บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าเพื่อการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน

การสร้างชีวมวลและการสะสมซี-ไฟโคไซยานินของสาหร่ายสไปรูลิน่า ขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมทางกายภาพและเคมีหลายประการ อาทิ สายพันธุ์ของสาหร่าย อุณหภูมิ ความเข้มแสง คุณภาพแสง ระยะเวลาในการให้แสง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของเกลือ อัตราการเติมอากาศ อัตราการเติมคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้นของไนโตรเจน อายุของกล้าเชื้อ ปริมาณกล้าเชื้อ และการกวนผสม เป็นต้น ซึ่งพบว่าปัจจัยที่สำคัญที่สุดต่อการสะสมซี-ไฟโคไซยานิน คือ ความเข้มแสงและความเข้มข้นของไนโตรเจน (Nomsawai et al., 1999.) จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina maxima* IFRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาด 250 ลิตร โดยใช้อาหาร Modified zarrouk´s medium (ความเข้มข้นเริ่มต้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 10 กรัมต่อลิตร) เป็นอาหารเพาะเลี้ยง (ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นประมาณ 8.4) ในระหว่างการเพาะเลี้ยงควบคุมความเข้มแสงให้อยู่ในช่วงที่ 15-20 กิโลลักซ์ โดยใช้ม่านพรางแสง (อุณหภูมิช่วงเช้า 27-29 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิช่วงบ่าย 29-34 องศาเซลเซียส) พบว่าการเพาะเลี้ยงรอบแรก (Run 1) ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงประมาณ 7 วัน โดยสาหร่ายสไปรูลิน่าจะมีการเจริญเติบโตและสะสมซี-ไฟโคไซยานินไว้ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 4.1) เมื่อพิจารณาพารามิเตอร์ในเทอมของการเจริญเติบโต ได้แก่ ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (Optical density: OD_{560}) ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight) และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (Total chlorophyll) (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1 – 4.3) พบว่าให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน โดยทุกพารามิเตอร์มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสไปรูลิน่ามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในวันที่ 6 และ 7 ของการเพาะเลี้ยงจะให้ค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวสูงสุด โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.791-0.818, 0.701-0.725 กรัมต่อลิตร และ 10.314-10.585 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางไคเนติกส์ของการเจริญเติบโต พบว่าสาหร่ายสไปรูลิน่ามีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; μ) ระยะเวลาทวีคูณ (Doubling time: t_d) และอัตราการผลิตเซลล์เชิงปริมาตร (Volumetric cell productivity: Q_x) เท่ากับ 0.208 ต่อวัน 3.336 วัน และ 0.085 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเกิดจากการที่สาหร่ายสไปรูลิน่ามีการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่มาจากการแตกตัวของไบคาร์บอเนตที่มีอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง ในกระบวนการสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโต เป็นผลให้เกิดการสะสมของคาร์บอเนต (CO_3^{2-}) ในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งคาร์บอเนตดังกล่าวจะไปทำปฏิกิริยากับ H^+ ที่ได้จากการแตกตัวของน้ำ เพื่อให้เกิดเป็น HCO_3^- สำหรับใช้ในการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ให้ไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงต่อไป ผลลัพธ์ที่ได้คือมีปริมาณ OH^- เพิ่มขึ้น ในขณะที่ H^+ ลดลง ดังนั้นเมื่อเริ่มมีการสังเคราะห์แสงค่าความเป็นกรด-ด่างจึงมีค่าเพิ่มสูงขึ้น จากผลการทดลองพบว่าเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาใน

การเพาะเลี้ยงวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงได้เท่ากับ 9.97 (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.4) โดยทั่วไปแล้วสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน สาหร่ายส่วนมากจะเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่มีสภาพเป็นด่าง โดยค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลกระทบค่อนข้างน้อยต่อการเจริญเติบโตเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงที่สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของสไปรูลิน่าจะอยู่ในช่วง 8.3-11.0

เมื่อพิจารณาพารามิเตอร์ในแง่ของสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโต ได้แก่ ปริมาณไนเตรททั้งหมด (Total nitrate concentration) และปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total phosphorus concentration) พบว่ามีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.5-4.6) แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสไปรูลิน่ามีการนำสารอาหารดังกล่าวไปใช้ในการเจริญเติบโต จากผลการทดลองพบว่าอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงดังกล่าวยังคงมีปริมาณไนเตรทและฟอสฟอรัสเหลืออยู่ประมาณ 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการนำอาหารเพาะเลี้ยงดังกล่าวมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในรอบถัดไป โดยเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 1 (วันที่ 7) วิเคราะห์ปริมาณไนเตรททั้งหมด และปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในอาหารเพาะเลี้ยงได้เท่ากับ 1.124 และ 7.687 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณโปรตีนทั้งหมดพบว่ามีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้น โดยเมื่อเริ่มต้นเพาะเลี้ยงและเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 1 สาหร่ายจะมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 36.591 และ 28.333 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.8) สำหรับปริมาณ ซี-ไฟโคไซยานินทั้งหมด (Total C-phycocyanin) พบว่าจะมีการสะสมเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยในวันที่ 5-6 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าจะมีการสะสมซี-ไฟโคไซยานินสูงสุดประมาณ 26 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 110 มิลลิกรัมต่อกรัม (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.9-4.10) โดยมีอัตราการผลิตซี-ไฟโคไซยานินเชิงปริมาตร (Volumetic C-PC productivity; Q_P) และอัตราจำเพาะของการเกิดซี-ไฟโคไซยานิน (Specific C-PC productivity; q_S) เท่ากับ 1.125 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และ 2.529 มิลลิกรัมต่อกรัมต่อวัน ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) เช่นเดียวกับปริมาณพอลิเมอร์นอกเซลล์ (Extracellular polymeric substances; EPS) ก็พบว่ามีการสะสมมากขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเช่นกัน โดยในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงมีการสะสมของพอลิเมอร์นอกเซลล์สูงสุดเท่ากับ 24.611 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.11)

การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำอาหารเหลวที่เหลือจากการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 1 (Run 1) นำกลับมาเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าเพื่อการผลิตซี-ไฟโคไซยานินในรอบที่ 2 (Run 2) และรอบที่ 3 (Run 3) โดยมีการเติมโซเดียมไนเตรท (คำนวณปริมาณโซเดียมไนเตรท ที่ต้องเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงจากน้ำหนักสาหร่ายแห้งที่ได้ โดยกำหนดความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทในอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร) แล้วเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตลงไปในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ในรอบแรกและรอบที่ 2 เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 2 และรอบที่ 3 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า สามารถนำอาหารเพาะเลี้ยงกลับมาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าได้อีก 1 รอบเท่านั้น ทั้งนี้ต้องมีการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (โซเดียมไบคาร์บอเนต และโซเดียมไนเตรท) ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงดังกล่าวด้วย เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสะสมซี-ไฟโคไซยานินของสาหร่ายสไปรูลิน่า จากการสังเกตพบว่าอาหารเหลวที่นำกลับมาใช้ในการเพาะเลี้ยง

ในรอบที่ 2 และรอบที่ 3 จะมีสีเข้มมากขึ้น ตามลำดับ ซึ่งเกิดจากการที่สาหร่ายสไปรูลิน่าขับสารประกอบต่าง ๆ ออกมาสู่นอกเซลล์ในระหว่างการเจริญเติบโตแล้วมีการสะสมไว้ในอาหารเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลิน่าในการเพาะเลี้ยงรอบที่ 2 และ 3 พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ช้ามากและเกือบไม่มีการเจริญเติบโตเลยเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 1 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2 และ ตารางที่ 4.3) โดยพบว่าสาหร่ายสไปรูลิน่าจะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 1 ประมาณ 2.2 เท่าตัว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.095 ต่อวัน และมีระยะเวลาทวีคูณนานกว่าการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 1 ประมาณ 2.2 เท่าตัว โดยมีค่าเท่ากับ 7.319 วัน (ตารางที่ 4.4) การที่สาหร่ายสไปรูลิน่ามีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 1 นั้นน่าจะมีสาเหตุหลักมาจากการที่อาหารเหลวที่นำกลับมาใช้เพาะเลี้ยงนั้น ยังคงขาดสารอาหารบางชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ของเซลล์แม้จะมีการเติมแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนลงไปแล้วก็ตาม อีกทั้งอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงน่าจะมีการสะสมของสารชีวเคมีบางอย่างที่เป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งสาหร่ายขับออกมานอกเซลล์มากขึ้น โดยจะเห็นได้จากปริมาณพอลิเมอร์นอกเซลล์ที่มีการสะสมมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในการเพาะเลี้ยงรอบที่ 2 (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.11) โดยในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.424 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณคลอโรฟิลล์รวม 6.489 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 1 ประมาณ 1.7 และ 1.6 เท่าตัว ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาปริมาณซี-ไฟโคไซยานิน พบว่าจะมีปริมาณลดลงตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้น แสดงให้เห็นว่าในการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 2 นี้น่าจะมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อการลดลงของปริมาณซี-ไฟโคไซยานิน นอกเหนือไปจากแหล่งไนโตรเจนเพราะการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 2 นี้มีมีปริมาณไนเตรทเริ่มต้นมากเพียงพอ อีกทั้งยังพบว่ามีอัตราการลดลงของไนเตรทช้ามาก เช่นเดียวกับปริมาณฟอสฟอรัสก็พบว่ามีแนวโน้มคงที่ตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง (การเพาะเลี้ยงในรอบที่ 2 นี้ไม่มีการเติมแหล่งฟอสฟอรัส โดยเมื่อเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงและสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 2 วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้เท่ากับ 6.630 และ 6.437 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) การลดลงของซี-ไฟโคไซยานินในการเพาะเลี้ยงรอบที่ 2 อาจมีสาเหตุมาจากสภาพอาหารที่นำกลับมาใช้เพาะเลี้ยงไม่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลิน่าตลอดจนปริมาณสารอาหารหรือแร่ธาตุต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการสะสมซี-ไฟโคไซยานินมีปริมาณจำกัด ประการที่สองคือความเข้มแสงที่เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงจะมีผลต่อการสะสมซี-ไฟโคไซยานินภายในเซลล์ จากรายงานวิจัยของ Nomsawai, P., Marsac, N.T., Thomas, J.C., Tanticharoen, M. and S. Cheevadhanarak. (1999) พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในสภาวะที่ความเข้มแสงสูงจะส่งผลให้สาหร่ายสไปรูลิน่ามีการสะสมคลอโรฟิลล์ เอ ไฟโคบิลิโปรตีน โปรตีนละลาย โปรตีนรวม รวมถึงองค์ประกอบอื่น ๆ ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงภายในสภาวะที่มีความเข้มแสงน้อยกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มแสงมีผลต่อขนาดและจำนวนของไฟโคบิลิโซม รวมทั้งองค์ประกอบของไฟโคบิลิโซมด้วย การเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงสูงจะเป็นผลให้โปรตีนขนาด 33 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนสำหรับการสร้าง rod-rod linker ของโครงสร้างของไฟโคบิลิโซมภายในเซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่าขาดหายไป แต่จะพบโปรตีนที่มีขนาด 29 kDA แทน ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าวนี้ สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

สไปรูลิน่าในงานวิจัยนี้เป็นการเพาะเลี้ยงแบบระบบเปิดกลางแจ้ง จึงประสบกับปัญหาสภาวะอากาศแปรปรวน ซึ่งเป็นการยากที่จะควบคุมให้ความเข้มแสงในระหว่างการเพาะเลี้ยงคงที่ตลอดเวลา สำหรับการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 3 พบว่าสาหร่ายสไปรูลิน่าสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 1 วันเท่านั้น (ตารางที่ 4.3) โดยพิจารณาได้จากค่าความขุ่น น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณคลอโรฟิลล์รวม ซึ่งพบว่ามีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับเริ่มต้น อีกทั้งปริมาณไนเตรทและฟอสฟอรัสก็มีแนวโน้มคงที่ด้วย รวมถึงปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่มีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด

จากผลการทดลองในขั้นต้นแสดงให้เห็นว่าการนำอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่ากลับมาเพาะเลี้ยงใหม่สามารถเพาะเลี้ยงได้อีกเพียง 1 รอบเท่านั้น โดยที่การเติมสารอาหารลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงรอบที่ 2 ไม่ควรให้ความสำคัญเฉพาะแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเพียงเท่านั้น หากแต่ควรพิจารณาถึงสารอาหารหรือแร่ธาตุอื่น ๆ ร่วมด้วย

ตารางที่ 4.1 ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. maxima* IFRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟ ในอาหาร Modified Zarrouk´s medium ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 10 กรัมต่อลิตร ในรอบที่ 1

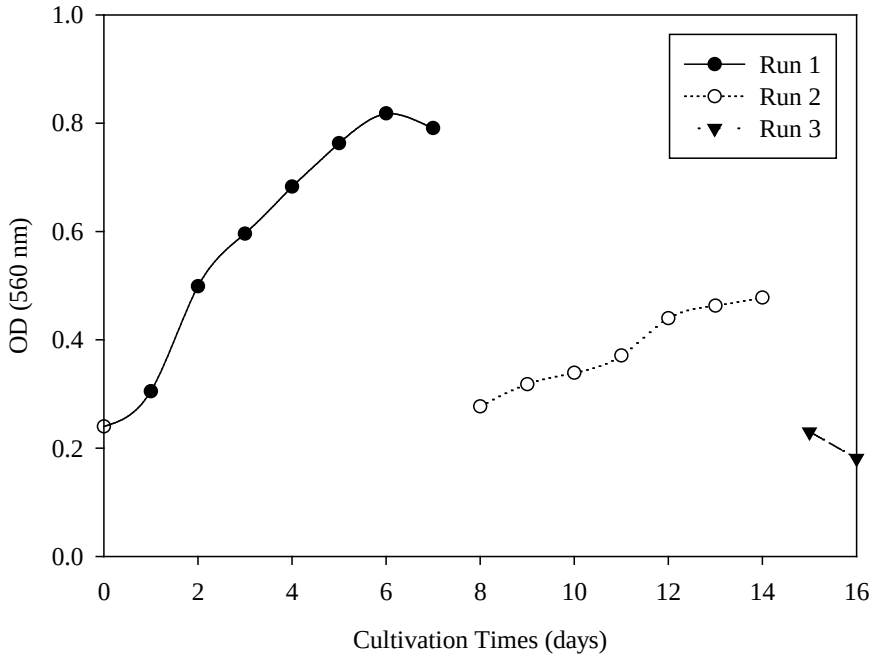
Time (day)	OD (560 nm)	Dry cell wieght (g/L)	Total Chlorophyll (mg/L)	pH	Nitrate Conc. (mg/L)	Phosphorus Conc. (mg/L)	Total alkalinity (mg/L)	Protein (%)	C-PC (mg/L)	C-PC (mg/g)	EPS (mg/L)
0	0.240	0.213	3.412	8.396	2.915	13.531	3,253.333	36.591	20.514	86.923	0.444
1	0.305	0.271	4.056	9.407	2.661	12.435	2,373.333	31.456	18.335	77.692	2.278
2	0.499	0.443	6.035	9.593	2.393	11.090	2,303.333	26.542	17.851	75.641	2.528
3	0.596	0.529	7.455	9.843	2.092	9.936	1,946.667	27.211	22.571	95.641	3.528
4	0.683	0.606	9.095	9.853	1.688	9.379	2,013.333	28.875	25.294	107.719	6.944
5	0.763	0.677	9.927	9.893	1.469	8.783	1,920.000	28.889	26.141	110.769	12.111
6	0.818	0.725	10.585	9.940	1.337	8.168	1,840.000	29.556	26.020	110.256	16.361
7	0.791	0.701	10.314	9.970	1.124	7.687	1,636.667	28.333	23.539	99.744	24.611

ตารางที่ 4.2 ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. maxima* IFRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 2 ที่มีการนำอาหารเพาะเลี้ยงหลังจากการแยกเซลล์ออกไปแล้วในรอบที่ 1 มาใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยมีการคำนวณปริมาณโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ที่ต้องเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงจากน้ำหนักสาหร่ายแห้งที่ได้ (กำหนดให้ใช้ในปริมาณ 2.5 กรัมต่อลิตร) แล้วเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตลงไปในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร

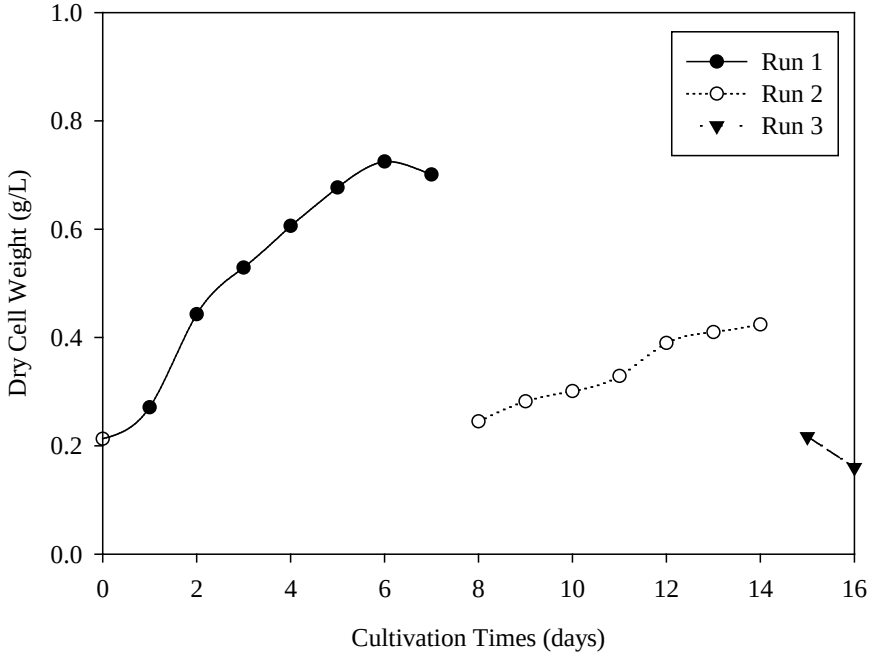
Time (day)	OD (560 nm)	Dry cell wieght (g/L)	Total Chlorophyll (mg/L)	pH	Nitrate Conc. (mg/L)	Phosphorus Conc. (mg/L)	Total alkalinity (mg/L)	Protein (%)	C-PC (mg/L)	C-PC (mg/g)	EPS (mg/L)
0	0.277	0.245	3.535	9.100	3.565	6.630	6,510.000	38.708	55.529	105.385	6.944
1	0.318	0.282	4.390	9.380	3.446	7.264	5,780.000	37.566	40.846	90.385	8.861
2	0.339	0.301	4.520	9.550	3.242	6.957	5,186.667	35.767	42.840	92.564	13.778
3	0.371	0.329	4.564	9.640	3.052	6.630	4,920.000	37.434	22.410	78.038	16.861
4	0.440	0.390	5.603	9.713	2.832	7.072	4633.333	38.120	39.582	88.974	17.361
5	0.463	0.410	6.614	9.800	2.583	6.707	4546.667	39.235	38.787	88.077	16.278
6	0.478	0.424	6.489	9.850	2.333	6.437	2856.667	40.120	27.837	74.651	49.778

ตารางที่ 4.3 ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. maxima* IFRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 3 ที่มีการนำอาหารเพาะเลี้ยงหลังจากการแยกเซลล์ออกไปแล้วในรอบที่ 2 มาใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยมีการคำนวณปริมาณโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ที่ต้องเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงจากน้ำหนักสาหร่ายแห้งที่ได้ (กำหนดให้ใช้ในปริมาณ 2.5 กรัมต่อลิตร) แล้วเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตลงไปในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร

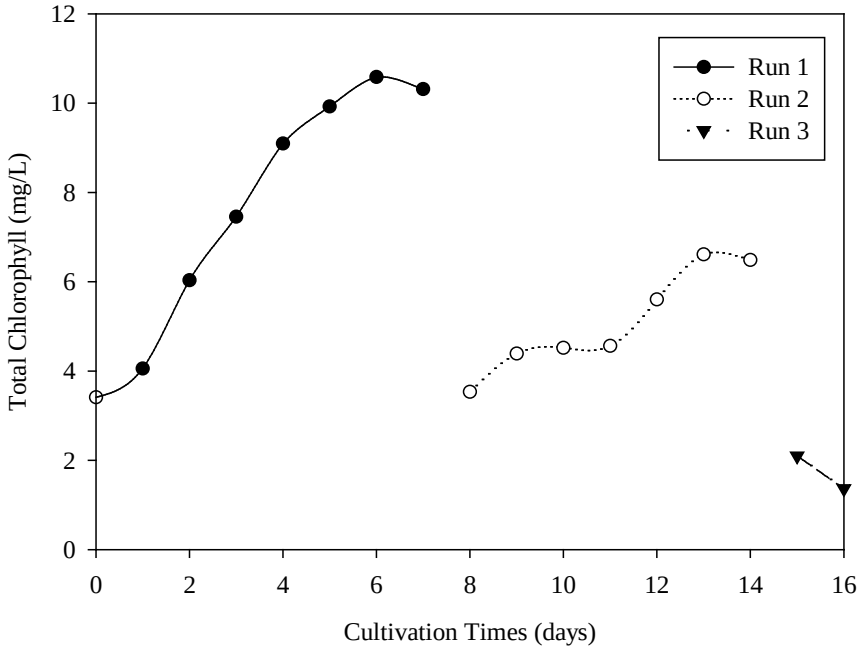
Time (day)	OD (560 nm)	Dry cell wieght (g/L)	Total Chlorophyll (mg/L)	pH	Nitrate Conc. (mg/L)	Phosphorus Conc. (mg/L)	Total alkalinity (mg/L)	Protein (%)	C-PC (mg/L)	C-PC (mg/g)	EPS (mg/L)
0	0.200	0.217	2.099	9.455	3.503	6.572	4,713.333	37.885	9.797	66.538	31.778
1	0.181	0.160	1.365	9.517	3.342	6.860	4,486.667	29.334	7.030	43.846	33.194



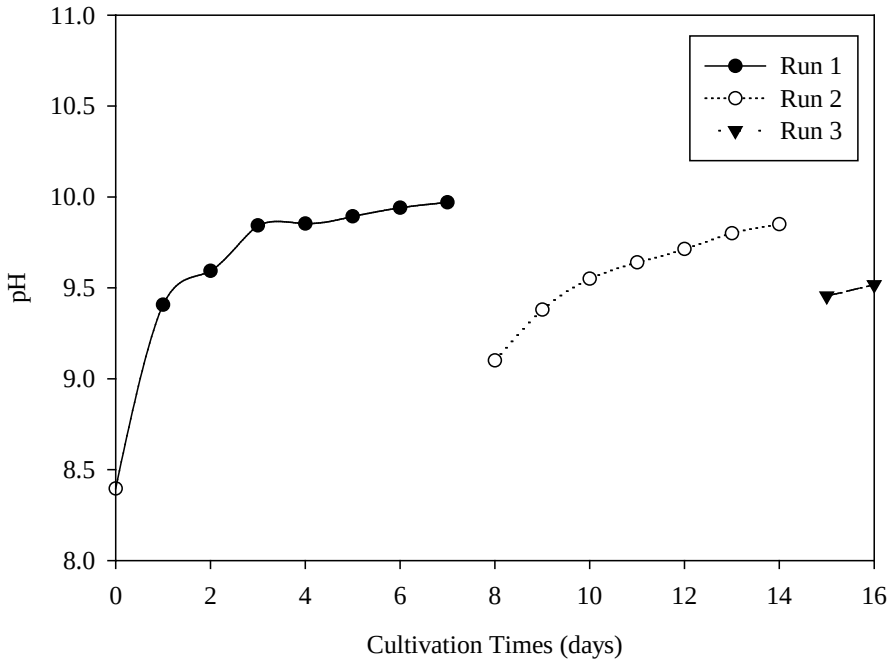
ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (Optical density: OD_{560}) ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *S. maxima* IFRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 1-3



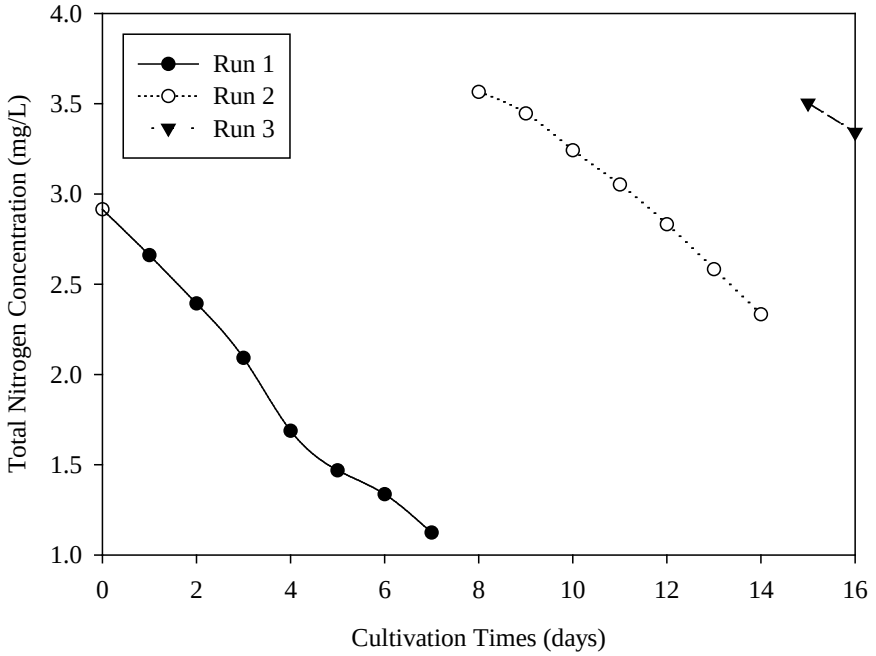
ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight) ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *S. maxima* IFRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 1-3



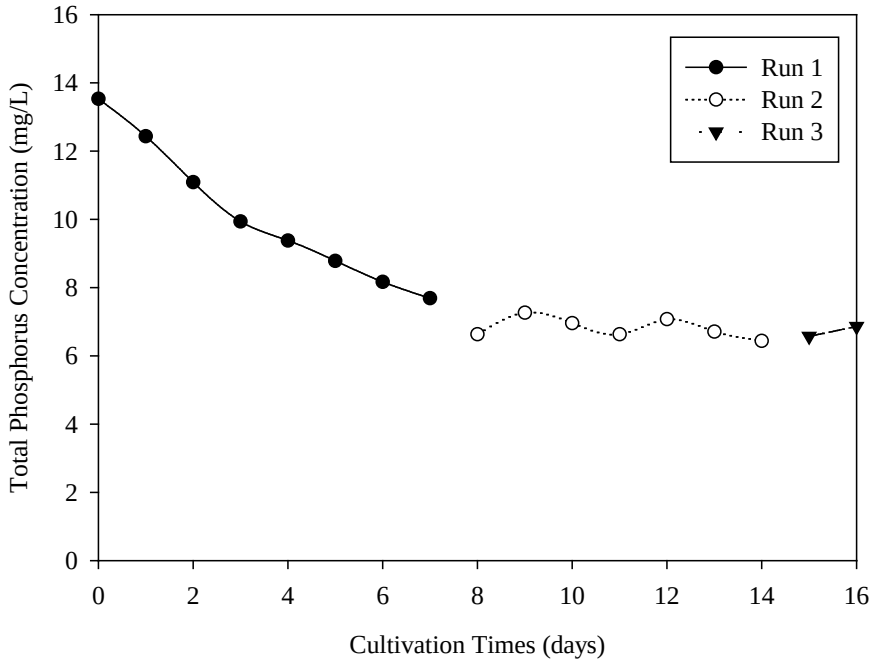
ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (Total chlorophyll) ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *S. maxima* IFRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 1-3



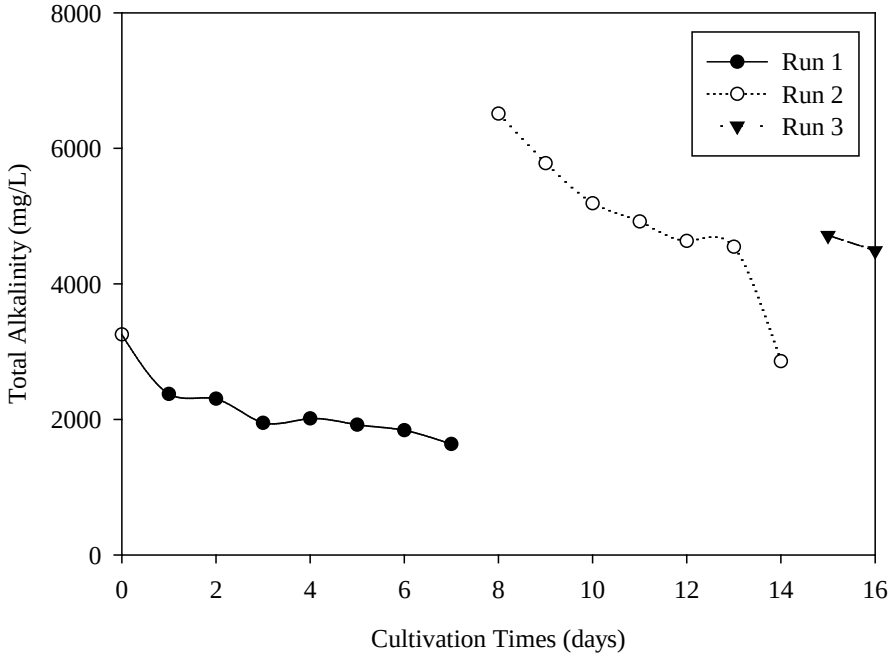
ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *S. maxima* IFRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 1-3



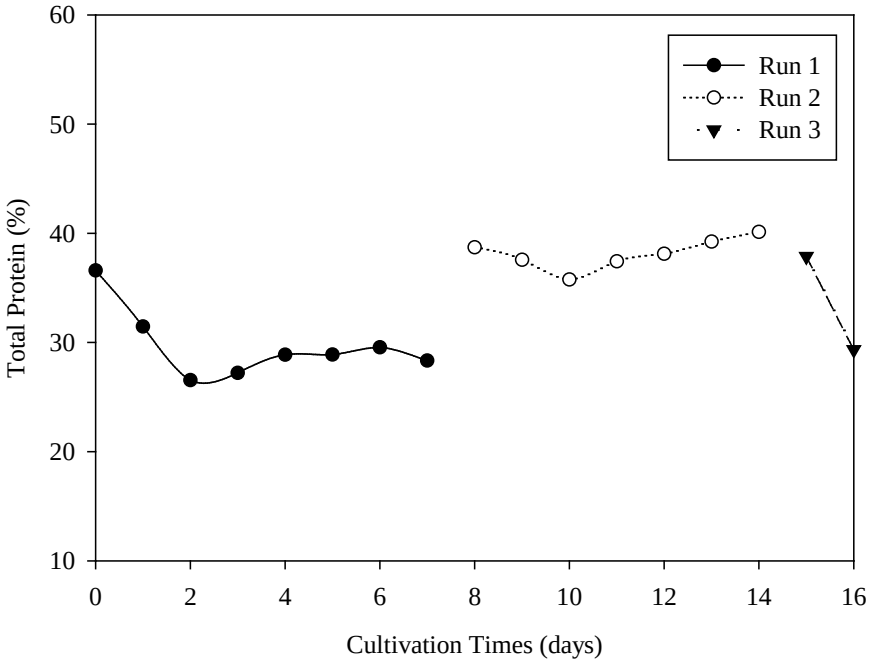
ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนเตรททั้งหมด (Total nitrate concentration) ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *S. maxima* FRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 1-3



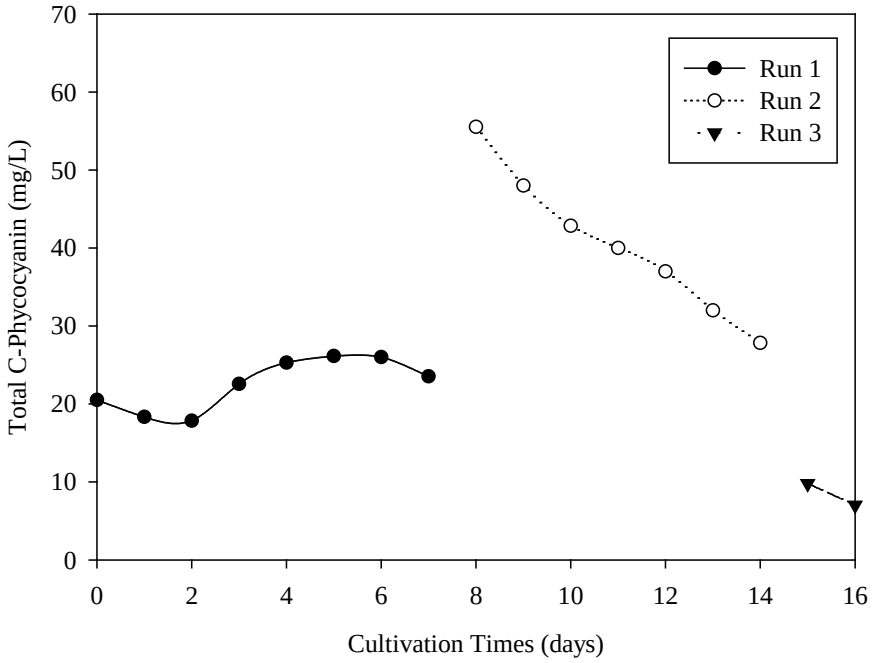
ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total phosphorus concentration) ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *S. maxima* FRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 1-3



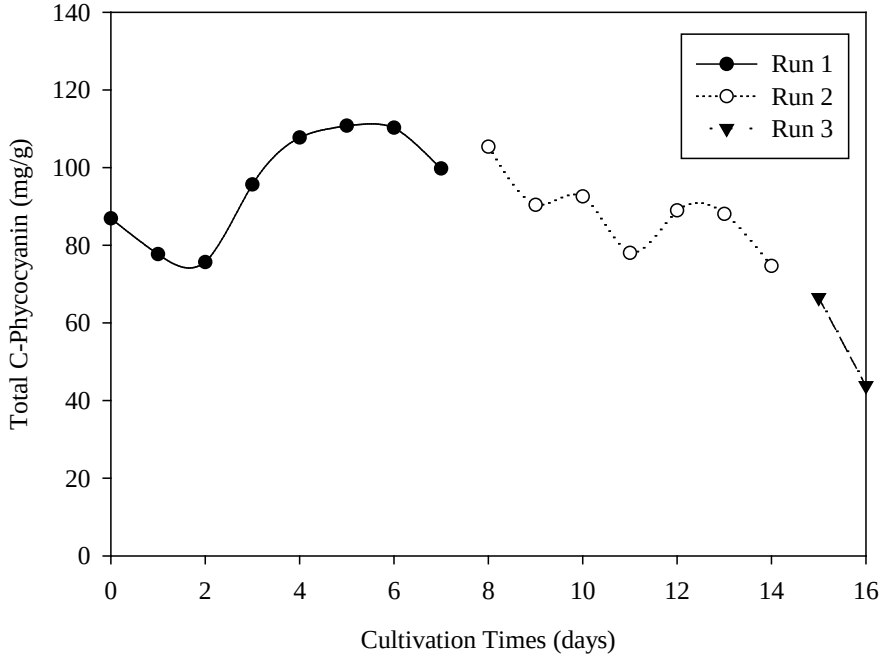
ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นอัลคาไลน์ (Total alkalinity) ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *S. maxima* FRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 1-3



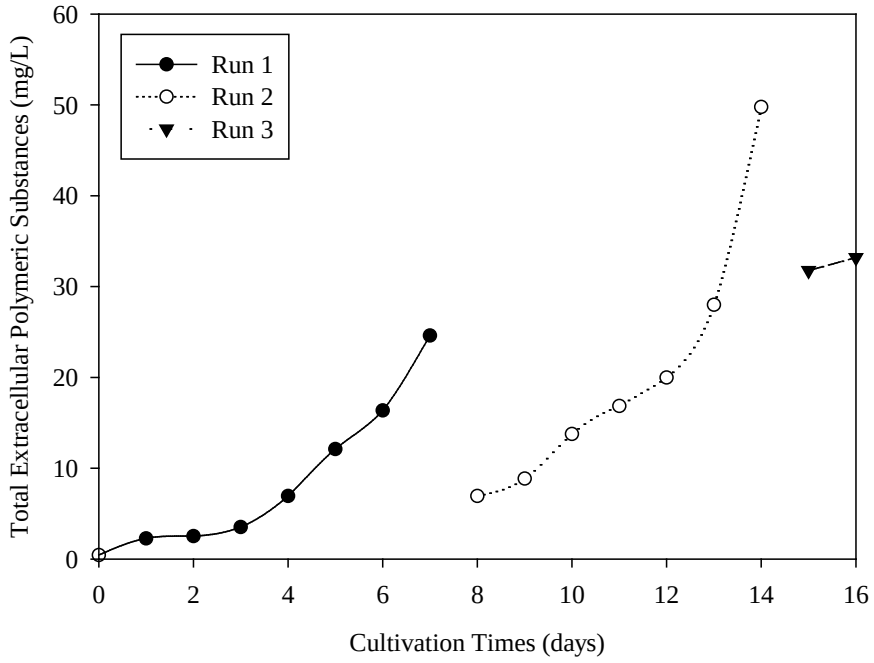
ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total protein) ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *S. maxima* FRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 1-3



ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณซี-ไฟโคไซยานินทั้งหมด (Total C-hycocyanin: mg/L) ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *S. maxima* FRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 1-3



ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณซี-ไฟโคไซยานินทั้งหมด (Total C-hycocyanin: mg/g) ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *S. maxima* FRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 1-3



ภาพที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณพอลิเมอร์นอกเซลล์ทั้งหมด (Total extracellular polymeric substances) ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *S. maxima* FRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 1-3

ตารางที่ 4.4 พารามิเตอร์การเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ของ *S. maxima* FRPD1183 แบบโฟโตออโททรอฟในรอบที่ 1-3

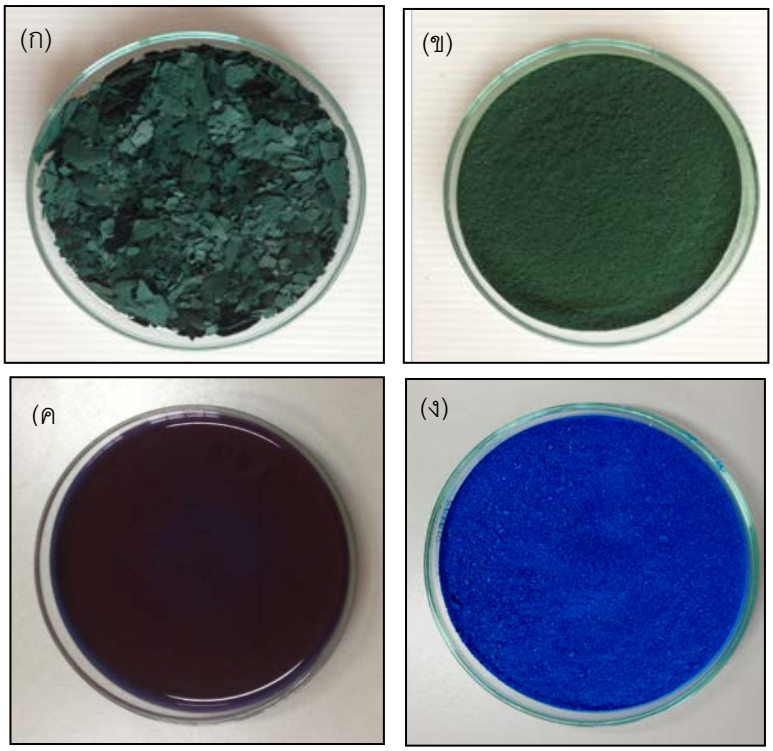
Parameter	Run I	Run 2	Run 3
Specific growth rate: μ (day^{-1})	0.208	0.095	-
Doubling time: t_d (day)	3.336	7.319	-
Volumetric cell productivity: Q_x (g L-1 day^{-1})	0.085	0.030	-
Volumetric C-PC productivity: Q_P (mg L-1 day^{-1})	1.125	-*	-
Specific C-PC productivity: q_p (mg g-1 day^{-1})	2.529	-	-

หมายเหตุ * ไม่ได้คำนวณ

4.2 ผลการศึกษาการผลิตผงสีซี-ไฟโคไซยานินโดยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

โดยทั่วไปแล้วกระบวนการทำบริสุทธิ์ซี-ไฟโคไซยานินจากสไปรูลิน่า จะอาศัยเทคนิคต่าง ๆ หลายขั้นตอน อาทิ การทำลายผนังเซลล์ (cell wal disruption) การตกตะกอน (precipitation) การปั่นเหวี่ยง (centrifugation) การทำไดอะไลซิส (dialysis) โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) และโครมาโทกราฟีแบบกรองเจล (gel filtration chromatography) เนื่องจากกระบวนการทำบริสุทธิ์ซี-ไฟโคไซยานินใช้เวลาค่อนข้างมากและมีต้นทุนค่อนข้างสูง ดังนั้นการทำบริสุทธิ์ซี-ไฟโคไซยานินจึงต้องคำนึงถึงงานที่นำไปใช้ เพราะในแต่ละงานต้องการความบริสุทธิ์ต่างกันและมีต้นทุนการผลิตแตกต่างกันด้วย (Cisneros and Rito-Palomares, 2004)

การทดลองนี้ได้พัฒนากรรมวิธีอย่างง่ายและราคาถูกในการผลิตผงสีซี-ไฟโคไซยานิจากสาหร่ายสไปรูลิน่า โดยนำชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่า มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนสาหร่ายมีปริมาณความชื้นไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีลักษณะเป็นแผ่นแข็งสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 4.12 ก) ซึ่งเกิดจากรงควัตถุคลอโรฟิลล์และไฟโคไบลิโปรตีนที่สะสมอยู่ภายในเซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่า และมีกลิ่นโปรตีนเด่นชัด เมื่อนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบด (Retsch ZM1) โดยตะแกรงร่อนขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.25 มิลลิเมตร พบว่าสาหร่ายที่ได้มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเขียวและฟุ้งกระจายได้ง่าย (ภาพที่ 4.12 ข) ผลจากการนำสาหร่ายที่บดละเอียดแล้วไปทำให้ผนังเซลล์แตกโดยการใช้กระบวนการไดโนมิลล์ (Dyno-mill) พบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการสกัดโดยวิธีการดังกล่าว ได้ส่วนสกัดหยาบซี-ไฟโคไซยานินมี่มีลักษณะเหลวข้นประมาณ 64.40 เปอร์เซ็นต์ และส่วนที่เป็นกากชีวมวลประมาณ 35.60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.5) เมื่อนำส่วนสกัดหยาบซี-ไฟโคไซยานินดังกล่าวไปตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด พบว่าส่วนสกัดซี-ไฟโคไซยานินหยาบที่แยกได้มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำเงินเข้มอมแดงและมีความหนืดลดลง (ภาพที่ 4.12 ค) ซึ่งเกิดจากรงควัตถุ ซี-ไฟโคไซยานิน และอัลโลไฟโคไซยานินที่ให้สีน้ำเงินและรงควัตถุไฟโคอิริธริน (phycoerythrin: PE) ที่ให้สีแดง สำหรับภาพที่ 4.12 ง แสดงลักษณะปรากฏของผงสีซี-ไฟโคไซยานินที่ผ่านการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีฟ้าเข้ม



ภาพที่ 4.12 แสดงลักษณะปรากฏของ (ก) ชีวมวลสไปรูลิน่าอบแห้ง (ข) ชีวมวลสไปรูลิน่าอบแห้งบดละเอียด (ค) ส่วนสกัดซี-ไฟโคไซยานินหยาบ และ (ง) ผงสีซี-ไฟโคไซยานินที่ผ่านการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ตารางที่ 4.5 ปริมาณส่วนสกัดหยาบซี-ไฟโคไซยานินและกากชีวมวลสไปรูลิน่าเหลือทิ้งที่ได้จากการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจากชีวมวลสไปรูลิน่าอบแห้งด้วยวิธีการบดด้วยเม็ดแก้ว

การทดลองที่	ส่วนสกัดหยาบซี-ไฟโคไซยานิน (%)	กากชีวมวลสไปรูลิน่าเหลือทิ้ง (%)
1	67.50	32.50
2	61.31	38.69
3	64.39	35.61
ค่าเฉลี่ย	64.40	35.60

4.3 ผลการวิเคราะห์คุณภาพของผงสีซี-ไฟโคไซยานิน

จากการนำผงสีซี-ไฟโคไซยานินที่พัฒนาได้มาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมีพบว่าผงสีซี-ไฟโคไซยานินที่พัฒนาได้มีค่าสี L*, a* และ b* เท่ากับ 50.173 -11.597 และ -18.610 ตามลำดับ มีค่าความหนาแน่น (Bulk density), ความสามารถในการกระจาย (Dispersibility), การดูดความชื้น (Hygroscopicity), การละลาย (Solubility) เท่ากับ 0.254 กรัมต่อมิลลิกรัม, 0.304, 3.140 เปอร์เซ็นต์ และ 79.420 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีปริมาณความชื้น, ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ (a_w), ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด และความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.600%, 0.353, 0.647 และ 4.465 ตามลำดับ โดยผงสีที่พัฒนาได้มีค่าความบริสุทธิ์ 0.710 ซึ่งมีความบริสุทธิ์อยู่ในระดับเกรดอาหาร (ตารางที่ 4.6)

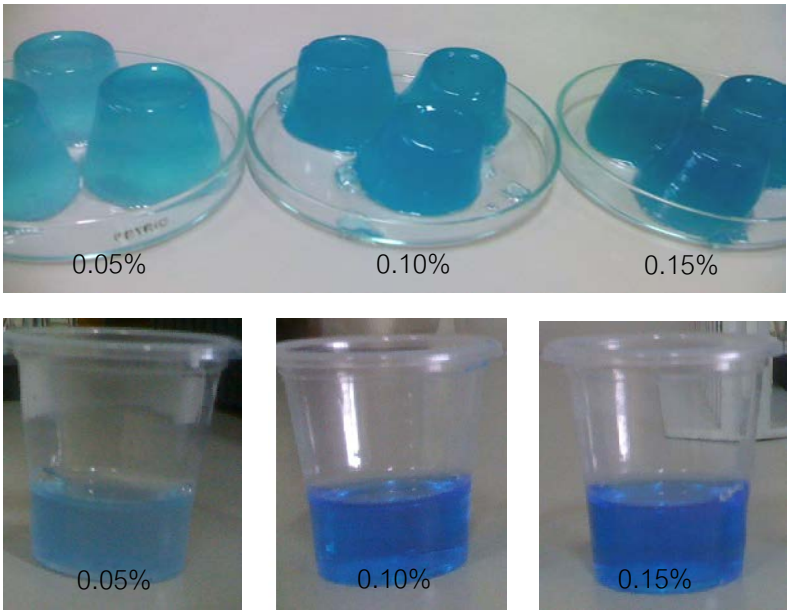
ตารางที่ 4.6 คุณสมบัติบางประการของผงสีซี-ไฟโคไซยานินที่พัฒนาได้

คุณสมบัติ	ค่าที่วัดได้
ค่าสี	
L	50.173
a	-11.597
b	-18.610
c	21.930
h	238.07
Purity (Abs620/Abs280)	0.710
ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน (mg.C-PC/mg)	130
ความหนาแน่นของผงสี (Bulk density; g/mL)	0.254
ความสามารถในการกระจายตัวของผงสี (Dispersibility)	0.304
การดูดความชื้น (Hygroscopicity; %)	3.140
การละลาย (Solubility; g/100 mL; %)	79.420
ปริมาณความชื้น (Moisture content; %)	7.600
ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ (a_w)	0.353
ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total soluble solids; %)	1.40
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	4.465

4.4 ผลการประยุกต์ใช้ผงสีซี-ไฟโคไซยานินในผลิตภัณฑ์อาหารและทดสอบความชอบด้านสี

จากการนำผงสีที่พัฒนาได้ไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร 2 ชนิด ได้แก่ เจลลี่และน้ำมะพร้าว ในปริมาณที่แตกต่างกัน 3 ระดับ แล้วนำไปทดสอบความชอบด้านสีกับผู้ทดสอบ จำนวน 50 คน ด้วยวิธีให้คะแนนความชอบ 9 ระดับ (9 Point-hedonic scale) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7 โดยพบว่า

ผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้การยอมรับกับผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมผงสีซี-ไฟโคไซยานินในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีคะความชอบเท่ากับ 7.820 และ 6.360 ตามลำดับ โดยลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์แสดงดังภาพที่ 4.13 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำผงสีซี-ไฟโคไซยานินที่ผลิตได้โดยกระบวนการผลิตนี้ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร และหากมีการปรับปรุงในเรื่องความคงตัวของสีก็น่าจะทำให้ผู้ทดสอบให้คะแนนการยอมรับเพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 4.13 ลักษณะปรากกฏของผลิตภัณฑ์เจลลี่และน้ำมะพร้าวที่มีการเติมผงสีซี-ไฟโคไซยานินในปริมาณต่าง ๆ กัน (บน) เจลลี่ (ล่าง) น้ำมะพร้าว

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยความชอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสีของเจลลี่และน้ำมะพร้าวที่เติมผงสีซี-ไฟโคไซยานินในปริมาณต่าง ๆ กัน

ผลิตภัณฑ์อาหาร	ปริมาณผงสีซี-ไฟโคไซยานิน (%)		
	0.05	0.10	0.15
เจลลี่	6.52	7.82	5.95
น้ำมะพร้าว	6.10	6.36	5.96

4.5 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้านสีของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา

จากการนำผลิตภัณฑ์เจลลี่และน้ำมะพร้าวที่เติมผงสีซี-ไฟโคไซยานินไปเก็บรักษาที่อุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าสีในระหว่างการเก็บรักษาทุก 3 วัน ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.8 และ 4.9 โดยเมื่อเริ่มต้นผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิดมีค่าความสว่าง (L) เท่ากับ 63.287 และ 54.460 และมีค่าสี a ตกอยู่ในอิทธิพลของความเป็นสีเขียว โดยพบว่าในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เจลลี่และน้ำมะพร้าวที่เติมผงสีซี-ไฟโคไซยานินมีการเปลี่ยนแปลงค่าสีน้อยมาก แสดงให้เห็นว่าผงสีซี-ไฟโคไซยานินที่พัฒนาได้มีความคงตัวในสภาวะที่ใช้ในการเก็บรักษาจึงมีความเป็นไปได้สูงในการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร อย่างไรก็ตาม การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งได้ทดลองนำผงสีซี-ไฟโคไซยานินไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพียง 2 ชนิดเท่านั้น และเนื่องจากซี-ไฟโคไซยานินเป็นสารประกอบโปรตีนที่มีไวต่อสภาวะแวดล้อมในการแปรรูปอาหารค่อนข้างมาก โดยเฉพาะความร้อนและค่าความเป็นกรด-ด่าง ดังนั้นการประยุกต์ใช้ผงสีซี-ไฟโคไซยานินในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ จึงจำเป็นต้องทราบถึงปัจจัยหรือสภาวะที่ใช้แปรรูปอาหารที่มีผลต่อความคงตัวและคุณสมบัติของซี-ไฟโคไซยานินด้วย ทั้งนี้เพื่อให้สามารถนำซี-ไฟโคไซยานินไปประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

ตารางที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้านสีของผลิตภัณฑ์เจลลี่ที่เติมผงสีซี-ไฟโคไซยานินในปริมาณต่าง ๆ กันในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	L	a	b	c	h
0	63.287	-20.463	1.277	20.507	176.423
3	63.097	-20.137	1.977	20.230	174.390
6	62.313	-20.543	1.490	20.167	175.760
9	61.843	-20.167	1.620	20.237	175.437
15	62.217	-19.847	1.683	19.917	175.143

ตารางที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้านสีของผลิตภัณฑ์น้ำมะพร้าวที่เติมผงสีซี-ไฟโคไซยานิน ในปริมาณต่าง ๆ กันในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	L	a	b	c	h
0	54.460	-23.343	-25.777	34.773	227.837
3	54.573	-21.197	-25.393	33.077	230.150
6	54.663	-20.607	-25.800	33.023	231.380
9	53.330	-20.207	-25.550	32.580	231.670
15	50.270	-17.907	-25.523	31.183	234.957