บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายสไปรูลิน่า

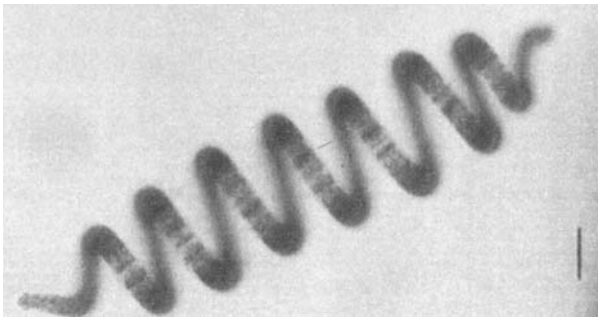
2.1.1 ลักษณะทางชีววิทยาของสาหร่ายสไปรูลิน่า

สาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina* sp.) หรือ อาร์โธรสไปร่า (*Arthrospira* sp.) หรือสาหร่ายเกลียวทองเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแบบเส้นสาย (filamentous cyanobacteria) จัดเป็นสาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) ที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า ซึ่งมีประวิติการบริโภคเป็นอาหารมาหลายศตวรรษถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Turpin ในปี ค.ศ . 1827 โดยแยกได้จากตัวอย่างน้ำจืด (Ciferri, 1983) ปัจจุบันสาหร่ายสไปรูลิน่าถูกจัดอยู่ในจีนัส *Arthrospira* ซึ่ง Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Castenholz, 1989) ได้บรรยายลักษณะของสาหร่ายชนิดนี้ไว้ว่า “ไตรโคมมีลักษณะเป็นเกลียวหลวม ๆ มีความกว้าง 3-12 ไมโครเมตร มีความยาวประมาณ 500 ไมโครเมตร และพบมากในเขตร้อน (Tropic) และใกล้เขตร้อน (Subtropic)” อย่างไรก็ตามพบว่าทางการค้ายังคงนิยมใช้ชื่อสไปรูลิน่ามากกว่าอาร์โธรสไปร่า(*Arthrospira*) ในขณะที่ผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการส่วนใหญ่จะใช้อาร์โธรสไปร่า และพบว่าบางฉบับใช้ทั้งสองแบบ ซึ่งในสารบบการจำแนกสายพันธุ์นั้น สาหร่ายสไปรูลิน่าถูกจัดไว้ดังนี้

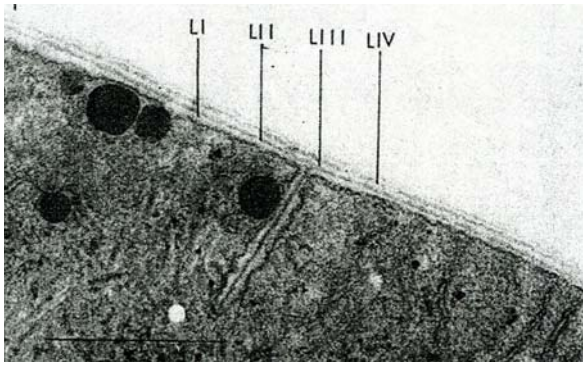
Division: *Cyanophyta*
Class: *Cyanophyceae*
Order: *Oscillatoriale*
Family: *Oscillatoriaceae*
Genus: *Spirulina*

สาหร่ายสไปรูลิน่ามีลักษณะเป็นเส้นสายที่ขดวนไปมาเหมือนสปริง (trichome) โดยพวกที่เป็น filament ประกอบด้วยเซลล์ที่เป็นทรงกระบอกต่อกันไม่มีกิ่งก้าน และบิดตัวเป็นเกลียว และเคลื่อนที่ไปตามแนวแกน (ภาพที่ 2.1) แต่ละชนิดมีรูปร่างแตกต่างกันหรือแม้แต่ชนิดเดียวกันก็พบรูปร่างที่แตกต่างกัน (สมบูรณ์, 2538) โดยสายพันธุ์ที่มีความสำคัญมากที่สุดคือ *S. platensis* และ *S. maxima* เส้นใยที่มีลักษณะบิดตัวเป็นเกลียวของสาหร่ายสไปรูลิน่า ประกอบด้วยเซลล์หนึ่งเซลล์หรือหลายเซลล์มาเรียงต่อกันเป็นเส้นตรงและหรือขดเป็นเกลียว โดยจะมีความยาวของเส้นใยแตกต่างกัน

ไป (ปกติ 100-200 ไมโครเมตร) สาหร่ายสไปรูลิน่ามีคลอโรฟิลล์ ไม่มีนิวเคลียส ไม่มีราก ไม่มีลำต้น และไม่มีใบที่แท้จริง โดยชนิดที่มีขนาดใหญ่ไซโตพลาสซึมจะมีแกรนูลที่มี gas vacuole สะสมอยู่จึงทำให้เซลล์ลอยตัวได้และเห็นผนังเซลล์อย่างชัดเจน (สมบูรณ์, 2538) โดยผนังเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลิน่าจะเป็นแบบเดียวกับแบคทีเรียแกรมลบซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ชั้น ประกอบไปด้วย Layers I, II, III และ IV (ภาพที่ 2.2) โดยชั้นนอกสุด (layer IV) ประกอบด้วย lipopolysaccharides (LPS) ซึ่งแต่ละโมเลกุลของ LPS จะเชื่อมต่อกันด้วยแคลเซียมและแมกนีเซียม ชั้น Layer III มีเส้นใยโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก ชั้น Layer II เป็นชั้นที่แข็งแรงที่สุดประกอบไปด้วยโมเลกุลของ peptidoglycan ส่วนชั้นในสุด Layer I จะมี β-1,2-glucan เป็นองค์ประกอบ (Van Eykelenburg, 1978)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของ *Arthrospira maxima (*เส้นตรงมีขนาดเท่ากับ 20 ไมโครเมตร)
ที่มา: Vonshak (2002)



ภาพที่ 2.2 ผนังเซลล์ของ *S. platensis*
ที่มา: Van Eykelenburg (1977)

สาหร่ายสไปรูลิน่าต้องการแสงในการเจริญเติบโตส่วนใหญ่เป็นพวกโฟโตออโตทรอฟ ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลจากแหล่งภายนอกได้ สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในบริเวณน้ำตื้น โดยเฉพาะน้ำกร่อย หรือน้ำที่มีความเป็นด่าง พบในธรรมชาติทั่วไปทั้งในดิน หนองน้ำ น้ำพุร้อน ทะเลและน้ำจืด โดยเฉพาะทะเลสาบที่น้ำมีความเป็นเบสของทวีปแอฟริกาและประเทศเม็กซิโก สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ *S. platensis* และ *S. maxima* (สินีนาฏ, 2550) มีรายงานว่า ทะเลสาบที่มีความเข้มข้นของเกลือมากกว่า 30 กรัมต่อลิตร (Alkaline Lake) จะพบสาหร่ายสไปรูลิน่าเพียงชนิดเดียวเท่านั้น (Cifferi, 1983)

ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า เพื่อผลิตเป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์/อาหารสัตว์ในระดับอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้มีการสกัดสารสีไฟโคไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุที่พบมากในสาหร่ายสไปรูลิน่ามาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าทางการค้าจะเพาะเลี้ยงในบ่อเปิดรางคู่ที่ไม่มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมใด ๆ และอาศัยแสงแดดเป็นแหล่งให้พลังงานโดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง มีการเติมแร่ธาตุอาหาร และมีการให้คาร์บอนไดออกไซด์เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต ผลผลิตของสาหร่ายสไปรูลิน่าทั่วโลกมีประมาณ 3,000 ตัน/ปี ปัจจุบันอย./สหรัฐอเมริกา จัดให้สาหร่ายสไปรูไรน่าเป็นอาหารที่ปลอดภัยต่อการบริโภค

ปัจจุบันพบว่าตลาดต่างประเทศที่มีการจำหน่ายสไปรูลิน่าได้แก่ ฟิลิปปินส์ จีน อินเดีย สเปน เยอรมัน ฝรั่งเศล เบลเยี่ยม ชิลี อเมริกา บราซิล อาร์เจนตินา อัฟริกา และอียิปต์ โดยบริษัทที่ผลิตผลิตภัณฑ์สาหร่ายสไปรูลิน่าจำหน่าย อาทิ Spirulina-Mexicana/แม็กซิโก Nippon-Spirulina/ญี่ปุ่น Koor-Foods/อิสราเอล Cyanotech-Corporation/สหรัฐอเมริกา Far-East-Microalgae/ไต้หวัน Parry-Agro-Industries/อินเดีย Yunnan-Spirin/จีน โดยผลิตภัณฑ์สาหร่ายสไปรูลิน่าส่วนใหญ่ใช้บริโภคเป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์ นอกนั้นใช้เป็นแหล่งโปรตีนอาหารสัตว์

2.1.2 คุณค่าทางโภชนาการและสารชีวโมเลกุลที่สำคัญจากสาหร่ายสไปรูลิน่า

ความสนใจในการนำสาหร่ายสไปรูลิน่ามาใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพนั้น เริ่มจากการที่มนุษย์ทราบว่าสาหร่ายสไปรูลิน่ามีปริมาณโปรตีนในเซลล์สูง (ร้อยละ 50-70 ของน้ำหนักแห้ง) อีกทั้งยังประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด รวมถึงวิตามิน (โดยเฉพาะวิตามินบี12) แร่ธาตุ กรดไขมันจำเป็น (*y*-linolenic acid) และรงควัตถุต่างๆ (phycobiliproteins and carotenoids) ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย (Richmond, 1986) สำหรับองค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ของสาหร่ายสไปรูลิน่านั้นพบว่าจะขึ้นอยู่กับสปีชีส์และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของ *S. platensis* และ *S. maxima* (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)

สายพันธุ์	น้ำ	เถ้า	ลิปิด	ไฟเบอร์	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน
S. platensis	6-10	4-5	9-14	3-8	10-18	56-72
S. maxima	4-7	6-9	4	1	8-13	60-71

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ciferri (1983)

2.1.2.1 โปรตีนกรดอะมิโน

สาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นแหล่งของอาหารจากธรรมชาติที่มีโปรตีนมากที่สุด ประมาณร้อยละ 50-70 ของน้ำหนักแห้ง มากกว่าเนื้อสัตว์และปลา (ร้อยละ 15-25), นมผง (ร้อยละ 35), ไข่ (ร้อยละ 12), ถั่วเหลือง (ร้อยละ 35) และธัญพืช (ร้อยละ 8-14) เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนเช่นกัน พบว่าผนังเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลิน่าไม่มีเซลลูโลสจึงทำให้ย่อยได้ง่ายกว่ายีสต์ ที่สำคัญคือ Phycobiliproteins ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานิน (C-Phycocyanin) และอัลโลไฟโคไซยานิน (Allophycocyanin) (สัดส่วนประมาณ 10:1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นแบบ Tetrapyrrole โดยที่ Biliproteins ทั้งสองชนิดประกอบไปด้วยหน่วยย่อยสองหน่วยคือ α และ β (21.5 และ 19 กิโลดาลตัน สำหรับไฟโคไซยานินและ 19.6 และ 17.7 กิโลดาลตัน สำหรับอัลโลไฟโคไซยานิน) ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณและคุณภาพโปรตีนของสาหร่ายสไปรูลิน่าเปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่น ๆ ส่วนตารางที่ 2.3 แสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนของสาหร่ายสไปรูลิน่าซึ่งพบว่ามีมากถึง 18 ชนิด โดยมีค่าใกล้เคียงกับไข่ที่จัดเป็นอาหารที่มีกรดอะมิโนจำเป็นทุกชนิดในปริมาณสูง

2.1.2.2 กรดนิวคลีอิก

การบริโภคอาหารที่มีกรดนิวคลีอิกสูงเสี่ยงต่อการเกิดโรคเก๊าท์ โดยร่างกายจะสร้างกรดยูริกจากเมตาบอลิซึมของเพียวรีน ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงอาหารที่มีกรดนิวคลีอิกในปริมาณสูง โดยพบว่าร่างกายของผู้ใหญ่ต้องการอาหารเพื่อเป็นแหล่งเพียวรีนและไพริมีดีนทั้งหมดประมาณ 450-750 มิลลิกรัมต่อวัน โดยสาหร่ายสไปรูลิน่าสายพันธุ์ *S. maxima* และ *S. platensis*

ประกอบด้วย RNA ร้อยละ 2.2-3.5 และ DNA ร้อยละ 0.6-1.0 ของน้ำหนักแห้ง จึงมีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดน้อยกว่าร้อยละ 5 ซึ่งพบว่ามีปริมาณน้อยกว่าแบคทีเรีย (ร้อยละ 10-16) หรือยีสต์ (ร้อยละ 4-10) (Ciferri, 1983) มีรายงานว่าสาหร่ายสไปรูลิน่ามีปริมาณเพียวรีนน้อยกว่าอาหารจำพวกเนื้อแดง ปลาซาดีน หอยสองฝา และพืชตระกูลถั่วประมาณร้อยละ 50

ตารางที่ 2.2 ปริมาณโปรตีนของสาหร่ายสไปรูลิน่าและอาหารอื่น ๆ

ชนิดของอาหาร	ร้อยละโปรตีน
สาหร่ายสไปรูลิน่า	65
ไข่	47
ยีสต์สำหรับหมักเบียร์	45
หางนม	37
ถั่วเหลือง	36
ชีส	36
ข้าวสาลี	27
ถั่ว	26
ไก่	24
ปลา	22
เนื้อวัว	22

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ali and Saleh (2012)

2.1.2.3 วิตามิน

สาหร่ายสไปรูลิน่ามีเบต้าแคโรทีนมากกว่าแครอท 10 เท่า โดยมนุษย์สามารถใช้ประโยชน์จากแคโรทีนจากสาหร่ายสไปรูลิน่าได้อย่างมีประสิทธิภาพ และที่น่าประหลาดใจก็คือสามารถต้านทานต่อโรคขาดวิตามินเอได้เป็นอย่างดี การได้รับวิตามินเอในปริมาณมากอาจเป็นผลเสียต่อร่างกายแต่การได้รับเบต้าแคโรทีนจากสาหร่ายสไปรูลิน่า และผักมีความปลอดภัยค่อนข้างสูง เพราะว่าร่างกายของมนุษย์สามารถเปลี่ยนเบต้าแคโรทีนไปเป็นวิตามินเอได้ในปริมาณที่ร่างกายต้องการได้ นอกจากนี้สาหร่ายสไปรูลิน่ายังอุดมด้วยวิตามินบี 12 มากกว่าตับดิบถึง 4 เท่า จึงถือว่า

สาหร่ายสไปรูลิน่า เป็นแหล่งของวิตามินบี 12 ที่ดี นอกจากนี้ยังประกอบด้วยวิตามินอีกหลายชนิด เช่น ไนอาซีน ไบโอติน กรดโฟลิก อินซิทอล และวิตามินอี ในปริมาณน้อย

ตารางที่ 2.3 กรดอะมิโนในสาหร่ายสไปรูลิน่า

ชนิดกรดอะมิโน	ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง
กรดอะมิโนจำเป็น (Essential amino acid)	
ไอโซลูซีน (Ile)	4.13
ลูซีน (Leu)	5.80
ไลซีน (Lys)	4.00
เมไธโอนีน (Met)	2.17
เฟนิลอะลานีน (Phe)	3.95
ธรีโอนีน (Thr)	4.17
ทริปโตเฟน (Try)	1.13
วาลีน (Val)	6.00
กรดอะมิโนไม่จำเป็น (Non-essential amino acid)	
อะลานีน (Ala)	5.82
อาร์จินีน (Arg)	5.98
กรดแอสปาร์ติก (Asp)	6.43
ซีสเตอีน (Cys)	0.67
กรดกลูตามิก (Glu)	8.94
ไกลซีน (Gly)	3.46
ฮีสติดีน (His)	1.08
โปรลีน (Pro)	2.97
เซรีน (Ser)	4.00
ไทโรซีน (Tyr)	4.60

ที่มา: Richmond (1986)

2.1.2.4 ไขมันและกรดไขมัน

สาหร่ายสไปรูลิน่ามีไขมันประมาณร้อยละ 4-7 ของน้ำหนักแห้ง จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่าสาหร่ายสไปรูลิน่ามีกรดไขมันจำเป็นซึ่งส่วนมากเป็น โอเมก้า-6 มีรายงานว่า *S. maxima* มีกรดแกมมาลิโนลีนิก (γ-linolenic acid: GLA) ประมาณร้อยละ 10-20 ในขณะที่ *S. platensis* มีมากกว่าถึงร้อยละ 49 ทั้งนี้ปริมาณขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ เช่น แสง และอุณหภูมิ เป็นต้น สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบได้แก่ กรดโอเลอิก และกรดลิโนเลอิก นอกจากนี้ยังมีกรดไขมันอิ่มตัวกรดปาลมิติกซึ่งพบว่ามีมากกว่าร้อยละ 60 ของกรดไขมันที่มีอยู่ใน *S. maxima* มีรายงานว่ากรดแกมมาลิโนลีนิกในสาหร่ายสไปรูลิน่ามีคุณสมบัติที่ดีทางการแพทย์ โดยใช้เป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ฮอร์โมนพรอสตาแกลนดินที่ใช้ในการรักษาอาการอักเสบ การเกิดลิ่มในเลือด และโรคมะเร็ง (Reddy *et al*., 2003) สาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นแหล่งที่ดีของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid; PUFA) กล่าวคือ มีอยู่ร้อยละ 1.5-2.0 ของร้อยละ 5-6 ของปริมาณไขมันทั้งหมด โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดแกมมา-ลิโนเลนิก (γ-linolenic acid; GLA) มีสูงถึงร้อยละ 36 ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนทั้งหมด อีกทั้งยังมีกรดแอลฟา-ลิโนเลนิก (α-linolenic acid; ALA) ซึ่งประโยชน์ของกรดไขมันทั้งสองชนิดนี้ คือ ช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular disease) กล่าวคืออยู่ในสถานะที่เป็นของเหลวภายในร่างกายมนุษย์จึงไม่ก่อให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด กรดลิโนเลอิก (Linoleic; LA) กรดสเตียริโดนิก (stearidonic acid; SDA) กรดไอโคซาเพนทาอีโนอิก (eicosapentaenoic acid; EPA) ช่วยลดความเสี่ยงการอุดตันของเส้นเลือด กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (docosahexaenoic acid; DHA) ช่วยในเรื่องการทำงานของระบบประสาท และกรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid; AA)

2.1.2.5 คาร์โบไฮเดรต

สาหร่ายสไปรูลิน่ามีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 15-25 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส แรมโนส แมนโนส ไซโลส และกาแลคโทส มีรายงานว่าสามารถแยกซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ (sulfated polysaccharide) ประมาณร้อยละ 0.5-2.0 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์น้ำหนักโมเลกุลสูงและมีชื่อเรียกว่าสไปรูแลน(Spirulan) พอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส แมนโนส ฟรุคโทส กาแลกโทส ไซโลส กลูโคส กรดกลูคูโรนิก และ กรดกาแลกทูโรนิก สามารถละลายน้ำได้ดีและมีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Cohen, 1997)

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบกรดไขมันของ *Spirulina platensis*

ชนิดของกรดไขมัน	ร้อยละกรดไขมัน
กรดไมริสติก	0.23
กรดปาล์มิติก	46.07
กรดพาลไมโตเลอิก	1.26
กรดโอเลอิก	5.26
กรดลิโนเลอิก	17.43
กรดแกมมา-ลิโนเลนิก	8.87
อื่น ๆ	20.88

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ali and Saleh (2012)

2.1.2.6 แร่ธาตุ

สาหร่ายสไปรูลิน่าสามารถดูดซับแร่ธาตุต่าง ๆ ไว้ภายในเซลล์ขณะที่มีการเจริญเติบโต ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้สามารถดูดซึมได้ในร่างกายมนุษย์สาหร่ายสไปรูลิน่า จะมีแร่ธาตุแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตและชนิดของแร่ธาตุที่มีอยู่ในน้ำ แร่ธาตุที่สำคัญที่พบในสาหร่ายสไปรูลิน่า คือธาตุเหล็ก (0.58-1.8 กรัมต่อกิโลกรัม), แคลเซียม (1.3-14 กรัมต่อกิโลกรัม), ฟอสฟอรัส (6.7-9.0 กรัมต่อกิโลกรัม) และโพแทสเซียม (6.4-15.4 กรัมต่อกิโลกรัม) โดยเป็นที่ยอมรับกันว่าสาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นแหล่งของอาหารที่มีธาตุเหล็กในปริมาณสูงโดยมีมากกว่าอาหารทั่วๆ ไปถึง 10 เท่า

2.1.2.7 รงควัตถุ

สีเขียวแกมน้ำเงินเข้มของสาหร่ายสไปรูลิน่าเกิดจากรงควัตถุหลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงแดดที่ช่วงความยาวคลื่นแตกต่างกัน ได้แก่ แคโรทีนอยด์ (carotenoid) ที่ให้สีเหลืองส้มซึ่งพบว่ามีประมาณร้อยละ 0.4 ของน้ำหนักแห้ง ส่วนคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ที่ให้สีเขียวพบว่ามีประมาณร้อยละ 1 ของน้ำหนักแห้ง โดยรงควัตถุที่พบมากที่สุดคือไฟโคไบลิโปรตีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของไฟโคไบลิโซม โดยมีปริมาณร้อยละ 14-16 ของน้ำหนักแห้ง ชนิดที่สำคัญคือไฟโคไซยานิน (Phycocyanin: PC) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ให้สีน้ำเงินครามหรือฟ้า

และดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 615-620 นาโนเมตร และอัลโลไฟโคไซยานิน (Allophycocyanin: APC) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ให้สีน้ำเงินเข้มและดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 652 นาโนเมตร โดยพบว่าประมาณร้อยละ 50 ของโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในสาหร่ายสไปรูลิน่าคือไฟโคไซยานิน และอัลโลไฟโคไซยานิน โดยที่อัลโลไฟโคไซยานินจะมีปริมาณน้อยกว่าไฟโคไซยานินหลายเท่าตัว อย่างไรก็ตาม มักพบรายงานว่าสไปรูลิน่าประกอบด้วยไฟโคไบลิโปรตีนเพียงสองชนิด คือไฟโคไซยานินและอัลโลไฟโคไซยานิน แต่ก็พบว่ามีที่รายงานว่าสไปรูลิน่ายังประกอบด้วยไฟโคไบโปรตีนชนิดที่เรียกว่าไฟโคอิริทริน (Phycoerythrin; PE) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ให้สีแดงและดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

จากคุณประโยชน์ของสาหร่ายสไปรูลิน่า จึงกล่าวได้ว่าสาหร่ายสไปรูลิน่ามีศักยภาพเป็นแหล่งของสารโภชนเภสัช(nutraceuticals) เพราะประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุ ที่เป็นประโยชน์หลายชนิด ทำให้มีการศึกษาและพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยมีรายงานว่าสาหร่ายสไปรูลิน่าและสารสกัดสาหร่ายสไปรูลิน่า แสดงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลดีต่อระบบภูมิคุ้มกัน การต้านทานไวรัส และการต้านมะเร็ง จากผลของสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สำคัญ 3 ชนิด คือซี-ไฟโคไซยานิน ซัลเฟตพอลิแซ็ก-คาไรด์ และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (กรดแกมมาลิโนลีนิก: GLA) (Belay, 2002)

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์สาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้งของบริษัท Siam Algae Company (SAC) วิเคราะห์คุณภาพโดย Japan Food Research Laboratories

องค์ประกอบ	ปริมาณต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม
ความชื้น	61.40 กรัม
โปรตีน	3.00 กรัม
ไขมัน	8.50 กรัม
เส้นใย	3 .00 กรัม
เถ้า	7.70 กรัม
ไนโตรเจนอิสระ	6.40 กรัม
ไฟโคไซยานิน	16.20 กรัม
แคโรทีนอยด์	477.00 มิลลิกรัม
คลอโรฟิลล์-*เอ*	1.20 กรัม
โปรวิตามิน เอ	214.00 มิลลิกรัม
ไธอะมิน (V.B1)	1.98 มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน (V.B2)	3.63 มิลลิกรัม
วิตามิน B6	0.59 มิลลิกรัม
วิตามิน B12	0.11 มิลลิกรัม
วิตามิน E	11.80 มิลลิกรัม
ไนอะซิน	13.20 มิลลิกรัม
กรดโฟลิก	42.00 ไมโครกรัม
กรดแพนโทธินิก	0.88 มิลลิกรัม
อินโนซิทอล	74.00 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	914.00 มิลลิกรัม
เหล็ก	57.40 มิลลิกรัม
แคลเซียม	171.00 มิลลิกรัม
โพแทสเซียม	1.77 กรัม
โซเดียม	1.05 กรัม
แมกนีเซียม	257.00 มิลลิกรัม

ที่มา: Shimamatsu (2004)

2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า

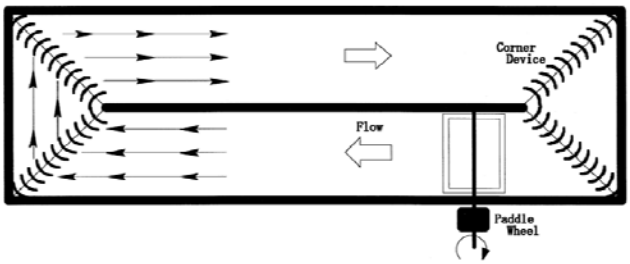
การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าทางการค้า นิยมใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซค์ที่ได้จากอุตสาหกรรมต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและแสงแดดเป็นแหล่งพลังงานในการเพาะเลี้ยง โดยสามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในระบบเปิดและระบบปิด (Chisti 2007; Sirisansaneeyakul *et al*., 2011). ซึ่งปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มแสง ค่าพีเอช อัตราการให้อากาศ ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เกลือ แอมโมเนีย และปริมาณกล้าเชื้อ เป็นต้น โดยที่ความเข้มแสงและอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเมตาบอไลท์ของสาหร่ายสไปรูลิน่ามากที่สุด (Volkmann *et al*., 2008; Kumar *et al*., 2011; Lee *et al*., 2012).

2.2.1 การเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโททรอฟ (Photoautotrophic cultivation)

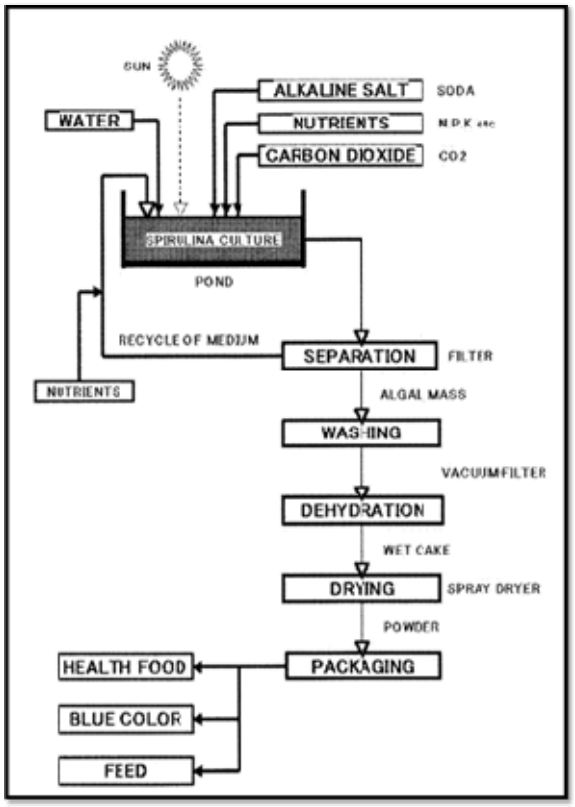
2.2.1.1 การเพาะเลี้ยงในบ่อเปิดแบบรางคู่ (open raceway pond)

การเพาะเลี้ยงแบบนี้จะไม่มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมใด ๆ บ่อเพาะเลี้ยงจะมีรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าและมีการติดตั้งกังหัน (paddle wheels) เพื่อควบคุมการหมุนวนของอาหารเหลวให้มีการกวนผสมแบบปั่นป่วน (turbulent flow) และป้องกันการนอนก้นของเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 2.3 ส่วนภาพที่ 2.4 แสดงระบบการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าทางการค้าเพื่อผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ อาหารสัตว์ และสารสีซี-ไฟโคไซยานิน ประกอบด้วย 6 ขั้นตอนหลักคือ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในบ่อเพาะเลี้ยง (Spirulina culture) การเก็บเกี่ยวชีวมวล (separation) การล้างเซลล์ (washing) การบีบน้ำ (dehydration) การทำแห้ง (drying) และการบรรจุหีบห่อ (packaging) สำหรับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่านิยมใช้อาหาร Zarrouk medium ซึ่งมีโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก และโซเดียมไนเทรต ($NaNO_3$) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยการปรับปริมาณแร่ธาตุอาหารจะขึ้นอยู่กับคุณภาพของน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และมักควบคุมให้มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 9.5-10.5 โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในการปรับ การเพาะเลี้ยงแบบนี้จะอาศัยแสงแดดจากธรรมชาติ ดังนั้นความสูงของระดับอาหารเหลวในบ่อเพาะเลี้ยงจึงไม่สูงมากนัก ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 10-30 เซนติเมตร ซึ่งเป็นระดับความสูงที่แสงสามารถทะลุผ่านได้และการผสมโดยใช้กังหันดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพ การเพาะเลี้ยงแบบนี้แสงจะทะลุผ่านได้ดีในระดับน้ำที่ไม่ลึกมาก หากการกวนผสมไม่ดีพอเซลล์ที่อยู่บริเวณผิวหน้าจะได้รับแสงที่มีความเข้มสูงมากกว่า

เซลล์ที่อยู่ด้านล่าง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงลดต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ได้รับแสงมากเกินไปจึงทำให้เซลล์อ่อนแอลงและตายในที่สุด(phototinhibition)



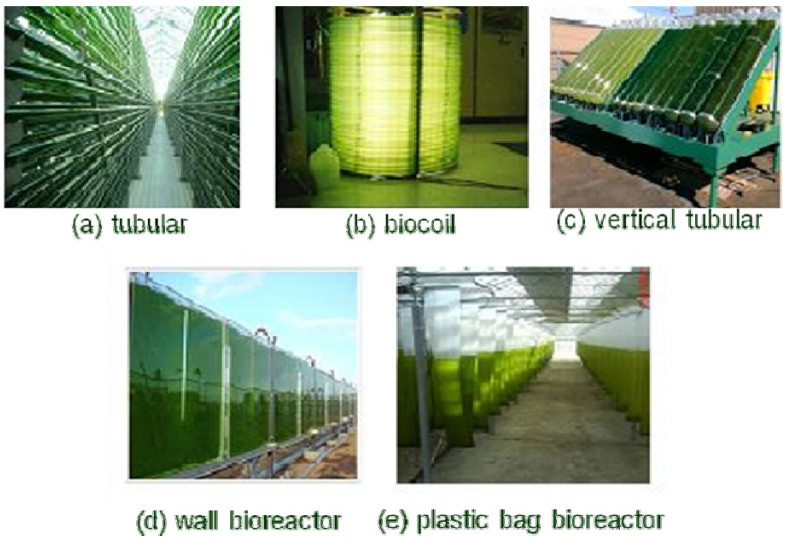
ภาพที่ 2.3 ลักษณะของบ่อเปิดแบบรางคู่ (open raceway pond) สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย
ที่มา: Shimamatsu (2004)



ภาพที่ 2.4 ระบบการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าทางการค้า
ที่มา: Shimamatsu (2004)

2.2.1.2 การเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ปิดแบบให้แสง (enclosed photobioreactor)

การเพาะเลี้ยงแบบนี้จะออกแบบให้มีพื้นที่ผิวในการรับแสงเพิ่มมากขึ้นและสามารถแก้ปัญหาเซลล์สาหร่ายได้รับแสงไม่ทั่วถึงได้ดี โดยเฉพาะในสภาวะที่เซลล์มีความหนาแน่นมากเกินไป ด้วยเหตุนี้การเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าในถังปฏิกรณ์แบบให้แสง จึงให้ผลผลิตของชีวมวลสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในบ่อเปิดแบบรางคู่ การเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบให้แสงจะออกแบบให้มีระบบหมุนเวียนอาหารเหลว ระหว่างบริเวณที่ได้รับแสงและไม่ได้รับแสงอย่างทั่วถึง และสามารถลดระยะเวลาในการรับแสงของเซลล์ให้สั้นลง จึงทำให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายเพิ่มขึ้น และการยับยั้งเนื่องจากความเข้มแสงที่มากเกินไปลดลง โดยแหล่งของแสงที่ให้สามารถใช้ได้ทั้งแสงจากดวงอาทิตย์หรือแสงเทียมจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ หรืออาจให้แสงจากทั้งสองแหล่งร่วมกัน สำหรับการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการเพาะเลี้ยงสามารถกระทำได้โดยการวางถังปฏิกรณ์ไว้ภายในห้องที่มีอุณหภูมิคงที่ อย่างไรก็ตาม ถังปฏิกรณ์แบบให้แสงที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน ผู้ผลิตมักออกแบบให้มีระบบควบคุมอุณหภูมิมาพร้อมกับตัวถังปฏิกรณ์ด้วย ตัวอย่างของถังปฏิกรณ์แบบให้แสงมีด้วยกันหลายรูปแบบ เช่น คอลัมน์ฟองอากาศ (bubble column), คอลัมน์อากาศลอยตัว (airlift column), ถังกวน (stirred-tank), ท่อขด (helical tubular) เป็นต้น (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.5 ถังปฏิกรณ์แบบให้แสง (photobioreactor) สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย
ที่มา: นิรนาม

จากที่กล่าวมาในขั้นต้นจะเห็นว่าการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าเพื่อการผลิตชีวมวลและสารมูลค่าสูงนิยมเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโททรอฟ ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้ในระบบเปิดและระบบปิด ในบ่อเปิดแบบรางคู่และถังปฏิกรณ์แบบให้แสง ตามลำดับ โดยการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบให้แสงจะให้ผลผลิตของสาหร่ายสูงกว่า อีกทั้งยังมีข้อดีหลายประการ อาทิ ต้องการพื้นที่ในการก่อสร้างน้อย ประสิทธิภาพในการรับแสงของเซลล์สาหร่ายสูง การระเหยของของเหลวต่ำ การสูญเสียก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สู่ชั้นบรรยากาศมีน้อย และมักไม่พบการปนเปื้อนของแมลงและสัตว์น้ำขนาดเล็ก อย่างไรก็ตาม พบว่าการเพาะเลี้ยงในบ่อเปิดแบบรางคู่ยังคงได้รับความนิยมเรื่อยมา เนื่องจากการก่อสร้างทำได้ง่าย การดูแลรักษาบ่อเพาะเลี้ยงไม่ยุ่งยาก และมีต้นทุนในการผลิตต่ำกว่ามาก

2.2.2 การเพาะเลี้ยงแบบมิกโซทรอฟ (Mixotrophic cultivation)

สาหร่ายสไปรูลิน่านอกจากจะเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีการให้แสงเพียงอย่างเดียวแล้ว ยังสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีการให้แสงร่วมกับการเติมกลูโคส (mixotrophically) Marquez *et al*., (1993) โดยมีรายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *A. platensis* แบบมิกโซทรอฟ พบว่าสาหร่ายจะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโททรอฟ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบไม่มีการให้แสงหรือเฮทิโรทรอฟ (heterotrophic) การเพาะเลี้ยงแบบมิกโซทรอฟจะช่วยให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้เร็วขึ้นและความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโตทรอฟ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการเพาะเลี้ยง *A. platensis* เพื่อการผลิตเซลล์และซี-ไฟโคไซยานิน โดยวิธีการหมักแบบครั้งคราวและใช้กลูโคสเป็นสับสเทรต สามารถช่วยเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ได้ถึง 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงแบบนี้จะไม่เกิดปัญหากลูโคสขัดขวางการเจริญเติบโตและการผลิตซี-ไฟโคไซยานินจึงทำให้อัตราการผลิตเซลล์และซี-ไฟโคไซยานินสูงขึ้น (Chen and Zhang, 1997)

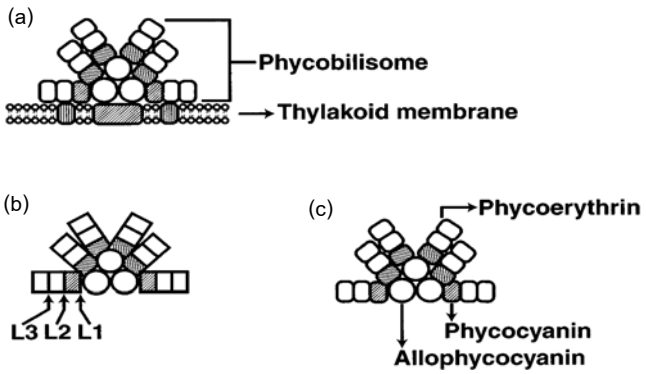
2.2.3 การเพาะเลี้ยงแบบเฮทิโรทรอฟ (Heterotrophic cultivation)

สาหร่ายสไปรูลิน่าเกือบทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ในที่มืด โดยอาศัยพลังงานจากกลูโคสและฟรักโทส จากรายงานวิจัยพบว่าการเพาะเลี้ยง *A. platensis* ในสภาวะดังกล่าวจะมีการผลิตซี-ไฟโคไซยานินได้น้อยมาก โดยมีรายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *A. platensis* แบบเฮทิโรทรอฟจะให้อัตราการผลิตรงควัตถุน้อยเพียง 0.01 กรัมต่อลิตรต่อวัน (Marquez *et al*., 1993)

จากการตรวจเอกสารพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรทรอฟและมิกโซทรอฟจะให้อัตราการผลิตเซลล์ (cell productivity) มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโตทรอฟ โดยที่การเพาะเลี้ยงแบบมิกโซทรอฟสไปรูลิน่าจะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบนี้จะมีข้อดีหลายประการอาทิ อัตราการผลิตชีวมวลสูง สามารถเพาะเลี้ยงได้ดีภายใต้ความเข้มข้นของเซลล์สูง ๆ และสามารถรักษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตได้ง่าย อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงแบบมิกโซทรอฟมีข้อจำกัดหลายประการอาทิ เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตแบบเฮเทอโรทรอฟ โดยเฉพาะหากมีการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในขนาดที่ใหญ่ขึ้น ซึ่งมักพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียประเภทนอน-โฟโตออโตทรอฟ (non-photoautotrophic bacteria) โดยแนวทางในการแก้ปัญหาดังกล่าวคือ ฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยง ควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงให้อยู่ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นสูง ๆ ใช้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์ชนิดพิเศษ (เอทานอล หรือ แอซีเทต) และเติมยาปฏิชีวนะลงในอาหารเพาะเลี้ยง เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเหล่านี้ให้อัตราการผลิตรงควัตถุต่ำมาก จึงทำให้มักพบรายงานวิจัยการผลิตซี-ไฟโคไซยานินแบบโฟโตออโททรอฟอยู่เสมอ

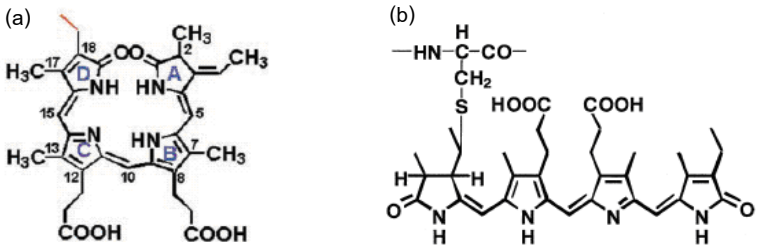
2.3. ไฟโคไบลิโซม (Phycobilisomes: PBS)

เนื่องจากสไปรูลิน่าเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยแสงเป็นแหล่งพลังงานหลัก จึงพบโครงสร้างของโปรตีนชนิดที่เรียกว่าไฟโคไบลิโซม (Phycobilisomes: PBS) (ภาพที่ 2.6 a) เช่นเดียวกับพืช ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวมีหน้าที่เก็บเกี่ยวพลังงานจากแสงแดดแล้วถ่ายเทพลังงานดังกล่าวผ่านเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ (Thylakoid membrane) แล้วเข้าสู่ระบบการสังเคราะห์แสงของเซลล์ ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ ไฟโคไบลิโปรตีน (Phycobiliprotein: PBPs) หรือไบลิโปรตีน (Biliprotein) และสายพอลิเพปไทด์ที่เป็นตัวเชื่อมโยง (linker polypeptide) (ภาพที่ 2.6 b) โดยไฟโคไบลิโปรตีนประกอบด้วยสองส่วนย่อย คืออะโพโปรตีน (Apoprotein) และไบลิน (Bilin) ซึ่งทั้งสองส่วนนี้จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไทโออีเทอร์ (thioether bond) ระหว่างวงแหวนเอ ของไบลินกับกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cystein) บนอะโพโปรตีน ดังแสดงในภาพที่ 2.7 โดยทั่วไปแล้วโครงสร้างของไบลินจะมีลักษณะเป็นวงแหวนไพร์รอล (pyrrole ring) 4 วงต่อกันเป็นเส้นตรง เรียกว่าเททราไพร์รอล (tetrapyrrole) โดยไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีไบลิน 4 ชนิด คือ ไฟโคไซยาโนไบลิน (Phycocyanobilin) ไฟโคอิริโทรไบลิน (Phycoerythrobilin) ไฟโคยูโรไบลิน (Phycoeurobilin) และไฟโคไบลิวิโอลิน (Phycobiliviolin) ทั้งนี้ ไบลินแต่ละชนิดจะมีจำนวนของพันธะคู่แบบคอนจุเกต (conjugated double bond) บนโมเลกุลแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 แบบจำลองการจัดเรียงตัวของไฟโคบิลิโซม (a) แสดงการเชื่อมต่อระหว่างไฟโคบิลิโซมกับเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ (b) แสดงตำแหน่งที่อยู่ของสายพอลิเพปไทด์ที่เป็นตัวเชื่อมโยง และ (c) แสดงการจัดเรียงตัวของ 3 องค์ประกอบหลักในไฟโคบิลิโซม

ที่มา: MacColl (1998)



ภาพที่ 2.7 (a) โครงสร้างไฟโคไซยาโนไบลิน และ (b) การเชื่อมต่อของไบลินกับอะโพโปรตีน

ที่มา: Hanzawa *et al*., (2002)

ไฟโคไบลิโปรตีนของไซยาโนแบคทีเรียมี 3 ชนิดคือ ไฟโคไซยานิน ไฟโคอิริทริน (Phycoerythrin: PE) และอัลโลไฟโคไซยานิน (Allophycocyanin) ซึ่งพบว่าประมาณร้อยละ 50 ของโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในสาหร่ายสไปรูลิน่า คือ อัลโลไฟโคไซยานิน และ ซี-ไฟโคไซยานิน (Tiensai, 1998) โดยจะพบซี-ไฟโคไซยานินมากกว่าอัลโลไฟโคไซยานิน (Ciferri, 1983)

ตารางที่ 2.6 จำนวนพันธะคู่แบบคอนจุเกตบนโมเลกุลของไบลินที่พบในไซยาโนแบคทีเรีย

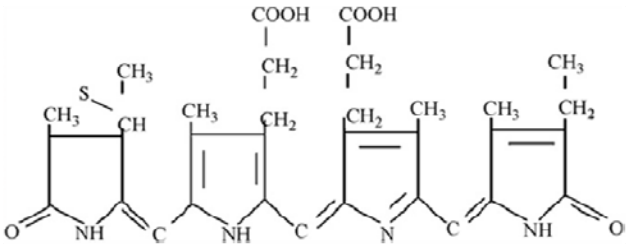
ไบลิน	จำนวนพันธะคู่แบบคอนจุเกต (คู่)
ไฟโคไซยาโนไบลิน (Phycocyanobilin: PCB)	8
ไฟโคอิริโทรไบลิน (Phycoerythrobilin: PEB)	6
ไฟโควิโอโลไบลิน (Phycoviolobilin	7
ไฟโคยูโรไบลิน (Phycourobilin)	5

ที่มา: MacColl (1998)

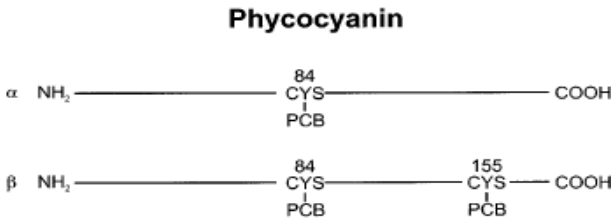
2.4. ซี-ไฟโคไซยานิน (C-Phycocyanin)

2.4.1 โครงสร้างของซี-ไฟโคไซยานิน

ซี-ไฟโคไซยานินประกอบด้วยส่วนที่เป็นอะโพโปรตีน (Apoprotein) และส่วนของไบลิน (Bilin) โดยที่ไบลินจะเป็นสารประกอบเชิงซ้อนมีลักษณะเป็นวงแหวนไพร์รอล (Pyrrole ring) สี่วงเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง (Tetrapyrrole) ส่วนที่เป็นอะโพโปรตีนและไบลินจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไทโออีเทอร์ (Thioether bond) ระหว่างวงแหวนเอของไบลินกับกรดอะมิโนซีสเตอีน (cysteine) ของอะโพโปรตีน (ภาพที่ 2.8) (Sanjiv *et al*., 2008) โมเลกุลของซี-ไฟโคไซยานินประกอบด้วยหน่วยย่อยแอลฟา (α-subunits) และบีตา (β-subunits) โดยปกติแต่ละโมเลกุลของซี-ไฟโคไซยานินจะรวมตัวกันในลักษณะของไตรเมอร์ ($\alpha_3\beta_3$) เฮกซะเมอร์($\alpha_6\beta_6$) หรือโอลิโกมอร์ (Oligomers) แบบอื่น ๆ โดยในแต่ละหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาจะมีไบลินเกาะอยู่กับกรดอะมิโนซีสเตอีนบนอะโพโปรตีนของหน่วยย่อย 1 และ 2 หมู่ ตามลำดับที่ตำแหน่ง α_{84} ของหน่วยย่อยแอลฟา และที่ตำแหน่ง β_{84} และ β_{155} ของหน่วยย่อยบีต้า (MacColl, 1998) ดังแสดงในภาพที่ 2.9 จากการวิเคราะห์โดยใช้ SDS-PAGE พบว่าหน่วยย่อยอัลฟามีขนาดประมาณ 19.5 กิโลดาลตัน ส่วนหน่วยย่อยบีตามีขนาดประมาณ 21.5 กิโลดาลตัน ซึ่งโดยปกติจะพบหน่วยย่อยทั้งสองในปริมาณที่เท่ากัน (Sanjiv *et al*., 2008)



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. platensis*.
ที่มา: Sanjiv *et al*., (2008)

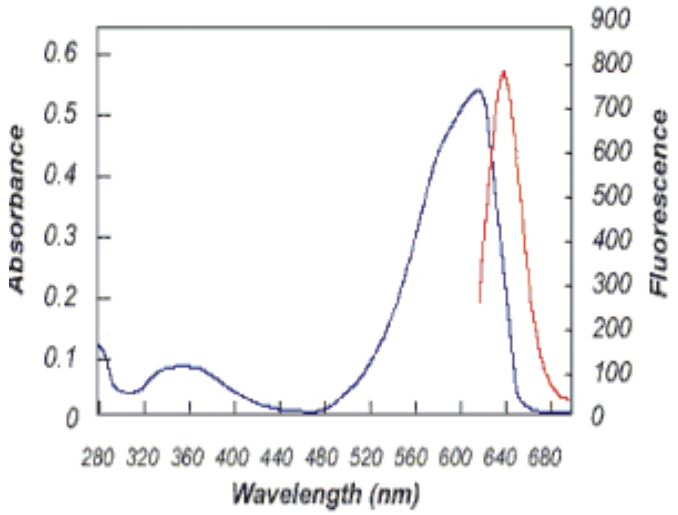


ภาพที่ 2.9 ตำแหน่งการเกิดพันธะโควาเลนท์ระหว่างไบลินกับอะโพโปรตีนของซี-ไฟโคไซยานิน
ที่มา: MacColl (1998)

2.4.2 คุณสมบัติของซี-ไฟโคไซยานิน

2.4.2.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ

ซี-ไฟโคไซยานินเป็นสารประกอบที่สีฟ้า เรืองแสงได้ ละลายน้ำได้ และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ คุณสมบัติเหล่านี้แตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์ วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย วิธีการสกัดซี-ไฟโคไซยานินออกจากเซลล์และกระบวนการหลังการสกัด ซี-ไฟโคไซยานินสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 615-620 นาโนเมตร และมีการปลดปล่อยแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 650 นาโนเมตร (ภาพที่ 2.10) อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการดูดกลืนแสงของซี-ไฟโคไซยานินจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย อุณหภูมิ ความเข้มข้นของโปรตีน และแหล่งที่มาของสาหร่าย (Sanjiv *et al*., 2008)



ภาพที่ 2.10 ช่วงความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงและเรืองแสงของ ซี-ไฟโคไซยานิน
ที่มา: Kommareddy and Anderson (2004)

2.4.2.2 คุณสมบัติทางชีวภาพ

1) คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

คุณสมบัติที่สำคัญที่สุดของซี-ไฟโคไซยานิน คือคุณสมบัติการเป็นสารต้านต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากซี-ไฟโคไซยานินมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐานหลายชนิด โดยสามารถกำจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide) ไฮดรอกซิล (hydroxyl) และแอลกอซิล (alkoxyl) ได้เช่นเดียวกับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl-sulfoxide; DMSO) และทรอลลอกซ์ (trolox) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี โดยที่การกำจัดอนุมูลอิสระเกิดจากส่วนของไฟโคไซยาโนไบลิน (Phycocyanobilin) เป็นหลัก มีรายงานว่าซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากเซลล์สดและเซลล์แห้งของสไปรูลิน่าที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีแนวโน้มในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ในทิศทางเดียวกัน

2) คุณสมบัติต้านการอักเสบบวม (anti-inflammatory capacity)

มีรายงานถึงคุณสมบัติการป้องกันการอักเสบของซี-ไฟโคไซยานินในอุ้งเท้าของหนู (in vivo model) โดยการฉีดเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) เข้าไปในอุ้งเท้าของหนูเพื่อกระตุ้นให้เกิดการอักเสบและเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และเกิดเป็น

อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลขึ้น ผลการทดลองพบว่าซี-ไฟโคไซยานินสามารถกำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (IC_{50} = 0.91 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และแอลกอซิล (IC_{50}= 76 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ในปริมาณ 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีรายงานการรักษาการอักเสบบวมในหนูที่ถูกกระตุ้นให้ลำไส้ใหญ่อักเสบ ก็พบว่าซี-ไฟโคไซยานินสามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์ myeloperoxidase (MPO) และสามารถควบคุมการอักเสบของลำไส้ได้

3) คุณสมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็ง (anticancer capacity)

การศึกษาในหลอดทดลองโดยการวัดการรอดชีวิตของ Ehrlich Ascites Carcinoma Cells (EACC) พบว่าเซลล์ที่ให้ซี-ไฟโคไซยานินมีการรอดชีวิตลดลง เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากสไปรูลิน่าเพิ่มขึ้น การศึกษาในเซลล์ไลน์ (cell line) พบว่าซี-ไฟโคไซยานินสามารถลดการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวขนาดใหญ่ของหนู (Macrophage cell line; RAW264.7) โดยซี-ไฟโคไซยานินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ที่เป็นสาเหตุหลักของการอักเสบและบาดเจ็บของเซลล์

4) คุณสมบัติต้านแบคทีเรียดื้อยา (agent against drug resistant bacteria)

Sarada *et al.,* (2011) รายงานว่าซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จาก *S. platensis* (Nordstedt) Geitler, Oscillatoriaceae ซึ่งผ่านการทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ชนิด DE-52 anion exchange (% C-PC from total protein, 96.35; Absorbance ratios (A620/A280), 4.69; Yield, 46.67) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 50-125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.4.3 การสกัดซี-ไฟโคไซยานิน

ซี-ไฟโคไซยานินเป็นสารที่อยู่ภายในเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลิน่า การสกัดหรือแยกออกมาจำเป็นต้องทำให้ผนังเซลล์แตกก่อนแล้วจึงสกัดซี-ไฟโคไซยานินออกมา ทั้งนี้การสกัดสามารถใช้ได้ทั้งเซลล์สดและเซลล์แห้งแต่เซลล์สดจะให้ผลผลิตของซี-ไฟโคไซยานินมากกว่าการใช้เซลล์แห้ง โดยทั่วไปแล้วการทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตกมีด้วยกัน 3 วิธี คือ การใช้เอนไซม์ วิธีทางเคมี

และวิธีทางฟิสิกส์ (Alkinson *et al.,* 1987) ได้แบ่งวิธีการทำให้เซลล์แตกเพื่อสกัดสารสำคัญที่อยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ออกเป็น 3 วิธี ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการทำให้ผนังเซลล์แตกเพื่อสกัดซี-ไฟโคไซยานินจากเซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่าสามารถทำได้โดยวิธีการทางกายภาพและการย่อยผนังเซลล์ด้วยสารเคมีและเอนไซม์ หรืออาจใช้วิธีการเหล่านี้ร่วมกัน โดยวิธีที่นิยมใช้และให้ผลดีในการปฏิบัติมี 3 วิธี คือการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย การใช้คลื่นอัตราโซนิกและการใช้ไลโซไซม์ ซึ่งแต่ละวิธีมีกลไกในการทำลายผนังเซลล์ดังนี้

2.4.3.1 การแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย (Repeatedly freezing and thawing, RFT)

การทำให้ผนังเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลิน่า แตกโดยการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย เกิดจากผลึกน้ำแข็งและการขยายขนาดของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในระหว่างการแช่เยือกแข็งไปบาดผนังเซลล์แล้วทำให้ผนังเซลล์เกิดรูรั่วเป็นผลทำให้เอนไซม์และโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์แพร่ออกสู่ภายนอกเซลล์ โดยอัตราการแพร่จะขึ้นอยู่กับอัตราการละลายน้ำแข็งและความคงตัวของรูรั่วภายในเซลล์ โดยที่บริเวณผิวนอกจะมีอัตราการละลายน้ำแข็งสูงกว่าบริเวณด้านใน การละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้รูรั่วภายในเซลล์คงตัวได้นานกว่าการละลายโดยใช้อุณหภูมิสูง

2.4.3.2 การใช้คลื่นอัตราโซนิก

การใช้คลื่นอัตราโซนิกที่มีความยาวคลื่นเสียงสูงกว่า 20 กิโลเฮิร์ต จะทำให้เกิดแรงสั่นสะเทือนและเกิดเป็นฟองอากาศขนาดเล็กขึ้นในสารแขวนลอยของสาหร่ายและภายในเซลล์สาหร่าย เรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวว่า “ Cavitation” เมื่อฟองอากาศถูกสร้างขึ้นและมีขนาดใหญ่ขึ้นจนแตกสลาย ผลที่ตามมาคือจะเกิดคลื่นสะท้านอย่างรุนแรง ณ จุดต่างๆ ทั้งภายในเซลล์และนอกเซลล์ของสาหร่าย เป็นผลทำให้เกิดความแตกต่างของแรงเฉือน ณ จุดต่าง ๆ ซึ่งกระทำต่อเซลล์จึงทำให้ผนังเซลล์ฉีกขาดในที่สุด โดยประสิทธิภาพในการทำให้ผนังเซลล์แตกขึ้นอยู่กับความถี่ของคลื่นเสียงที่ใช้ อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้คลื่นอัตราโซนิกร่วมกับการใช้เม็ดทรายละเอียดจะให้ประสิทธิภาพในการทำลายผนังเซลล์ดีกว่าการใช้คลื่นอัตราโซนิกเพียงอย่างเดียว (Viskari and Colyer, 2003)

2.4.3.3 การใช้ไลโซไซม์

ไลโซไซม์จะย่อยสลายผนังเซลล์ชั้น LII ซึ่งเป็นชั้นที่มีความแข็งแรงมากที่สุดของผนังเซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่า โดยไลโซไซม์จะตัดพันธะ β-1,4-glucosidic ในโมเลกุลของเพพติโดไกลแคน (Hatti-Kaul and Mattiasson, 2003) อย่างไรก็ตามการจะทำลายผนังเซลล์ชั้นดังกล่าวได้นั้นจะต้องทำลายผนังเซลล์ชั้นนอกก่อนเพื่อเปิดทางให้ไลโซไซม์สามารถเข้าถึงชั้นของเพพติโดไกลแคนได้ เช่น การใช้สารลดแรงตึงผิว หรือสารกำจัดไอออน เป็นต้น

Sarada *et al.,* (1999) กล่าวว่าการทำแห้งสาหร่ายสไปรูลิน่าโดยวิธีการต่าง ๆ จะทำให้ซี-ไฟโคไซยานินสูญเสียไปประมาณร้อยละ 45-50 เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์สด ด้วยเหตุนี้การสกัดซี-ไฟโคไซยานินจากเซลล์สดจึงมีความเหมาะสมมากกว่าการใช้เซลล์แห้ง Eriksen (2008) กล่าวว่าการสกัดซี-ไฟโคไซยานินโดยใช้สาหร่ายแห้งจะสกัดโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง7 หรือสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

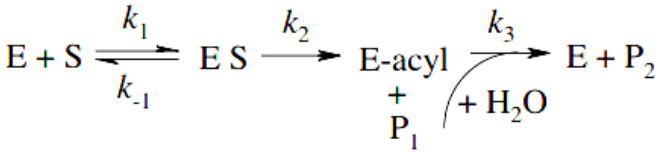
ในปี ค.ศ. 2005 Doke ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. platensis* อบแห้ง พบว่าสามารถสกัดซี-ไฟโคไซยานินได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ การสกัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตของซี-ไฟโคไซยานินเท่ากับ 80 มิลลิกรัมต่อกรัม ในขณะที่การสกัดโดยใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตของซี-ไฟโคไซยานินต่ำกว่าประมาณ 4.8 เท่าตัว (16.5 มิลลิกรัมต่อกรัม)

Soundarapanadian and Vasanthi (2008) สกัดซี-ไฟโคไซยานินจาก *S. platensis* อบแห้ง โดยใช้เซลล์ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 10 20 และ 30 วัน โดยศึกษาวิธีการสกัด 4 วิธี คือ การใช้ไนโตรเจนเหลว การแช่แข็งสลับกับการละลาย (Freezing and thawing) การใช้คลื่นอัลตราโซนิกและการใช้ไลโซไซม์ พบว่าการสกัดโดยใช้ไนโตรเจนเหลวจะให้ปริมาณซี-ไฟโคไซยานินสูงที่สุด ส่วนการใช้คลื่นอัลตราโซนิกจะให้ซี-ไฟโคไซยานินน้อยที่สุดและพบว่าสาหร่ายที่มีอายุมากจะมีการสะสมซี-ไฟโคไซยานินมากกว่าสาหร่ายที่มีอายุน้อย

2.5 เอนไซม์โปรติเอส (Protease)

โปรติเอส (proteases) เป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรไลติกเอนไซม์ (hydrolytic enzyme) จัดอยู่ใน Class E.C.3.4.-.- หรือที่รู้จักกันในชื่อ peptidyl-peptide hydrolases เป็นเอนไซม์ที่ทำ

หน้าที่ย่อยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) หรือพันธะเอไมด์ (amide bond) ในโมเลกุลของโปรตีน จัดเป็นเอนไซม์ประเภท เอนโดเพปติเดส (endopeptidase) โดยเอนไซม์โปรติเอสสามารถย่อยสลายเอไมด์ (amide) หรือ พันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ได้ด้วยกลไก 3 ขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 กลไกการเร่งปฏิกิริยาอย่างง่ายโดยเอนไซม์โปรติเอส
ที่มา: Foukis *et al*., (2012)

เอนไซม์โปรติเอสมีความสำคัญอย่างมากต่อการย่อยสลายวัตถุดิบประเภทโปรตีน นิยมใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น การผลิตนมหรือผลิตภัณฑ์นม การผลิตเบียร์และการเพิ่มความนุ่มของเนื้อ เป็นต้น (Rao *et al*., 1998) โดยการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระยะแรกผลิตจากพืชและสัตว์ ปัจจุบันนิยมผลิตจากจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อรา และแบคทีเรีย เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตได้เป็นผลิตภัณฑ์นอกเซลล์จึงสกัดแยกออกมาได้ง่าย อีกทั้งยังให้ผลได้ของการผลิตสูงและมีความคุ้มค่างทางเศรษฐศาสตร์มากกว่า โดยร้อยละ 70 ของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์

2.5.1 ประเภทของเอนไซม์โปรติเอส

2.5.1.1 แอลคาไลน์โปรติเอส (Alkaline protease) หรือเซอรีนโปรติเอส (serine protease) (EC 3.4.21)

เอนไซม์ชนิดนี้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง (alkali protease) ในช่วง พีเอช 7-11 โดยมีกรดอะมิโนเซอรีนและฮีสติดีนอยู่ที่บริเวณเร่ง ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น ซับติไลซิน คาร์ลสเบิร์ก (subilisin carisberg) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ซึ่งนิยมใช้กันมากในอุตสาหกรรมสารซักฟอก นอกจากนี้เอนไซม์บางชนิดในกลุ่มนี้ยังสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง สารลดความตึงผิว (surfactants) และสารที่เป็นตัวแยก (sequestering agents) ซึ่งเป็นส่วนผสมของผงซักฟอกได้ด้วย เอนไซม์จะถูกยับยั้งได้โดย

diisopropyl-phospho-fluoride (DFP) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ OH- ของ serine ในบริเวณเร่งของเอนไซม์

2.5.1.2 นิวทรัลโปรติเอส (Neutral protease) หรือเมทัลโลโปรติเอส (metalloprotease) (EC 3.4.22)

เอนไซม์กลุ่มนี้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง (neutral protease) ในช่วงพีเอช 6.0-7.5 โดยมีกรดอะมิโนซีสเตอีนและฮีสติดีนอยู่ที่บริเวณเร่ง เช่น เอนไซม์ปาเปน (papain) เอนไซม์โบรมีเลน (bromelain) และเอนไซม์ฟิซิน (ficin) เป็นต้น เอนไซม์กลุ่มนี้โมเลกุลจะประกอบด้วยอะตอมของโลหะสังกะสี นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B.subtilis*, B. *megaterium*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus* และเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ตัวอย่างเช่น เอนไซม์เทอร์โมไลซิน (Thermolysin) จาก *B. stearothermophilus*

2.5.1.3 แอซิดโปรติเอส (acid protease) (EC 3.4.23)

เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในสภาวะกรด ในช่วงพีเอช 3-5 โดยมีกรดอะมิโนแอสปาติกอยู่ที่บริเวณเร่ง ส่วนใหญ่ผลิตจากเชื้อรา แบ่งป็น 2 กลุ่มย่อย คือ 1) กลุ่ม pepsin-like ซึ่งผลิตได้จากเชื้อราสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* และ 2) กลุ่ม rennin-like ซึ่งผลิตได้จากราสกุล *Mucor* และ *Endothia* เอนไซม์กลุ่มนี้นิยมใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เนยแข็ง และ ซีอิ๊ว เป็นต้น

2.5.1.4 เมทัลเอนโดเปปติเดส (Metalloendopeptidases) (EC 3.4.24)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้ต้องการไอออนของโลหะ ในการเร่งปฏิกิริยาที่บริเวณเร่งหรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลาย เอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วยสารจับไอออนของโลหะ (metal chelating agents) เช่น ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether) N, N, N, N-tetraacetic acid (EGTA) และ 1, 10 – phenanthroline โดยเอนไซม์จะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 6.5-7.5

2.5.1.5 โปรติเอสชนิดที่ยังไม่รู้ถึงกลไกการเร่งปฏิกิริยา (EC 3.4.99)

2.5.2 การประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรม

2.5.2.1 อุตสาหกรรมสารซักฟอก

ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกจะมีการนำเอนไซม์โปรติเอสมาใช้เป็นส่วนประกอบของผงซักฟอกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการขจัดคราบสกปรก เพื่อทำให้คราบต่าง ๆ ที่เกาะอยู่ตามเสื้อผ้าถูกขจัดออกได้ง่ายขึ้น เช่น เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

2.5.2.2 อุตสาหกรรมฟอกหนัง

มีการนำโปรติเอสมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง เพื่อกำจัดขนสัตว์ออกจากหนังสัตว์ หนังสัตว์ที่ได้จะนุ่มและมีคุณภาพดีกว่าหนังที่ฟอกด้วยโซเดียม ซัลเฟต (sodium sulphate)

2.5.2.3 อุตสาหกรรมอาหาร

อุตสาหกรรมที่มีการนำเอนไซม์โปรติเอสไปใช้อย่างแพร่หลายคือ อุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง โดยจะใช้เอนไซม์ chymosin หรือ rennin ในกระบวนการผลิต เนื่องจากมีความจำเพาะต่อการย่อยพันธะเปปไทด์ (Phe105-Met106 bond) ของโปรตีนเคซีนในนม โดยจะย่อยเคซีนได้เป็น para-**K** -casein และ macroglycopeptide นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *A. oryzae* ในการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของแป้งในขณะนวด เพื่อให้แป้งนวดง่ายและมีการจับตัวเป็นก้อน ส่วนการผลิตซีอิ๊วจะมีการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไปในกระบวนการหมักเพื่อเร่งกระบวนการหมัก ในขณะที่อุตสาหกรรมการผลิตซุปก้อนหรือผงซุปเข้มข้น จะใช้เอนไซม์โปรติเอสย่อยเนื้อสัตว์ เพื่อให้ได้กลิ่นและรสที่ดีขึ้น (Kumar and Takagi, 1999)

2.5.2.4 ทางการแพทย์

มีการนำเอนไซม์โปรติเอสร่วมกับเอนไซม์ ไลเปส และอมัยเลส เพื่อใช้เป็นส่วนผสมของยาเม็ดที่เรียกว่า pancretin เพื่อรักษาผู้ป่วยที่มีอาการผิดปกติของตับอ่อน เพื่อช่วยในการย่อยอาหาร นอกจากนี้ยังมีการใช้โปรติเอสที่เรียกว่า urokinase ในผู้ป่วยลิ่มเลือดอุดตัน โดยฉีดเข้าไปในหลอดเลือดเพื่อทำหน้าที่ละลายลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหัวใจ

นอกจากนี้ยังมีการใช้ bromelain รักษาการอักเสบของเนื้อเยื่อ collagenase ใช้รักษาโรคไขสันหลังอักเสบ และ chymotrypsin ใช้ในการผ่าตัดเลนส์ตา เป็นต้น

2.6 การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทะกุจิ (Taguchi Method)

การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทะกุจิถูกพัฒนาโดย Dr. Genichi Taguchi เมื่อปี ค.ศ. 1980 ซึ่งเป็นกลไกทางวิทยาศาสตร์สำหรับการกำหนดค่า และการปรับปรุงเครื่องมือ กระบวนการ และวัตถุดิบที่เกี่ยวข้องกับการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ให้ง่าย หรือสะดวกขึ้นการปรับปรุงนี้มีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงลักษณะ และลดจำนวนของความผิดพลาดลงพร้อม ๆ กัน โดยศึกษาถึงการควบคุมตัวแปรหลักในกระบวนการ และการหาสภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง หรือออกแบบการทดลองเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด (Madhav, 1989) วิธีการทะกุจิออกแบบการทดลองโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ fractional factorial ร่วมกับ orthogonal array (OA) (Box *et al*.,1988) ซึ่งเป็นตารางที่ประกอบไปด้วยการทดลอง และระดับของปัจจัยในแต่ละการทดลอง มีหลายประเภทขึ้นกับจำนวนปัจจัยและระดับของปัจจัยนั้น โดย OA จะมีจำนวนน้อยที่สุดเท่ากับ L_4 (Lochner and Matar, 1990) แสดงตัวอย่าง OA (L_4) ดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 L_4 (2^3) Orthogonal array

ชุดการทดลอง	ปัจจัย		
	A	B	C
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

ที่มา: Roy (2001)

ซึ่งเทคนิคนี้ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน และในขั้นตอนทั้งหมดสามารถจัดกลุ่มใหญ่ ๆ ออกได้ 3 กลุ่ม (Madhav, 1989) คือ

1. การออกแบบการทดลอง (Designing of experiment : DOE)

1.1 บ่งชี้หน้าที่หลัก ผลข้างเคียง และแบบ หรือชนิดของความผิดพลาด

1.2 บ่งชี้ปัจจัยรบกวน และสภาวะที่ใช้ในการทดสอบสำหรับการคำนวณการเสื่อมคุณภาพ

1.3 บ่งชี้ลักษณะของคุณภาพที่สังเกตได้ และหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการทดลอง

1.4 บ่งชี้ปัจจัยควบคุม และระดับต่าง ๆ ของปัจจัย

1.5 ออกแบบการทดลองแบบเมทริกซ์ และการวิเคราะห์ข้อมูลการทดลอง

2. การทำการทดลอง (Conducting experiment)

ทำการทดลองโดยใช้การทดลองแบบเมทริกซ์

3. การวิเคราะห์ และการยืนยันผลการทดลอง (Analyzing and confirming predicted result)

3.1 การวิเคราะห์ข้อมูล ทำนายระดับที่เหมาะสมของปัจจัยควบคุม และทำนายการทดลองภายใต้ระดับเหล่านี้

3.2 ยืนยันผลการทำนาย และออกแบบการทดลองต่อไป

การวัดค่าในวิธีการทากุชิจะแสดงในรูปของอัตราส่วน Signal/Noise (อัตราส่วน S/N) ซึ่งถูกใช้เพื่อวัดอิทธิพลของ noise factor (ตัวแปรที่ไม่สามารถควบคุมได้ในกระบวนการ) ที่มีต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ หรือกระบวนการ โดยอาศัยการวัดลักษณะของคุณภาพ (quality characteristic, QC) ซึ่งสามารถแสดงถึงความต้องการการเปลี่ยนแปลงของผลการทดลองที่ต้องการต่างกันออกไป ประกอบด้วย 3 รูปแบบ ดังนี้ 1. QC = B (Bigger is better) 2. QC = S (Smaller is better) และ 3. QC = N (Nominal is best) นอกจากนี้ วิธีการทะกุจิยังนำเอาการวิเคราะห์ความแปรปวนทางสถิติ (analysis of variance, ANOVA) มาใช้เพื่อพิจารณาอิทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีผลต่อการทดลองที่ได้

2.5 กรอบแนวคิดในการวิจัย

กากชีวมวลเหลือทิ้งของการสกัดรงควัตถุซี-ไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่า ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็นที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย รวมถึงคาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ซุปสาหร่ายสไปรูลิน่าสกัดเข้มข้นและพร้อมดื่มที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เหมาะสมต่อผู้บริโภคที่รักสุขภาพซึ่งนิยมบริโภคอาหารฟังก์ชันเพื่อสุขภาพ