวสีดำ ผลการทดสอบสารสกัดเพื่อหาเมทิลเอสเทอร์ด้วยแผ่น TLC ได้ลักษณะของโครมาโตแกรมแสดงดังภาพที่ 45 ผลการวิเคราะห์พบว่าน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่าย CM01-4 มีค่าใกล้เคียงกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน FAME (Fatty acid methylester) และจากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเตอร์ (FAME) ได้เมทิลเอสเตอร์ที่ระดับ 40.52% จากผลทดสอบค่าความบริสุทธิ์ที่ได้มีค่าต่ำเมื่อเทียบกับค่ามาตรฐานคุณภาพของไบโอดีเซลที่ควรมีค่าเมทิลเอสเตอร์มากกว่า 96.5%

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 45 a) ชุดทำปฏิกิริยา acidic transesterification จากชีวมวลสาหร่ายสด
b) สารสกัดจากการทำปฏิกิริยาของสาหร่าย CM01-4 และ KK20
c) ผลทดสอบหาเมทิลเอสเตอร์ในสารสกัดของสาหร่าย CM01-4 และ KK20 ด้วยแผ่น TLC

5. การผลิตพลาสติกชีวภาพจากสาหร่ายขนาดเล็ก

5.1 การผลิตชีวมวลสาหร่ายในบ่อเพาะเลี้ยงแบบเปิด

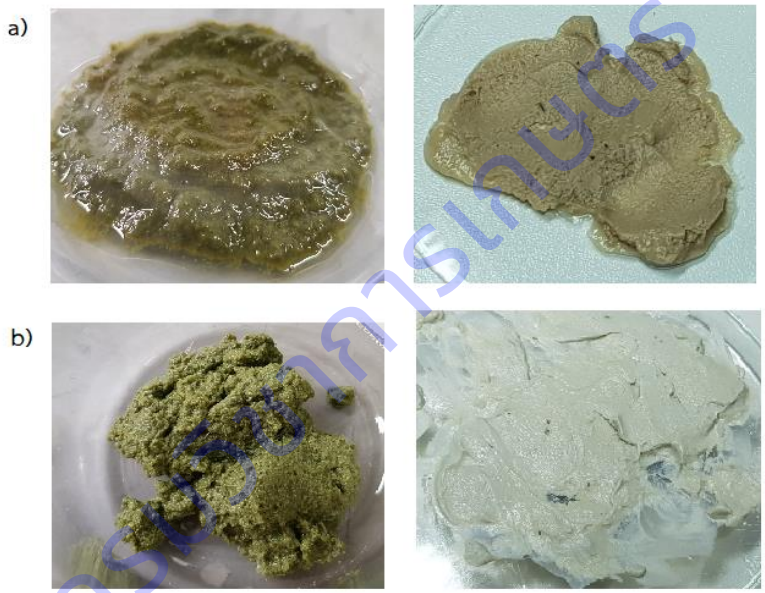
การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก Sm6-3 ด้วยหัวเชื้อสาหร่าย 5 ลิตร ด้วยสูตรอาหาร BG-11 (N-Free) (เกรดการค้า) และปุ๋ยสูตร 8-24-24 ในบ่อเพาะเลี้ยงขนาด 500 ลิตร แบบเปิดนอกห้องปฏิบัติการ (Raceway pond) ที่มีใบพัดกวนเพื่อให้เกิดการไหลเวียนน้ำเพาะเลี้ยงในบ่อเป็นระยะเวลา 15 วัน ทำการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และเพาะเลี้ยงต่อเนื่องอีก 10 วัน หลังการเก็บเกี่ยวได้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.54 และ 1.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับโดยตลอดระยะเวลาในการศึกษาในครั้งนี้มีระดับความเข้มของแสงอยู่ในช่วง 11-17 kLux และอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ในช่วง 35-41 องศาเซลเซียส ดังแสดงภาพที่ 46

ภาพที่ 46 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย Sm6-3 แบบบ่อเปิด (ซ้าย) วันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง (ขวา) วันที่ 25 ของการเพาะเลี้ยงหลังการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์

กรมวิชาการเกษตร

5.2 การสกัดพอลิเมอร์ชีวภาพจากชีวมวลสาหร่าย

จากการศึกษาการใช้สารละลายด้วยสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อการทำความสะอาดพรีทรีตเมนต์ชีวมวลเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กขั้นต้นก่อนการนำไปสกัดสารบริสุทธิ์โดยใช้อัตราส่วน สาหร่าย : SDS เท่ากับ 1 : 2 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการการใช้ทำความสะอาดเซลล์สาหร่าย จึงเลือกใช้สาร SDS ที่ความเข้มข้นดังกล่าวร่วมกับการใช้สารละลายสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) 6 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการทำความสะอาดและฟอกสีเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร BG-11 N-Free และปุ๋ย พบว่าการใช้สารละลาย SDS 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ NaOCl 6 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 47) ได้ปริมาณชีวมวลเซลล์สาหร่าย 6.13 และ 10.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนวิธีการสกัดบริสุทธิ์ด้วยคลอโรฟอร์มหลังการพรีทรีตเมนต์นั้น ได้ปริมาณสารสกัดสูงสุด 0.029 และ 0.012 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 39) จากปริมาณสารหลังการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มที่ได้น้อยมาก จึงปรับวิธีการนำสารสกัดไปใช้ด้วยการนำชีวมวลเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ขั้นต้นเป็นส่วนผสมหลักในการพัฒนาสูตรส่วนผสมในการเตรียมแผ่นฟิล์มชีวภาพต่อไป



ภาพที่ 47 ชีวมวลสาหร่ายหลังการพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลาย SDS 5% และ NaOCl 6%
a) ชีวมวลสาหร่ายจากสูตรอาหาร BG-11 (N-Free)
b) ชีวมวลสาหร่ายจากสูตรอาหารปุ๋ย 8-24-24

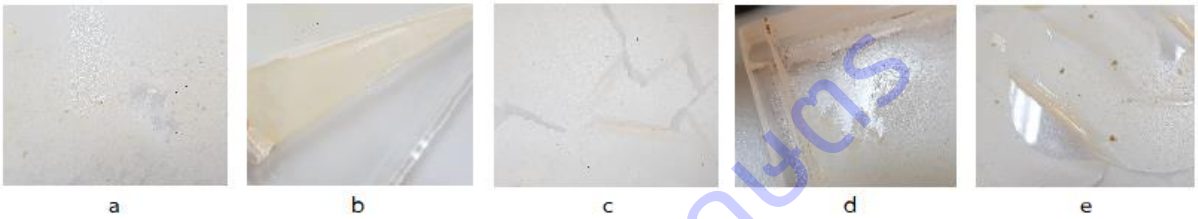
ตารางที่ 39 ปริมาณเซลล์สาหร่าย (วิธีการที่ 1 และ 2) และสารสกัดที่ได้ (วิธีการที่ 3 และ 4) จากแต่ละสูตรอาหาร

วิธีการ	อาหาร BG-11 (N-Free), %	อาหารปุ๋ย (8-24-24), %
1) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และโซเดียมไฮโปคลอไรต์	6.13	10.50
2) โซเดียมไฮโปคลอไรต์	3.04	10.26
3) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต โซเดียมไฮโปคลอไรต์ และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	0.029	0.012
4) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	0.028	0.010

กรมวิชาการเกษตร

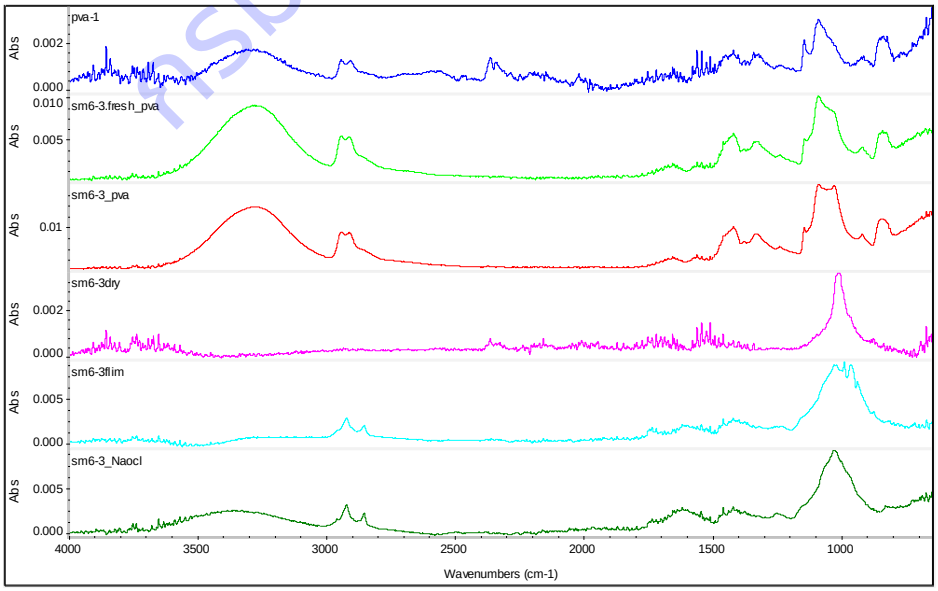
5.3 การเตรียมแผ่นฟิล์มเบื้องต้นโดยใช้เซลล์สาหร่าย

แผ่นฟิล์มที่เตรียมจากชีวมวลสาหร่าย SM6-3 ที่ผ่านพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ และการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 6 เปอร์เซ็นต์ นั้นมีลักษณะแข็งเปราะและฉีกขาดง่าย ไม่สามารถแกะออกจากแผ่นเพลตที่ใช้ในการขึ้นรูปได้ ทำให้ต้องมีการผสมสารเติมแต่งที่เหมาะสมอื่นๆ เข้าไปเพื่อเพิ่มคุณสมบัติของฟิล์มให้มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นมากขึ้น จากการทดสอบการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มสารหร่ายด้วยสารก่อฟิล์มจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ สารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) สตาร์ช (Starch) กลีเซอรอล (Glycerol) และแป้งมันสำปะหลัง เพื่อหาสารก่อฟิล์มที่เหมาะสมต่อการขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม โดยทดลองใช้ในอัตราส่วนร้อยละ 10 ได้สารก่อฟิล์มที่เหมาะสมเพียง 1 ชนิดคือ สาร PVA ที่แผ่นฟิล์มมีความสมบูรณ์ที่สุดและสามารถลอกออกจากเพลตที่ใช้ขึ้นรูปได้ แต่แผ่นฟิล์มที่ได้ค่อนข้างบาง ส่วนแผ่นฟิล์มที่เตรียมด้วยแป้งสตาร์ชไม่สามารถขึ้นรูปแผ่นฟิล์มได้ เนื่องจากแผ่นฟิล์มมีลักษณะแข็งเปราะ แตกง่าย และมีการยึดติดกับแบบอะคริลิคที่ใช้ขึ้นรูปดังภาพที่ 48 แผ่นฟิล์มที่เตรียมด้วยกลีเซอรอล พบว่าแผ่นฟิล์มจะมีลักษณะเปื่อยยุ่ยและเยิ้มที่ผิว ไม่สามารถดึงออกมาเป็นแผ่นฟิล์มได้ และแผ่นฟิล์มที่เตรียมด้วยแป้งมันสำปะหลังสารละลายมีความข้นหนืดจนไม่สามารถขึ้นรูปให้เป็นแผ่นได้



ภาพที่ 48 แผ่นฟิล์มจากส่วนผสมระหว่างชีวมวลสาหร่ายกับสารก่อฟิล์มแต่ละชนิด a) ชีวมวลสาหร่าย 100% b) PVA 10% c) สตาร์ช 10% d) กลีเซอรอล 10% และ e) แป้งมันสำปะหลัง 10%

หลังการนำชีวมวลสาหร่ายและแผ่นฟิล์มที่เตรียมกับสาร PVA และสารสกัดพอลิเมอร์ชีวภาพมาวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชั่นของสารด้วยเทคนิค FTIR พบว่ามีพีคของหมู่ฟังก์ชั่น C-H Stretching และ deforming ที่ความยาวคลื่นช่วง 2,924 และ 1,425 cm^{-1} ตามลำดับ และพบตำแหน่งพันธะ C=O และ C-O ที่ความยาวคลื่นช่วง 1,618 และ 1,047 cm^{-1} ซึ่งเป็นโครงสร้างของสาร PHB เป็นองค์ประกอบด้วย เพิ่มขึ้นจากตัวอย่างแผ่นฟิล์มที่เตรียมจากสาร PVA (ภาพที่ 49)



ภาพที่ 49 FTIR สแปคตรัมของเซลล์สาหร่าย Sm6-3 และแผ่นฟิล์มที่เตรียมได้

การเลือกใช้สาร PVA เป็นสารพลาติไซเซอร์ในการเตรียมแผ่นฟิล์มและปรับสูตรเติม PVA ในอัตราส่วนร้อยละ 20 30 และ 40 พบว่าหลังการอบแผ่นฟิล์มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แผ่นฟิล์มเซลล์สาหร่ายผสม PVA เกิดการย่นจนหลุดออกจากแบบอะคริลิคที่ใช้ในการขึ้นรูปแผ่น แต่แผ่นฟิล์มที่ได้มีความแข็งกรอบและขาดความยืดหยุ่น (ภาพที่ 50)

ภาพที่ 50 แผ่นฟิล์มสาหร่ายผสมกับสาร PVA ในสัดส่วน a) 10% b) 20% และ c) 30%

หลังการปรับใช้เซลล์สาหร่ายที่ใช้ผสมเป็นชีวมวลที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพียงขั้นตอนเดียวผสมกับสาร PVA ร้อยละ 20 และแป้งสตาร์ชร้อยละ 5 พบว่าแผ่นฟิล์มสามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นเรียบได้ ไม่หดย่นหลุดจากแบบอะคริลิค อย่างไรก็ตามลักษณะของแผ่นฟิล์มที่ได้ยังมีคุณสมบัติในการยืดหยุ่นมากเท่าที่ควร ทำให้ไม่มีแรงต้านในการดึงฉีกขาดได้ง่าย จะต้องปรับอัตราส่วนของสาร PVA และแป้งสตาร์ชเพิ่มเติม เพื่อนำแผ่นฟิล์มไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆ เช่น ความหนา ความชื้น การละลายน้ำ ความต้านทานแรงดึงขาด เปอร์เซ็นต์การยืดตัว และอัตราการซึม-ผ่านของไอน้ำ (WVTR) ในลำดับต่อไป ตลอดจนการขึ้นรูปเป็นถุงเพาะชำและศึกษากระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพต่อไป

5.4 การเตรียมฟิล์มและทดสอบคุณสมบัติของฟิล์มเซลล์สาหร่าย

ผลการเตรียมฟิล์มจากเซลล์สาหร่ายด้วยการเพิ่มส่วนผสม PVA และแป้งสตาร์ชมันสำปะหลัง ที่อัตราส่วนต่างๆ ตามสูตรดังนี้ $AP_{2.4}S_{0.6}$, $AP_{2.4}S_{1.2}$., $AP_{3.0}S_{0.6}$, $AP_{3.0}S_{1.2}$, $AP_{3.6}S_{0.6}$, $AP_{3.6}S_{1.2}$, $AP_{4.2}S_{0.6}$, $AP_{4.2}S_{1.2}$, $AP_{4.2}S_{1.8}$, $AP_{4.8}S_{1.2}$, $AP_{4.8}S_{1.8}$ และ $AP_{4.8}S_{2.4}$ แสดงดังตารางที่ 40

ตารางที่ 40 คุณสมบัติของแผ่นฟิล์มสาหร่ายผสมพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และสตาร์ช

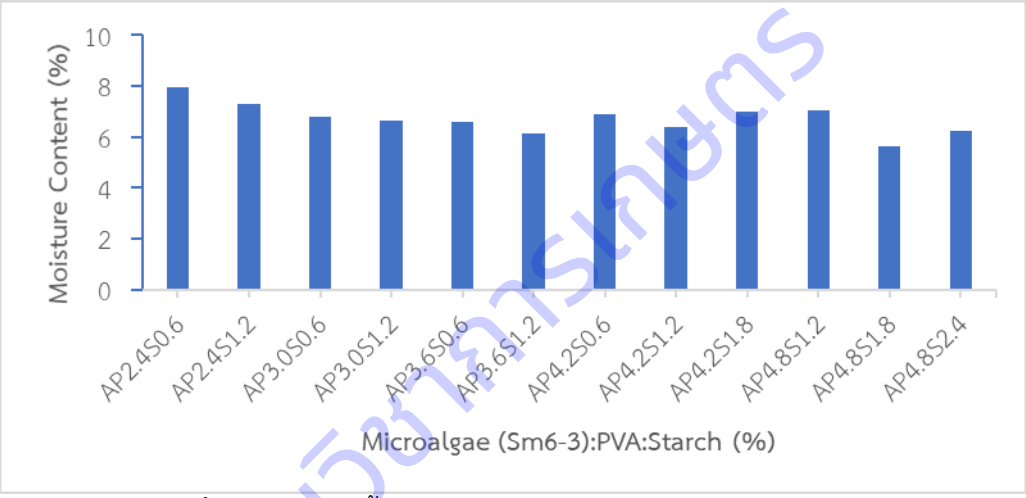
ตัวอย่าง	ความหนา (mm.)	ความชื้น (%)	ค่าการละลายน้ำ (%)	TS kF/cm^2	E (%)	WVTR g/m^2/day	DWL (%)
AP2.4S0.6	0.05f	7.97a	2.00bcde	119.09bcd	1.78e	1,770bc	-
AP2.4S1.2	0.05f	7.31ab	2.68bc	131.17b	2.33de	2,063a	-
AP3.0S0.6	0.05f	6.80bc	0.25f	157.72a	5.26cde	1,856ab	-
AP3.0S1.2	0.07e	6.66bc	0.62ef	124.23bc	4.33cde	1,809ab	-
AP3.6S0.6	0.06f	6.58bcd	1.24cdef	159.26a	4.61cde	1,893ab	16.46
AP3.6S1.2	0.09cd	6.16cd	2.34bcd	172.86a	5.71cde	1,863ab	23.66
AP4.2S0.6	0.08d	6.91bc	1.59cdef	105.27de	15.13ab	1,817ab	15.13
AP4.2S1.2	0.08d	6.38bcd	2.22bcd	107.17cd	10.04bc	1,701ab	23.97
AP4.2S1.8	0.09cd	7.00bc	3.19b	127.10b	19.59a	1,664b	27.19
AP4.8S1.2	0.10c	7.02bc	0.85def	116.35bcd	8.03cd	1,805ab	27.06
AP4.8S1.8	0.11b	5.63d	1.67cdef	129.99b	15.76a	1,653b	28.82
AP4.8S2.4	0.13a	6.24cd	4.62a	88.95e	8.64c	1,885ab	30.51

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในด้านสดมภ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

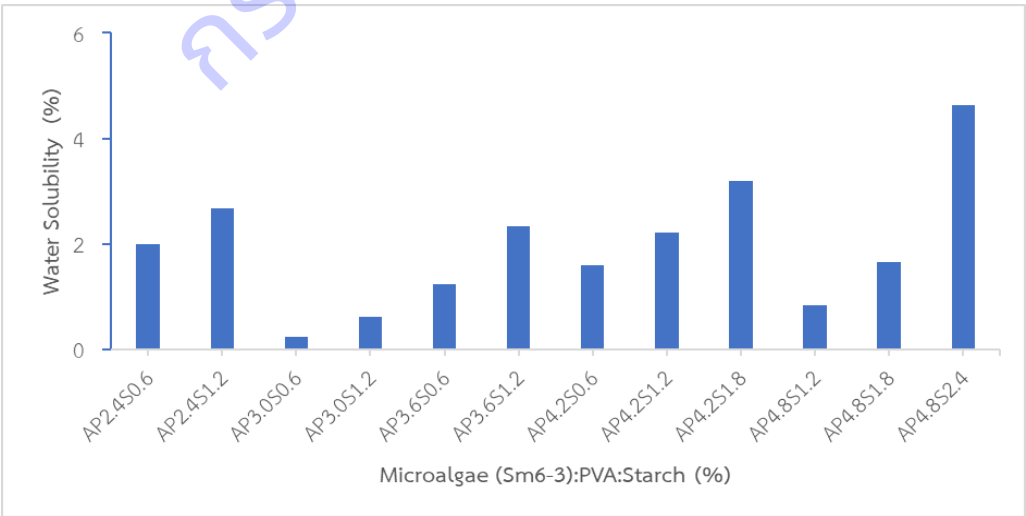
- TS = ความต้านทานแรงดึงขาด (Tensile strength)
- E = เปอร์เซ็นต์การยืดตัว (Elongation)
- WVTR = อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (Water Vapor Transmission Rate)
- DWL = อัตราการย่อยสลายทางธรรมชาติ (Dry Weight Loss)

กรมวิทยาศาสตร์

จากผลทดสอบแผ่นฟิล์มสาหร่ายในตารางที่ 40 พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ดี มีความยืดหยุ่น แกะออกจากแผ่นอะคริลิคได้ง่าย มีลักษณะโปร่งแสง มีสีเขียวตามสีของเซลล์สาหร่าย โดยผลทดสอบของแผ่นฟิล์มสาหร่ายมีดังนี้ ความหนาของฟิล์มอยู่ในช่วง 0.05-0.13 มม. แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณส่วนผสม โดยสูตร $AP_{4.2}S_{2.4}$ มีค่าความหนาของฟิล์มสูงสุด ค่าความชื้นของฟิล์มอยู่ในช่วง 5.63-7.97% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) มีค่าสูงสุดในสูตร $AP_{2.4}S_{0.6}$ และลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณ PVA เพิ่มขึ้น โดยในสูตร $AP_{4.8}S_{1.2}$ มีค่าน้อยที่สุด (ภาพที่ 51) ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์ม เป็นค่าที่บอกถึงความสามารถในการต้านทานน้ำ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของพลาสติกชีวภาพที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ได้ ซึ่งหากมีค่าสูงแสดงว่าฟิล์มมีความสามารถในการต้านทานน้ำต่ำ (Bourtoom *et al.*, 2008) ผลการทดลองพบว่าฟิล์มมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำอยู่ในช่วง 0.25-4.62% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และมีค่าสูงขึ้นเมื่ออัตราส่วนของสาร PVA กับแป้งสตาร์ชเพิ่มขึ้นดังภาพที่ 52 โดยสูตร $AP_{3.0}S_{0.6}$ มีค่าความสามารถในการละลายน้ำต่ำที่สุด แสดงให้เห็นว่าแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของ PVA และแป้งสตาร์ชต่อเซลล์สาหร่ายแข็งแรงมากขึ้น ซึ่งเกิดจากพันธะไฮโดรเจนที่เกิดแรงกระทำกันทั้งภายในและภายนอกของโมเลกุล



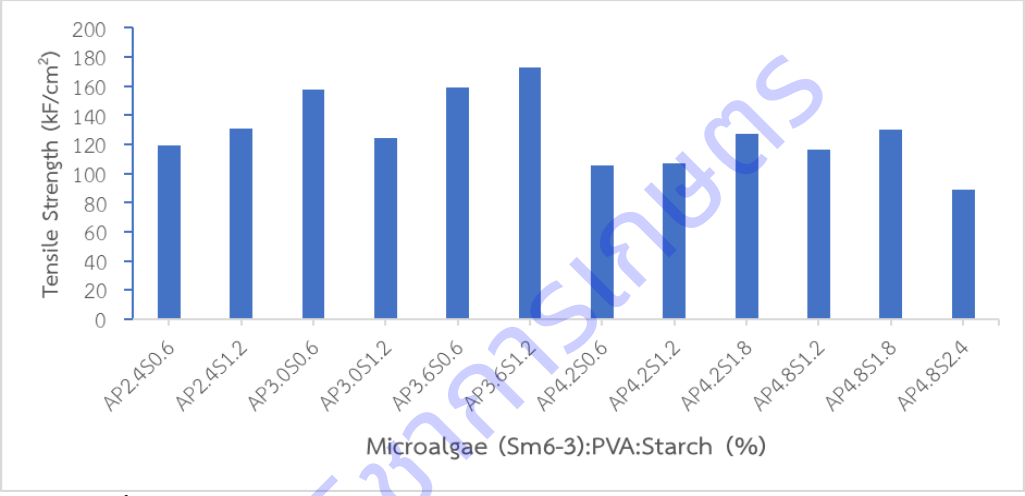
ภาพที่ 51 ค่าความชื้นของแผ่นฟิล์มผสม (สาหร่าย:PVA:แป้งสตาร์ช)



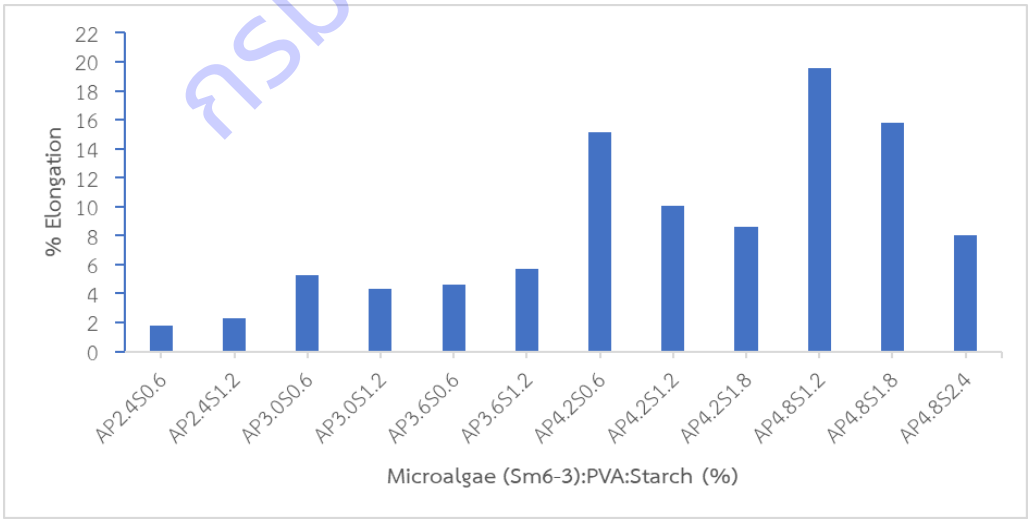
ภาพที่ 52 ค่าการละลายน้ำของแผ่นฟิล์มผสม (สาหร่าย:PVA:แป้งสตาร์ช)

กรมวิชาการเกษตร

คุณสมบัติเชิงกล เป็นค่าที่แสดงถึงความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของของฟิล์มซึ่งหากมีค่าสูงก็สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ได้ดี โดยความแข็งแรงของฟิล์มเกิดขึ้นจากแรงกระทำทั้งภายในและภายนอกโมเลกุลผ่านพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) จากทั้งโมเลกุลของ PVA และแป้ง (Adriana *et al.*, 2015) ซึ่งผลการทดสอบความต้านทานแรงดึงขาด (Tensile Strength; TS) ของฟิล์มอยู่ในช่วง 88.95-172.86 kF/cm^2 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยมีค่าสูงสุดในสูตร $AP_{3.6}S_{1.2}$ที่ส่วนผสม PVA ร้อยละ 30 และแป้งร้อยละ 10 จากนั้นค่า TS จะลดลงเมื่อปริมาณ PVA มากกว่าร้อยละ 30 (ภาพที่ 53) เปอร์เซ็นต์การยืดตัว (Elongation; E) ของฟิล์มอยู่ในช่วง 1.78-19.59 % แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยแผ่นฟิล์มสาหร่ายสามารถยืดตัวได้สูงสุดในสูตร $AP_{4.8}S_{1.2}$ หรือเมื่อเพิ่มปริมาณสาร PVA เพิ่มขึ้นที่ร้อยละ 40 (ภาพที่ 54) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของสาร PVA ในการเพิ่มความยืดหยุ่นของฟิล์มมากขึ้น ส่วนการเพิ่มปริมาณแป้งนั้นจะทำให้แผ่นฟิล์มมีความแข็งมากขึ้นเกิดการยืดตัวน้อยลงสอดคล้องกับค่าความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์ม คือแผ่นฟิล์มมีค่า TS มากขึ้นเมื่อเปรียบกับแผ่นฟิล์มที่มีปริมาณสาร PVA เท่ากัน



ภาพที่ 53 ความต้านทานแรงดึงขาดของแผ่นฟิล์มผสม (สาหร่าย:PVA:แป้งสตาร์ช)

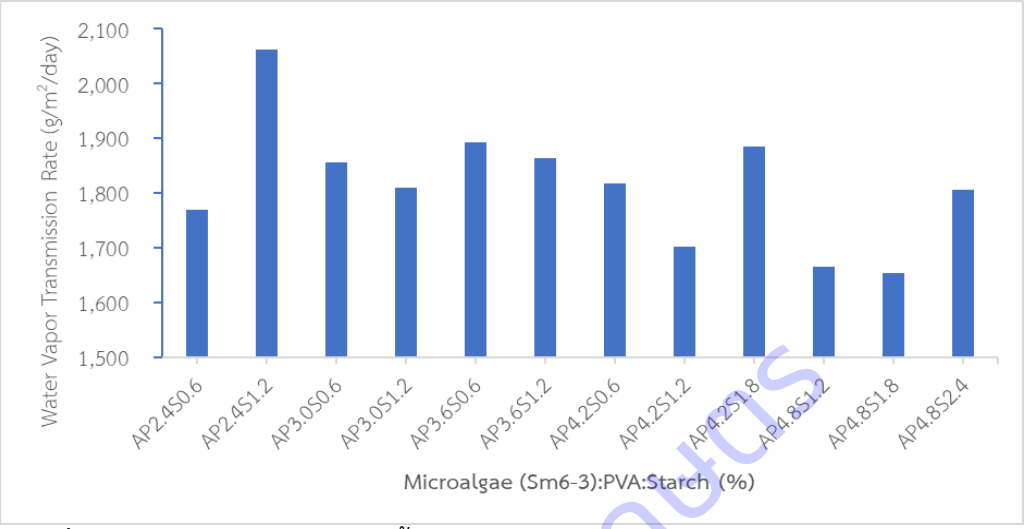


ภาพที่ 54 เปอร์เซ็นต์การยืดตัวของแผ่นฟิล์มผสม (สาหร่าย:PVA:แป้งสตาร์ช)

อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (WVTR) อีกคุณสมบัติที่สำคัญของแผ่นฟิล์มที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ได้ เนื่องจากมีผลต่อการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ โดยผลการทดลองพบว่า ค่า WVTR ของ

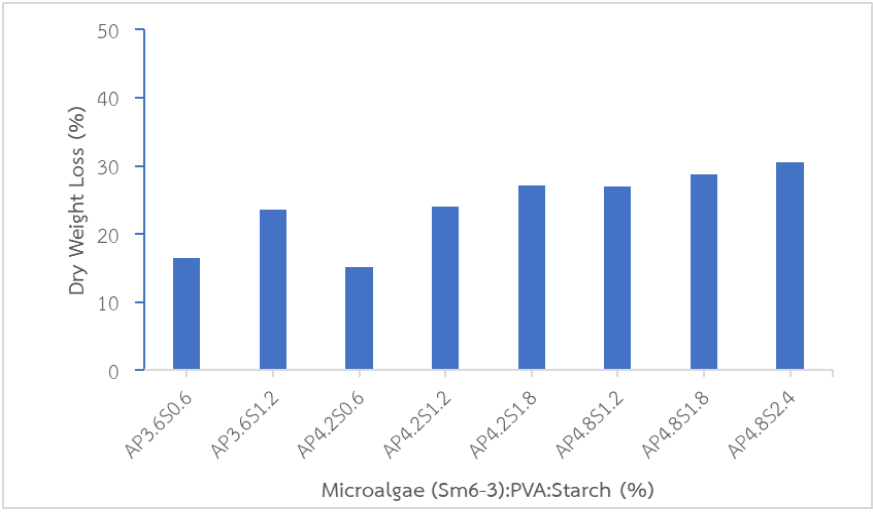
กรมวิชาการเกษตร

แผ่นฟิล์มสาหร่ายอยู่ในช่วง 1,664-2,063 g/m^2/day ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของแป้งต่อสาร PVA มีค่ามากกว่า พบว่าในสูตร $AP_{2.4}S_{1.2}$ แผ่นฟิล์มที่มีแป้งร้อยละ 10 กับ PVA ร้อยละ 20 มีค่า WVTR สูงสุดเท่ากับ 2,063 g/m^2/day และมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณ PVA และมีค่าต่ำสุดเมื่อมีส่วนผสมของ PVA ร้อยละ 40 (ภาพที่ 55) ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของสาร PVA ที่ชอบน้ำ (hydrophilic polymer) จึงละลายน้ำได้ส่งผลให้ค่า WVTR ลดลง



ภาพที่ 55 อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (WVTR) ของแผ่นฟิล์มผสม (สาหร่าย:PVA:แป้งสตาร์ช)

ผลการนำแผ่นฟิล์มสาหร่ายมาทดสอบการพับเป็นถุงเพาะชำและทำการซีลด้วยเครื่องซีลถุง พบว่าแผ่นฟิล์มสาหร่ายทั้ง 12 สูตรสามารถพับและซีลเป็นถุงเพาะชำได้ แต่เนื่องจากแผ่นฟิล์มที่ได้จากสูตร $AP_{2.4}S_{0.6}$ $AP_{2.4}S_{1.2}$. $AP_{3.0}S_{0.6}$ และ $AP_{3.0}S_{1.2}$ ที่เติมสาร PVA ร้อยละ 20 และ 25 จำนวน 4 สูตรนั้น ค่อนข้างบางและเปราะทำให้สภาพถุงที่ขึ้นรูปได้ไม่เหมาะสมต่อการใช้งาน ภายหลังการนำแผ่นฟิล์มที่เตรียมได้จาก 8 สูตร คือสูตร $AP_{3.6}S_{0.6}$, $AP_{3.6}S_{1.2}$, $AP_{4.2}S_{0.6}$, $AP_{4.2}S_{1.2}$, $AP_{4.2}S_{1.8}$, $AP_{4.8}S_{1.2}$, $AP_{4.8}S_{1.8}$ และ $AP_{4.8}S_{2.4}$ ที่เติมสาร PVA ร้อยละ 30 35 และ 40 นำไปทดสอบหาอัตราการย่อยสลายทางธรรมชาติ พบว่าหลังการทดสอบเป็นเวลา 7 วัน อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นฟิล์มอยู่ในช่วง 15.13-30.51 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยสูตร $AP_{4.2}S_{0.6}$ มีการสูญเสียน้ำหนักของแผ่นฟิล์มน้อยที่สุดและเมื่อเพิ่มปริมาณของ PVA และแป้งมากขึ้นอัตราการย่อยสลายก็จะมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ (ภาพที่ 56, ภาพที่ 57)



ภาพที่ 56 อัตราการย่อยสลายทางธรรมชาติของแผ่นฟิล์มผสม (สาหร่าย:PVA:แป้งสตาร์ช) ในวันที่ 7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 57 แผ่นฟิล์มผสม (สาหร่าย:PVA:แป้งสตาร์ช) และการซีลขึ้นรูปถุงเพาะชำ

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

1. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิคการสกัดในสภาวะยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction (SFE)) ที่ความดัน 500 บาร์ และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทำให้ได้สารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์มากที่สุด โดยสาหร่ายสายพันธุ์ *Coelastrella sp.* (SK-QSGMF6) ได้ปริมาณ 5.2 มิลลิกรัมต่อกรัมสาหร่ายแห้ง โดยมีองค์ประกอบคือ เบต้าแคโรทีน ลูทีน ซีแซนธิน และแอสตาแซนธิน ปริมาณ 92.60 131.88 188.32 และ 202.33 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด และสาหร่าย *Coelastrum sp.* (SK-KhY6) ได้ปริมาณ 4.28 มิลลิกรัมต่อกรัมสาหร่ายแห้ง โดยมีองค์ประกอบคือ เบต้าแคโรทีน ไลโคปีน ลูทีน ซีแซนธิน และแอสตาแซนธิน ปริมาณ 27.74 32.77 84.47 266.37 และ 137.22 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด ซึ่งสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ล้วนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง จึงเหมาะสมกับการใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ซึ่งผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวได้รับความชอบในด้านต่างๆ คือ สี ความหนืด การซึมสู่ผิว ความเหนอะหนะ กลิ่น และความชุ่มชื่นหลังทา เป็น 4.89 4.44 4.41 3.96, 3.67 และ 4.67 คะแนน ตามลำดับ ซึ่งเซรั่มบำรุงผิวปริมาณ 300 กรัม มีต้นทุนรวม 269.30 บาท สำหรับผลิตภัณฑ์แผ่นมาส์กหน้าที่ได้รับความชอบในด้านต่างๆ คือ สี การซึมสู่ผิว ความเหนียวเหนอะหนะ กลิ่นหลังมาส์ก ความชุ่มชื่นหลังมาส์ก ความชอบโดยรวม คือ 5.57 5.48 4.86 4.38 5.48 และ 5.38 คะแนน ตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์แผ่นมาส์กหน้า จำนวน 10 แผ่น คิดเป็นปริมาณน้ำเคลือบแผ่นมาส์กหน้า 300 กรัม มีต้นทุนอยู่ที่ 127.81 บาท คิดเป็นราคาแผ่นละ 12.78 บาท

2. ได้วิธีการผลิตสีผงคลอโรฟิลล์ และสีผงแคโรทีนอยด์ ทำการสกัดสารสีจากเซลล์สาหร่ายด้วยเอทานอล 95% จากนั้นระเหยภายใต้ความดันเพื่อลดปริมาตร ผสมสารสกัดต่อมอลโตเด็กซ์ทรินต่อน้ำ อัตราส่วน 1:1:1 นำไปทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิลมร้อนเข้า 130°C สีเขียวผงที่ได้มีปริมาณคลอโรฟิลล์ 38.75 mg/100g และมีกลิ่นไม่พึงประสงค์ เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีม ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมยังคงมีกลิ่นไม่พึงประสงค์ สำหรับสีเหลืองที่ได้ มีปริมาณแคโรทีนอยด์ 19.39 mg/100g และมีกลิ่นไม่พึงประสงค์เล็กน้อย เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีม กลิ่นนมและกลิ่นวานิลลาช่วยกลบกลิ่นไม่พึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมได้ ส่วนการผลิตสีผงไฟโคบิลิน ทำการสกัดด้วยวิธีทางกายภาพคือ ผสมเซลล์สาหร่ายกับน้ำ อัตราส่วน 1:1 นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C ระยะเวลา 16 ชั่วโมง นำออกมาละลายที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสนำไปผสมกับมอลโตเด็กซ์ทริน 10% โดยน้ำหนัก และนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิ 110 °C สีฟ้าผงที่ได้มีปริมาณไฟโคบิลิน 36.96 mg/100g มีกลิ่นไม่พึงประสงค์เล็กน้อย เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีม ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมไม่มีกลิ่นไม่พึงประสงค์

3. ได้วิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กโดยการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 70°C อัตราส่วนของแข็งที่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์:น้ำ เท่ากับ 1:1 เวลาสกัด 70 นาที ให้ปริมาณผลผลิตของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสูงสุดเท่ากับ 3.97 % มีองค์ประกอบได้แก่ ปริมาณความชื้น 7.59 % คาร์โบไฮเดรต 87.50 % ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 82.19 และมีปริมาณกรดยูโรนิคทั้งหมด 5.82 % การใช้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารให้ความข้นหนืดในผลิตภัณฑ์ซุปข้าวโพดที่ปริมาณ 1.5 % มีค่าความข้นหนืด และ % serum Loss ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ซุปข้าวโพดที่เติมแซนแทนกัม 1.0 % และการสกัดใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเอทานอล 95 % ได้ใยอาหารที่มีปริมาณผลได้เท่ากับ 89.35 % มีปริมาณใยอาหารรวม 82.16 % ของน้ำหนักแห้ง การประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้าเสริมใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็ก ปริมาณ 3 % มีปริมาณใยอาหารรวม 0.84 % ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้าเสริมใยอาหารจากบุก 3 % ที่มีปริมาณใยอาหารรวม 1.05 % ของน้ำหนักแห้ง

4. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus* sp. (CM01-4) และ *Desmodesmus* sp. (KK20) ด้วยสูตรอาหาร Modified Chu 13 (เกรดการค้า) มีอัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่ายสด 1.85 และ 1.95 กรัมต่อลิตร ซึ่งดีกว่าการใช้อาหารปุ๋ยเคมี 15-15-15 ส่วนการสกัดและผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายแห้งด้วยตัวทำละลายอะซีโตนสามารถสกัด

กรมวิชาการเกษตร

ไขมันจากสาหร่าย CM01-4 และ KK20 ได้ 0.1034 และ 0.0942 กรัมต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ หลังการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้ความบริสุทธิ์ของไบโอดีเซล 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่าการทำปฏิกิริยา acidic transesterification กับชีวมวลสาหร่ายสด

5. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย Sm6-3 ด้วยอาหาร 2 สูตร คือ BG-11 (N-free) และ ปุ๋ยเคมี 8-24-24 มีอัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.54 และ 1.24 กรัมต่อลิตร หลังการพรีทรีตเมนต์ได้เซลล์สาหร่าย 6.13 และ 10.50 เปอร์เซ็นต์ และสามารถสกัดสารพอลิเมอร์ชีวภาพได้สูงสุด 0.029 และ 0.012 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสามารถนำเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์เตรียมเป็นแผ่นฟิล์มขนาด 30x30 ซม. ได้ด้วยการผสมร่วมกับสารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และแป้งสตาร์ช โดยทุกกรรมวิธีขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ดี ฟิล์มมีลักษณะโปร่งแสง มีสีเขียวตามสีเซลล์สาหร่าย และสามารพับขึ้นรูปและซีลด้วยความร้อนทำเป็นถุงเพาะชำได้ทั้งหมด 8 สูตร ได้แก่ $AP_{3.6}S_{0.6}$, $AP_{3.6}S_{1.2}$, $AP_{4.2}S_{0.6}$, $AP_{4.2}S_{1.2}$, $AP_{4.2}S_{1.8}$, $AP_{4.8}S_{1.2}$, $AP_{4.8}S_{1.8}$ และ $AP_{4.8}S_{2.4}$

ข้อเสนอแนะ

1. สารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์ละลายในน้ำมัน ควรเลือกใช้น้ำมันหอมระเหยชนิดที่ไม่มีกลิ่นฉุน และปรับใช้น้ำมันหอมระเหยเพื่อแต่งกลิ่นและกลบกลิ่นสารสกัดออก อาจทำให้คะแนนความชอบในด้านกลิ่นสูงขึ้น และสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากเครื่อง SFE มาประยุกต์เป็นเครื่องสำอางแล้ว หากสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้สาหร่ายขนาดเล็กมากขึ้น

2. เนื่องจากสารสีที่ทำเป็นสีผงนั้นเป็นสารสีทางธรรมชาติ จึงต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในการที่จะยืดอายุการเก็บรักษาสีผงให้คงสารสีให้ได้นานมากขึ้นทั้งการเพิ่มส่วนผสมที่เสื่อมสภาพหรือรูปแบบบรรจุภัณฑ์เก็บรักษา

3. พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กมีคุณสมบัติเป็นสารให้ความข้นหนืด โดยสามารถใช้เป็นสารให้ความข้นหนืดและความคงตัวในผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ ได้ เช่น ผลิตภัณฑ์ซอสพริก ซอสมะเขือเทศ มายองเนส และน้ำสลัด หรือนำมาใช้เป็นสารให้ความข้นหนืดหรือสารให้ความคงตัวในผลิตเวชสำอาง เช่น ผลิตภัณฑ์โลชั่นและครีม โดยปริมาณการใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กในผลิตภัณฑ์อาหารหรือเวชสำอางต่างๆนั้น อาจใช้ในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับคุณลักษณะที่ต้องการของผลิตภัณฑ์นั้นๆ

4. วิธีการสกัดไขมันจากชีวมวลสาหร่ายแห้งด้วยอะซีโตนและเฮกเซน พบว่าไขมันที่ได้มีลักษณะสีเหลืองใส ซึ่งถ้าทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมวิธีการเพาะเลี้ยงในรูปแบบระบบปิดหรือถังปฏิกรณ์เพื่อลดผลกระทบจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ จะเป็นแนวทางในการเพิ่มปริมาณผลิตชีวมวลสาหร่ายและอัตราการให้ไขมันที่สูงขึ้นและมีความปลอดภัยเพียงพอต่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมจากสามารถสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดไขมันโอเมก้า-3 ได้แก่ docosahexaenoic (DHA) และ eicosapentaenoic (EPA) ได้

5. วิธีการสกัดสารพอลิเมอร์ชีวภาพทั้งแบบสารบริสุทธิ์และชีวมวล จึงเป็นแนวทางที่จะสามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทีได้แตกต่างกัน ซึ่งมีข้อมูลงานวิจัยอื่นที่มีการนำพลาสติกไซเซอร์เช่น พอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) เพิ่มความเหนียวของพลาสติกได้ ซึ่งถ้าทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมวิธีการเพาะเลี้ยงในรูปแบบระบบปิดหรือถังปฏิกรณ์เพื่อลดผลกระทบจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ จะเป็นแนวทางในการเพิ่มปริมาณผลิตชีวมวลสาหร่ายและอัตราการให้พอลิเมอร์ชีวภาพที่สูงขึ้น

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. ได้สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารสำคัญจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ *Coelastrella* sp. (SK-QSGMF6) *Coelastrum* sp. สายพันธุ์ (SK-KhY6) สายพันธุ์ *Coelastrella microporum* (A052) สายพันธุ์ *Botryococcus* sp. (CM01-4) สายพันธุ์ *Desmodesmus* sp. (KK20) และสายพันธุ์ *Nostoc* sp. (SM6-3) โดยแต่ละสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตในอาหาร จำนวนวันในการเพาะเลี้ยง และศักยภาพในการผลิตสาระสำคัญได้แตกต่างกัน

2. ได้สูตรการใช้ปุ๋ยเคมีเพื่อทดแทนสูตรอาหารมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงแบบบ่อเปิดขยายขนาด พบว่าปุ๋ย 16-8-8 เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-QSGMF6, SK-KhY6 และ A052 ปุ๋ย 15-15-15 เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย CM01-4 และ KK20 และปุ๋ย 8-24-24 เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย Sm6-3

3. ได้วิธีการสกัดสารแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 ด้วยเทคนิค SFE ความดัน 500 บาร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ให้ปริมาณสารสกัดสูงสุด 5.2 และ 4.28 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งสาหร่ายตามลำดับ โดยสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายขนาดเล็กมีองค์ประกอบของสารที่สำคัญคือ เบต้าแคโรทีน ลูทีน ไลโคปีน ซีแซนธิน และแอสตาแซนธิน จากการประยุกต์ใช้สารสกัดในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง สามารถใส่สารสกัดในปริมาณ 0.02% สำหรับผลิตภณฑ์เซรั่มบำรุงผิว และ 0.015% ในผลิตภัณฑ์แผ่นมาส์กหน้า

4. ได้วิธีการผลิตสีผงคลอโรฟิลล์ และสีผงแคโรทีนอยด์ ทำการสกัดสารสีจากเซลล์สาหร่ายด้วยเอทานอล 95% จากนั้นระเหยภายใต้ความดันเพื่อลดปริมาตร ผสมสารสกัดต่อมอลโตเด็กซ์ทรินต่อน้ำ อัตราส่วน 1:1:1 นำไปทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิลมร้อนเข้า 130°C สีเขียวผงที่ได้มีปริมาณคลอโรฟิลล์ 38.75 mg/100g สำหรับสีเหลืองที่ได้ มีปริมาณแคโรทีนอยด์ 19.39 mg/100g และวิธีการผลิตสีผงไฟโคบิลิน ทำการสกัดด้วยวิธีทางกายภาพคือ ผสมเซลล์สาหร่ายกับน้ำ อัตราส่วน 1:1 นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C ระยะเวลา 16 ชั่วโมง นำออกมาละลายที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสนำไปผสมกับมอลโตเด็กซ์ทริน 10% โดยน้ำหนัก และนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิ 110 °C สีฟ้าผงที่ได้มีปริมาณไฟโคบิลิน 36.96 mg/100g จากทดสอบผลิตภัณฑ์สีผงทั้ง 3 สี สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในรูปแบบสีผสมอาหารในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมได้

5. ได้วิธีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก ได้วิธีการสกัดที่ให้ปริมาณผลผลิตของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสูงสุดเท่ากับ 3.97 % สามารถใช้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณ 1.5 % เป็นสารให้ความข้นหนืดในผลิตภัณฑ์ซุปข้าวโพดได้ และวิธีการสกัดใยอาหารจากสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเอทานอล 95 % ได้ปริมาณใยอาหารรวม 82.16 % ของน้ำหนักแห้ง หลังพัฒนาสูตรทำผลิตภัณฑ์เส้นพาสต้าที่เสริมใยอาหารจากสาหร่าย 3 % ทำให้มีปริมาณใยอาหารรวม 0.84 % ของน้ำหนักแห้ง

6. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย Botryococcus sp. (CM01-4) และ Desmodesmus sp. (KK20) ด้วยสูตรอาหาร Modified Chu 13 (เกรดการค้า) แบบบ่อเปิดและกระตุ้นด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ให้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่ายสเท่ากับ 1.85 และ 1.95 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยการสกัดไขมันด้วยตัวทำละลายอะซีโตนให้เปอร์เซ็นต์ไขมันสูงสุด ผลการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้ความบริสุทธิ์ของไบโอดีเซล 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่าการทำปฏิกิริยากับชีวมวลสาหร่ายสดโดยตรง

7. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย Nostoc sp. (Sm6-3) ด้วยสูตรอาหาร BG-11 (NFree) (เกรดการค้า) แบบบ่อเปิดและกระตุ้นด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ เป็นสภาวะที่เหมาะสม โดยจากการสกัดสารพอลิเมอร์ชีวภาพจากชีวมวลสาหร่ายสดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 6% และคลอโรฟอร์มได้ปริมาณสารสกัดสูงสุด 0.029 % โดยน้ำหนักสด ส่วนการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพสามารถนำชีวมวลสาหร่ายที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 0.5 ใช้เป็นส่วนผสมหลักร่วมกับสารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 30-40 และแป้งสตาร์ชร้อยละ 5-20 ที่สามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มมีลักษณะโปร่งแสง มีสีเขียวตามสีเซลล์สาหร่าย และสามารพับขึ้นรูปและซีลด้วยความร้อนทำเป็นถุงเพาะชำได้

กรมอุทยานแห่งชาติ

จากข้อมูลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์ที่ได้ ทั้งสูตรอาหารมาตรฐานที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและปัจจัยด้านสภาวะความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยงเพื่อการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญเพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตแล้ว ยังสามารถที่จะพัฒนาและดัดแปลงสูตรอาหารดังกล่าวด้วยการปรับอัตราส่วนธาตุอาหารเฉพาะบางตัวเช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแตสเซียม หรือธาตุอาหารเสริมที่สำคัญ รวมทั้งระบบการเพาะเลี้ยงที่มีการกระตุ้นแสงสีต่าง ๆ และก๊าซคาร์บอนไดร์ออกไซด์ เป็นต้น เพื่อกระตุ้นให้เซลล์สาหร่ายขนาดเล็กมีการสังเคราะห์สารสำคัญบางตัวที่นักวิจัยสนใจต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ถ่ายทอดเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงและต้นทุนการผลิตสาหร่ายที่มีศักยภาพการผลิตสารสำคัญสู่กลุ่มเกษตรกรหรือผู้ประกอบการเอกชนที่สนใจ

2. ถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและเวชสำอาง สีผงจากสารสีของสาหร่าย สารพอลิแซ็กคาไรด์และใยอาหารจากสาหร่าย ไขมัน และพอลิเมอร์ชีวภาพ

3. ได้หัวเชื้อสายพันธุ์สาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตสารสี สารออกฤทธิ์ชีวภาพ พอลิแซ็กคาไรด์ ไขมัน และพอลิเมอร์ชีวภาพ ที่สามารถนำไปผลิตทางการค้าได้

ผลลัพธ์ Outcome ที่ได้จากผลวิจัย

วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระบบเปิดและการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตสารสำคัญที่มีมูลค่าสูงชนิดต่างๆใช้ภายในประเทศตลอดจนการพัฒนาต้นแบบในการนำไปประยุกต์ใช้หรือผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆจากสาหร่ายขนาดเล็ก

ผลกระทบ Impact จากการดำเนินโครงการ

ผู้ประกอบการสามารถการพัฒนาอาหารเสริมเพื่อสุขภาพโดยเฉพาะในรูปของอาหารฟังก์ชั่น (Functional food) เวชสำอาง และผลิตภัณฑ์เพื่อสิ่งแวดล้อม

กรมวิชาการเกษตร

บรรณานุกรม

กิจกรรมที่ 1

ทวีทรัพย์ แสงนุภาพ ทุติยาพร อู่เจริญ และบุษกร เจริญสุข. 2559. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายน้ำจืดที่มีศักยภาพในการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิตสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.), กรุงเทพฯ. 150 หน้า.

ประยูร เอ็นมาก วิมลวรรณ วัฒนวิจิตร และศุภมาศ กลิ่นขจร. 2557. การวิจัยและพัฒนาการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายกลุ่ม Chlorophyta. หน้า 302-322. ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2557. กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร. กรมวิชาการเกษตร.

ประยูร เอ็นมาก ศิริพร เต็งรัง โกเมศ สัตยาวุธ ศุภมาศ กลิ่นขจร และกนกศักดิ์ ลอยเลิศ. 2558. การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์. หน้า 637-651. ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2558. กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร. กรมวิชาการเกษตร.

ภัทระ ทรวงสุรัตนกุล ณัฐภาส ผู้พัฒน์ สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา และประมุข ภระกูลสุขสถิตย์. 2556. การคัดเลือกสาหร่าย Chlorella spp. สายพันธุ์ที่มีปริมาณลิพิดสูงเพื่อผลิตไบโอดีเซล. หน้า 207-215. ใน : เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 31 ม.ค.-2 ก.พ. 2555. กรุงเทพฯ.

ยุวดี พีรพรพิศาล และฉมาภรณ์ นิวาศะบุตร. 2546. คู่มือปฏิบัติการสาหร่ายวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 5. เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วงศ์เทวัญ แสนไชย สมเกียรติ จตุรงค์ล้ำเลิศ ชนวัฒน์ นิทัศน์วิจิตร และจตุรภัทร วาฤทธิ์. 2559. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายเตาโดยใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคร่วม. เอกสารการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่: 40

แวมารีอนี มะดีเยาะ. 2561. ศักยภาพการผลิตสาหร่ายไส้ไก่ Ulva intestinalis เชิงพาณิชย์จากโรงเรือนเลี้ยง สาหรับผลผลิตสาหร่ายเกล็ดและสาหร่ายผง. สืบค้นจาก: http://www.bims.buu.ac.th/backoffice/DocLib3/...2059.pdf. [ก.พ. 2563].

วิทวัส แจ้งเอี่ยม. 2553. กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่าย. บทความทางวิชาการ: วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ ปีที่ 13 (1): 68-77.

ศิริลักษณ์ อิ่มจงใจรัก จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ ภัทรา ผาสอน รัตติยา แววนุกูล ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และกนก รัตนะกนกชัย. 2557. สารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็คคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) ที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ. ว. วิทย์. กษ. 45(2) (พิเศษ): 325-328.

ศิริวิมล สุขสวัสดิ์ และ วสุ ปฐมอารีย์. 2555. บทบาทของแบคทีเรียต่อพลาสติกชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 28(2): 285-304.

อานนท์ ทัศยานนท์ชัย และ ธงชัย มาลา. 2558. การคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียสร้างเฮทเทอโรซีสต์บางชนิดเพื่อเป็นแหล่งในโตรเจนสำหรับปลูกข้าว. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 4(3). หน้า 1-12. ISSN 2286-6558. สืบค้นจาก: https://kuojs.lib.ku.ac.th/index.php/jstku/article/view/3412. [ม.ค. 2565].

Abe, K., H. Hattori and M. Hirono. 2007. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalgae Coelastrella striolata var. multistriata. *Food Chemistry*. 100: 656-661.

Burdon, K.L. 1946. Fatty Material in Bacteria and Fungi Revealed by Staining Dried, Fixed Slide Preparations. *Journal of Bacteriology*. 52:665-678.

กรมวิชาการเกษตร

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advance*. 25:294-306.

Chittra, Y. and C. Benjamas. 2010. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *J. Bioresource Technology*. 102:3034-3040.

Dayananda, C., R. Sarada, V. Kumar and G. A. Ravishankar. 2007. Isolation and characterization of hydrocarbon producing green alga Botryococcus braunii from Indian freshwater bodies. *Electronic Journal of Biotechnology*. ISSN: 0717-3458. 10(1):14.

Ganesh, I., N. Vinod, V. G. Yash, D. Swapnil, I. Mitali, M. Nimish and S. Vallari. 2015. Characterization of High Carotenoid Producing Coelastrella oocystiformis and its Anti-Cancer Potential. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 4(10):527-536.

Hossain, S. A.B.M., A. Salleh, A. N. Boyce, P. Chowdhury and M. Naqiuddin. 2008. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 4(3):250-254.

John, H. and A. Ralph. 1960. Assay of poly-β-hydroxybutyrate acid. *Biol. Sci*.31: 33-36.

Karthikeyan D., Muthukumaran M. and Balakumar B.S. 2016. Mass Cultivation of Microalgae in Open Raceway Pond for Biomass and Biochemicals Production. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 3(2):247-260.

Kim, D. O. and C. Y. Lee. 2002. Extraction and isolation of polyphenolics. Current protocols Food Analytical Chemistry. R.E. Wrolsted, New York.

Kim, J. H., M. J. Chang and H. D. Choi. 2011. Protective effects of Haematococcus astaxanthin on oxidative stress in healthy smokers. *J. Med. Food*. 14 (11): 1469-1475.

Kuda, T., M. Tsunekana, H. Goto and Y. Araki. 2005. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal of Food Composition and Analysis* 18:625-633.

Li, P., C. Luo, W. Sun, S. Lu, Y. Mou, Y. Peng and L. Zhou. 2011. In vitro antioxidant activities of polysaccharides from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* Dzf17. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5 (32): 5990-5993.

Liu, Z. Y., G. C. Wang and B. C. Zhou. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. 99(11):4717-4722.

Miao, X. and Q. Wu. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*. 97(6):841-846.

Microalgae biotechnology. 2014. Microalgae and its metabolites. Retrieved February 24, 2020, form https://w3.ual.es/~jfernand/MBio70411204/Lesson1/Indice.html

Monrawat, R., J. Kantima, K. Pokchut, S. Sophon, W. Rungaroon and P. Thanit. 2019. Nutrient Deprivation-Associated Changes in Green Microalga Coelastrum sp. TISTR 9501RE Enhanced Potent Antioxidant Carotenoids. *Mar Drugs*. 17(6):328.

กรมวิทยาศาสตร์

Qi, H., Q. Zhang, T. Zhao, R. Chen, H. Zhang, X. Nin and Z. Li. 2005. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from Ulva pertusa (Chlorophyta) in vitro. *Int. J. Biol. Macromol.* 37(4):195-199.

Qin, J. 2005. Bio-hydrocarbons from algae: impacts of temperature, light and salinity on algae growth. Retrieved February 10, 2020, form https://rirdc.infoservices.com.au/downloads /05-025.

Qin, S., G. X. Liu and Z. Y. Hu. 2008. The accumulation and metabolism of astaxanthin in Scenedesmus obliquus (Chlorophyceae). *Process Biochemistry*. 43(8):795–802.

Rao, R., A. R. Sarada and G. A. Ravishankar. 2007. Influence of CO_2 on growth and hydrocarbon productions *in Botryococcus braunii*. *J. Microbiol.Biotechnol.* 17(3):414-419.

Sabbir, A. and F. Tasneem. 2016. Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening Optimization and Characterization. *PLoS One.* 11(6): e0158168.

Schaeffer, D. J. and V. S. Krylov. 2000. Anti-HIV Activity of Extracts and Compounds from Algae and Cyanobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 45(3):208-227.

Shankha K., Thangavel M., Sourav K.B., Sashi S., and Nirupama M. 2019. Microalgal biodiesel production at outdoor open and polyhouse raceway pond cultivations: A case study with Scenedesmus accuminatus using low-cost farm fertilizer medium. *Biomass and Bioenergy*. 120:156-165

กิจกรรมที่ 2

กัญญา บุตราช. 2560. แอสตราแซนธินสารต้านอนุมูลอิสระสีแดงจากธรรมชาติ. รายการบทความการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ทั้งหมดของ Blog : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 14/1/2560. สืบค้นจาก: https://erp.mju.ac.th/acticleDetail.aspx?qid=611 [ต.ค. 2564].

กนกศักดิ์ ลอยเลิศ และ ศิริพร เต็งรัง. 2556. การเตรียมแผ่นฟิล์มชีวภาพจากแป้งของพืชที่มีศักยภาพ. ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2556. สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 312-328.

กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 197) พ.ศ. 2543. เรื่องกาแฟ.

กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 350) พ.ศ. 2556. เรื่องนมโค. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 130, ตอนพิเศษ 87 ง (ลงวันที่ 24 กรกฎาคม 2556).

กองเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย. 2551. ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสาร Alpha hydroxyl acids (AHAs). กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพ.

กฤติยา ไชยนอก. 2018. ดาวเรือง ดอกไม้สีเหลืองที่ดีต่อดวงตา. Med Hurb Guru รอบรู้เรื่องสมุนไพร สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ขนิจศากรณ์ เสรีสงแสง. 2553. การผลิตสีธรรมชาติจากใบข้าอ่อนและการใช้ประโยชน์. ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิตรา สิงห์ทอง สุเวทย์ นิงสานนท์ และ Steve W. Cui. 2550. การศึกษาการสกัดองค์ประกอบและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดใบย่านาง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี.

กรมวิชาการเกษตร

ฐาปนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ. 2550. น้ำมันหอมระเหยและการใช้ในสุคนธบำบัด. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ. โรงพิมพ์วิฑูรณ์การปก กรุงเทพมหานคร. 240 หน้า.

ณัฏฐินี อนันตโชค. 2559. ดอกคาโมมายล์. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. สืบค้นจาก: https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/321/ดอกคาโมมายล์/. [พ.ย. 2564].

นราทร สุขวิเสส. จารุวรรณ์ รัตนสกุลธรรม. และวุฒิพล จันทร์สระคู. 2562. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาด. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2562. กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร: 492-507.

นพรัตน์ มะเห, ปิยรัตน์ ศิริวงษ์ไพศาล และอุไรวรรณ วัฒนกล. 2553. การสกัดและคุณสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผมนาง สาหร่ายผักกาดทะเล และสาหร่ายขนนก. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

นุชนาถ แช่มช้อย. 2557. สาหร่ายขนาดเล็ก : การเพาะเลี้ยงและการนำมาใช้ประโยชน์. วารสาร มฉก.วิชาการ ปีที่ 17 ฉบับที่ 34 มกราคม-มิถุนายน 2557: 169-183.

บ้านจอมยุทธ. ม.ป.ป. ซีไฟโคไซยานิน. สืบค้นจาก: https://www.baanjomyut.com/, [ม.ค. 2565].

ประไพพิศ อินเสน. 2561. การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินจากพืชกลุ่มเบอร์รีไทย. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ 12 ฉบับที่ 2 ประจำเดือน พฤษภาคม-สิงหาคม 2561: 69-82.

ประยูร เอ็นมาก. วิมลวรรณ วัฒนวิจิตร และ ศุภมาศ กลิ่นขจร. 2558. การวิจัยและพัฒนาการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายกลุ่ม Chlorophyta. รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ประจำปี 2557 กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ : 302-317.

ประเวศน์ ชำนาญ. 2553. สาหร่าย พลังงานใหม่จากโลกใต้น้ำ. สำนักงานสิ่งแวดล้อม ภาคที่ 6. นนทบุรี.

ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์, เบญจมาส เชียรศิลป์ และสินินาฏ จงคง. 2559. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. และกระบวนการผลิตไบโอดีเซล. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา. สืบค้นจาก: https://kb.psu.ac.th/psukb/handle/2016/12678. [ม.ค. 2565].

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 2564.รายละเอียดข้อมูลยาทางชีวภาพ: ไลโคปีน (Lycopene). โครงการเพิ่มศักยภาพฐานข้อมูลอุตสาหกรรมยาทางชีวภาพและเชื้อเพลิงชีวภาพ: 53.1-53.8. สืบค้นจาก: http://asp.plastics.or.th:8001/files/article_file/20181016081600u.pdf. [ต.ค. 2564].

มอก เอส 15-2561.2561. ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวผสมสมุนไพร. มาตรฐานอุตสาหกรรมเอส สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา (Phycology). ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

ลิ่วมโนมนต์ กาญจนภาชน์. 2527. สาหร่าย. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 343 หน้า.

วรภา หีบจันทร์ตรี. 2540. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* NIES 144 เพื่อผลิตแอสตราแซนธิน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. วิทยาศาสตร์ (เทคโนโลยีทางชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 129 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร

วรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์ และ มารุจ ลิมปะวัฒนะ. 2552. แอสตราแซนธิน: คุณค่าที่มากกว่าความเป็นสี. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม ปีที่ 5 ฉบับที่ 1 มิถุนายน 2552-พฤษภาคม 2553: 7-12.

ศิริลักษณ์ อิ่มจงใจรัก, จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ, ภัทรา ผาสอน, รัตตยิา แววนุกูล, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และ กนก รัตนะกนกชัย. 2557. สารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็คคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง (Gracilaria fisheri) ท่มีฤทธ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ. ว. วิทย์. กษ. 45(2) (พิเศษ): 325-328

สุริยา สาสนรักกิจ และคณะ. 2543. การผลิตสารสีธรรมชาติจากสาหร่ายเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ม.ป.ป. ข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานสำหรับสารสกัดให้สีจากส่วนของพืชหรือสัตว์. สืบค้นจาก: http://www.fda.moph.go.th/sites/food/FoodAdditives/Extract-from-the-Plant-or-Animal.pdf. [ม.ค. 2562].

อุรัจฉวี อุณหเลขกะ. 2555. สาหร่าย sustainable energy เพื่อโลก. วารสารธุรกิจสีเขียว. 6(3): 7-8. สืบค้นจาก: http://www.tei.or.th/publications/2013-download/2013-TBCSD-Greenbusiness-y6-3.pdf [4 มกราคม 2565].

Adriana N. F., Cristian A. N., Raluca A. G., and Denis M. P. 2015. Thermal properties of water-resistant starch – polyvinyl alcohol films modified with cellulose nanofibers. *Polymer Degradation and Stability*. 121:385-397.

AOAC. 2000. Official methods of analysis. Gaithersburgs, MD: Association of Official Analytical Chemists.

AOAC. In Association of Official Analytical Chemists, 17th ed. A.O.A.C. Inc. Arlington, Virginia, USA. 2005.

Becker, E.W. 1994. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge. 293 p.

Bennett, A. and L. Bogorad. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*. 58:419-435.

Bourtoom, T. 2008. Plasticizer effect on the properties of biodegradable blend film from rice starch-chitosan. *Songklanakarin Journal of Science and Technology.* 30(1):149-165.

Bourtoom, T. and Chinan M.S. 2008. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *LWT-Food Science and Technology*. 41:1633-1641.

Britton, G., R., Powls and R.M. Schulze. 1977. The Effect of Illumination on the Pigment Composition of Carotenic Mutant PG1 of Scenedesmus obliquus. *Arch Microbiol.* 113:61-68

Burtin, P. 2003. Nutritional value of seaweeds. Electronic *Journal of Environmental, Agricultural and Chemistry*. 2(4):498-503.

Chillo, S., Flores, S., Mastromatteo, M., Conte, A., Gerschenson, Lia. And Del Nobile, M.A. 2008. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*. 88:159-168.

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advance*. 25:294-306.

กรมวิชาการเกษตร

Cotelle, N., J.L. Bernier, J.P. Catteau, J. Pommery, J.C. Wallet and E.M. Gaydou. 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine.* 20(1):35-43.

CIR. 2001. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel: 2001. Final Report on the Safety Assessment of Malic Acid and Sodium Malate. *International Journal of Toxicology.* 20(1):47–55.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry.* 28:350-356.

Farahin, A.W., F.M. Yusoff, M. Basri, N. Nagao, and M. Shariff. 2018. Use of microalgae: Tetraselmis tetrathele extract in formulation of nanoemulsions for cosmeceutical application. *Journal of Applied Phycology Springer Nature* B.V.

Goodwin, A.L. 2012. Teaching as a profession: Are we there yet? In C. Day (Ed.), the Routledge International Handbook of Teacher and School Development. Abingdon, UK: Taylor & Francis. 44-56.

Hardeep Singh Gujral, Abhishek Sharma and Narpinder Singh. 2002. Effect of Hyprocolloids, storage temperature, and duration on the consistency of tomato ketchup. International *Journal of Food Properties*. 5(1):179–191.

Hossain, A.B.M.S., Salleh, A., Boyce, A.N., Chowdhury, P., and Naqiuddin, M. 2008. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 4(3):250-254.

Krinsky, N. I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic Biol Med.* 7(6):617-35. doi: 10.1016/0891-5849(89)90143-3.

Kubo, I., I. Kinst-Hori, S.K. Chaudhuri, Y. Kubo, Y. Sánchez, T. Ogura. 2000. Flavones from Heterotheca inuloides: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg. Med. Chem.* 8:1749–1755.

Lichtenthaler, K. and C. Buschmann. 2005. Chlorophyll and carotenoids: measurement and characterization by UV-Visible spectroscopoy, pp. 171-178. *In* R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D. Smith and P. Sporns, eds. Handbook of Food Analytical Chemistry. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.

MacArtain, P., PhD, Gill, C.I.R., Brooks, M., Campbell, R. and Rowland, I.R., PhD. 2007. Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutrition Reviews.* 65(12):535-543.

Maria, B.A., M.C. Thalita, L.M.J. Ana, V.R.V. Maria, C. Joao, and B.B. Andre. 2017. Cosmetic attributes of algae- A review. *Algal Research.* 25:483-487.

Mata, T.M., Martins, A.A., and Caetano, N.S. 2010. Microalgae fo biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14:217-232.

Melton, L.D. and B.G. Smith. 2001. Determination of the uronic acid content of plant cell walls using a colorimetric assay, pp. E3.3.1-E3.3.4. In R.E. Wrolstad, T.E. Acree, H. An, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D.M. Smith and P. Sporns,

eds. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Miao and Wu. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology.* 97(6):841-846.

Microalgae biotechnology. 2014. Microalgae and its metabolites. Retrieved February 24, 2020, form https://w3.ual.es/~jfernand/MBio70411204/Lesson1/Indice.html.

Panida Rattanapoltee. 2015. Upstream to downstream process for biodiesel production from extracted microalgae oil. Thesis for the degree of doctor of philosophy. Khon Kean University: Khon Kean.

Purnamayati, L., E.N. Dewi and R.A. Kurniasih. 2017. Phycocyanin stability in microcapsules processed by spray drying metho using different inlet temperature. IOP Conf. Series: *Earth and Environmental Science*. 116. 2018: 012076.

Saewan, N., S. Koysomboon, and K. Chantrapromma. 2011. Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from Blumea balsamifera DC. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(6):1018-1025.

Sharma, G. 2003. Digital color imaging. CRC Press, New York.

Su, J.F., Huang, Z., Yuan, X.Y., Wang, X.Y. and Li, M. 2010. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. Carbohydrate Polymers. 79:145-153.

Takaichi, S. 2011. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Mar. Drugs.* 9:1101-1118. doi: 10.3390/md906110.

Tongdeesoontorn, W., Mauer, L.J., Wongruong, S., Sriburi, P. and Rachtanapun, P. 2011. Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. *Chemistry Central Journal*. 5:6.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

กิจกรรมที่ 1

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่าย

1. อาหารสูตร Modified Chu 13 medium (ยุวดีและฉมาภรณ์, 2547) มีองค์ประกอบหลักดังต่อไปนี้

องค์ประกอบหลัก	เตรียมเป็นสารละลาย 200 มิลลิลิตร	ปริมาตรสารละลายในสูตรอาหาร 1 ลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	2.16 กรัม	5 มิลลิลิตร
Citric acid	4 กรัม	5 มิลลิลิตร
K_2HPO_4	1.6 กรัม	5 มิลลิลิตร
ferric citrate	0.4 กรัม	5 มิลลิลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	4 กรัม	5 มิลลิลิตร
KNO_3	8 กรัม	5 มิลลิลิตร
Trace metals		1 มิลลิลิตร

โดยสูตรของ Trace metals เตรียมเป็นสารละลายจากปริมาณสารเคมีดังตารางนี้

องค์ประกอบ	เตรียมเป็นสารละลาย 100 มิลลิลิตร
$CoCl_2.6H_2O$	2.16 กรัม
H_3BO_3	4 กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	1.6 กรัม
$Na_2MoO_4.6H_2O$	0.4 กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	4 กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	1 กรัม

เมื่อผสมสูตรอาหารได้ในปริมาตร 1 ลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 6.7 โดยใช้ 1 N KOH ร่วมกับ HCl จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

กรมวิชาการเกษตร

2. อาหารสูตร BG-11 medium มีองค์ประกอบหลักดังต่อไปนี้

องค์ประกอบหลัก	เตรียมเป็นสารละลาย 1 ลิตร	ปริมาตรสารละลายในสูตรอาหาร 1 ลิตร
$NaNO_3$	150 กรัม	10 มิลลิลิตร
K_2HPO_4	30 กรัม	1 มิลลิลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	75 กรัม	1 มิลลิลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	36 กรัม	1 มิลลิลิตร
citric acid	6 กรัม	1 มิลลิลิตร
ferric citrate	6 กรัม	1 มิลลิลิตร
$Na_2EDTA.2H_2O$	1 กรัม	1 มิลลิลิตร
Na_2CO_3	20 กรัม	1 มิลลิลิตร
Trace metals		1 มิลลิลิตร
F/2 vitamins		1 มิลลิลิตร

โดยสูตรของ Trace metals เตรียมเป็นสารละลายจากปริมาณสารเคมีดังตารางนี้

องค์ประกอบ	เตรียมเป็นสารละลาย 100 มิลลิลิตร
H_3BO_3	2.86 กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	1.81 กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.222 กรัม
$Na_2MoO_4.6H_2O$	0.39 กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.079 กรัม
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.494 กรัม

เมื่อผสมสูตรอาหารได้ในปริมาตร 1 ลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 6.7 โดยใช้ 1 N KOH ร่วมกับ HCl จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

กรมวิชาการเกษตร

3. อาหารสูตร BBM medium มีองค์ประกอบหลักดังต่อไปนี้

องค์ประกอบหลัก	เตรียมเป็นสารละลาย 400 มิลลิลิตร	ปริมาตรสารละลายในสูตรอาหาร 1 ลิตร
$NaNO_3$	10 กรัม	10 มิลลิลิตร
K_2HPO_4	1 กรัม	10 มิลลิลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	3 กรัม	10 มิลลิลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	1 กรัม	10 มิลลิลิตร
NaCl	1 กรัม	10 มิลลิลิตร
EDTA Solution	EDTA 5 กรัม/KOH 3.1 กรัม	1 มิลลิลิตร
H_3BO_3	1.142 กรัม/100 มิลลิลิตร	1 มิลลิลิตร
Trace metals		1 มิลลิลิตร

โดยสูตรของ Trace metals เตรียมเป็นสารละลายจากปริมาณสารเคมีดังตารางนี้

องค์ประกอบ	เตรียมเป็นสารละลาย 100 มิลลิลิตร
$ZnSO_4.7H_2O$	2.205 กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.36 กรัม
MoO_3	0.1775 กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.3925 กรัม
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.1225 กรัม

เมื่อผสมสูตรอาหารได้ในปริมาตร 1 ลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 6.7 โดยใช้ 1 N KOH ร่วมกับ HCl จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

กรมวิชาการเกษตร

4. อาหารสูตร C medium มีองค์ประกอบหลักดังต่อไปนี้

องค์ประกอบหลัก	เตรียมเป็นสารละลาย	ปริมาตรสารละลายในสูตรอาหาร 1 ลิตร
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	3.75 กรัม/250 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
Biotin	0.005 กรัม/ 50 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
b-glycerophodphate.$5H_2O$	1.25 กรัม/250 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
Tris buffer	12.5 กรัม/250 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	1 กรัม/250 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
KNO_3	2.5 กรัม/250 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
vitamin B_1		10 มิลลิลิตร
vitamin B_{12} *(Thiamine)*		10 มิลลิลิตร
PIV metal		3 มิลลิลิตร
Agar		15 กรัม

โดยสูตรของ PIV metal เตรียมเป็นสารละลายจากปริมาณสารเคมีดังตารางนี้

องค์ประกอบ	เตรียมเป็นสารละลาย 100 มิลลิลิตร
$CoCl_2.6H_2O$	0.004 กรัม
H_3BO_3	0.0196 กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.0036 กรัม
$Na_2MoO_4.6H_2O$	0.0003 กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.1 กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.022 กรัม

เมื่อผสมสูตรอาหารได้ในปริมาตร 1 ลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 6.7 โดยใช้ 1 N KOH ร่วมกับ HCl จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ภาคผนวก ข
การศึกษาการเจริญของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

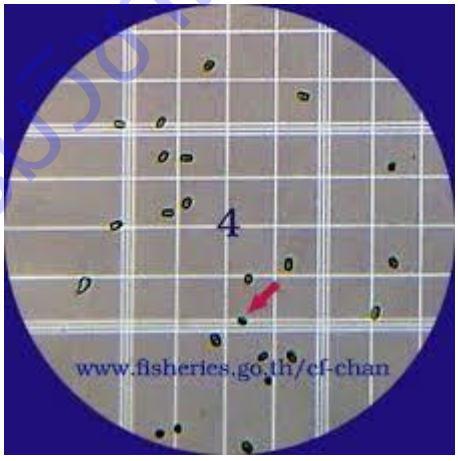
การติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก มีวิธีการดังนี้

1. วิธีการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก

ในการทดลองในครั้งนี้ใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้ Heamacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 400 เท่า แล้วคำนวณจำนวนเซลล์ของสาหร่าย (ยุวดี, 2546) ซึ่งการนับความหนาแน่นของสาหร่าย จำนวนเซลล์/ปริมาตรน้ำ จะมีตาราง 2 ตาราง (ลูกศรชี้ลง) โดยมีรายละเอียดบอกระดับความลึก โดยทั่วไปจะใช้ 0.1 มิลลิเมตร และบอกขนาดของช่องเล็กที่สุดที่ตีตารางไว้ (ลูกศรชี้ขึ้น)

รูปที่ 1 แสดงรายละเอียดของแผ่น Heamacytometer

เส้นขอบช่องสี่เหลี่ยมที่นับจะมี 3 เส้น ซึ่งตาราง Heamacytometer ที่ผู้ผลิตแนะนำให้ใช้นับสาหร่ายหรือแพลงก์ตอนได้ เส้นขอบสี่เหลี่ยมนั้นจะมี 3 เส้น โดยเส้นตรงกลางเป็นเส้นของพื้นที่ตารางส่วนเส้นนอกและเส้นใน มีไว้เพื่อให้ง่ายต่อการตัดสินใจว่าเซลล์ของสาหร่ายจะอยู่นอกหรือในพื้นที่ช่องนับ (ลูกศรชี้)



รูปที่ 2 ลักษณะของเส้นขอบตารางของแผ่น Heamacytometer

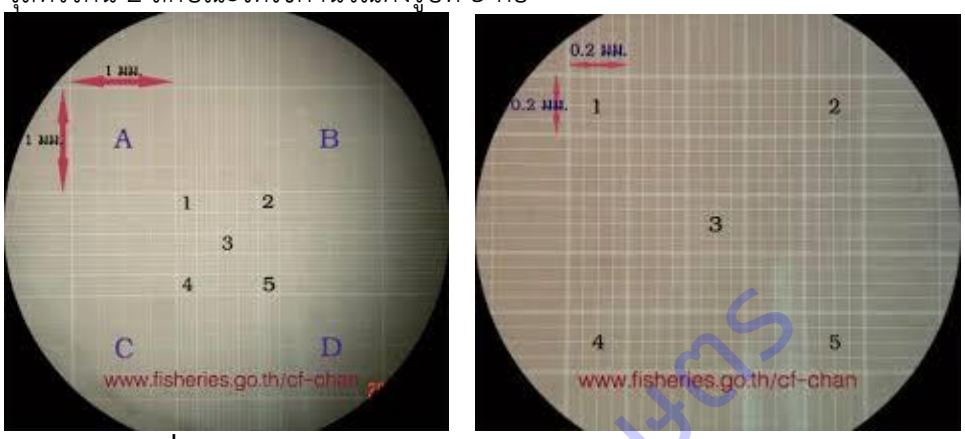
1.1 ขั้นตอนการใช้งาน Heamacytometer

1) วางกระจกปิดสไลด์ (Cover Glass) บน Hemacytometer ซึ่งแผ่นกระจกปิดสไลด์จะอยู่เหนือผิวตาราง 0.1 มิลลิเมตร
2) ใช้ไมโครปิเปตดูดนำตัวอย่างมา 9-10 ไมโครลิตร วางปลายปิเปตใกล้ขอบกระจกปิดสไลด์ จากนั้นค่อยๆ หยดน้ำตัวอย่างลงไป ซึ่งน้ำจะไหลเข้าใต้กระจกปิดสไลด์เองจนเต็มพื้นที่ตาราง (หยดทั้ง 2 ตาราง) หากหยดน้ำตัวอย่างมากเกินไปจะเลอะล้นกระจกปิดสไลด์ แต่ถ้าหากหยดน้อยเกินไปน้ำก็จะไหลเข้าไม่เต็มพื้นที่ตาราง ต้องล้างและหยดใหม่

กรมวิชาการเกษตร

1.2 วิธีการนับปริมาณเซลล์สาหร่าย

1) เมื่อน้ำตัวอย่างไหลเข้าใต้กระจกปิดสไลด์จนเต็มพื้นที่ตาราง จะสามารถคำนวณปริมาตรน้ำได้จากพื้นที่ตาราง x ความลึก
2) เมื่อนับจำนวนสาหร่ายในตารางภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะได้จำนวนเซลล์ต่อปริมาตรน้ำของตารางนั้น
3) นำมาคำนวณเป็นจำนวนสาหร่ายต่อปริมาตรน้ำ 1 มิลลิลิตร โดยมีลักษณะของตารางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 2 ลักษณะให้ใช้คำนวณดังรูปที่ 3 คือ



รูปที่ 3 ตารางบนผิว Heamacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย (ซ้าย) 40 เท่า (ขวา) 100 เท่า

- รูปที่ 3 (ซ้าย) ตารางบนผิว Heamacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ช่อง A B C และ D แต่ละช่องมีความกว้างและยาวด้านละ 1 มิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรน้ำของแต่ละช่องเมื่อคูณกับความลึกของ Heamacytometer 0.1 มม. แล้วจะเท่ากับ 0.1 ลบ.มม. หรือ 0.0001 มล. (10^{-4}) ดังนั้นหากเลือกนับเซลล์สาหร่ายที่ช่อง A B C และ D ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายจะเท่ากับ ค่าเฉลี่ยเซลล์สาหร่ายในช่อง A B C D x 10^{4} เซลล์ต่อมิลลิลิตร
- รูปที่ 3 (ขวา) ตารางบนผิว Heamacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ช่อง 1 2 3 4 และ 5 แต่ละช่องมีความกว้างและยาวด้านละ 0.2 มิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรน้ำของแต่ละช่องเมื่อคูณกับความลึกของ Heamacytometer 0.1 มม. แล้วจะเท่ากับ 0.004 ลบ.มม. หรือ 0.000001 มล. (10^{-6}) ดังนั้นหากเลือกนับเซลล์สาหร่ายที่ช่อง ช่อง 1 2 3 4 และ 5 ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายจะเท่ากับ ค่าเฉลี่ยเซลล์สาหร่าย 5 ช่อง x 1/4 x 10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ถ้าน้ำตัวอย่างมีการทำให้เจือจางต้องนำค่า Dilution factor เข้ามาคูณด้วย)

กรมประมง405