# บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ทฤษฎี

### 2.1.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับจุลสาหร่าย

จุลสาหร่าย (Microalgae) เป็นพืชชั้นต่ำที่ไม่มีระบบท่อน้ำ ท่ออาหาร มีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นชัดเจนด้วยตาเปล่า ต้องตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูง การดำรงชีพเป็นแบบพึ่งตนเอง โดยการผลิตสารอาหารและพลังงาน ผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงบริเวณที่พบจุลสาหร่ายคือแหล่งน้ำที่มีสีเขียว พื้นดินที่ชื้นแฉะ บนผิวใบไม้ ต้นไม้ ร่องน้ำ หรือพื้นผนัง ที่มีความชื้นสูง จุลสาหร่ายชอบอยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน (colony) จึงพบเห็นในลักษณะเป็นแผ่นสีเขียวสด หรือ สีเขียวคล้ำ บางครั้งมีลักษณะเป็นเมือกลื่นๆ

จุลสาหร่ายจัดเป็นทรัพยากรชีวภาพ (bioresource) ที่มีความสำคัญยิ่งทางเศรษฐกิจเนื่องจากสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเป็นจำนวนมากได้ ตามความต้องการและมีศักยภาพในการนำมาเป็นวัตถุดิบของโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เพื่อผลิตสารที่เป็นประโยชน์หลายชนิด เพราะภายในเซลล์ของ จุลสาหร่ายมีสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีคุณค่าในเชิงพาณิชย์สูงอยู่มากมาย อันได้แก่ กรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด กรดไขมันไม่อิ่มตัว วิตามิน เกลือแร่ รงควัตถุหรือสีธรรมชาติ และสารปฏิชีวนะ เป็นต้น

จุลสาหร่าย จึงหมายถึงสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ ที่มีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เป็นพืชชั้นต่ำไม่มีส่วนที่เป็นราก ลำต้นและใบที่แท้จริง มีขนาดตั้งแต่เล็กมากมีเซลล์เดียว ไปจนถึงขนาดใหญ่ ประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก อาจเป็นเส้นสายหรือมีลักษณะคล้ายพืชชั้นสูง ซึ่งดูเหมือนมีราก ลำต้น และใบ ซึ่งรวมเรียกว่า ทัลลัส (Thallus) ส่วนใหญ่จะมีคลอโรฟิลล์ช่วยในการสังเคราะห์แสง อาศัยอยู่ในน้ำหรือบริเวณที่มีความชื้นสูง จัดเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นที่สำคัญที่สุดในระบบนิเวศน์ทางน้ำ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมายทั้งบริโภคโดยตรงและ ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ สาหร่ายมีรงควัตถุหลัก 3 ชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ (chlorophyl) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และไฟโคบิลิน (phycobilin) ซึ่งรงควัตถุเหล่านี้กระจาย อยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm)

**2.1.2 ลักษณะที่สำคัญของจุลสาหร่าย *Chlorella sp.***

คลอเรลลา (*Chlorella sp.*) (นวรัตน์, 2532) เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดแรกที่ใช้ในการวิจัย ตั้งแต่ในปี ค.ศ.1950 นอกจากนี้ได้มีการใช้เป็น แบบจำลองในโครงการอวกาศอีกด้วย ต่อมาได้มีการศึกษามาก เพื่อจะดูความเป็นไปได้ ในการใช้ทำโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) ในปี ค.ศ.1960 ได้เริ่มมีบริษัทผลิตคลอเรลลาขึ้น ในประเทศไต้หวัน และหลังจากนั้น มีถึง 30 บริษัทที่ผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ กัน จากคลอเรลลา ซึ่งการที่คลอเรลลายิ่งมีสีเขียวของเซลล์มาก จะเป็นตัวบอกถึงคุณภาพของเซลล์ ในกระบวนการผลิตคลอเรลลาส่วนมากจะเลี้ยงแบบกลางแจ้ง โดยให้แสงในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอน ที่เป็นสารอินทรีย์ต่ำ ราคาของคลอเรลลาจะอยู่ในช่วงประมาณ 10 - 15 ดอลลาร์สหรัฐ ต่อกิโลกรัม น้ำหนักแห่งผลิตภัณฑ์ ส่วนมากใช้ผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ ซึ่งในอนาคต ควรจะมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ เพิ่มขึ้นต่อไป และควรพยายามลดต้นทุนการผลิต เพื่อเป็นการขยายตลาด

คลอเรลลา (*Chlorella sp.*) มีลักษณะที่สำคัญดังนี้

1. มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก รูปร่างกลมหรือรี ผนังเซลล์ค่อนข้างบางคลอโรพลาสต์ เป็นแบบแถบข้างเซลล์

2. เป็นพวกเซลล์เดี่ยวที่เคลื่อนที่ไม่ได้ โดยไม่มีแฟลกเจลลัม

3. รงควัตถุที่พบจะเป็นเช่นเดียวกับที่พบในพืชชั้นสูง คือ มีคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี เบตาคาโรทีน และแซนโทฟิลล์ รงควัตถุทั้งหมดนี้จะประกอบกันด้วยอัตราส่วนที่เหมือนกับพวกพืชชั้นสูงจึงทำให้มีสีเขียวสด รงควัตถุทั้งหมดนี้จะรวมกันอยู่ในเม็ดสี หรือพลาสติด (Plastid) ที่เรียกว่าคลอโรพลาสต์ โดยอาจจะมี 1 อัน หรือมากกว่า 1 อัน คลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างเป็นรูปตัว U

4. อาหารที่เก็บไว้ก็คือ ไพรีนอยด์ (Pyrenoids) อยู่ในเม็ดคลอโรพลาสต์ มีไพรีนอยด์เป็นโครงสร้างที่มีโปรตีนเป็นแกนกลาง และมีแผ่นแป้งหุ้มล้อมรอบอยู่

5. การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างออโตสปอร์ (autospore) มีจำนวน 4 8 หรือ 16

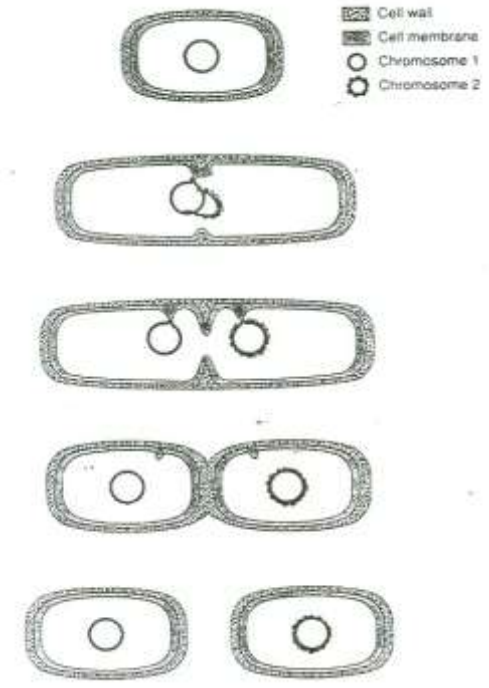
6. แหล่งที่อยู่ สาหร่ายสีเขียวพบในน้ำจืดเป็นส่วนใหญ่ ในน้ำเค็มก็มีบ้างตามที่ชื้นแฉะทั่วไป เปลือกไม้ ใบไม้ ก้อนหินเปียกและบนหิมะก็มี บางชนิดอยู่ในภาวะพึ่งพากับรา เกิดเป็นไลเคน บางชนิดก็เป็นปรสิตของพืชชั้นสูง

**2.1.3 การเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์**

คลอเรลลา (*Chlorella sp.*) (ธวัชชัย, 2547) สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยการแบ่งเซลล์และสร้างสปอร์ได้แก่

1. การแบ่งเซลล์ (cell division) โดยการเพิ่มจำนวนเซลล์จาก 1 เป็น 2 4 8 และ 16 ถ้าเซลล์ใดมีชีทหุ้ม เมื่อเซลล์ทำการแบ่งเซลล์หลายๆ ครั้งจะเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ (colony) มีขนาดใหญ่ขึ้น ต่อมาจะหลุดออกจากกันเป็นกลุ่มเซลล์ย่อยโดยวิธีการฉีกขาด (fragmentation) ส่วนพวกที่เป็นเส้นสายการแบ่งเซลล์ทำให้ trichome ยืดยาวออก และจะขาดท่อน เมื่อมีการกระทบกระเทือน แต่ละท่อนจะเจริญเป็น trichome ใหม่ พวกที่มี heterocyst การขาดท่อนจะเกิดตรงรอยต่อของเซลล์ปกติกับ heterocyst

2. การสร้างสปอร์ (sporulation) สปอร์ที่สร้างขึ้นเป็นสปอร์ที่ไม่มีหนวด (non-motile spore) สำหรับการเคลื่อนไหวแบ่งเป็น 2 ชนิด ชนิดแรกเรียกว่า endospore คือสปอร์ที่เกิดภายในเซลล์โดยการแบ่งโปรโตพลาสซึมออกเป็น 2 ส่วนหรือหลายส่วน แต่ละส่วนเมื่อหลุดออกจากผนังเซลล์จะงอกเป็นต้นใหม่ ชนิดที่สองได้แก่ exospore สปอร์ที่เกิดขึ้นโดยการแบ่งส่วนของเซลล์ออกมาเป็นสปอร์มีจำนวน 1 หรือหลายสปอร์เรียงต่อกัน

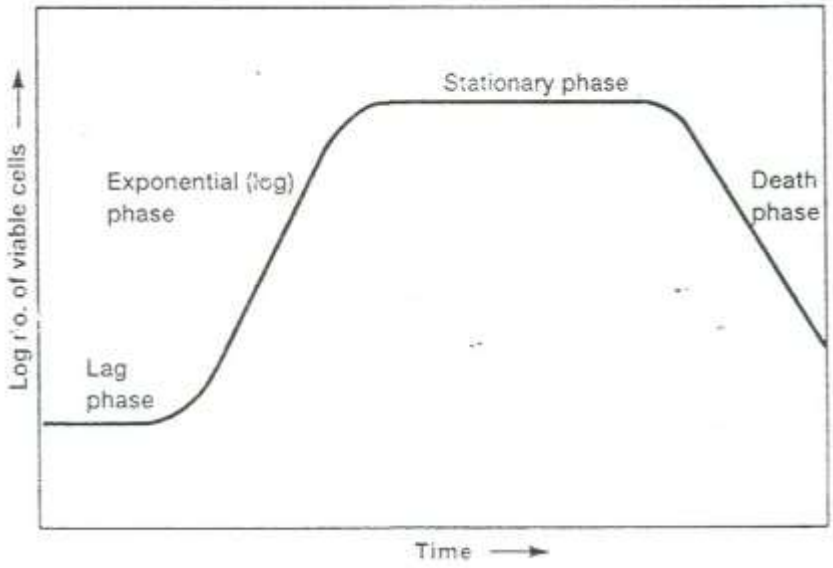



**รูปที่ 2.1** ขั้นตอนการแบ่งเซลล์ของเซลล์สาหร่าย (ธวัชชัย, 2547)

3. เซลล์สาหร่ายมีเจริญเติบโต (growth) และการเจริญพันธุ์ (reproduction) โดยการแบ่งเซลล์การเจริญเติบโตโดยทั่วไป การเพิ่มจำนวนและการเจริญพันธุ์ โดยทั่วไปเซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งตัวเองจาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์ (binary fission) และเป็นการแบ่งเซลล์ตาม

ขวาง (transverse fission) ก่อนที่จะมีการแบ่งเซลล์ จะมีขนาดยาวขึ้น มีการสร้าง DNA RNA โปรตีนชนิดต่างๆ และสารประกอบอื่นๆ ขึ้นภายในเซลล์ ต่อมาจะมีการสร้างผนังกั้นเซลล์ทางขวาง แบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ส่วน จากนั้นเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่จึงแยกออกจากกันเป็น 2 เซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายในแต่ละช่วงที่เพิ่มจำนวนขึ้นเท่าตัวนั้น เรียกว่า generation ระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละ generation เรียกว่า generation time ดังรูปที่ 2.1 แสดงขั้นตอนการแบ่งเซลล์ของเซลล์สาหร่าย

เนื่องจากเซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ การหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของเซลล์สาหร่าย และระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยวิธีทำกราฟแสดงความสัมพันธ์โดยใช้สเกลธรรมดาจึงไม่เหมาะสม เพราะถ้าเซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่เร็ว ดังนั้น การหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ และเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจึงมักใช้ค่า logarithmic (log) ของจำนวนเซลล์สาหร่าย ดังนั้น หากมีการทำกราฟเพื่อแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แกน Y ของกราฟจะเป็นค่า log ของจำนวนเซลล์สาหร่าย ส่วนแกน X จะเป็นเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง จำนวนของเซลล์สาหร่ายที่สัมพันธ์กับเวลาแสดงเป็น growth curve ดังรูปที่ 2.2




**รูปที่ 2.2** การเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย (ธวัชชัย, 2547)

### 2.1.4 ระยะของการเจริญเติบโต

เมื่อนำเซลล์สาหร่าย (ธวัชชัย, 2547) จำนวนหนึ่ง ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลวแล้วจัดสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจน ให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จะพบว่า

เซลล์สาหร่ายมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น รูปแบบของการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายจะเป็นไป ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งแบ่งเป็นระยะต่างๆ ได้ 4 ระยะ ดังนี้

1. Lag phase (ระยะพัก) เป็นระยะแรกที่เซลล์สาหร่าย เริ่มพบกับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ จะปรับตัวให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมนั้น มีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม ที่จะใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อมีการสร้างโปรตีน และส่วนประกอบอื่นๆ ที่สำคัญของเซลล์ ตอนระยะท้ายๆ ของระยะนี้ เซลล์อาจจะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อยและพร้อมที่จะแบ่งตัวระยะ lag นี้อาจจะยาวนานแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. Exponential หรือ log phase (ระยะแบ่งตัวทวีคูณ) เป็นระยะที่เซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด มีอัตราการแบ่งตัวคงที่ ส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์ และขบวนการต่างๆ ตลอดจนคุณสมบัติทางสรีรวิทยา เป็นแบบเดียวกัน

3. Stationary phase (ระยะคงจำนวนเซลล์) เป็นระยะที่เซลล์มีจำนวนคงที่ ซึ่งแสดงว่าเซลล์สาหร่ายไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก หรือคืออัตราเกิดเท่ากับอัตราตาย การที่เซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตแล้วเข้าสู่ระยะ Stationary นี้เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้จะหมดลง จึงเจริญช้าลง นอกจากนี้ ของเสียที่เซลล์สาหร่ายสร้างขึ้นยังยับยั้งการเจริญเติบโตด้วย

4. Death phase หรือ decline phase (ระยะเซลล์ตาย) เป็นระยะสุดท้าย เซลล์สาหร่ายที่มีอยู่จะตายลงมากกว่าเซลล์สาหร่ายที่เพิ่มจำนวนขึ้น ทั้งนี้ เป็นเพราะอาหารอาจหมด มีสารพิษสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก

**2.1.5 การสังเคราะห์แสงของสาหร่าย**

เนื่องจากสาหร่าย (นวรัตน์, 2532) ส่วนใหญ่ได้พลังงานมากจากกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) การศึกษาสรีรวิทยาการเจริญของสาหร่ายจึงต้องการความเข้าใจในกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งบางคนอาจจะมองข้ามความสำคัญในจุดนี้ไปดังจะเห็นได้ว่าในหนังสือหรือตำราเกี่ยวกับสาหร่ายมักจะไม่กล่าวถึงเรื่องการสังเคราะห์แสงรวมทั้งปัจจัยทางสรีรวิทยาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของสาหร่าย ซึ่งอาจทำให้สภาวะการเลี้ยงสาหร่ายที่ใช้ไม่อยู่ในระดับที่เหมาะสม เช่น สาหร่ายอาจจะได้รับแสงที่มีความเข้มต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมทำให้สาหร่ายมีการเจริญช้า ในขณะที่ความเข้มแสงที่มากเกินไป (Photoinhibition) ซึ่งจะทำให้ผลผลิตสาหร่ายลดลงและความเข้มของแสงยังมีผลต่อองค์ประกอบทางชีวเคมีภายในเซลล์ เช่น มีผลต่อปริมาณสารสีคาโรทีนอยด์ในสาหร่ายคลอเรลลา สาหร่ายดูนาลิเอลลา สาหร่ายฮีมาโตคอคคัส ปริมาณเอนไซม์ ไนเตรทรีดักเตสในไดอะตอม เป็นต้น

การสังเคราะห์แสงของสาหร่ายจะใช้พลังงานจากแสงในช่วงคลื่นที่เรียกว่า photosyntheticalla active radiation (PAR) ซึ่งมีความยาวคลื่นระหว่าง 400 – 700 นาโนเมตร พลังงานที่ได้จากแสงจะนำไปใช้ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในวัฏจักรคาลวิน (Calvin cycle) สมการโดยภาพรวมของการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายและพืชเป็นดังนี้

$$6CO_2 + 12H_2O \longrightarrow (CH_2O)_6 + 6H_2O + 6O_2$$

จากสมการข้างต้น แสดงให้เห็นว่าเมื่อสาหร่ายมีการสังเคราะห์แสง จะมีการปลดปล่อยออกซิเจนออกมาภายนอกเซลล์ ดังนั้นการวัดอัตราการปลดปล่อยออกซิเจนจากสาหร่ายจึงเป็นวิธีหนึ่งในการวัดประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายซึ่งจะเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงสภาวะทางสรีรวิทยาของสาหร่ายได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นๆ เช่น การวัดการตรึงคาร์บอนที่ติดฉลากด้วยสารรังสี เช่น คาร์บอน - 14 หรือ คาร์บอน - 13 ก็เป็นวิธีการที่ทำได้อย่างรวดเร็วและมีความไวสูง แต่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและยังต้องมีระบบความปลอดภัยเกี่ยวกับการใช้สารกัมมันตรังสีมาเกี่ยวข้องด้วย

**2.1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์สาหร่าย**

การเจริญเติบโต (สกานต์, 2535) ของเซลล์สาหร่ายต้องอาศัยปัจจัยดังต่อไปนี้

- อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายคือ 25 - 35 องศาเซลเซียส สาหร่ายคลอเรลลาไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ประเทศไทยมีสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมมากสำหรับเป็นแหล่งผลิตสาหร่ายคลอเรลลา เนื่องจากมีอุณหภูมิอากาศที่เหมาะสม ค่าอุณหภูมิของอากาศโดยเฉลี่ยประมาณ 32 - 35 องศาเซลเซียส

- แสง ความเข้มแสง เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ถ้าความเข้มของแสงสูง ความสามารถในการใช้พลังงานแสงของสาหร่ายจะลดลง ความเข้มแสงที่เหมาะต่อการเจริญของสาหร่ายคลอเรลลาเมื่อเพาะเลี้ยงสภาพกลางแจ้งคือ 30 - 35 กิโลลักซ์

- ความเข้มข้นเชื้อตั้งต้น การเพาะเลี้ยงสาหร่ายจำนวนมาก ควรใช้สารตั้งต้นในปริมาณที่เหมาะสม อยู่ระหว่าง 225 - 250 มิลลิลิตรของน้ำหนักแห้งต่ออาหารที่เพาะเลี้ยง 1 ลิตร

- แร่ธาตุอาหาร แร่ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามปริมาณของแร่ธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการ แร่ธาตุอาหารแต่ละกลุ่ม มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช

แร่ธาตุที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณมาก (macronutrients หรือ major elements) ได้แก่ ธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน ไฮโดรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และ

โปตัสเซียม แหล่งของธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ได้มาจากคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และก๊าซออกซิเจน ตามลำดับ ทั้งคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสารหลักภายในพืชได้แก่โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน

แร่ธาตุที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณน้อย (micronutrients หรือ minor elements) คือ ต้องการเป็นปริมาณมิลลิกรัมต่อลิตร หรือ ต่ำกว่านี้ แร่ธาตุเหล่านี้มีอยู่ 7 ชนิด ได้แก่ คลอรีน เหล็ก แมงกานิส โบรอน สังกะสี ทองแดง และโมลิบดินัม

- แหล่งคาร์บอนโซเดียมไบคาร์บอเนตในเป็นแหล่งคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยตรงได้

- การกวนน้ำการกวนมีผลต่อการเจริญของสาหร่าย ทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตดี เป็นการเพิ่มการกระจายตัวของสาหร่ายให้ได้รับแสงอย่างสม่ำเสมอ ช่วยลดอัตราการตกตะกอนของสาหร่าย สารอาหารกระจายตัวอย่างทั่วถึง ทำให้เซลล์สาหร่ายดูดซึมสารอาหารต่าง ๆ ไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ป้องกันไม่ให้เกิดความแตกต่างของอุณหภูมิที่ผิวน้ำ และระดับลึกลงไป เครื่องมือที่สามารถติดตั้งเพื่อทำการกวนอาจเป็นใบพัด หรือ thermoziphon การกวนโดยให้น้ำเคลื่อนที่ควรอยู่ที่ความเร็วประมาณ 21 - 25 เซนติเมตรต่อวินาที ซึ่งเป็นอัตราที่ไม่รบกวนสาหร่าย

- น้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นหัวเชื้อในห้องปฏิบัติการ คือ น้ำกลั่น เพื่อให้บริสุทธิ์สะอาด แต่น้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงปริมาณมากจะเป็นน้ำประปาที่ไม่มีคลอรีน น้ำบ่อหรือน้ำบาดาลที่ใสสะอาดไม่มีโลหะหนัก ใช้หุงต้มได้ก็ได้ น้ำบ่อหรือน้ำบาดาลมักจะใช้ได้ผลดีกว่า

- ความเป็นกรดด่าง การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ช่วงที่เหมาะสม 9.5 - 10.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะอยู่ในช่วง 4 - 6 อีกทั้งยังควบคุมไม่ให้เกิดการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตหรือสาหร่ายชนิดอื่นที่เป็นพิษ

**2.1.7 อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ**

อาหาร (สกานต์, 2535) ที่ใช้เลี้ยงเชื้อสามารถแบ่งได้ดังนี้

1. อาหารแข็งหรืออาหารวุ้น (Solid or agar media) ทำโดยเตรียมอาหารเหลวก่อนแล้วเติมวุ้นลงไป วุ้นที่ใช้เป็นวุ้นที่บริสุทธิ์ การแยกเชื้อสาหร่ายควรเตรียมวุ้นให้แข็งหรือถ้าต้องการทำอาหารแบบเอียง (Slant agar) เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิที่เหมาะสม

2. อาหารเหลว การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวทำโดยนำเชื้อที่ว่องไวจากอาหารแข็งมาถ่ายเพาะลงในอาหารเหลวในขวดรูปชมพู่ (flask) แล้วปิดด้วยจุกสำลี

3. ส่วนประกอบที่สำคัญสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่

แหล่งพลังงาน ได้จากการสลายสารประกอบอินทรีย์ และอนินทรีย์ แต่บางชนิดใช้แสงสว่างเป็นแหล่งของพลังงานได้

แหล่งคาร์บอน พวกที่หากินได้เอง (autotroph) ได้จาก $CO_2$ ส่วนพวกอื่นๆ ได้จากสารประกอบอินทรีย์ เช่น น้ำตาล คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน

แหล่งของไนโตรเจน บางชนิดสามารถใช้ $N_2$ ในอากาศได้ บางชนิดในรูปของสารอนินทรีย์ เช่น เกลือแอมโมเนีย บางชนิดก็ได้จากสารอาหารพวกโปรตีน

แร่ธาตุต่างๆ เช่น P K Mg Fe Mn Ca Cu Zn CO มีความต้องการน้อยแล้วแต่ชนิดของเซลล์

วิตามิน ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์

**2.1.8 การนำสาหร่ายมาใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพ**

ในระยะ 15 ปีที่ผ่านมานี้ (ดร.ดวงรัตน์, 2549) ได้มีการศึกษาถึง การนำสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) มาเลี้ยงเพื่อผลิตในเชิงการค้ากันมาก ซึ่งพื้นฐานของการเลี้ยงสาหร่ายทางชีวภาพนี้ จะเหมือนกับการทำการเกษตรกรรมแบบเก่า กล่าวคือ เป็นการใช้การสังเคราะห์แสงเพื่อผลิตเซลล์สาหร่ายเป็นจำนวนมาก เพื่อมาใช้เป็นแหล่งสารอาหาร แหล่งสารเคมีและพลังงาน โดยเฉพาะสาหร่ายสีเขียว ซึ่งในทางจุลชีววิทยาจัดจำแนกสาหร่ายนี้ ว่าเป็นจุลินทรีย์ประเภทหนึ่ง ชื่อว่า ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ในทางพฤกษศาสตร์ จัดจำแนกสาหร่ายสีเขียว ไว้ในส่วนของพืชชั้นต่ำ ที่ไม่มีระบบท่อน้ำท่ออาหาร ดำรงชีวิตแบบพึ่งตนเอง โดยการผลิตสารอาหาร และพลังงาน โดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง ถึงแม้สาหร่ายสีเขียว จะมีขนาดเล็กมาก จนไม่สามารถมองเห็นชัดได้ด้วยตาเปล่า ต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่สาหร่ายนี้ จัดเป็นทรัพยากรชีวภาพ (bioresource) ที่มีความสำคัญมากทางเศรษฐกิจ คือ การผลิตสาหร่ายในเชิงการค้า เนื่องจากสาหร่ายนี้มีศักยภาพที่เหมาะสมในการใช้เป็นวัตถุดิบในทางการเกษตร และทางอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารเสริมสุขภาพสำหรับคน อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมการผลิตเคมีภัณฑ์ เป็นต้น

ในการผลิตเซลล์สาหร่ายนั้น มีขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน คือ การเลี้ยงสาหร่ายให้ได้เซลล์จำนวนมาก การเก็บเกี่ยวเซลล์ และการทำแห้ง การเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้ได้เซลล์จำนวนมากนั้น เราจะต้องเข้าใจวิธีการ (know-how) ในการเลี้ยงจุลชีพที่เป็นพวก photoautotrophic และการออกแบบบ่อเลี้ยงที่เหมาะสม สำหรับสาหร่ายแต่ละชนิด (appropriate reactor) คือต้องมีความรู้ และความเข้าใจในปัจจัยต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้อง เช่น แสง และอุณหภูมิในระบบการเลี้ยงแบบกลางแจ้ง ความเป็นกรดด่าง การเกิด photoinhibition และการหายใจในสภาวะที่ไม่มีแสง (dark respiration) รวมไปถึงความเข้มข้นของอาหารอีกด้วย ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ จะเป็นตัวแปรที่จะต้อง

คำนึงถึง ในการควบคุมการผลิต ระบบการเลี้ยงกลางแจ้งส่วนมาก จะใช้ shallow raceways และมีการกวนโดยใช้ใบพัด กระบวนการผลิตขั้นตอนการขยายพันธุ์สาหร่าย มีดังนี้

1. การเพาะเลี้ยง นำสายพันธุ์ที่มีคุณภาพดี ผ่านการคัดเลือกแล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่ได้เตรียมไว้ในหลอดทดลอง อาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายในระดับหลอดทดลองนี้จะผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ซึ่งขั้นตอนนี้จะทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic Technique)

เมื่อได้สาหร่ายในระดับหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นของเซลล์มากพอแล้ว จะทำการถ่ายสาหร่ายลงในฟลาส์ก (Flask) และให้แสงสว่างตลอด 24 ชั่วโมง รวมทั้งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ($CO_2$) เป็นครั้งคราว เพื่อปรับค่าความเป็นกรดด่าง เนื่องจากเมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้น โดยจะนำฟลาส์กที่มีสาหร่ายวางบนเครื่องเขย่าเพื่อให้สาหร่ายได้รับแสงและสัมผัสสารอาหารทั่วถึงกัน จากนั้นจะทำการขยายตามขั้นตอนจนถึงระดับบ่อเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ในการเก็บเกี่ยว

สารเคมีทุกชนิดที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบของอาหารในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายนั้น จะทำการคัดเลือกวัตถุดิบที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่าปลอดจากการปนเปื้อนของโลหะหนัก ทั้งนี้เพื่อสร้างความมั่นใจแก่ผู้บริโภคว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีความปลอดภัยจากโลหะหนัก รวมทั้งยังมีการควบคุมสภาวะของการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของสาหร่าย ซึ่งเป็นสภาวะที่สิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ การที่มีระบบการจัดการและควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่ดี ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สาหร่ายที่มีความปลอดภัยและมีคุณภาพดีเหมาะแก่การนำไปบริโภคเป็นอาหารเสริมสุขภาพ ซึ่งครอบคลุมตั้งแต่กระบวนการเพาะเลี้ยงนี้ด้วย

2. การเก็บเกี่ยวสาหร่าย (Harvest) การเก็บเกี่ยวสามารถเก็บเกี่ยวได้จากทุกบ่อเลี้ยง ก่อนการวางแผนการเก็บเกี่ยวฝ่ายวิเคราะห์คุณภาพจะตักตัวอย่างสาหร่ายทุกบ่อไปตรวจค่าต่างๆของสาหร่ายเพื่อนำมาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตแล้วกำหนดปริมาณการเก็บเกี่ยว

ในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวสาหร่ายนี้มีความสำคัญมาก เพราะเกี่ยวกับต้นทุนในการผลิต ซึ่งความเข้มข้นของสาหร่ายจะไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนมากจะอยู่ระหว่าง 200 - 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะมีเทคนิคที่ใช้ในการเก็บเกี่ยวสาหร่ายต่างๆในที่นี้ จะกล่าวถึงเทคนิคที่นิยมใช้โดยทั่วไป

การกรอง (filtration) วิธีการกรองนี้ เหมาะสำหรับสาหร่ายที่มีลักษณะ เป็นเส้นสาย หรือมีเซลล์ขนาดใหญ่ เช่น สาเหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina sp.*) จะทำโดยใช้ผ้ากรองไนลอน (nylon sieve) ที่มีรูให้กรองผ่าน ตามขนาดที่เหมาะสม ซึ่งวิธีการนี้ใช้ได้ผลดี สะดวกและราคาถูก

การปั่นแยก (centrifugation) เทคนิคนี้ใช้กันมากในการแยกสาหร่าย ที่มีขนาดเซลล์เล็ก เช่น คลอเรลลา (*Chlorella sp.*) วิธีการนี้ทำให้ค่าใช้จ่าย ในการลงทุนสูง เนื่องจากต้องใช้พลังงานในการแยก

การทำให้เกิดฟลอค และการตกตะกอน (floculation and sedimentation) ซึ่งการใช้เทคนิคนี้ ส่วนใหญ่จะใช้ในการแยกเซลล์สาหร่าย จากระบบบำบัดน้ำเสีย

สายพันธุ์สาหร่ายที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในทางการค้า ควรเป็นสายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็ว มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ไม่มีสารพิษ ทนทานต่ออุณหภูมิสูง ถ้าเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ก็จะง่ายต่อการเก็บเกี่ยว

3. การอบแห้ง (Dryness) มีระบบการอบแห้งสาหร่ายที่ทันสมัยเป็น Spray dry system ซึ่งควบคุมอุณหภูมิด้วยกราฟดิจิตอล สามารถอบเนื้อสาหร่ายที่มีความเข้มข้นสูง ให้เป็นฝอยละเอียดภายในระยะเวลาสั้นๆ ซึ่งรักษาคุณค่าทางอาหารของสาหร่ายให้อยู่ในปริมาณสูง

**2.1.9 คุณค่าทางโภชนาการ**

สถาบันวิจัยโภชนาการ ได้ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่าย โดยได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ พบว่าคุณค่าทางด้านโปรตีน อยู่ระหว่าง 10 - 40 กรัม ต่อสาหร่าย 100 กรัม ซึ่งถ้าเทียบกับอาหารที่เป็นแหล่งโปรตีนที่ดี เช่น เนื้อสัตว์ที่นำมาทำแห้ง เช่น เนื้อวัวอบแห้ง หมูแผ่น กุ้งแห้ง ซึ่งจะมีโปรตีนประมาณ 50 11 60 กรัม ต่อ 100 กรัม ตามลำดับ นอกจากนี้คุณค่าทางด้านใยอาหาร (Dietary fiber) ก็พบว่ามีอยู่สูงตั้งแต่ 27 - 41 กรัมต่อสาหร่าย 100

**ตารางที่ 2.1** กรดไขมันที่มีในสาหร่าย (Lee. J-Y et al., 2009)

| กรดไขมัน | ปริมาณของกรดไขมัน (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | โบทีโอคอกคัส | | คลอเรลลา วูกาลิส | | ซีนีเดสมัส | |
| C16:1 | 0.58 | (4.8) | | | | |
| C17:0 | 0.10 | (0.8) | 0.20 | (0.1) | 0.13 | (0.7) |
| C18:0 | 0.52 | (4.3) | 0.85 | (3.4) | 0.57 | (3.0) |
| C18:1 | 6.68 | (55.7) | 4.07 | (16.3) | 10.75 | (57.2) |
| C18:2 | 4.10 | (34.2) | 19.79 | (79.4) | 6.91 | (36.8) |
| C18:3 | 0.02 | (0.2) | 0.03 | (0.1) | 0.40 | (2.2) |
| รวม | 12.00 | (100) | 24.94 | (100) | 18.78 | (100) |

หมายเหตุ: (-) คือองค์ประกอบกรดไขมันโดยน้ำหนัก

C18:1 Oleic acid C18:3 linolenic acid C18:2 linoleic acid C18:0 Stearic acid

**ตารางที่ 2.2** สารอาหารที่เป็นประโยชน์ในจุลสาหร่าย

| | |
|---|---|
| กรดโฟลิค | ในจุลสาหร่ายมีกรดโฟลิคมากกว่า ไข่ นม และ ตับ หลายสิบเท่ากรดโฟลิคในสาหร่าย ช่วยบำรุงเลือด ป้องกันโรคโลหิตจาง และป้องกันความผิดปกติในลำไส้ |
| กรดไขมันจำเป็น | กรดไขมันจำเป็นคือกรดไขมันที่ร่างกายสร้างขึ้นเองไม่ได้ มีกรดไขมันจำเป็นมากกว่าที่พบในดอกคำฝอยและน้ำมันพริมโรส กรดไขมัน GLA สามารถทำให้ผิวเนียนนุ่ม ผมดำเป็นเงางาม และยังช่วยเสริมรากผมให้แข็งแรงและหยุดอาการผมร่วง |
| วิตามินบี 12 | ในสาหร่ายจะมีวิตามินบี 12 มากกว่าที่มีในอาหารชนิดอื่นและมากกว่าตับถึง 250 เปอร์เซ็นต์ สาหร่ายสไปรูลิน่าจึงเหมาะสำหรับผู้บริโภคอาหารมังสวิรัติเพราะในพืชชนิดอื่นมีวิตามินบี 12 น้อยมากหรือไม่มีเลย |
| วิตามินอี | ในสาหร่ายจะมีวิตามินอีเป็น 3 เท่าของจมูกข้าวสาลี เป็นสารแอนตี้ออกซิเดนท์ที่ช่วยป้องกัน และลดการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย ช่วยชะลอกระบวนการของความชรา ลดการเกิดริ้วรอย และการเสื่อมสลายของเซลล์ |
| โปรตีนและกรดอะมิโน | ในสาหร่ายจะมีโปรตีนอยู่ถึงร้อยละ 60 - 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นโปรตีนจากพืช จะเห็นว่าในสาหร่ายจะมีโปรตีนมากกว่าถั่วเหลือง เนื้อสัตว์และนม เนื่องจากโปรตีนจากสาหร่ายเป็นโปรตีนจากพืชจึงสามารถถูกย่อย และดูดซึมได้ดีกว่าโปรตีนจากเนื้อสัตว์ สาหร่ายมีกรดอะมิโนที่จำเป็นซึ่งร่างกายไม่สามารถสร้างเองได้ อยู่ครบในสัดส่วนที่เหมาะสม |

**2.1.10 หลักการทำงานของคลื่นไมโครเวฟ**

ไมโครเวฟ (http://www.dss.go.th/dssweb/starticles/files/pep_2_2546_microwave.pdf) เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่สูงมากถึง 2,450 ล้านรอบต่อวินาที ที่มีลักษณะคล้ายกับคลื่นวิทยุ แต่มีความถี่ที่สั้นกว่า หัวใจสำคัญของเตาไมโครเวฟ คือตัวแม็กนิตรอนที่จะเป็นตัวเปลี่ยนพลังงานไฟฟ้าเป็นคลื่นไมโครเวฟ ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ เพราะคลื่นไมโครเวฟเป็นความถี่สูงมิใช่รังสี จึงไม่กระจายและสะสมในร่างกายมนุษย์

ระบบการทำงานของเตาไมโครเวฟ คลื่นไมโครเวฟจะพุ่งเข้าสู่อาหารจากทุกทิศทุกทาง โดยรอบของผนังเตาด้านในแล้วแผ่กระจายไปสู่อาหาร เมื่อคลื่นไปกระทบอาหารทำให้โมเลกุลของอาหารเกิดการสั่นและเสียดสีกัน ก่อให้เกิดเป็นพลังงานความร้อนทำให้อาหารสุกอย่างรวดเร็ว ลักษณะเช่นเดียวกับที่เราใช้มือถูกันไปมาเร็วๆ จะรู้สึกร้อนขึ้นทันที

คลื่นไมโครเวฟมีลักษณะเด่น 3 ประการ ดังนี้

1. การสะท้อนกลับ (Reflection) คลื่นไมโครเวฟเมื่อไปกระทบกับภาชนะที่เป็นโลหะหรือมีส่วนผสมของโลหะ คลื่นไมโครเวฟไม่สามารถทะลุผ่านภาชนะดังกล่าวได้ จะสะท้อนกลับหมด ดังนั้นอาหารที่ใส่ในภาชนะที่เป็นโลหะก็จะไม่สุก

2. การส่งผ่าน (Transmission) คลื่นไมโครเวฟสามารถทะลุผ่านภาชนะที่ทำด้วยแก้ว กระดาษ ไม้ เซรามิกและพลาสติกได้ เพราะภาชนะดังกล่าวไม่มีส่วนผสมของโลหะ จึงเป็นภาชนะที่ใช้ได้ดีในเตาไมโครเวฟ

3. การดูดซึม (Absorption) ปกติอาหารโดยทั่วไปจะประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำในอาหาร ซึ่งจะดูดซึมคลื่นไมโครเวฟทำให้อาหารร้อนอย่างรวดเร็ว และอีกนัยหนึ่งเมื่อโมเลกุลของน้ำดูดซึมคลื่นไมโครเวฟแล้วจะสลายตัวได้ในทันทีไม่สะสมในอาหาร

เทคนิคการสกัดสารโดยอาศัยคลื่นไมโครเวฟ การสกัดโดยอาศัยคลื่นไมโครเวฟเป็นวิธีที่พัฒนามาจากวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายโดยการประยุกต์ใช้คลื่นไมโครเวฟมาช่วยในการสกัดพร้อมกับตัวทำละลาย ซึ่งมีข้อดีคือสิ้นเปลืองระยะเวลาในการสกัดสั้น มีต้นทุนในการสกัดต่ำ และคลื่นไมโครเวฟไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ การสกัดสารโดยใช้คลื่นไมโครเวฟมาช่วยในการสกัดได้มีผู้ทำการทดลองศึกษาปัจจัยต่างๆเกี่ยวกับการสกัด คือ อุณหภูมิ ปริมาณสารตัวอย่าง ชนิดของตัวทำละลาย ปริมาณของตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัด

เตาไมโครเวฟ (Microwave Oven) การประกอบอาหารด้วยเตาไมโครเวฟนี้แตกต่างจากการประกอบอาหารด้วยเตาอบธรรมดา คือเตาอบธรรมดาให้พลังงานความร้อนโดยเปลวไฟแบบเตาอบแก๊สหรือความร้อนจากขดลวดไฟฟ้า ซึ่งจะทำให้อาหารสุกโดยการถ่ายเทความร้อน คือการนำความร้อน การพาความร้อนและการแผ่รังสีความร้อนแต่เตาไมโครเวฟทำให้อาหารสุกโดยคลื่นไมโครเวฟที่มีความถี่สูง ทำให้โมเลกุลของน้ำในอาหารเกิดการสั่นสะเทือนและชนโมเลกุลอื่นๆ ต่อไปจนเกิดเป็นพลังงานจลน์และพลังงานจลน์นี้เองจะกลายสภาพเป็นพลังงานความร้อน จึงทำให้อาหารสุกอย่างรวดเร็วและเร็วกว่าการประกอบอาหารด้วยระบบอื่นๆ โดยไม่เสียพลังงานความร้อน

ระดับความร้อนของเตาไมโครเวฟที่ผลิตขึ้นใช้งานส่วนมากจะมี 5 ระดับของการทำงาน คือ HIGH MEDIUM HIGH MEDIUM MEDIUM LOW LOW VERY LOW ดังตารางที่ 2.3

**ตารางที่ 2.3** ค่าระดับความร้อนกับกำลังคลื่นไมโครเวฟ (วัตต์)

| ระดับความร้อน | กำลังคลื่นไมโครเวฟ (วัตต์) |
|---|---|
| HIGH | 800 |
| MEDIUM HIGH | 600 |
| MEDIUM | 450 |
| MEDIUM LOW | 300 |
| LOW | 180 |
| VERY LOW | 100 |

HIGH (FULL POWER) หมายถึง กำลังแรงสุดถ้าใช้ระบบนี้ในการปรุงอาหารก็จะช่วยให้อาหารสุกอย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปใช้ในการปรุงอาหารประเภทปลา เบคอน ผักต่างๆ อุ่นอาหารให้ร้อน เครื่องดื่มร้อน ละลายเนย และเนื้อ

MEDIUM HIGH (ROAST) ระบบนี้เหมาะสำหรับอบอาหาร ปิ้งอาหารและอาหารที่สุกแล้วโดยทั่วไปจะใช้ระบบนี้กับประเภทอาหารดังนี้ อุ่นอาหารที่ต้องการให้ร้อน อุ่นขนมปัง ไก่ย่าง หมูย่างและปรุงอาหารประเภทที่มีส่วนผสมของเนยแข็ง

MEDIUM (SIMMER) ระบบนี้เหมาะทำอาหารประเภท ซุป สเต็ก ข้าวอบหมูสับ อาหารที่แช่แข็ง ทำแฮมเบอเกอร์ ละลายน้ำแข็ง และต้มไข่

MEDIUM LOW (DEFROST) ระบบนี้ใช้ละลายอาหารที่แช่แข็ง เคี่ยวหรืออุ่นอาหารบางประเภทเท่านั้นอาหารสดส่วนใหญ่จะต้องเก็บรักษาไว้ในห้องเย็น เมื่อต้องการจะใช้ต้องเสียเวลาในการรอคอยให้น้ำแข็งละลายหรือคลายความเย็น แต่ระบบนี้ช่วยให้ประหยัดเวลาในการละลายอาหารแช่แข็งโดยอาหารยังคลสภาพสดไว้เช่นเดิมและไม่เสียคุณค่าทางอาหาร

LOW (WORM) ระบบนี้ใช้สำหรับอุ่นอาหารที่ไม่ต้องการให้อาหารร้อนจัดเกินไปจะทำให้รสชาติและสีสันของอาหารสดกว่าการอุ่นอาหารจากเตาทั่วๆไปเพราะสามารถปรับระดับความร้อนที่เหมาะสมกับชนิดของอาหารได้ตามที่ต้องการ

### 2.1.11 หลักการทำงานของเครื่องอัลตราโซนิค

อัลตราซาวนด์ (Barroso et al., 2008) มาจากคำว่า ultra+sound ซึ่งแปลว่าคลื่นที่อยู่นอกเหนือการได้ยินของมนุษย์ ที่มีค่าประมาณ 16 เฮิรตซ์ ถึง 16 กิโลเฮิรตซ์ อัลตราซาวนด์นั้นสามารถแบ่งการใช้งานออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงให้พลังงานต่ำ หรือช่วงความถี่สูง (Low power high frequency ultrasound) ช่วงความถี่ประมาณ 2 - 10 เมกะเฮิรตซ์ ซึ่งจะนำคลื่นอัลตราซาวนด์ช่วงนี้ไป

ประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น เครื่องอัลตราซาวนด์สำหรับดูเพศ หรือความผิดปกติของทารกในครรภ์ และ ช่วงให้พลังงานสูง (High power หรือ Low frequency ultrasound) จะมีค่าความถี่ประมาณ 20 - 100 กิโลเฮิรตซ์ เป็นช่วงที่สามารถนำมาใช้ในการสกัดสารจากพืชได้ วิธีการที่ใช้ในการสกัดแบ่งเป็น

1. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (โดยการสกัดแบบเดิมนั้นจะขึ้นอยู่กับการเลือกตัวทำละลายที่ถูกต้อง การผสม การให้ความร้อน และการกวน)

2. การกลั่น

3. การใช้เทคนิคสมัยใหม่เข้าช่วย เช่น การสกัดด้วยของเหลวยิ่งยวด Vortical extraction การสกัดโดยใช้พลังงานไฟฟ้าช่วย (Extraction by electrical energy) และการสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิค (Ultrasonically assisted extraction)

จากการประยุกต์ใช้อัลตราซาวนด์ในการสกัดพืช จำเป็นต้องทราบว่าเพราะเหตุใด อัลตราซาวนด์จึงช่วยในการสกัดสาระสำคัญได้ เนื่องจากเนื้อเยื่อของพืชที่ประกอบเป็นเซลล์นั้นมีส่วนผนังเซลล์อยู่ชั้นนอกสุด ซึ่งจะเป็นตัวต้านทานการสกัดได้ ซึ่งการสกัดจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ กระบวนการแพร่ผ่านผนังเซลล์ของตัวทำละลาย และการชะสาระสำคัญออกจากเซลล์เมื่อผนังเซลล์ถูกทำลายลง ส่วนการสกัดพืชแห้งจะเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งกระบวนการคือ กระบวนการดูดน้ำกลับ อัลตราซาวนด์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการดังกล่าวได้ โดยการเกิดปรากฏการณ์คาวิเทชั่น เนื่องมาจากคลื่นนั้นประกอบด้วยช่วงอัดและช่วงขยาย ในช่วงขยายเมื่อคลื่นเคลื่อนที่ผ่านตัวทำละลายจะทำให้เกิดฟอง (bubble) ของตัวทำละลายขนาดเล็กจำนวนมาก จากนั้นเมื่อฟองได้รับแรงจากคลื่นในช่วงอัดจะทำให้ฟองนั้นแตกออก และเกิด microjet ที่มีความแรงมาก จนสามารถเจาะทำลายผนังเซลล์ของพืชได้ เมื่อผนังเซลล์นั้นแตกออกจะทำให้เพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การทำให้ขนาดของตัวอย่างเล็กลงก่อนจะเพิ่มการสัมผัสกับตัวทำละลาย และคาวิเทชั่นได้ง่ายขึ้น

**2.1.12 หลักการของออสโมติกช็อค**

ออสโมติกช็อค (http://en.wikipedia.org/wiki/Osmotic_shock) คือ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวถูกละลายรอบเซลล์อย่างฉับพลัน ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของน้ำผ่านบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ภายใต้เงื่อนไขของเกลือที่มีความเข้มข้นสูงน้ำจะไหลออกจากเซลล์ด้วยวิธีออสโมซีส ด้วยเหตุนี้จึงไปยับยั้งการส่งผ่านของสารตั้งต้นและเป็นปัจจัยที่มีผลร่วมทำให้เซลล์แตกตัว หรือที่ความเข้มข้นของตัวถูกละลายต่ำๆ น้ำภายนอกเซลล์ก็จะไหลเข้าไปในเซลล์ทำให้เซลล์ขยายออก

**2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

**Lee. J-Y et al. (2009)** ได้ทำการศึกษาสาหร่ายสามสายพันธุ์คือโบทีโอคอกคัส คลอเรลลา วูกาลิส และซีนีเดสมัส ที่เลี้ยงด้วยอาหาร BG 11ให้อากาศ 150 มิลลิโมลต่อตารางเมตรต่อนาที อยู่ในระบบหมุนเวียน เพื่อนำสาหร่ายที่เลี้ยงได้มาสกัดไขมันด้วยตัวทำละลาย คลอโรฟอร์มและเมททานอล ในอัตราส่วน 1:1 ในการสกัดไขมันนั้นต้องทำให้เซลล์สาหร่ายแตกตัว โดยเปรียบเทียบกรรมวิธีต่างๆ 5 วิธี ดังนี้

1. วิธี Autoclave ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 เมกะปาสคาล ในเวลา 5 นาที
2. วิธี Bead beating ที่ความเร็ว 2,800 รอบนาที ในเวลา 5 นาที
3. วิธี Microwave ที่อุณหภูมิสูง 100 องศาเซลเซียส และ 2,450 เมกะเฮิรตซ์ ในเวลา 5 นาที
4. วิธี Sonication ใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่ 10 กิโลเฮิรตซ์ ในเวลา 5 นาที
5. วิธี Osmotic shock ใช้สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ ของ NaCl ในน้ำวน 1 นาที หลังจากนั้นเก็บไว้ 48 ชั่วโมง

การเปรียบเทียบกรรมวิธีการสกัดไขมัน สาหร่ายโบทีโอคอกคัส (*Botryococcus sp.*) ให้ผลที่น่าพอใจ คือ 160 มิลลิกรัม ซึ่งให้ผลที่สูงกว่าคลอเรลลา วูลกาลิส (*Chlorella vulgaris*) และซินีเดสมัส (*Scenedesmus*) และคลอเรลลา วูลการีส (*Chlorella vulgaris*) และซินีเดสมัส (*Scenedesmus*) มีผลคล้ายกัน ในขณะที่ผลผลิตของไขมันที่ได้จากสาหร่ายโบทีโอคอกคัส ให้ผลสูงถึง 11.5 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งมีผลคล้ายกันกับ คลอเรลลา วูลการีส ซึ่งกรรมวิธีที่ใช้คือไมโครเวฟ ซึ่งทั้งสามสายพันธุ์ใช้วิธีนี้จะได้ปริมาณน้ำมันสูงกว่าวิธีอื่น สาหร่ายโบทีโอคอกคัส ใช้กรรมวิธีเบดบีดติ้ง (bead beating) และไมโครเวฟ (microwave) จะให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับกับวิธีอื่นให้ผลคือ 28.1 และ 28.6 ตามลำดับ และวิธีโซนิคเคชั่น (sonication) จะให้ผลที่ต่ำ 8.8 เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษาที่ผ่านมาและกรรมวิธีเบดบีดติ้ง แสดงผลที่สกัดไขมันที่สูงเช่นกัน จากสาหร่ายโบทีโอคอกคัส เมื่อเทียบกับวิธีโซนิคเคชั่น อย่างไรก็ตามการสกัดด้วยวิธี เบดบรีดติ้ง เป็นวิธีที่ยุ่งยาก กับคลอเรลลา วูลกาลิส เมื่อเทียบกับวิธีไมโครเวฟ กับวิธีออโตเคลฟ (autoclave) วิธีไมโครเวฟสามารถนำไปปรับปรุงใช้ในการสกัดไขมันจากสาหร่ายได้ดีที่สุด

**Yusuf Chisti (2007)** กล่าวว่าปัจจุบันได้มีการศึกษาแนะนำการรวมวิธีการผลิตไบโอดีเซลจากจุลสาหร่าย การเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella protothecoides* แบบ heterotrophic ในสภาวะที่ได้รับแสง ใน Batch ภายใต้อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส (±1) ให้แสงที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาที ให้ออกซิเจนภายใต้ความดันปกติ เพิ่มกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และลด glycine ลงเหลือ 0.1 กรัมต่อลิตร จะมีการสะสม lipid ภายในเซลล์สูงถึง 55 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ที่นำมาสกัด

น้ำมันถูกเก็บโดยวิธี ปั่นแยก การล้างน้ำกลั่น อบแห้ง และนำมาสกัดโดยใช้ n-Hexane เมื่อเราได้ทำการเปรียบเทียบน้ำมันดีเซลกับน้ำมันไบโอดีเซลที่ได้จากคลอเรลลา โพรโตติคอยด์ (*Chlorella protothecoides*) โดยวิธี Acidic transesterification โดยวิธีที่ดีที่สุดคือการใส่ตัวเร่งปฏิกิริยาลงไป 100 เปอร์เซ็นต์ (ขึ้นอยู่กับน้ำหนักของน้ำมัน) อัตราส่วนของเมทิลแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันคือ 56:1 โดยโมล ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และลดค่า Specific gravity ลงจาก 0.912 เหลือ 0.8637 ในการทดลอง 4 ชั่วโมงด้วยวิธี Acidic transesterification จึงทำให้ได้กระบวนการใหม่ คือการรวม Bioengineering และ Transesterification เพื่อการผลิตไบโอดีเซลจาก จุลสาหร่าย ที่มีประสิทธิภาพและคุณภาพสูง น้ำมันที่ได้สามารถตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ โดยใช้ CE - 440 Element analyzer

**ดนุกูล และ ศิริลักษณ์ (2008)** ได้เพาะเลี้ยงสาหร่าย 2 สายพันธุ์คือ *Chlorella sp.* และ *Chlorella vulgaris* ที่สภาวะต่างๆ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสาหร่ายผลปรากฏสภาวะและสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลสาหร่ายคือ *Chlorella vulgaris* เลี้ยงด้วยอาหาร BG 11 ที่อุณหภูมิ 29.56 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 7.14 อัตราการไหลของ $CO_2$ เท่ากับ 15.54 มิลลิลิตรต่อนาที ให้อัตราการไหลของอากาศคงที่ที่ 600 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.932 กรัมต่อลิตร

**ชิโนรส และ คณะ (2551)** ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและเปอร์เซ็นต์ของการสะสมไขมันในการเลี้ยงสาหร่ายพื้นเมืองในขวดแก้วใส (PET) โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลงให้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 1 % ณ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และ 5,000 ลักซ์ โดยใช้แสงสีส้มและแสงสีขาวจากหลอด ฟลูออเรสเซนต์ ขนาด 36 วัตต์ ช่วงเวลาของการให้แสงสว่างต่อมืด เท่ากับ 12:12 และ 16:8 ชั่วโมง อุณหภูมิประมาณ 27 - 29 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของสาหร่ายท้องถิ่นพื้นเมือง จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้สาหร่ายพื้นเมืองมีการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.542 ต่อวัน และมีไขมันสะสมในเซลล์ ร้อยละ 6.42 ตามลำดับ ณ ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ โดยมีแสงสีส้มเป็นแหล่งพลังงาน ช่วงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16:8 ชั่วโมง ปริมาณเฟอร์ริคคลอไรด์และกลูโคสเท่ากับ 0.003 และ 0.45 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โครงงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella sp.* และ *Chlorella vulgaris* เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น อัตราการไหลโดยปริมาตรของ $CO_2$ และชนิดของอาหาร เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย และเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสาหร่ายตามวิธีการของ Lowry

**ประหยัด โภคฐิติยุกต์ (2550)** ได้ศึกษาการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่าย ได้กล่าวถึงงานวิจัยในช่วงเบื้องต้นว่า สาหร่ายสีเขียว 3 ชนิด ที่นำมาทดสอบจะให้น้ำมันประมาณร้อยละ 20 - 30 ขณะที่สาหร่ายทั่วไปจะให้น้ำมันเฉลี่ยร้อยละ 7 - 14 และสาหร่ายที่โตเร็วก็มักจะให้น้ำมันน้อยกว่าสาหร่ายที่โตช้า คณะวิจัยได้เพาะเลี้ยงสาหร่ายในห้องทดลอง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ

การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วพร้อมทั้งให้น้ำมันมากแล้วจึงขยายลงสู่บ่อเพาะเลี้ยงต่อไป นอกจากนี้ยังพบด้วยว่าสภาพแวดล้อมในประเทศไทยเหมาะแก่การเพาะเลี้ยงสาหร่ายอย่างยิ่ง เพราะภายใน 24 ชั่วโมงสาหร่ายก็เติบโตได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่พืชพลังงานอื่นๆ ต้องใช้เวลาเพาะปลูกนานกว่า 6 - 7 ปี จึงจะสกัดน้ำมันได้ และหากเลี้ยงสาหร่ายในบ่อพื้นที่ขนาดเท่ากับพื้นที่ปลูกสบู่ดำ 1 ตัน เป็นเวลา 7 ปี สบู่ดำจะให้น้ำมันร้อยละ 25 ในขณะที่สาหร่ายให้น้ำมันมากถึงร้อยละ 70 ปริมาณน้ำมันนี้อาจเพียงพอกระทั่งผลิตเพื่อส่งออกต่างประเทศได้ในส่วนของกรรมวิธีในการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายนั้นคณะวิจัยได้นำองค์ความรู้ที่สืบเนื่องมาจากการวิจัยพืชพลังงานรุ่นก่อน โดยวางแนวทางได้ 5 วิธี ได้แก่ การใช้แรงเหวี่ยงแยกเอาน้ำมันออก การตกตะกอนแยกเอาตัวสาหร่ายออก การใช้สารละลายทางเคมีละลายเอาน้ำมันออก การใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้นให้สาหร่ายคลายน้ำมัน และบีบอัดเพื่อให้คลายน้ำมัน อย่างไรก็ตาม ทั้งนี้ยังเป็นแนวทางที่ยังต้องศึกษาต่อไปว่าวิธีใดเหมาะสมกับเครื่องยนต์และความต้องการในการใช้งานของคนไทยมากที่สุด ในทางอ้อมผลพลอยได้จากการสกัดน้ำมันจากสาหร่าย คือการนำกากสาหร่ายที่ตกตะกอนไปใช้เป็นวัตถุดิบของผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น อาหารสัตว์ ปุ๋ย ยา เป็นต้น นอกจากนี้สาหร่ายยังเอื้อประโยชน์ในด้านอื่นๆ ทั้งการสร้างงานของเกษตรกรสร้างรายได้ให้แก่ชุมชน สังคม และประเทศชาติ ลดการพึ่งพาพลังงานจากต่างประเทศ บรรเทาผลกระทบจากวิกฤติราคาน้ำมันที่มีต่อทุกภาคส่วนของสังคม ก่อเกิดการขยายตัวของธุรกิจปิโตรเลียมและธุรกิจอื่นๆ อย่างต่อเนื่อง

**วิษณุ มีอยู่ (2550)** ได้กล่าวถึงการนำสาหร่ายมาผลิตน้ำมันว่าการเผาเซลลูโลสที่เป็นโพลิเมอร์ทางธรรมชาติ ความร้อนจะแตกโครงสร้างทางเคมี โมเลกุลที่ใหญ่จะเล็กลงกลายเป็น น้ำมันกับแก๊สซึ่งในกระบวนการแตกเซลลูโลสเป็นน้ำมัน สามารถทำได้กับพืชทุกชนิด แต่จะมองกันที่ความคุ้มค่ามากกว่า และต้องดูว่าพืชแต่ละชนิดมีน้ำเป็นองค์ประกอบมากน้อยแค่ไหน เพราะถ้าเป็นพืชที่มีน้ำมาก เมื่อนำมาเผาแล้วก็ได้น้ำมันน้อย อันที่จริงแล้วน้ำมันที่ได้จากการแตกเซลลูโลส ไม่อยากให้เรียกว่าน้ำมัน ควรเรียกว่าสารเคมีชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงน้ำมัน เพราะเราสามารถนำสารเคมีที่ได้จากพืชนี้ไปตกแต่งทางเคมีให้มีคุณสมบัติเหมือนน้ำมันดีเซล เบนซิน โพลิเมอร์พลาสติก ที่ขายกันอยู่ก็ทำได้