การประยุกต์ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์เพื่อสกัดสารจาก *Chlorella vulgaris* TISTR8580

An Application of Pulsed Electric Field for Intracellular Extraction from *Chlorella vulgaris* TISTR8580

เวสารัช จรเจริญ[1] พานิช อินต๊ะ[2] และ สุเปญญา จิตตพันธ์ [1]*

Veasarach Jonjaroen[1], Panich Intra[2] and Supenya Chittapun[1]*

[1] *สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*

[2] *หน่วยวิจัยสนามไฟฟ้าประยุกต์ในทางวิศวกรรม วิทยาลัยเทคโนโลยีและสหวิทยาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา*

[1]*Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University*

[2] *Research Unit of Applied Electric Field in Engineering, College of Intregrated Science and Technology, Rajamangala University of Technology Lanna*

Received : 7 May 2018

Accepted : 8 August 2018

Published online : 12 September 2018

บทคัดย่อ

ศึกษาการประยุกต์ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์เพื่อสกัดสารจากจุลสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR8580 โดยนำสาหร่ายความเข้มข้น 25 กรัมเซลล์สดต่อลิตร อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียสมาสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่ความเข้มของสนามไฟฟ้าเท่ากับ 5 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร และแปรผันจำนวนพัลส์ดังนี้ 1,500 2,500 3,500 และ 4,500 พัลส์ ตรวจวัดอุณหภูมิ พีเอช และค่าการนำไฟฟ้าทั้งก่อนและหลังการทดลอง ตรวจหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนทั้งหมดในสารสกัดหยาบโดยวิธี Phenol-sulfuric และ Bradford และตรวจสอบชนิดของคาร์โบไฮเดรตโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง พร้อมทั้งตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ผ่านการสกัดด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และตรวจสอบความสามารถในการอยู่รอดของเซลล์สาหร่ายด้วยการนำไปทดลองเลี้ยงซ้ำ พบว่าเมื่อใช้จำนวนพัลส์ในการสกัดเพิ่มขึ้น อุณหภูมิและค่าการนำไฟฟ้าของตัวอย่างมีค่าเพิ่มขึ้น โดยที่จำนวนพัลส์เท่ากับ 2,500 พัลส์สามารถสกัดคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนทั้งหมดได้มากที่สุดเท่ากับ 23.19 ± 1.47 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 144.48 ± 1.41 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ คาร์โบไฮเดรตที่สกัดได้ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มไดแซ็กคาไรด์และโอลิโกแซ็กคาไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์มีสีจางลงและไม่ปรากฏเซลล์แตก โดยเมื่อนำสาหร่ายไปสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์จำนวน 2,500 พัลส์ขึ้นไป ทำให้เซลล์สาหร่ายเสื่อมสภาพและไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสนามไฟฟ้าแบบพัลส์สามารถประยุกต์ใช้สกัดคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนจากสาหร่ายได้ อย่างไรก็ตามสารที่สกัดได้ยังมีปริมาณน้อย ฉะนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงปัจจัยอื่นๆ ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ในสาหร่ายเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ : จุลสาหร่าย, สนามไฟฟ้าแบบพัลส์, การสกัด

*Corresponding author. E-mail : supenyac@tu.ac.th

Abstract

This study aimed to apply Pulsed Electric Field (PEF) for *Chlorella vulgaris* TISTR8580 intracellular extraction. Twenty-five g/L of algal cell samples were treated with PEF at 5 kV/cm under different pulses (1,500 2,500 3,500 and 4,500 pulses) with the initial temperature of 7 degree Celsius. Temperature, pH and conductivity were measured before and after treatments. Total carbohydrate and protein contents in the crude extracts were determined by the Phenol sulfuric acid method and the Bradford assay, respectively. Subsequently, carbohydrate composition was analyzed by Thin Layer Chromatography (TLC). In addition, the morphology of PEF-treated cells was observed under light microscope and cell survival was examined by re-culture in BG-11. The results showed an increased number of PEF pulses raised the temperature and conductivity of the algal extract. The highest total carbohydrate (23.19 ± 1.47 mg/L) and protein (144.48 ± 1.41 μg/L) contents were obtained from the crude extract treated with 2,500 pulses. TLC revealed that disaccharides and oligosaccharides were the major carbohydrate composition in the extract. PEF-treated algal cells exhibited color fading without any cell lysis. However, PEF treatment at 2,500 pulses led to cell death. This study clearly suggested that PEF is a potential technology for *C. vulgaris* TISTR8580 carbohydrate and protein extraction. Further optimization to enhance PEF extraction efficiency are still needed to achieve high yield of algal intracellular extract.

Keywords : microalgae, Pulsed Electric Field, extraction

บทนำ

ปัจจุบันจุลสาหร่าย (Microalgae) ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เช่น อาหารเสริม โภชนเภสัช องค์ประกอบในเครื่องสำอาง และเชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นต้น (Batista *et al.,* 2013; Vanthoor-Koopmans *et al*., 2013) *Chorella* sp. เป็นจุลสาหร่ายสีเขียวที่รู้จักกันโดยทั่วไป สามารถพบได้ในแหล่งน้ำจืดทุกประเภท และนิยมนำไปใช้ประโยชน์ เนื่องจาก *Chorella vulgaris* ประกอบด้วย โปรตีนร้อยละ 51 – 58 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 12-17 และไขมันร้อยละ 14-22 จึงเหมาะสมในการใช้เป็นอาหารเสริม (Becker, 2007) นอกจากนี้ยังมีแคโรทีนอยด์ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Gouveia *et al*., 1998) และมีลูทีนเป็นองค์ประกอบซึ่งช่วยในการบำรุงสมองอีกด้วย (Luengo *et al.,* 2015) การนำสารต่างๆ จากเซลล์สาหร่ายมาใช้ประโยชน์ต้องผ่านกรรมวิธีสกัด ซึ่งมีทั้งวิธีเชิงกลและเชิงเคมี โดยแต่ละวิธีสกัดมีความซับซ้อนและมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ในการสกัดสารจากเซลล์ *C. vulgaris* นั้นนิยมใช้วิธีบดด้วยเม็ดบีดที่เรียกว่า บีดมิลล์ (Bead mill) และวิธีแช่แข็งละลาย (Freezing and thawing) การสกัดทั้งสองวิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถทำให้เซลล์แตกและปล่อยสารที่อยู่ภายในเซลล์ออกมาได้ อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีนี้ประสบปัญหาในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวองค์ประกอบของสารสกัดหยาบที่สกัดได้ เนื่องจากต้องมีการแยกเศษเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ออกจากสารสกัดหยาบ รวมทั้งต้องมีการนำสารสกัดหยาบไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ทำให้ใช้ระยะเวลานานและใช้พลังงานสูงในกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ (Postma *et al.,* 2015) ฉะนั้นการหาวิธีสกัดอื่นที่ช่วยลดปัญหาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากจะช่วยลดระยะเวลาและความซ้ำซ้อนในการเก็บเกี่ยวสารแล้ว ยังช่วยลดต้นทุนในกระบวนการผลิตได้อีกด้วย

การสกัดสารโดยใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ (Pulsed Electric Field : PEF) เป็นเทคนิคที่ให้สนามไฟฟ้าความเข้มสนามไฟฟ้าสูงผ่านตัวกลางและไปกระทบกับผนังเซลล์ ส่งผลให้ชั้นฟอสโฟลิพิดซึ่งเป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ ทำให้เกิดรูพรุนของเยื่อหุ้มเซลล์ (Electroporation) ทำให้สารที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ถูกปล่อยออกมาภายนอกทางรู (Goettel *et al.,* 2013) และหากความเข้มสนามไฟฟ้ามีค่าสูงมากพออาจทำให้เซลล์แตก (Disintegration) และปล่อยสารต่างๆ ออกนอกเซลล์ได้ ('t Lam *et al.,* 2017) ปัจจุบันสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย เช่น ใช้ในขั้นตอนการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในการรักษาทางการแพทย์ และใช้ในการสกัดสารจากสิ่งมีชีวิต เป็นต้น โดยการใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่ความแรงสูงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารที่มีลักษณะเป็นของเหลว เช่น น้ำผลไม้ โดยน้ำผลไม้ที่ผ่านกระบวนการการให้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ยังมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำผลไม้คั้นสดและยังคงคุณค่าทางโภชนาการได้อีกด้วย (Kungsadan, 2011) สนามไฟฟ้าแบบพัลส์จึงสามารถประยุกต์ใช้ในการยืดอายุผลิตภัณฑ์อาหารได้ การทดลองใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนม พบว่าการให้สนามไฟฟ้าแรงดัน 30 KV ที่ความถี่ 10 KHz กับน้ำนมที่ลำเลียงผ่านห้องฆ่าเชื้อด้วยอัตราการไหล 2 ลิตรต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 นาที ทำให้ปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* มีจำนวนลดลงจากเริ่มต้น 3.28×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เหลือ 1.09×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และน้ำนมมีอุณหภูมิสูงขึ้น 2-3 องศาเซลเซียส (Panyamuangjai *et al.,* 2012) นอกจากนี้การทดลองใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ร่วมกับอุณหภูมิในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Salmonella* Panama, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในน้ำแอบเปิ้ล น้ำส้ม และน้ำแตงโม พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำผลไม้ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ชนิดของจุลินทรีย์ และอุณหภูมิของน้ำผลไม้ รวมทั้งพบว่าอุณหภูมิและสนามไฟฟ้าแบบพัลส์มีความสัมพันธ์กันในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นพลังงานที่ใช้ในการให้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์จะน้อยลง (Timmermans *et al.,* 2014) จะเห็นได้ว่าสนามไฟฟ้าแบบพัลส์นิยมนำมาใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลาย

ส่วนการประยุกต์ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์เพื่อสกัดสารที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ของจุลสาหร่ายนั้นยังมีอยู่ค่อนข้างน้อย โดยมีรายงานการประยุกต์ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์เพื่อสกัดไขมันจาก *Auxenochlorella protothecoides* พบว่าสามารถสกัดไขมันได้ร้อยละ 20 (Goettel *et al.,* 2013) การใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ร่วมกับอุณหภูมิในช่วง 10 – 40 องศาเซลเซียสเพื่อสกัดลูทีนจาก *C. vulgaris* พบว่าความเข้มสนามไฟฟ้าเท่ากับ 25 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตรส่งผลให้อุณหภูมิของสารสกัดเพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส และสามารถสกัดลูทีนได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 35 (Luengo *et al.,* 2015) นอกจากนี้การใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ร่วมกับอุณหภูมิในการสกัดสารจาก *C. vulgaris* พบว่าอุณหภูมิในช่วง 25 – 55 องศาเซลเซียสร่วมกับการใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ ส่งผลให้สารละลายมีค่าการนำไฟฟ้าเพิ่มขึ้นร้อยละ 70 และสามารถสกัดคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนได้ร้อยละ 25 – 39 และ 3 – 5 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามปริมาณสารที่สกัดได้จากการใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ยังมีปริมาณน้อยกว่าการสกัดโดยวิธีบีดมิลล์ (Postma *et al.,* 2016) จากรายงานการประยุกต์ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ในการสกัดสารต่างๆ จากจุลสาหร่าย พบว่าสนามไฟฟ้าแบบพัลส์มีศักยภาพในการสกัดสารจากสาหร่าย และจากสมมติฐานที่กล่าวว่าสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ทำให้ชั้นฟอสโฟลิพิดมีการจัดเรียงตัวใหม่และทำให้เกิดรูพรุนที่เยื่อหุ้มเซลล์ ฉะนั้นเมื่อหยุดให้สนามไฟฟ้าฟอสโฟลิพิดของเยื่อหุ้มเซลล์อาจมีการกลับมาจัดเรียงตัวตามปกติ ทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ต่อไปได้ งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการประยุกต์ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ในการสกัดสารจากจุลสาหร่าย *C. vulgaris* TISTR8580 ซึ่งเป็นสาหร่ายที่นิยมนำไปใช้งานทางเทคโนโลยีชีวภาพอย่างแพร่หลาย โดยหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถสกัดคาร์โบไฮเดรตและ

โปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์ออกมาได้มากที่สุด พร้อมทั้งยังตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ทั้งก่อนและหลังการสกัด รวมทั้งทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ *C. vulgaris* TISTR8580 หลังสกัดโดยการนำไปทดลองเลี้ยงซ้ำเพื่อดูการเจริญเติบโต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สายพันธุ์จุลสาหร่าย

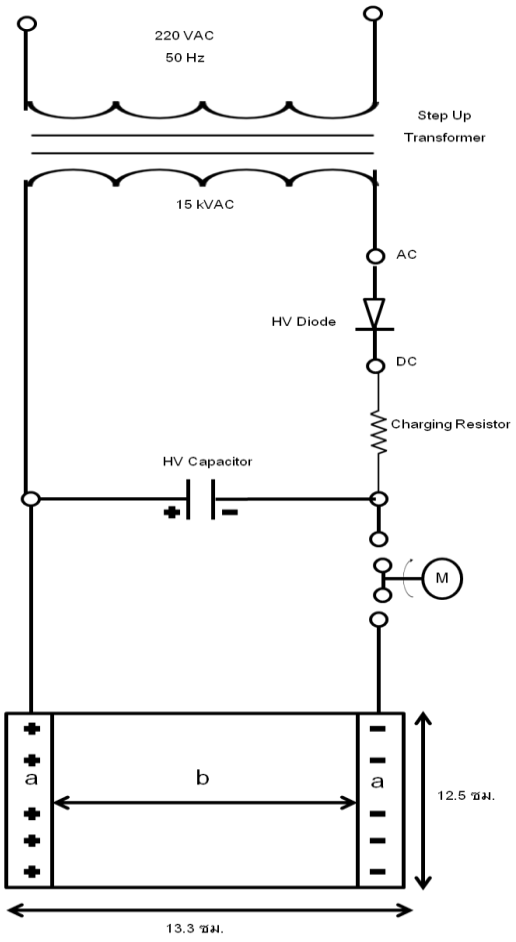
จุลสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR8580 ที่ใช้ในการทดลองนี้โดยได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2. การเพาะเลี้ยงและเตรียมเซลล์ *C. vulgaris* TISTR8580

เริ่มต้นด้วยการเพาะเลี้ยง *C. vulgaris* TISTR8580 ด้วยอาหารเหลว BG-11 ปริมาตร 30 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นนำไปขยายระดับการเพาะเลี้ยงด้วยระบบเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก (Chittapun *et al.,* 2017) โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ปริมาตร 15 ลิตร ภายใต้สภาวะธรรมชาติเป็นเวลา 15 วัน จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และล้างเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาโดยปรับความเข้มข้นของเซลล์ *C. vulgaris* TISTR8580 ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 กรัมเซลล์สดต่อลิตร และปรับอุณหภูมิเริ่มต้นให้เท่ากับ 7 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดลองสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ต่อไป

3. การสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์

เติมตัวอย่างที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 500 มิลลิลิตรลงไปในห้องสกัด (Chamber) ซึ่งมีขนาด 6.5 x 13.3 x 12.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 1) สกัดโดยใช้ความเข้มสนามไฟฟ้าเท่ากับ 5 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ความถี่ 2 เฮิรตซ์ และแปรผันจำนวนพัลส์ดังนี้ 1,500 2,500 3,500 และ 4,500 พัลส์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยมีน้ำกลั่นที่ผ่านการให้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์จำนวนต่างๆ เป็นชุดควบคุม ทำการทดลองทรีทเมนต์ละ 2 ซ้ำ และดำเนินการทดลองทั้งสิ้น 3 ครั้ง



ภาพที่ 1 วงจรสนามไฟฟ้าแบบพัลส์และห้องสกัดสำหรับเติมตัวอย่างปริมาตร 500 มิลลิลิตร
a แทนขั้วไฟฟ้า (Electrodes)
b แทนระยะห่างของขั้วไฟฟ้า

ตารางที่ 1 ทรีทเมนต์การสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์

ทรีทเมนต์	ตัวอย่าง (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)	ความเข้มสนามไฟฟ้า (กิโลโวลต์/เซนติเมตร)	จำนวนพัลส์ (พัลส์)
ควบคุม 1	น้ำกลั่น	5	1,500
ควบคุม 2	น้ำกลั่น	5	2,500
ควบคุม 3	น้ำกลั่น	5	3,500
ควบคุม 4	น้ำกลั่น	5	4,500
1	*C. vulgaris* TISTR8580	5	1,500
2	*C. vulgaris* TISTR8580	5	2,500
3	*C. vulgaris* TISTR8580	5	3,500
4	*C. vulgaris* TISTR8580	5	4,500

4. การตรวจวัดและวิเคราะห์ตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์

4.1 พารามิเตอร์ที่ตรวจวัด

ตรวจวัดพารามิเตอร์ต่างๆ ทั้งก่อนและหลังการสกัดดังนี้ วัดค่าพีเอชโดยใช้ pH meter (BECKMAN Φ50 pH Meter) วัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ และวัดค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง Conductivity meter (CON 6/TDS 6 Conductivity/TDS meter) จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดทุกทรีทเมนต์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (OLYMPUS CX31) ส่วนใสของสารสกัดหยาบนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 ถึง 800 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟทอมิเตอร์ (Spectrophotometer Biochrom Product Libra S21, S22) และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนทั้งหมด

4.2 การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่สกัดได้ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid (Dubois *et al.*, 1956) โดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน จากนั้นคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดดังสมการที่ 1

$$\text{ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{(อัตราการเจือจาง x ค่าการดูดกลืนแสง)}}{\text{ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน}} \quad (1)$$

4.3 การตรวจสอบชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่สกัดได้

ตรวจสอบชนิดของคาร์โบไฮเดรตในสารสกัดหยาบโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin layer chromatography, TLC) และใช้กลูโคส ซูโครส และแมนโนไบโอสเป็นสารมาตรฐาน โดยหยดสารมาตรฐานและสารสกัดหยาบปริมาตรอย่างละ 2 ไมโครลิตรลงบนแผ่น Aluminium silica gel 60 จากนั้นจุ่มลงในแท็งก์ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย N-butanol: Isopropanol: Ethanol: น้ำกลั่น อัตราส่วน 2:3:3:2 และย้อมสีด้วยสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.2% (w/v) ออร์ซินอล(Orcinol) ใน 10% (v/v) กรดซัลฟิวริก (ดัดแปลงจากวิธีของ Akiyama *et al.* (1996)) จากนั้นคำนวณค่า R_f ซึ่งหาได้จากอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่สารเคลื่อนที่กับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ดังสมการที่ 2

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}} \quad (2)$$

4.4 การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้ด้วยวิธีของ Bradford (Bradford, 1976) โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นคำนวณปริมาณโปรตีนทั้งหมดดังสมการที่ 3

$$\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{(อัตราการเจือจาง x ค่าการดูดกลืนแสง)}}{\text{ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน}} \quad (3)$$

5. การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์

ทดสอบการมีชีวิตของ *C. vulgaris* TISTR8580 ที่ผ่านการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่จำนวนพัลส์ต่างๆ โดยนำตะกอนเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตรไปทดลองเลี้ยงซ้ำในอาหาร BG-11 ปริมาตร 200 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน และศึกษาการเจริญเติบโต โดยสุ่มเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นระยะเวลา 13 วัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จะนำเสนอในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Average ± SD) เปรียบเทียบปริมาณของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จากทรีทเมนต์ต่างๆ โดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณที่สกัดได้แต่ละคู่โดยใช้ Tukey's HSD test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. พีเอช อุณหภูมิ และค่าการนำไฟฟ้า

การประยุกต์ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ในการสกัดมีผลให้ค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 2) และทำให้อุณหภูมิและค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3) และจำนวนพัลส์ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ทั้งอุณหภูมิและค่าการนำไฟฟ้าเพิ่มขึ้นตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการสกัดสารจาก *C. vulgaris* TISTR8580 โดยใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งต่างจากรายงาน Oleksii *et al.* (2015) ที่รายงานว่าการใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์โดยให้ความเข้มสนามไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดเท่ากับ 2 เซนติเมตร เพื่อสกัดสารจาก *Nannochloropsis* ทำให้อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงจาก 293 เคลวินเป็น 303 เคลวิน และรายงานของ Grimi *et al.* (2011) ที่รายงานว่าการใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์เป็นการสกัดที่ไม่ก่อให้เกิดความร้อน และไม่ส่งผลให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ลดลง แต่งานวิจัยนี้พบว่าการใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ในการสกัดสารจาก *C. vulgaris* TISTR8580 มีความร้อนเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการ ทั้งนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นเกิดจากการให้กระแสไฟฟ้าผ่านของเหลวที่มีความต้านทานในห้องสกัด จึงทำให้มีความร้อนเกิดขึ้น เรียกว่าโอห์มิก (Ohmic heating) (Lindgren *et al.*, 2002; Bhat *et al.*, 2018) เช่นเดียวกับรายงานของ Luengo *et al.* (2015) ที่รายงานว่าการใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ในการสกัดลูทีนจาก *C. vulgaris* ทำให้อุณหภูมิของสารสกัดสูงขึ้น นอกจากนี้ค่าการนำไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นหลังการสกัดแสดงให้เห็นว่ามีองค์ประกอบของสารในสารละลายเพิ่มขึ้น แสดงว่าการประยุกต์ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์สามารถสกัดสารจาก *C. vulgaris* TISTR8580 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Postma *et al.* (2016) ได้รายงานว่าการเพิ่มอุณหภูมิระหว่างการสกัดสารจาก *C. vulgaris* โดยใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ส่งผลให้ค่าการนำไฟฟ้าของสารที่สกัดได้สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการให้กระแสไฟฟ้าแบบพัลส์ส่งผลต่อความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์สาหร่าย ทำให้อิออนขนาดเล็กบางชนิดภายในเซลล์สาหร่ายสามารถเคลื่อนที่ออกนอกเซลล์ได้ อิออนที่ออกมานี้มีผลทำให้ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายเพิ่มขึ้น ฉะนั้นการนำสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ไปใช้ในการสกัดสารชีวภาพเช่น โปรตีน และเอนไซม์จากสาหร่ายต้องระมัดระวังความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการสกัดด้วย เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในสารสกัดหยาบเสื่อมสภาพได้

ตารางที่ 2 ค่าพีเอชของตัวอย่างก่อนและหลังการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์

ทรีทเมนต์	ตัวอย่าง (500 มิลลิลิตร)	จำนวนพัลส์ (พัลส์)	พีเอช	
			ก่อน	หลัง
ควบคุม 1	น้ำกลั่น	1,500	7.73±0.11	7.77±0.01
ควบคุม 2	น้ำกลั่น	2,500	7.70±0.15	7.42±0.16
ควบคุม 3	น้ำกลั่น	3,500	7.92±0.09	7.83±0.25
ควบคุม 4	น้ำกลั่น	4,500	7.76±0.14	7.56±0.14
1	*C. vulgaris*	1,500	7.70±0.15	7.65±0.16
2	*C. vulgaris*	2,500	7.70±0.15	7.18±0.53
3	*C. vulgaris*	3,500	7.09±0.43	7.56±0.50
4	*C. vulgaris*	4,500	7.07±0.47	7.56±0.62

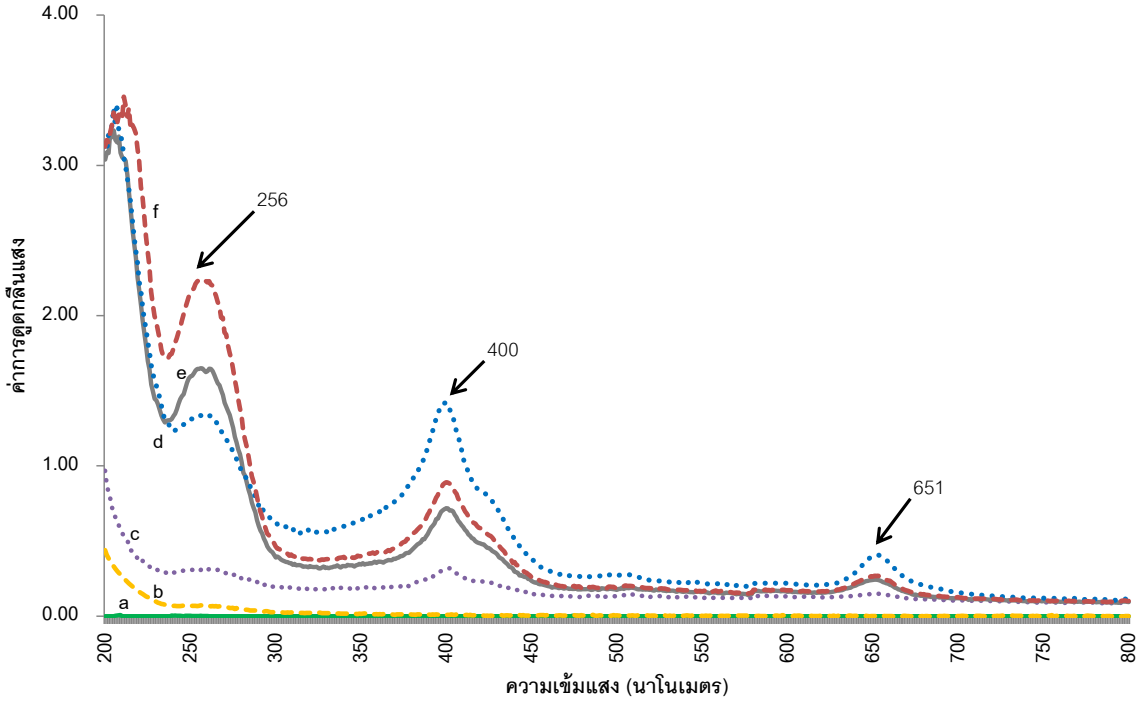
ตารางที่ 3 อุณหภูมิ และค่าการนำไฟฟ้าของตัวอย่างก่อนและหลังการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์

ทรีทเมนต์	ตัวอย่าง (500 มิลลิลิตร)	จำนวนพัลส์ (พัลส์)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		ค่าการนำไฟฟ้า (ไมโครซีเมนต์ต่อเซนติเมตร)	
			ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
ควบคุม 1	น้ำกลั่น	1,500	7.0±0.0	40.1±1.1	17.0±2.3	23.2±2.1
ควบคุม 2	น้ำกลั่น	2,500	7.0±0.0	52.3±0.8	21.1±2.2	26.2±2.1
ควบคุม 3	น้ำกลั่น	3,500	7.0±0.0	61.8±0.8	15.4±0.9	23.0±1.0
ควบคุม 4	น้ำกลั่น	4,500	7.0±0.0	68.0±1.0	14.6±1.0	20.0±1.9
1	*C. vulgaris*	1,500	7.0±0.0	39.8±1.4	164.9±9.0	202.2±22.2
2	*C. vulgaris*	2,500	7.0±0.0	51.5±1.2	177.8±7.0	249.1±20.6
3	*C. vulgaris*	3,500	7.0±0.0	63.3±0.3	183.9±17.2	254.1±31.2
4	*C. vulgaris*	4,500	7.0±0.0	67.8±0.3	184.9±16.9	234.5±21.7

2. ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบในช่วง 200 ถึง 800 นาโนเมตร

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดจาก *C. vulgaris* TISTR8580 ที่ผ่านสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่จำนวนพัลส์เท่ากับ 1,500, 2,500, 3,500 และ 4,500 พัลส์ และที่ไม่ผ่านสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ พบว่าค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่นที่ 256 400 และ 651 นาโนเมตรของสารสกัดหยาบมีค่าเพิ่มขึ้น โดยค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 256 นาโนเมตรเพิ่มขึ้นตามจำนวนพัลส์ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2) ซึ่งต่างจากความยาวคลื่นที่ 400 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากการให้สนามไฟฟ้าที่จำนวนพัลส์เท่ากับ 2,500 พัลส์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่นเท่ากับ 400 มากที่สุด รองลงมาคือที่สารสกัดหยาบที่สกัดได้จากจำนวนพัลส์เท่ากับ 4,500 และ 3,500 พัลส์ ตามลำดับ จากการสืบค้นเอกสารพบว่าค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 และ 651 นาโนเมตร นั้น ใกล้เคียงกับช่วงคลื่นสีน้ำเงิน (A_{428}) และช่วงคลื่นสีแดง (A_{661}) ของคลอโรฟิลล์เอ และช่วงคลื่นสีน้ำเงิน (A_{400}- A_{500}) ของคลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ (Lichtenthaler *et al.*, 2001) แสดงให้เห็นว่าสนามไฟฟ้าแบบพัลส์สามารถสกัดสารจากภายในเซลล์สาหร่ายได้ โดยการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่จำนวน 2,500 พัลส์สามารถวัดปริมาณรงควัตถุได้สูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการให้สนามไฟฟ้าที่จำนวนพัลส์มากขึ้น ส่งผลให้เกิดความร้อนและอาจทำให้รงควัตถุเสื่อมสภาพ จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่จำนวน 3,500 และ 4,500 พัลส์มีค่าน้อยกว่าที่ 2,500 พัลส์



ภาพที่ 2 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่นที่ 200 ถึง 800 นาโนเมตรของสารสกัดหยาบที่ผ่านการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์จากแต่ละทรีทเมนต์ (a คือน้ำกลั่น, b คือน้ำกลั่นผสมสาหร่ายที่ไม่ผ่านสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ และ c d e และ f คือ สารสกัดหยาบที่ผ่านสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่จำนวน 1,500, 2,500, 3,500 และ 4,500 พัลส์ ตามลำดับ)

3. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จาก *C. vulgaris* TISTR8580 ด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์

พบว่าสนามไฟฟ้าแบบพัลส์สามารถประยุกต์ใช้ในการสกัดคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนจาก *C. vulgaris* TISTR8580 ได้ โดยจำนวนพัลส์มีผลต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) การประยุกต์ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์โดยให้จำนวนพัลส์เท่ากับ 2,500 พัลส์ในการสกัดสารจาก *C. vulgaris* TISTR8580 ให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 23.19 ± 1.47 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 144.48 ± 1.41 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ รองลงมาได้แก่การให้จำนวนพัลส์เท่ากับ 3,500 4,500 และ 1,500 พัลส์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ผลการศึกษา

แสดงให้เห็นว่าสนามไฟฟ้าแบบพัลส์สามารถประยุกต์ใช้ในการสกัดคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนจาก *C. vulgaris* TISTR8580 ได้ เช่นเดียวกับ Oleksii *et al.* (2015) ที่รายงานว่าการใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ร่วมกับการปรับพีเอชสามารถสกัดโปรตีน คาร์โบไฮเดรต สารฟีนอลิก และสารสีต่างๆ จาก *Nannochloropsis* ได้ และ Postma *et al.* (2016) ได้รายงานว่าการใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ร่วมกับอุณหภูมิสามารถสกัดโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจาก *C. vulgaris* ได้

ตารางที่ 4 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จาก *C. vulgaris* TISTR8580 ด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่จำนวนพัลส์เท่ากับ 1,500 2,500 3,500 และ 4,500 พัลส์

จำนวนพัลส์	ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อลิตร)
1,500	13.59 ± 0.11^{C}	79.43 ± 4.85^{b}
2,500	23.19 ± 1.47^{A}	144.48 ± 1.41^{a}
3,500	21.45 ± 0.11^{B}	118.77 ± 2.76^{a}
4,500	14.75 ± 1.36^{B}	119.89 ± 5.69^{b}

หมายเหตุ A B และ C หมายถึง มีความแตกต่างของปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ a b และ c หมายถึง มีความแตกต่างของปริมาณโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

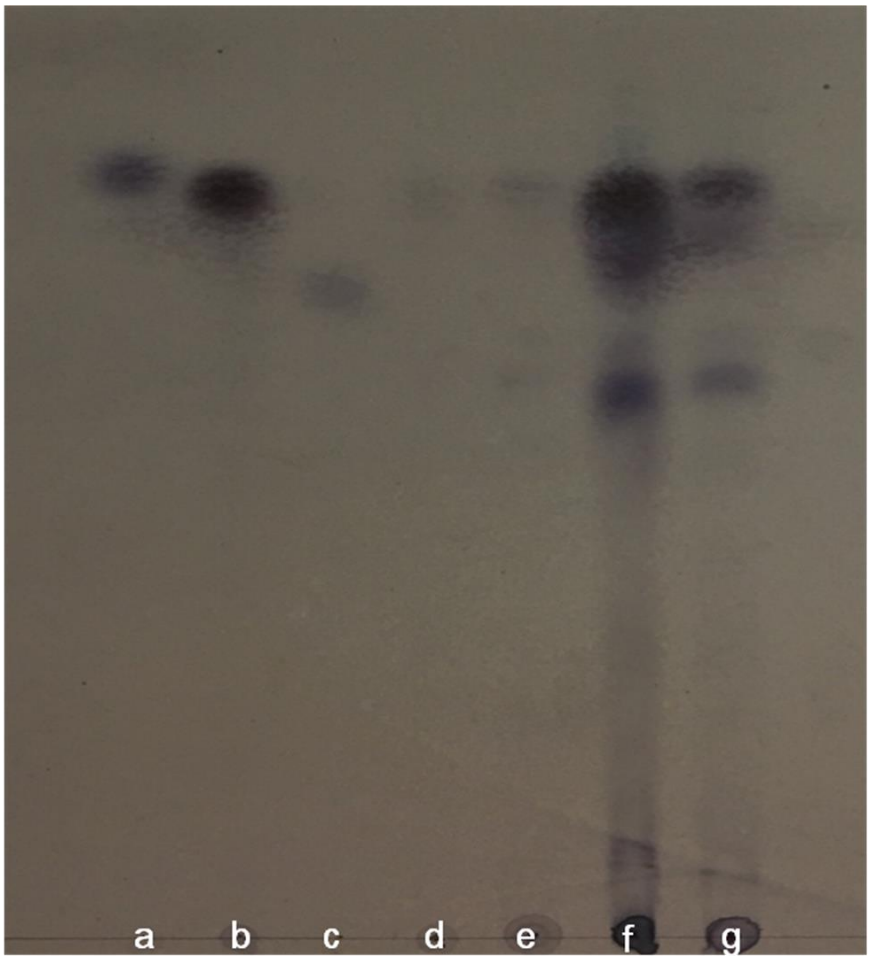
4. ชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่สกัดได้จาก *C. vulgaris* TISTR8580 ด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์

จากการนำสารสกัดหยาบของสาหร่ายที่ผ่านการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่จำนวนพัลส์ต่างๆ มาวิเคราะห์หาชนิดของคาร์โบไฮเดรตด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โดยใช้กลูโคส ซูโครส และแมนโนไบโอสเป็นตัวแทนของมอโนแซ็กคาไรด์ ไดแซ็กคาไรด์ และโอลิโกแซ็กคาไรด์ ตามลำดับ พบว่าคาร์โบไฮเดรตในสารสกัดหยาบที่ได้จากการทดลองนี้ประกอบด้วยไดแซ็กคาไรด์และโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ภาพที่ 3)

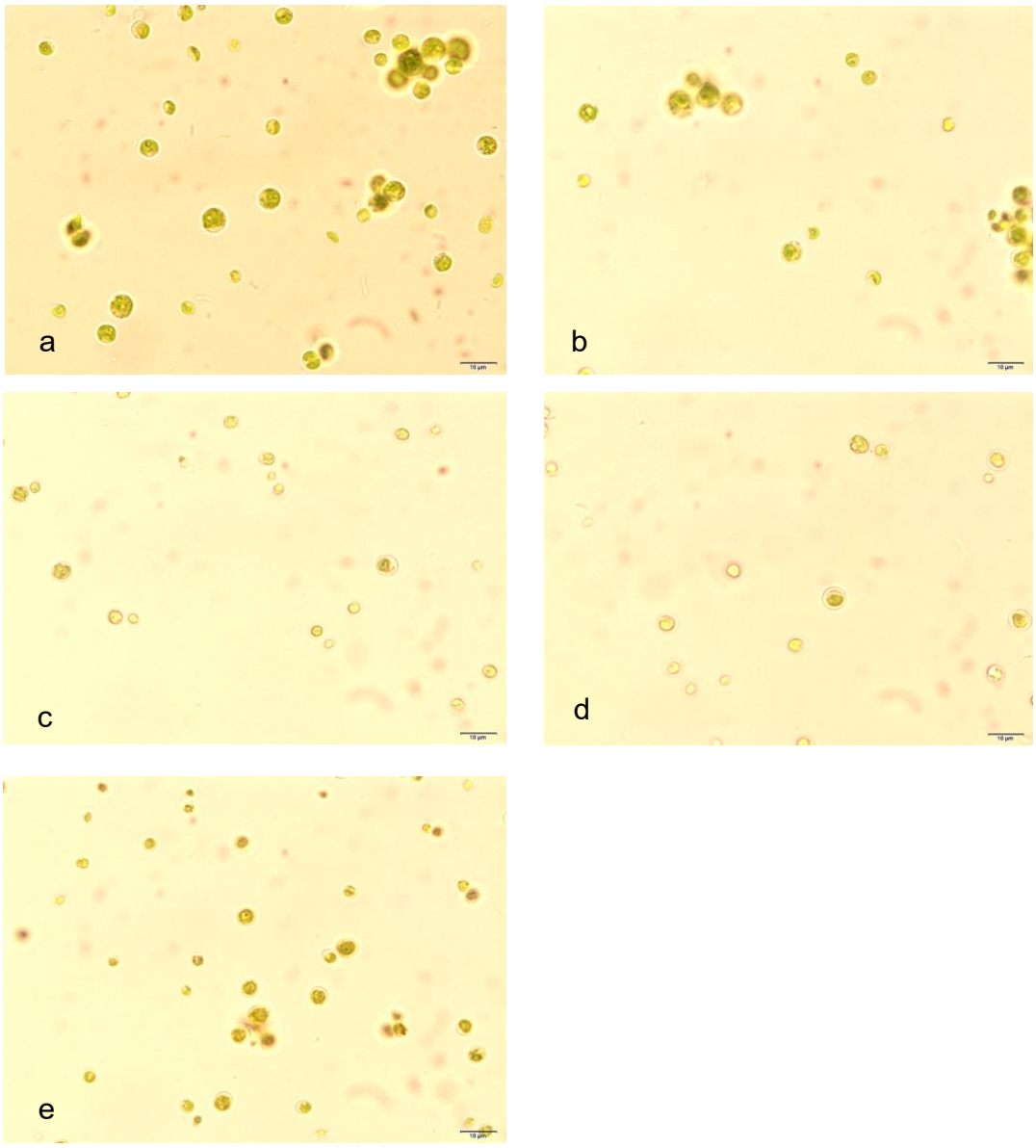
5. สัณฐานวิทยาและความอยู่รอดของเซลล์ *C. vulgaris* TISTR8580 ที่ผ่านการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์

จากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ที่ผ่านการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์มีสีจางลง (ภาพที่ 4) และสังเกตเห็นบริเวณสีขาวใสภายในเซลล์ ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการปล่อยรงควัตถุ เช่น คลอโรฟิลล์และสารต่างๆ ออกมานอกเซลล์ ทำให้สีของเซลล์จางลง โดยพบว่าเซลล์ที่ผ่านการให้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่จำนวนพัลส์เพิ่มขึ้นมีสีจางลงอย่างชัดเจน และเมื่อให้จำนวนพัลส์เท่ากับ 4,500 พัลส์ เซลล์มีสีน้ำตาลไหม้ ซึ่งอาจเป็นผลของอุณหภูมิที่สูงขึ้นจากการให้สนามไฟฟ้าทำให้รงควัตถุและสารภายในเซลล์เสียสภาพ อย่างไรก็ตามเซลล์ที่ผ่านการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์นั้นยังคงรูปร่างเหมือนเดิมและไม่ปรากฏเศษเซลล์ จึงอาจจะเป็นไปได้ว่า การสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ในการทดลองนี้ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูพรุน สอดคล้องกับรายงานของ Juan *et al*. (2017) ที่ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ ความเข้มสนามไฟฟ้าเท่ากับ 25 kV/cm สกัดซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycocyanin) จากสาหร่าย *Artrosphira platensis* นั้น เซลล์ที่ผ่านการสกัดมีลักษณะเหมือนเดิม รูปร่างเป็นท่อนสั้นลง และสีจางลง ซึ่งแตกต่างจากการสกัดโดยใช้วิธีบีดมิลล์ที่ทำให้เซลล์แตกอย่างเห็นได้ชัด

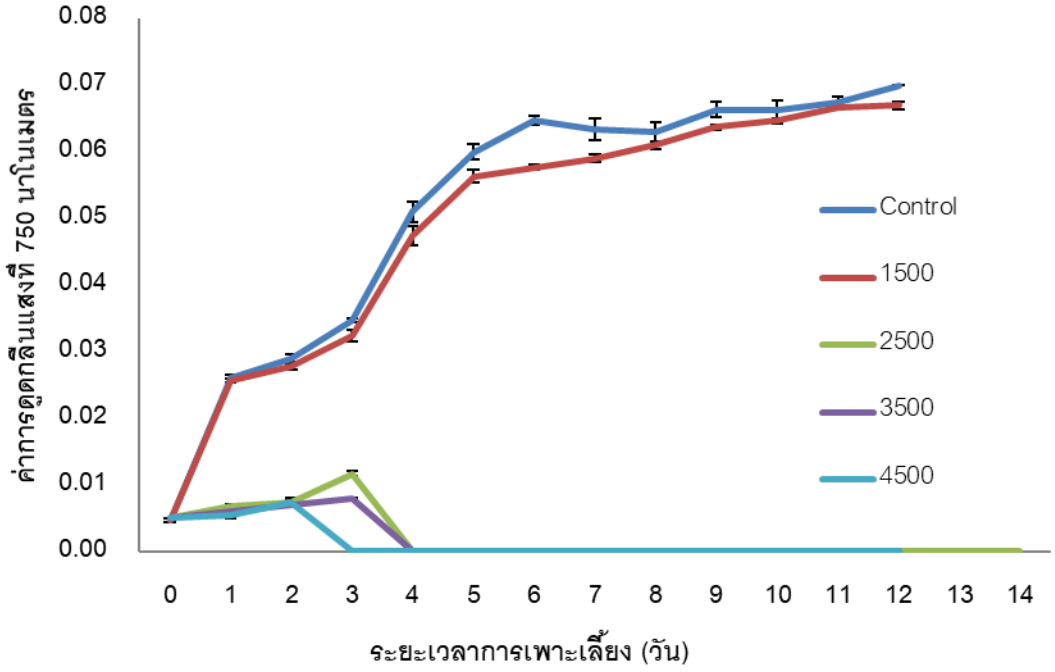
เมื่อนำเซลล์ที่ผ่านการสกัดโดยใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่จำนวนต่างกันไปเพาะเลี้ยงซ้ำ เทียบกับเซลล์ก่อนพัลส์ พบว่าเซลล์ที่ผ่านการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่จำนวนพัลส์เท่ากับ 1,500 พัลส์สามารถเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกับเซลล์ก่อนพัลส์ ในขณะที่เซลล์ที่ผ่านการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าที่จำนวนพัลส์เท่ากับ 2,500 3,500 และ 4,500 พัลส์ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (ภาพที่ 5) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่มากกว่า 1,500 พัลส์ส่งผลให้เซลล์เกิดรูพรุนและสามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ ในขณะที่การให้จำนวนพัลส์ที่ 2,500 3,500 และ 4,500 พัลส์ นั้นทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูพรุนและจัดเรียงตัวใหม่ต่างไปจากเดิม หรือทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงจนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ รวมทั้งอุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์เสื่อมสภาพและทำให้เซลล์ตายได้



ภาพที่ 3 ชนิดของคาร์โบไฮเดรตในสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่จำนวนพัลส์แตกต่างกัน (a คือ กลูโคส, b คือ ซูโครส, c คือ แมนโนไบโอส, d e f และ g คือ สารสกัดจากสาหร่ายที่ผ่านการให้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์จำนวน 1,500 2,500 3,500 และ 4,500 พัลส์ ตามลำดับ)



ภาพที่ 4 สัณฐานวิทยาของเซลล์ *C. vulgaris* TISTR8580 ก่อนและหลังการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ (a คือ เซลล์ก่อนพัลส์, b c d และ e คือ เซลล์ที่ผ่านการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่ 1,500 2,500 3,500 และ 4,500 พัลส์ ตามลำดับ และ scale bar = 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของ *C. vulgaris* TISTR8580 ที่ผ่านการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์จำนวนต่างๆ

สรุปผลการวิจัย

การประยุกต์ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ ความเข้มสนามไฟฟ้า 5 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ความถี่ 2 เฮิรตซ์ สามารถสกัดสารจาก *C. vulgaris* TISTR8580 ได้ โดยพบว่าที่จำนวนพัลส์เท่ากับ 2,500 พัลส์สามารถสกัดคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน (23.19 ± 1.47 มิลลิกรัมต่อลิตร, 144.48 ± 1.41 ไมโครกรัมต่อลิตร) ได้มากที่สุด โดยคาร์โบไฮเดรตที่สกัดได้ส่วนใหญ่เป็นไดแซ็กคาไรด์และโอลิโกแซ็กคาไรด์ การสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ในการทดลองนี้ทำให้เกิดรูพรุนของเยื่อหุ้มเซลล์ และที่จำนวนพัลส์เท่ากับ 2,500 พัลส์ขึ้นไปมีผลทำให้เซลล์เสื่อมสภาพและไม่สามารถเจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตามสารที่สกัดได้จากสาหร่ายโดยการประยุกต์ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ยังมีปริมาณน้อย ฉะนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงปัจจัยอื่นๆ ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ในสาหร่ายต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 และ 2560 และขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ทวี ฉิมอ้อย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรินทร์ รัตนะวิศ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือที่ให้คำปรึกษาและแนะนำความรู้ในทางฟิสิกส์

เอกสารอ้างอิง

Akiyama, T., Kaku, H., & Shibuya N. (1996). Purification and partial characterization of an Endo-(1⟶3, 1⟶4)-β-glucanase from rice, *Oryza sativa* L.. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 60*(12), 2078-2080

Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Franco, J.M., & Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research Journal, 2*, 164–173.

Becker, E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances, 25*, 207-210.

Bhat, F. Z., Morton, D. J., Mason, L. S., & Bekhit, A. E. A. (2018). Current and future prospects for the use of pulsed electric field in the meat industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*, 1-15.

Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry, 72*, 248–254.

Chittapun, S., Charoenrat, T., Maijui, I., & Antimanon, S. (2017). Development of a simple inclined algal culture system for outdoor cultivation. *Science & Technology Asia, 22(3)*, 1-6.

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

Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., & Frey, W. (2013). Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Research Journal, 2*, 401–408.

Gouveia, L., Choubert, G., Gomes, E., Rema, P., & Empis, J. (1998). Use of *Chlorella vulgaris* as a carotenoid source for salmonids: Effect of dietary lipid content on pigmentation, digestibility and muscular retention. *Aquaculture International, 6*, 269–279.

Grimi, N., Mamouni, F., Lebovka, N., Vorobiev, E., & Vaxelaire, J. (2011). Impact of apple processing modes on extracted juice quality: Pressing assisted by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering, 103*, 52-61.

Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., & Danquah M. K. (2010). Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. *International Journal of Chemical Engineering,* 1-11.

Juan, M.M., Luengo, E., Saldaña, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2017). C-phycocyanin extraction assisted by pulsed electric field from *Artrosphira platensis*. *Food Research International, 99*, 1042 –1047.

Kungsadan, T. (2011). Food Preservation using High Electrical Field Pulse (HELP) Technique. *Journal of KMUTNB, 21*(1), 198 – 207. (in Thai)

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, 227*, 680-685.

Lichtenthaler, H.K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F4.3.1-F4.3.8.

Lindgren, M., Aronsson, K., Galt, S., & Ohlsson, T. (2002). Simulation of the temperature increase in pulsed electric field (PEF) continuous flow treatment chambers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *3*, 233–245.

Luengo, E., Martínez, J.M., Bordetas, A., Álvarez, I., & Raso, J. (2015). Influence of the treatment medium temperature on lutein extraction assisted by pulsed electric fields from *Chlorella vulgaris*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *29*, 15–22.

Oleksii, P., Francisco, J. B., Nabil, G., Luc, M., Sébastien, J., Nikolai, L., & Eugene, V. (2015). Pulsed electric field and pH assisted selective extraction of intracellular components from microalgae *Nannochloropsis*. *Algal Research, 8*,128-134.

Postma, P.R., Miron, T.L., Olivieri, G., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., & Eppink, M.H.M. (2015). Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresource Technology Journal*, *184*, 297–304.

Postma, P.R., Pataro, G., Capitoli, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., Olivieri, G., & Ferrari, G. (2016). Selective extraction of intracellular components from the microalga *Chlorella vulgaris* by combined pulsed electric field–temperature treatment. *Bioresource Technology Journal, 203*, 80–88.

Panyamuangjai, V., Janthara, S., Kusuya, R., Yawootti, A. & Intra, P. (2012). Juice extraction from fresh apples using pulsed electric field combined with mechanical pressing. *Journal of KMUTNB, 4*, 469 – 484. (in Thai)

Timmermans, R.A.H., Nierop Groot, M.N., Nederhoff, A.L., van Boekel, M.A.J.S., Matser, A.M., & Mastwijk, H.C., (2014). Pulsed electric field processing of different fruit juices: impact of pH and temperature on inactivation of spoilage and pathogenic micro-organisms. *International Journal of Food Microbiology*, *173*, 105–111.

Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., & Eppink, M.H.M., (2013). Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresource Technology journal, 135*, 142–149.

't Lam, G.P., Postma, P.R., Fernandes, D.A., Timmermans, R.A.H., Vermuë, M.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H.M., Wijffels, R.H., & Olivieri, G. (2017). Pulsed electric field for protein release of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans. Algal Research, 24*, 181-187.