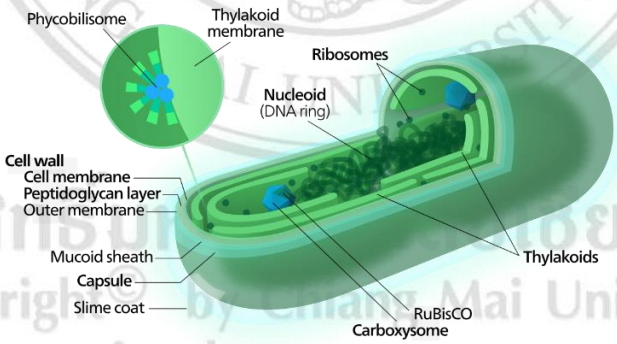
บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) เป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มโพรคาริโอต (prokaryote) จัดอยู่ในอาณาจักรมอเนอรา (Kingdom Monera) ดิวิชันไซยาโนไฟตา (Division Cyanophyta) สิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้ไม่มีเยื่อหุ้มออแกเนลล์ และเยื่อหุ้มนิวเคลียส สารพันธุกรรมกระจายอยู่ในเซลล์ มีรงควัตถุคลอโรฟิลล์ *เอ* (chlorophyll *a*) กระจายอยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ทำหน้าที่สังเคราะห์ด้วยแสง และมีรงควัตถุกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliprotein) อยู่ที่ผนังด้านนอกของเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ (thylakoid) ทำหน้าที่ตรึงพลังงานแสงช่วงความยาวคลื่นที่คลอโรฟิลล์ตรึงไม่ได้ (Desikachary, 1959; ยุวดี, 2549) (ภาพ 2.1)



ภาพ 2.1 โครงสร้างของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

ที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/Cyanobacteria#/media/File:Cyanobacterium-inline.svg

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไซยาโนแบคทีเรียมีความหลากหลายด้านรูปร่างสูงมีทั้ง กลุ่มที่ไม่สร้างเส้นสาย (non - filamentous form หรือ unicellular cyanobacteria) และกลุ่มที่เป็นเส้นสาย (filamentous form) บางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ มีการสะสมอาหารในรูปไกลโคเจน เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียสามารถปรับตัวให้ดำรงชีวิตได้ในหลายสภาวะทำให้มีความหลากหลายทางด้านสภาวะแวดล้อมที่สามารถเจริญได้ เช่น บริเวณที่มีอุณหภูมิสูง ได้แก่ น้ำพุร้อน ภูเขาไฟ บริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำ ได้แก่ ธารน้ำแข็ง เขตพื้นที่ที่มีหิมะปกคลุม สภาวะความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นเกลือ ที่มีค่าสูงหรือต่ำมาก อีกทั้งยังสามารถเจริญในสภาวะที่มีความเป็นพิษหรือเจริญร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Whitton and Potts, 2000; Castenhölz *et al.*, 2001; Stal, 2007)

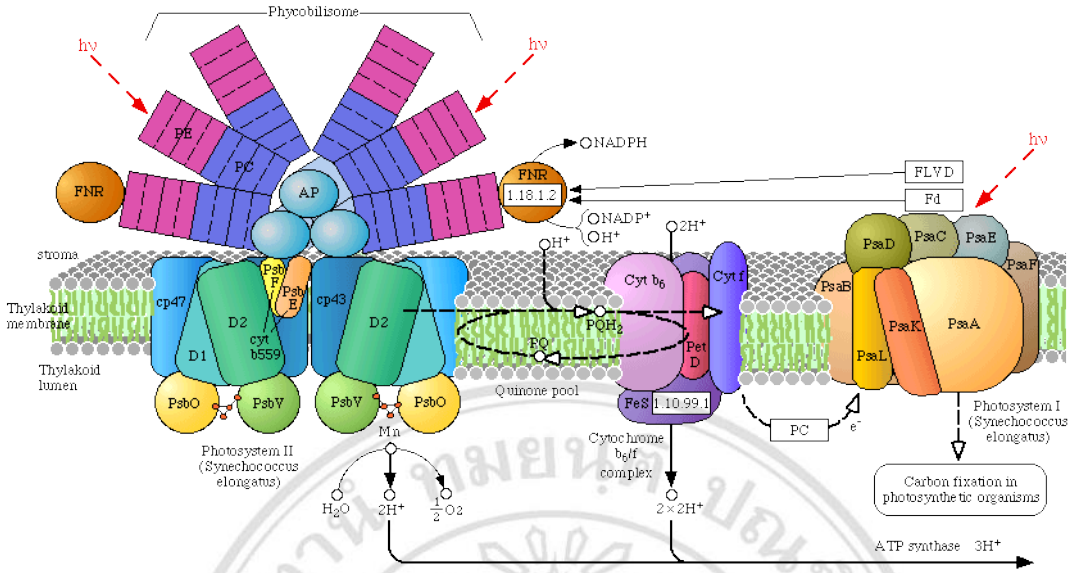
กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรียทำให้เกิดการหมุนเวียนในวัฏจักรสาร โดยเปลี่ยนสารอนินทรีย์ให้เป็นสารอินทรีย์ เช่น เปลี่ยนน้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และปลดปล่อยออกซิเจนสู่อากาศ (Hagemann and Erdmann, 1997) ปัจจุบันมีการนำสารที่ผลิตจากไซยาโนแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ เช่น สารต้านไวรัส (antiviral compounds) สารต้านมะเร็ง (anticancer compounds) สารยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial compounds) สารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive compounds) เป็นต้น (Namikoshi and Rinehart, 1996; Abed *et al*., 2009; Nagarajan *et al.,* 2012)

2.2 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับไฟโคไซยานิน

2.2.1 ไฟโคบิลิโซม (phycobilisome)

ไฟโคบิลิโซมเป็นกลุ่มของโปรตีนซึ่งประกอบด้วยพอลิเพปไทด์มากกว่า 600 โมเลกุลเรียงต่อกันอยู่บริเวณผิวของเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่ายสีแดงและคริปโตโมแนดส์ ทำหน้าที่ดูดกลืนแสงในช่วงแสงที่มองเห็น (visible light) ที่คลอโรฟิลล์ *เอ* ดูดกลืนไม่ได้ หรือดูดกลืนได้น้อย จากนั้นจึงถ่ายทอดพลังงานไปยัง PS II (Adir, 2008) โดยถ่ายทอดพลังงานจาก ไฟโคอีริธริน ไปยังไฟโคไซยานิน ส่งต่อไปที่อัลโลไฟโคไซยานิน และไปที่คลอโรฟิลล์ *เอ* เป็นลำดับสุดท้าย (Viskari and Colyer, 2003) (ภาพ 2.2) ไฟโคบิลิโซมประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ส่วน ได้แก่ส่วน core รูปร่าง hemidiscoidial และ ส่วน rod รูปทรงกระบอกซึ่งจะมีจำนวนแตกต่างไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดโดยไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมี core และ rod จำนวน 3 และ 6 แท่งตามลำดับ (MacColl, 1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

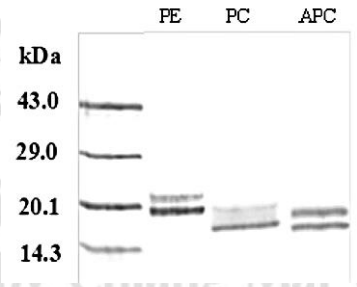


ภาพ 2.2 โครงสร้างของไฟโคบิลิโซมและการถ่ายทอดอิเล็กตรอนใน PS II

ที่มา: Johnson (2006)

2.2.2 ไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliprotein)

ไฟโคบิลิโปรตีนประกอบด้วยส่วนประกอบ 2 ส่วน คืออะโปโปรตีน (apoproteins) เป็นส่วนที่ไม่มีสี ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ α และ β (ภาพ 2.3)

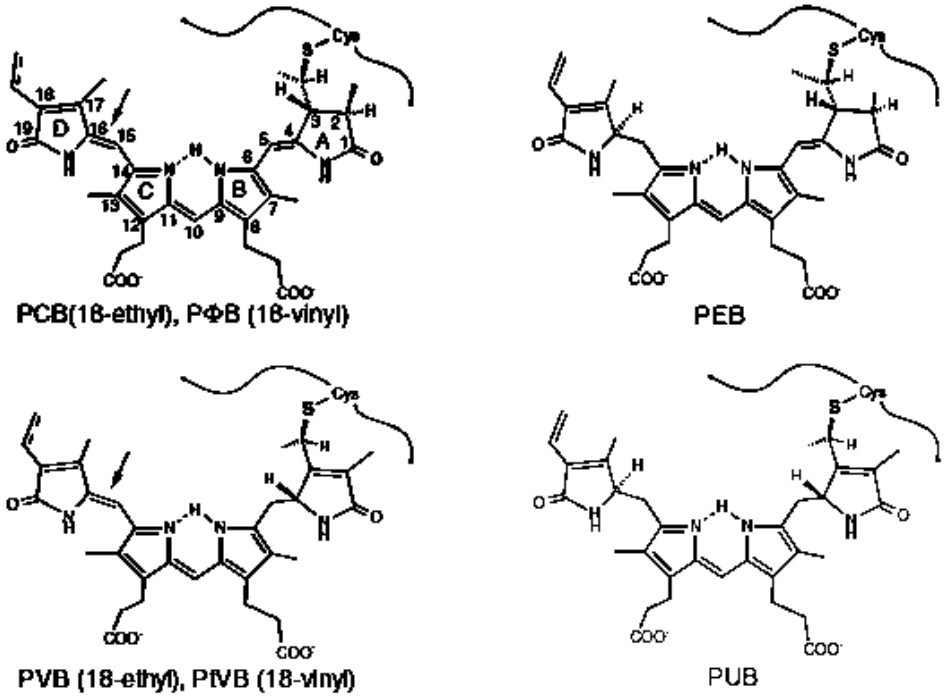


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 2.3 เจล SDS-PAGE ของไฟโคอีริธริน ไฟโคไซยานิน และอัลโลไฟโคไซยานิน ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จาก *Lyngbya* sp. A09DM โดยโปรตีนแถบบนคือหน่วยย่อย β และโปรตีนแถบล่างคือหน่วยย่อย α

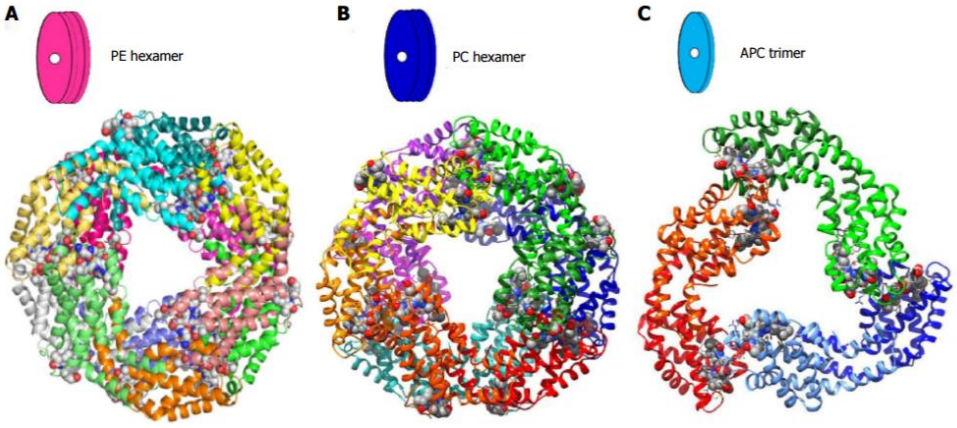
ที่มา: Sonani *et al.* (2014)

ส่วนที่ 2 เป็นส่วนที่มีสี คือ รงควัตถุบิลิน (bilin) หรือ โครโมฟอร์ (chromophores) (Sonani *et al*., 2014) มีโครงสร้างวงแหวน pyrrole 4 วงต่อกันเป็นเส้นตรง เรียกว่า tetrapyrrole บิลินที่พบในไซยาโนแบคทีเรียมี 4 ชนิด ได้แก่ ไฟโคไซยาโนบิลิน (phycocyanobilin: PCB) ไฟโคอีริโธรบิลิน (phycoerythrobilin: PEB) ไฟโคยูโรบิลิน (phycourobilin: PUB) และไฟโคไวโอโรบิลิน (phycoviolobilin: PVB) (MacColl, 1998; Scheer *et al*., 2015) โครงสร้างของบิลินดังภาพ 2.4 ส่วนของบิลินจะเกาะกับอะโปโปรตีนด้วยพันธะไธโออีเทอร์ ไฟโคบิลิโปรตีนประกอบด้วยหลายหน่วยย่อยแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด เช่น ไฟโคอีริธรินมีโครงสร้างเป็น hexamer คือมีพอลิเพปไทด์ α และ β อย่างละ 6 หน่วยย่อย โดยหน่วยย่อย α มีบิลินเกาะอยู่ 2 โมเลกุล และหน่วยย่อย β มีบิลินเกาะอยู่ 3 โมเลกุล ไฟโคไซยานินมีโครงสร้างเป็น hexamer เช่นกัน แต่หน่วยย่อย α จะมีบิลินเกาะอยู่ 1 โมเลกุล และหน่วยย่อย β มีบิลินเกาะอยู่ 2 โมเลกุล ส่วนอัลโลไฟโคไซยานินจะมีโครงสร้างเป็น trimer คือมีพอลิเพปไทด์ α และ β อย่างละ 3 หน่วยย่อย มีบิลินเกาะอยู่หน่วยย่อยละ 1 โมเลกุล (ภาพ 2.5) (Scheer and Zhao, 2008; Sonani, 2016) ไฟโคบิลิโปรตีนแบ่งตามค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ($\lambda_{A\ max}$) ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ ไฟโคอีริธริน ($\lambda_{A\ max}$ = 540-570 nm; $\lambda_{F\ max}$ = 575-590 nm) ไฟโคไซยานิน ($\lambda_{A\ max}$= 610-620 nm; $\lambda_{F\ max}$: 645-653 nm) และ อัลโลไฟโคไซยานิน ($\lambda_{A\ max}$ = 650-655 nm; $\lambda_{F\ max}$ = 657-660 nm) (ภาพ 2.6) (Glazer *et al*., 1976; Sonani *et al.* 2016)



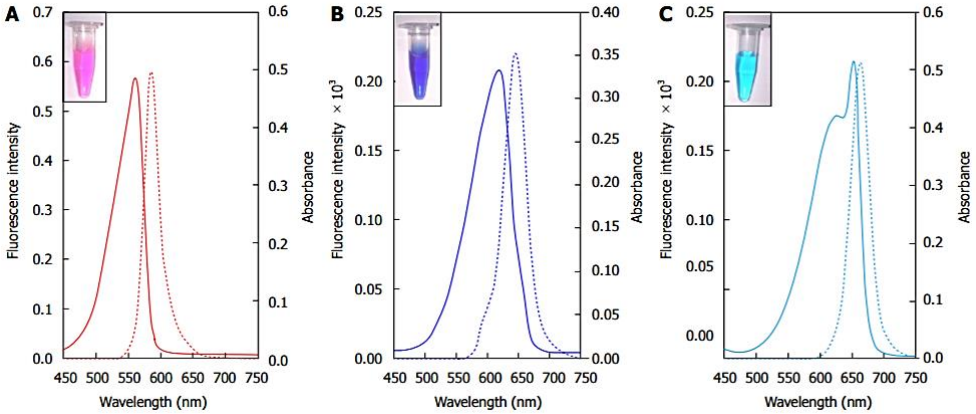
ภาพ 2.4 โครงสร้างของบิลินแต่ละชนิด

ที่มา: Scheer *et al.* (2015)



ภาพ 2.5 โครงสร้าง 3 มิติของไฟโคบิลิโปรตีน โดยไฟโคอีริธรินและไฟโคไซยานินมีโครงสร้างเป็น hexamer และอัลโลไฟโคไซยานินมีโครงสร้างเป็น trimer (A: PE = ไฟโคอีริธริน B: PC = ไฟโคไซยานิน และC: APC = อัลโลไฟโคไซยานิน)

ที่มา: Sonani *et al.* (2016)



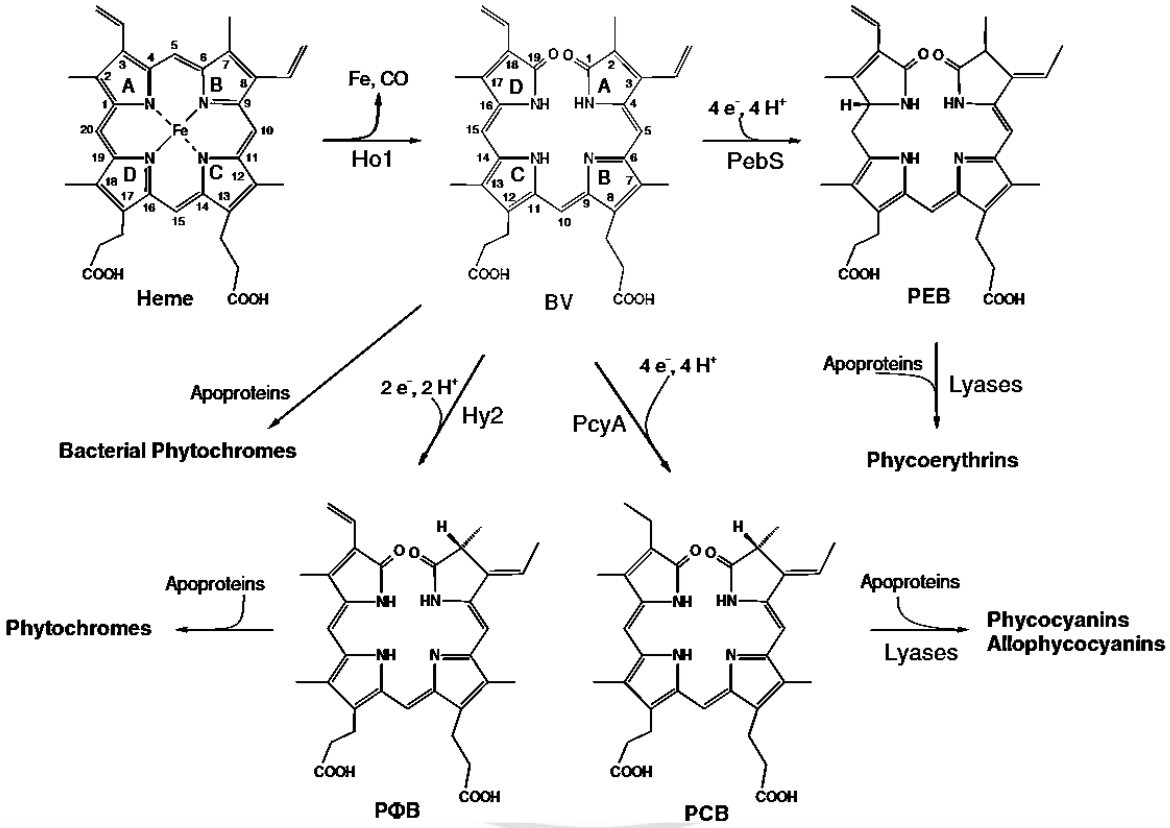
ภาพ 2.6 ค่าดูดกลืนแสงช่วงที่ตามองเห็น (เส้นทึบ) และ ช่วงฟลูออเรสเซนต์ที่ปลดปล่อยมา (เส้นประ) ของไฟโคบิลิโปรตีนแต่ละชนิด (A: ไฟโคอีริธริน B: ไฟโคไซยานิน C: อัลโลไฟโคไซยานิน)

ที่มา: Sonani *et al.* (2016)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสังเคราะห์บิลิน เริ่มต้นจาก protoheme ถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ heme oxygenase (*ho*1) เป็น biliverdin IxΑ (BV) ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นสารได้ 4 ชนิดตามกระบวนการของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น ในสัตว์ BV ถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ biliverdin reductase (*bvd*R) จะได้ bilirubin IxΑ (BR) ในพืชชั้นสูงเอนไซม์ phytochromobilin: redoxin oxidoreductase (*hy*2) รีดิวซ์ BV ที่โครงสร้างวงแหวนตำแหน่ง 2,3,3^{1},3^{2}-diene เป็น phytochromobilins (PΦB) ในสาหร่ายสีแดงมีเอนไซม์ 2 ชนิดได้แก่ 15,16-

dihydrobiliverdin: ferredoxin oxidoreductase (*peb*A) รีดิวซ์ BV ที่ตำแหน่ง C-15 methine ได้เป็น 15,16-DHBV จากนั้นเอนไซม์ phycoerythrobilin: ferredoxin oxidoreductase (*peb*B) จะรีดิวซ์ต่อจนได้ไฟโคอีริโธรบิลิน และในไซยาโนแบคทีเรีย มีเอนไซม์ phycocyanobilin: ferredoxin oxidoreductase (*pcy*A) ทำปฏิกิริยากับ BV ได้ $18^1,18^2$-dihydrobiliverdin ($18^1,18^2$-DHBV) และเอนไซม์เดิมรีดิวซ์ต่อจนได้ไฟโคไซยาโนบิลิน (Scheer *et al*., 2015) (ภาพ 2.7)



ภาพ 2.7 การสังเคราะห์บิลิโปรตีน

ที่มา: Scheer *et al.* (2015)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.3 ไฟโคไซยานิน (phycocyanin)

ไฟโคไซยานิน เป็นไฟโคบิลิโปรตีนชนิดหนึ่ง มีบิลินชนิดไฟโคไซยาโนบิลินเกาะอยู่ ทำให้มีสีฟ้าสด มีคุณสมบัติในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่นช่วง 645-652 nm ไฟโคไซยานินที่พบในปัจจุบันแบ่งเป็น 3 ชนิดตามสิ่งมีชีวิตที่พบครั้งแรก ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานิน (C-PC) สกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย อาร์-ไฟโคไซยานิน (R-PC) สกัดจากสาหร่ายสีแดง และ อาร์-ไฟโคไซยานิน II (R-PCII) สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่พบในทะเลสายพันธุ์ *Synechococcus* sp. (Kuddus *et al*., 2013) ซึ่งไฟโคไซยานินทั้งสามชนิดแตกต่างกันที่ชนิดของบิลินที่เกาะอยู่ที่หน่วยย่อย α และหน่วยย่อย β ตามตาราง 2.1 ขนาด

ของสายพอลิเปปไทด์ทั้งสองหน่วยย่อยขึ้นอยู่กับชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย และวิธีที่สกัด โดยหน่วยย่อย α จะมีขนาดระหว่าง 13-20.5 kDa และหน่วยย่อย β จะมีขนาดระหว่าง 11-24.4 kDa ตัวอย่างข้อมูลใน Gen Bank ระบุน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Spirulina maxima* มีขนาด 121 kDa ($\alpha_3\beta_3$) โดยหน่วยย่อย α มีขนาด 17,362.6 Da และหน่วยย่อย β มีขนาด 17,827.2 Da (Sonani *et al*., 2014)

ตาราง 2.1 แสดงชนิดของบิลินที่เกาะกับโปรตีนในไฟโคไซยานินแต่ละชนิด

ชนิดของไฟโคไซยานิน	ตำแหน่งที่จับ		
	α-84	β-84	β-155
C-PC	PCB	PCB	PCB
R-PC	PCB	PCB	PEB
R-PC II	PEB	PCB	PEB

หมายเหตุ: (C-PC: ซี-ไฟโคไซยานิน R-PC: อาร์-ไฟโคไซยานิน R-PC II: อาร์-ไฟโคไซยานิน II
PCB: ไฟโคไซยาโนบิลิน PEB: ไฟโคอีริธริน)

ที่มา: Ong and Glazer (1987)

2.3 การประยุกต์ใช้ไฟโคไซยานิน

2.3.1 การใช้เป็นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent agent)

ไฟโคไซยานินมีความสามารถในการดูดกลืนและปลดปล่อยแสงในช่วงที่ตามองเห็น และละลายง่ายในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ ทำให้มีการนำไฟโคไซยานินมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบวิเคราะห์โดยใช้ในเทคนิคฟลูออเรสเซนต์อย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นสารเรืองแสง (fluorescent marker) เพื่อติดตามการแสดงออกในระดับยีน การทำงานของแอนติบอดี ใช้ในการตรวจเนื้องอก มะเร็ง โรคเอดส์ เป็นต้น (Waggoner, 2006; Spolaore *et al*., 2006)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

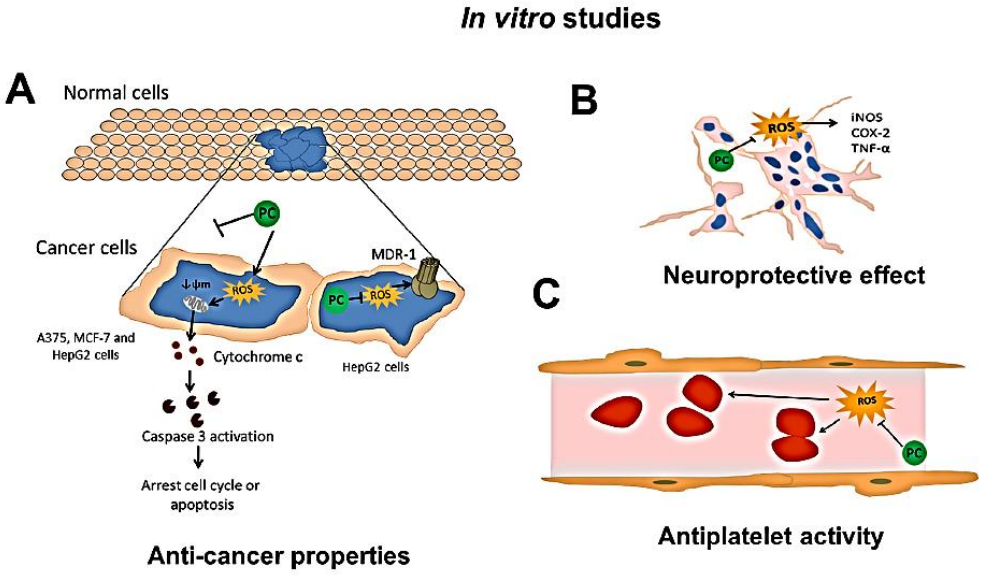
2.3.2 การใช้เป็นสีย้อมธรรมชาติ (natural dye)

มีการนำไฟโคไซยานินมาประยุกต์ใช้เป็นสีย้อมธรรมชาติในด้านที่หลากหลาย โดยไฟโคไซยานินที่ใช้ในอุตสาหกรรมสกัดมาจาก *Spirulina* sp. เช่น บริษัท DIC LIFETEC Co., Ltd. ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ชื่อ Linablue® ซึ่งเป็นไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Spirulina* sp. ใช้ผสมในหมากฝรั่ง ลูกอม เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องสำอางจากธรรมชาติ เช่น ลิปสติก และอายไลเนอร์ (DIC LIFETEC Co., Ltd, 2012)

2.3.3 การประยุกต์ใช้ด้านเภสัชวิทยา (pharmacology)

มีรายงานการศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของไฟโคไซยานินในด้านต่างๆ เช่น สามารถดักจับอนุมูลอิสระหลายชนิด มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต่อมามีการศึกษาโครงสร้างของไฟโคไซยานิน พบว่าโครงสร้างทางเคมีของไฟโคไซยาโนบิลินในไฟโคไซยานินมีความคล้ายคลึงกับบิลิรูบิน ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญมาก ทำหน้าที่ยับยั้งการออกซิไดซ์ของพลาสมาโปรตีนและกรดอะมิโน รวมถึงกำจัดอนุมูลออกซิเจน (Romay *et al*., 2003) ไฟโคไซยานินมีผลต่อ สเต็มเซลล์ (stem cell) ซึ่งอยู่ในไขกระดูก เป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง ไฟโคไซยานินจะกระตุ้นการสร้างเลือดและควบคุมการผลิตเซลล์ไขกระดูก โดยทดลองในผู้ป่วยที่ไขกระดูกถูกทำลาย เนื่องจากได้รับสารกัมมันตภาพรังสี ส่งผลให้มีการสร้างเซลล์เม็ดเลือดผิดปกติ ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ให้ผู้ป่วยรับประทานสาหร่ายสไปรูลินาซึ่งมีปริมาณไฟโคไซยานินสูงวันละ 5 g พบว่าผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นจนหายเป็นปกติภายใน 6 สัปดาห์ (Henrikson, 2009) ไฟโคไซยานินยังสามารถลดความเสียหายของปอดจากพาราควอท (paraquat) ได้ ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารกำจัดวัชพืชชนิดหนึ่ง หากได้รับเข้าไปภายในร่างกายจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนโดยเฉพาะบริเวณปอดซึ่งมีการแลกเปลี่ยนออกซิเจนสูง ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระจำนวนมากส่งผลให้เซลล์เสื่อมและมีการทำงานผิดปกติ ซึ่งไฟโคไซยานินจะทำลายสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ (Blanco-Ayala *et al*., 2014) และมีการทดสอบคุณสมบัติของไฟโคไซยานินแบบ *in vitro* ในอีกหลายด้าน เช่น คุณสมบัติยับยั้งมะเร็งโดยทำให้เกิดกลไก apoptosis และป้องกันการแสดงออกของ multidrug resistance protein (MDR-1) ซึ่งทำให้เกิดการดื้อยา (Chen and Wong, 2008; Nishanth *et al.,* 2010) ไฟโคไซยานินสามารถป้องกันระบบประสาทในเซลล์ microglial BV-2 โดยการลดการเกิดของไลโปพอลิแซคคาไรด์ ในระดับ mRNA เพื่อยับยั้งการเกิด nitric oxidative synthase (iNOS), COX-2, TNF-α และ interleukin 6 (IL-6) (Chen *et al*., 2012) นอกจากนี้ไฟโคไซยานินยังสามารถยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือดได้ด้วย จึงสามารถใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีอาการหลอดเลือดแดงอุดตันได้ (arterial thrombosis) (Hsiao *et al*., 2005) (ภาพ 2.8)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2.8 การศึกษาคุณสมบัติแบบ *In vitro* ของไฟโคไซยานิน

(A: คุณสมบัติต้านมะเร็ง B: ผลต่อระบบประสาท และ C: การต้านการแข็งตัวของเลือด)

ที่มา: Fernández-Rojas *et al*. (2014b)

2.4 น้ำพุร้อน (hot spring)

น้ำพุร้อน (hot spring) เป็นแหล่งพลังงานใต้พิภพที่ขนาดใหญ่ สาเหตุของการเกิดน้ำพุร้อนมีหลายแบบ แตกต่างกันไปตามสภาพธรณีวิทยาบริเวณนั้นๆ เช่น น้ำใต้ดินแทรกตัวมาขึ้นมาที่ระดับของหินแกรนิต การเสียดทานบริเวณระนาบรอยเลื่อน หรือการปะทุของหินภูเขาไฟ เป็นต้น ในปีพุทธศักราช 2530 กรมทรัพยากรธรณีสำรวจพบว่า บริเวณภาคเหนือของประเทศไทยมีแหล่งน้ำพุร้อนเป็นจำนวนมาก ส่วนใหญ่มักเกิดจากรอยเลื่อนบริเวณหินแกรนิตยังมีพลังอยู่ เมื่อน้ำบนผิวดิน หรือน้ำฝนไหลซึมผ่านช่องว่างระหว่างรอยแตกของหินจะเกิดการถ่ายเทความร้อน ส่งผลให้อุณหภูมิของน้ำและความดันสูงขึ้น และไหลกลับมาสู่เบื้องบน (กรมทรัพยากรธรณี, 2530)

สิ่งมีชีวิตที่เจริญได้ในที่อุณหภูมิสูง มักมีคุณสมบัติพิเศษเช่น ผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพ (bioactive compound) หรือเอนไซม์ (enzyme) ที่ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความคงตัวในอุณหภูมิสูง (thermostability) จึงมีการศึกษาเพื่อนำสารดังกล่าวมาประยุกต์ใช้งานในด้านอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากจะมีความร้อนเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต เอนไซม์ที่ใช้จึงจำเป็นต้องมีคุณสมบัติในการคงตัวในอุณหภูมิสูงเพื่อป้องกันการเสียสภาพของเอนไซม์ หรืออาจต้องควบคุมอุณหภูมิตลอดกระบวนการผลิตซึ่งส่งผลให้ต้นทุนในอุตสาหกรรมสูงตาม (Kumar *et al*., 2013) ดังนั้น การศึกษาทางด้านชีววิทยาจึงมีความสนใจที่จะศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในมีน้ำพุร้อน ทั้งด้านชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวน สรีรวิทยา และสารออกฤทธิ์ชีวภาพ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายที่พบในน้ำพุร้อนทั้งในด้านของชนิดและจำนวนคือ ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria)

2.5 ความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน

การศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนในต่างประเทศมีอย่างกว้างขวาง ในประเทศเขตร้อนชื้น เช่น ประเทศอินโดนีเซียซึ่งมีสภาพอากาศและภูมิประเทศใกล้เคียงกับประเทศไทย มีรายงานการศึกษาไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อน On Sunda พบว่าที่อุณหภูมิ 45 - 55 °C พบ *Mastigocladus laminosus, Phormidium laminosum, Pleurocapsa fluviatilis, Plectonema notatum* var. *africanum, Scytonema coactile* var. *thermal* และที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 °C พบ *Synechococcus elongates* f. *thermalis, Synechosystis aquatilis* และ *Phormidium laminosum* (Round, 1975) ส่วนประเทศในเขตอบอุ่นและเขตหนาว พบว่าที่ช่วงอุณหภูมิ 30 - 35 °C มีจำนวนและชนิดของไซยาโนแบคทีเรียค่อนข้างหลากหลายแต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียลดลง (Brock, 1978) และในประเทศไทยก็มีการศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนมานาน โดยในปี 2532 กาญจนาและคณะ ได้ศึกษาไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนแม่ฝาง น้ำพุร้อนโป่งฮ่อม จังหวัดเชียงใหม่ น้ำพุร้อนบ้านท่าไม้แดง จังหวัดกำแพงเพชร ซึ่งเป็นน้ำพุร้อนบริเวณภาคเหนือ พบไซยาโนแบคทีเรียชนิดเด่น ได้แก่ *Calothrix* sp., *Oscillatoria terabriformis* และ *Synechococcus* sp. ต่อมามีการศึกษาน้ำพุร้อนบริเวณภาคกลาง จังหวัดกาญจนบุรี คือ บ่อน้ำร้อนหินดาด พบไซยาโนแบคทีเรียชนิดเด่น ได้แก่ *Oscillatoria* spp., *Mastigocladus* sp., *Synechococcus* sp. และ *Calothrix* sp. (กาญจนาและสุทธิรัตน์, 2535) ในภาคใต้มีการศึกษาน้ำพุร้อนเขาชัยสน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง พบไซยาโนแบคทีเรียหลากหลายชนิด ได้แก่ *Synechococcus elongatus, Synechococcus aquatilis, Phormidium ambigum, Stigonema hormoides* และ *Chroococcus* sp. (วิรัชนีย์, 2534) และในปี 2544 อุดมลักษณ์ ศึกษาไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อน 6 แหล่งในประเทศไทย ได้แก่ น้ำพุร้อนสันกำแพง น้ำพุร้อนโป่งเดือด น้ำพุร้อนเทพพนม จังหวัดเชียงใหม่ น้ำพุร้อนรักษะวาริน จังหวัดระนอง และน้ำพุร้อนเขาชัยสน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง พบไซยาโนแบคทีเรียชนิดเด่น ได้แก่ *Synechococcus lividus* Copeland, *Cyanothece* sp., *Phormidium boryanum* Anagnostidis and Komárek และ *Leptolyngbya* sp. โดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาระบุชนิด ดังนั้นจากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าน้ำพุร้อนในประเทศไทยมีความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียสูง

2.6 งานศึกษาเกี่ยวกับไฟโคไซยานินทนร้อน

ปัจจุบันไฟโคไซยานินทางการค้าสกัดได้จากสิ่งมีชีวิตที่เจริญในอุณหภูมิปกติ เช่น *Spirulina* sp. ซึ่งมีความคงตัวที่อุณหภูมิประมาณ 47°C -50°C เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะเริ่มเสียสภาพคือมีสีซีดจางลง (Chaiklahan *et al*., 2012) จึงเป็นอุปสรรคสำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุตสาหกรรมส่วนใหญ่มักมีความร้อนเกิดขึ้นในกระบวนการผลิต ดังนั้นจึงมีการศึกษาต่างๆ เพื่อให้ทราบถึงสภาวะที่ไฟโคไซยานินจะเริ่มเสียสภาพ และแนวทางที่จะนำมาซึ่งไฟโคไซยานินที่มีความเสถียรมากขึ้น

Zhao และ Brand (1989) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อไฟโคบิลิโปรตีนในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีแดง พบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ไฟโคบิลิโปรตีนจะมีสีจางลง แต่โครงสร้างทางเคมี ทั้งส่วนของโปรตีนและโครโมฟอร์จะมีน้ำหนักโมเลกุลไม่เปลี่ยนแปลง ไฟโคบิลิโปรตีนในสารละลายที่มีความเข้มข้นฟอสเฟตสูง จะมีความคงตัวมากกว่าไฟโคบิลิโปรตีนที่อยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำ จึงมีข้อสันนิษฐานว่า ไฟโคบิลิโปรตีนน่าจะมีความเสถียรในสภาวะที่มีไอออนสูง มีแรง osmotic สูง Pumas *et al.* (2011) ศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิและกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในไซยาโนแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cyanosarcina* sp. SK40, *Phormidium* sp. PD40-1, *Scytonema* sp. TP40 และ *Leptolyngbya* sp. KC45 พบว่าไฟโคบิลิโปรตีนมีความคงตัวสูงสุดถึง 80% ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที Suwanmanee *et al.* (2015) ศึกษาการคัดแยกและเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี เพื่อเป็นแหล่งทางเลือกไฟโคไซยานินทนอุณหภูมิสูง พบไซยาโนแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ และเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01

Chaiklahan *et al.* (2012) ศึกษาผลของอุณหภูมิ pH และสารกันบูดต่อไฟโคไซยานินพบว่า ไฟโคไซยานินจะมีความคงตัวที่ pH 5.5-6.0 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 47°C จากงานวิจัยนี้พบว่า การเติมกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) หรือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) จะทำให้ไฟโคไซยานินมีความคงตัวสูงขึ้น Kannaujiya *et al.* (2016) ศึกษาความคงตัวของไฟโคไซยานินและไฟโคอีริธรินในสารกันบูดแต่ละชนิด ได้แต่ เบนโซอิกแอซิด ($C_7H_6O_2$) ซิตริกแอซิด ($C_6H_8O_7$) ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) และ วิตามินซี พบว่าไฟโคบิลิโปรตีนทั้งสองชนิดมีความคงตัวสูงที่สุดใน เบนโซอิกแอซิด

จากรายงานข้างต้นทำให้ทราบว่ามีการศึกษาด้านความคงตัวต่ออุณหภูมิของไฟโคบิลิโปรตีนอย่างต่อเนื่อง และไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญในน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิสูงก็มีแนวโน้มที่จะผลิตไฟโคบิลิโปรตีนที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงด้วย งานวิจัยนี้จึงจะคัดกรองเพื่อให้ได้ไซยาโนแบคทีเรียที่มีไฟโคไซยานินทนร้อน และสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว เพื่อนำมาใช้ผลิตไฟโคไซยานินทนร้อนในทางอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

2.7 การทำบริสุทธิ์และการตรวจสอบความบริสุทธิ์โปรตีน

เป้าหมายของการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์คือทำให้โปรตีนเป้าหมายปราศจากการปนเปื้อนและเสียสภาพน้อยที่สุด กระบวนการทำบริสุทธิ์โปรตีนมีหลายขั้นตอนดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.7.1 การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation)

เป็นการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) มักถูกใช้เป็นขั้นแรกของการทำบริสุทธิ์โปรตีน เพื่อให้ง่ายต่อการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป อาศัยคุณสมบัติการละลาย ในสภาวะปกติโปรตีนละลายในน้ำเนื่องจากส่วน hydrophobic ของโมเลกุลโปรตีนทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำ ดังนั้นการตกตะกอนโปรตีนจำเป็นต้องเพิ่มแรงปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลโปรตีนและลดแรงปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลโปรตีนและโมเลกุลน้ำ เพื่อให้โมเลกุลโปรตีนจับกันแล้วตกตะกอนลงมา โดยวิธีที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีนมี 3 วิธี ได้แก่

1) Ionic strength/ salt fractionation precipitation

วิธีนี้เป็นวิธีตกตะกอนโปรตีนที่ได้รับความนิยมสูง โดยการใช้เกลือเพิ่มความแรงอิ-ออน ให้โมเลกุลของน้ำจับกับโมเลกุลของเกลือแทน ทำให้โมเลกุลโปรตีนเคลื่อนที่มาจับกันแล้วตกตะกอน เกลือที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เนื่องจาก มีค่าการอิ่มตัวในน้ำสูง สามารถละลายน้ำได้ดีในอุณหภูมิห้อง และมีราคาถูก (Sarkar *et al*., 2011; Chuner *et al*., 2012)

2) Organic solvent และ organic polymer

เป็นการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้สารละลายอินทรีย์และพอลิเมอร์อินทรีย์ เพื่อให้น้ำมีความสามารถในการทำละลายต่ำลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายอินทรีย์สูงขึ้นทำให้แรงกระทำระหว่างโมเลกุลโปรตีนมีค่าสูงขึ้นจนเกิดการรวมตัวกันและตกตะกอนลงมา สารละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีนคือ เอทานอล เมทานอล อะซิโตน และพอลิเอทิลีนไกลคอล เป็นต้น (Hemlata *et al*., 2011)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3) Isoelectric precipitation

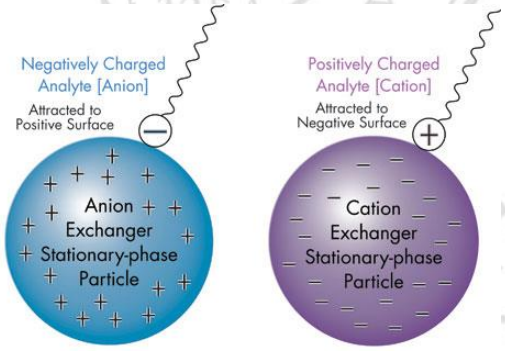
วิธีนี้เป็นการตกตะกอนโปรตีนโดยปรับ pH ของสารละลายจนทำให้ประจุสุทธิของโมเลกุลโปรตีนเป็นศูนย์เรียกว่า “isoelectric point: pI” ทำให้โมเลกุลโปรตีนไม่มีแรงผลักระหว่างกัน สามารถเคลื่อนเข้าใกล้ และจับกันตกตะกอนลงมาได้ วิธีนี้ค่อนข้างนิยมใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ เนื่องจากมีต้นทุนต่ำ แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้คือไม่สามารถแยกโปรตีนที่มีค่า pI ใกล้เคียงกันได้ (ชรินทร์, 2542; Chiu *et al*., 2009)

หลังจากตกตะกอนโปรตีนแล้ว จะต้องมีการแยกโปรตีนออกจากสารละลาย มักใช้การ dialysis ซึ่งอาศัยหลักการแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน ผ่านทางรูพรุนของเยื่อเลือกผ่าน เช่น cellophane หรือ cellulose tubing เป็นต้น จากนั้นจึงนำสารละลายโปรตีนที่ต้องการไปทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

2.7.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยอาศัยคุณสมบัติด้านประจุ

1) Ion-exchange chromatography

วิธีการนี้จะอาศัยการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างของเหลวที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) กับของแข็งที่เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) โดยเฟสคงที่มีลักษณะเป็นของแข็ง ไม่ละลายในตัวทำละลายเรียกว่า “matrix” เป็นพอลิเมอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดประจุ โดยการปรับโครงสร้างให้เกิดพันธะโควาเลนท์กับหมู่ฟังก์ชัน เรียก “ligand” รวมเรียกว่า “ตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchanger)” หรือ “เรซิน (resin)” ทำให้แยกสารออกจากกันได้ โดยสารที่มีประจุตรงข้ามกับ resin จะถูกจับไว้ และสารที่มีประจุเดียวกันกับ resin จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ก่อน สามารถแบ่ง resin ออกเป็น 2 กลุ่มตามคุณสมบัติประจุ คือ cation exchanger ประจุของเรซินจะเป็นประจุลบ ใช้แลกเปลี่ยนประจุบวก และ anion exchanger ประจุของเรซินเป็นประจุบวก ใช้แลกเปลี่ยนประจุลบ คอลัมน์ประเภทนี้จะมีลักษณะกว้าง เนื่องจากต้องเพิ่มพื้นที่สัมผัสระหว่างโมเลกุลของสารที่ต้องการแยก (Waithaisong *et al.*, 2015) (ภาพ 2.9)



ภาพ 2.9 ลักษณะตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกและตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ

ที่มา: Shrestha (2013)

2) Isoelectric focusing

เป็นการแยกสารตามค่า pI ของสาร โดยจะทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างค่า pH ขึ้นระหว่างขั้วไฟฟ้า โปรตีนในสารละลายจะเคลื่อนที่จนถึงจุดที่ประจุสุทธิเป็นศูนย์จึงหยุด และในสารละลายโปรตีนผสมจะมีการเติมตัวกลางหรือตัวพา (carrier) บางชนิดลงไปก่อนการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แยกเพื่อไม่ให้โปรตีนเคลื่อนที่มาผสมกันได้อีก จึงทำให้เกิดการแยกโปรตีนได้ ตัวกลางที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนด้วยวิธีนี้ ได้แก่ agar และ polyacrylamine gel (ภาวิณี, 2529)

2.7.3 การทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของขนาด

1) Gel filtration column chromatography

วิธีนี้อาศัยคุณสมบัติความแตกต่างของขนาดโมเลกุลสารตัวอย่าง โดยเจลที่ใช้ในวิธีนี้เป็นพอลิเมอร์ที่มีรูพรุน โดยสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านรูพรุนของเจลได้ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ก่อน สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่าขนาดของรูพรุนเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปตามรูพรุนของเจลจึงถูกชะออกมาทีหลัง ทำให้สามารถแยกสารที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันได้ ประสิทธิภาพของการแยกสารโดย gel filtration column chromatography นี้ขึ้นอยู่กับความยาวของคอลัมน์ ขนาดรูพรุนของเจล และอัตราการไหลของบัฟเฟอร์

2) Ultrafiltration

วิธีนี้ เป็นการกรองโดยใช้เยื่อเลือกผ่าน (membrane filtration) ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ใช้แรงดันภายนอก ดันให้ของเหลวเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเยื่อเลือกผ่าน มักใช้กับการแยกสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ประมาณ 300-500,000 Da เช่น โปรตีน เอนไซม์ แป้ง และเซลล์แบคทีเรีย เป็นต้น

2.7.4 การทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยอาศัยคุณสมบัติจำเพาะ

1) Affinity chromatography

วิธีการนี้อาศัยโครงสร้างทางเคมีหรือคุณสมบัติจำเพาะของสาร ligand ที่ใช้มีความจำเพาะกับสารที่ต้องการแยกสูง เมื่อสารผ่านคอลัมน์ โปรตีนที่ต้องการแยกจะทำปฏิกิริยากับ ligand ที่ถูกตรึงอยู่ โปรตีนที่ไม่ต้องการจะถูกชะออกมา วิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถแยกโปรตีนที่ต้องการออกจากสารผสมได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง มักใช้กับสารที่มีความเจือจางสูง และเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง แต่ข้อเสียคือมีค่าใช้จ่ายสูง (ภาวิณี, 2529)

2) Hydrophobic chromatography

วิธีนี้จะอาศัยคุณสมบัติของกลุ่มไม่มีขั้วบนโมเลกุลสาร ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารไม่มีมีขั้วด้วยกัน ligand ของเฟสเคลื่อนที่จะมีลักษณะเป็นสายสั้นๆ ของแขนงไฮโดรคาร์บอน โดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ติดกับพอลิเมอร์เรซินที่เป็น phynyl FF HS resin ซึ่งโปรตีนจะถูกแยกโดยโมเลกุลที่ไม่มีขั้วจับกับเรซินด้วยแรง hydrophobic

2.7.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์โปรตีน

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนอาศัยเทคนิค gel electrophoresis คือการใช้กระแสไฟฟ้าเป็นตัวพาสารให้เคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจล เจลที่นิยมใช้ในวิธีนี้คือ พอลิอะคริลาไมด์ ซึ่งมี 2 แบบ (บุญยืน, 2522) ได้แก่

1) Native gel electrophoresis

วิธีนี้ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนในสภาพธรรมชาติ ทำให้สามารถนำโปรตีนบนเจลไปใช้งานต่อได้ โดยโปรตีนบนเจลถูกแยกตามขนาด รูปร่าง และประจุ

2) Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

วิธีนี้โปรตีนทำปฏิกิริยากับ sodium dodecylsulfate (SDS) ร่วมกับ reducing agent และให้ความร้อนทำให้โปรตีนที่พับงอคลายตัวเป็นเส้นตรง ดังนั้นการเคลื่อนที่ของโปรตีนในเจลจะแยกตามขนาดของโปรตีนเท่านั้น และโปรตีนที่ผ่านวิธีนี้จะเสียสภาพ ไม่สามารถนำไปใช้งานต่อได้

2.8 อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical, antioxidant reagent and antioxidant activity determination)

2.8.1 อนุมูลอิสระ (free radicals)

อนุมูลอิสระ คือสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวในโมเลกุล เมื่ออิเล็กตรอนในโมเลกุลไม่สมดุลจะกลายเป็นอนุมูลอิสระที่ดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่เพื่อให้เกิดความเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดต่อเนื่องในเซลล์ตลอดดังสมการ 1 และ 2 อนุมูลอิสระมีหลายชนิด ได้แก่ ได้แก่ oxygen radical (รวมถึงอนุพันธ์ของ oxygen radical เช่น hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$), hydrogen peroxide, transition metals, carbonate radical ($CO_3^{\bullet-}$), nitrate radical ($NO_3^{\bullet}$), methyl radical ($CH_3^{\bullet}$), superoxide radical ($O_2^{\bullet}$), peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$), reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น (Halliwell, 1999)

สารอนุมูลอิสระมีผลทำลายสารชีวโมเลกุลทุกชนิด ส่งผลให้เกิดสภาวะผิดปกติในสิ่งมีชีวิต เช่น การแก่ก่อนวัย (aging) โรคหลอดเลือดหัวใจและหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) ผนังหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(allergies) โรคเสื่อมของระบบต่างๆ รวมถึงการกลายพันธุ์ของเซลล์ ซึ่งอาจพัฒนาจนกลายเป็นเนื้องอกหรือมะเร็ง เป็นต้น (Smith *et al*., 2000; Upston *et al*., 2003; Hyun *et al*., 2006; Durackova, 2010)

2.8.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant reagent)

สารต้านอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน มีกลไกที่แตกต่างกันไป เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การจับโลหะที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (metal chelation) การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) ตัวอย่างกลไกการต้านอนุมูลอิสระแสดงดังสมการ 3 และ 4 (เจนจิรา และประสงค์, 2554) สารต้านอนุมูลอิสระในปัจจุบันมีทั้งที่มาจากการสังเคราะห์ เช่น trolox, gallic acid สารประกอบฟีนอลิก และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่พบในทั้งพืชและสัตว์ เช่น วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี และกลูตาไธโอน สารต้านอนุมูลอิสระจากการสังเคราะห์นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่ทำให้อาหารมีลักษณะเปลี่ยนไป สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์นี้มีความคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติแต่ยังมีข้อจำกัดด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Pokorny *et al*., 2001)

$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$ (สมการ 1)

$ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot}$ (สมการ 2)

$R^{\cdot} + AH \rightarrow RH + A^{\cdot}$ (สมการ 3)

$RO^{\cdot} + AH \rightarrow ROH + A^{\cdot}$ (สมการ 4)

2.8.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีก็จะมีความจำเพาะต่อสารแตกต่างกัน เพื่อความถูกต้องจึงมักใช้การวิเคราะห์จะใช้หลายวิธีร่วมกัน วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยมได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1) 2,2-Diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH) (Que *et al*., 2006)

DPPH˙ เป็นอนุมูลอิสระที่คงตัว มีสีม่วง ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 nm ใช้ในการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (scavenging activity) โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในตัวทำละลายเอทานอล จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ดังสมการ 5 และความสามารถในการต้านออกซิเดชันจะแสดงออกมาในค่า %inhibition ตามสมการ 6

$$DPPH^{\cdot} + RH \rightarrow DPPH\text{-}H + R^{\cdot} \quad \text{(สมการ 5)}$$

สีม่วง ตัวอย่าง สีเหลือง

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{517 \text{ control}} - A_{517 \text{ test sample}})/ A_{517 \text{ control}})] \times 100 \quad \text{(สมการ 6)}$$

Demiral *et al*. (2012) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ crude extracts และไฟโคไซยานิน ที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *Oscillatoria amphibia* และ *Spirulina platensis* โดยวิธี DPPH พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ crude extract ที่สกัดจาก *S. platensis* มีค่าสูงกว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ crude extract ที่สกัดจาก *O. amphibia* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไฟโคไซยานินที่สกัดจากทั้งสองสายพันธุ์มีค่าสูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wu *et al*. (2016) ที่พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไฟโคไซยานินหลังทำบริสุทธิ์มีค่าสูงกว่าสารสกัดน้ำที่สกัดจาก *S. platensis* และ Paliwal *et al*. (2015) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไฟโคบิลิโปรตีนที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudanabaena* sp., *Spirulina* sp. และ *Lyngbya* sp. ด้วยวิธี DPPH พบว่า *Lyngbya* sp. มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.78 mg gallic acid/mg extract

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved