บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1) ปากคีบ
2) กรรไกร
3) คัตเตอร์
4) กล่องพลาสติกทนร้อน
5) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH30
6) กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์
7) เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Tolebo รุ่น PG802-S
8) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Julabo Eco Temp รุ่น TW12
9) เครื่องปั่นเหวี่ยงจุลินทรีย์แบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) ยี่ห้อ Hettich/ Germany รุ่น MIKRO 220 R
10) Sonicator Sonics ยี่ห้อ Vibra-cell™
11) Microplate reader ยี่ห้อ Dynex technologies รุ่น Spectra MR™
12) เครื่อง Lyophilizer
13) 96 well microplate plastic
14) หลอด centrifuge ขนาด 50 mL
15) ออโตปิเปต และทิปขนาด 1,000 µL
16) เมทานอล
17) Phosphate buffer pH 6.2 (ภาคผนวก ก)
18) นาฬิกาจับเวลา
19) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (ภาคผนวก ข)
20) ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ
21) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 และ 500 mL

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

22) ถังพอลิคาร์บอนขนาด 10 L
23) หลอดฟลูออเรสเซนต์
24) เครื่องปั๊มอากาศ
25) ไส้กรองอากาศ
26) สายยางให้อากาศ
27) ไส้กรองอากาศ
28) ÄKTA purifier system (Amersham Biosciencese)
29) Q-sepharoseTM fast flow (Amersham Biosciencese)
30) Sephadex G-75 (Amersham Biosciencese)
31) กระดาษกรอง
32) PVDF membrane
33) Towbin buffer (ภาคผนวก ก)

สารเคมี

1) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)
2) Tris-HCl pH 8.0 (ภาคผนวก ก)
3) 1M NaCl (ภาคผนวก ก)
4) สารเคมีในการทดสอบโปรตีน BSA protein assay (ภาคผนวก ง)
5) สารเคมีในการทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) (ภาคผนวก ฉ)
6) สารเคมีในการทดสอบ *in vitro* digestibility
7) สารเคมีในการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (ภาคผนวก ช)

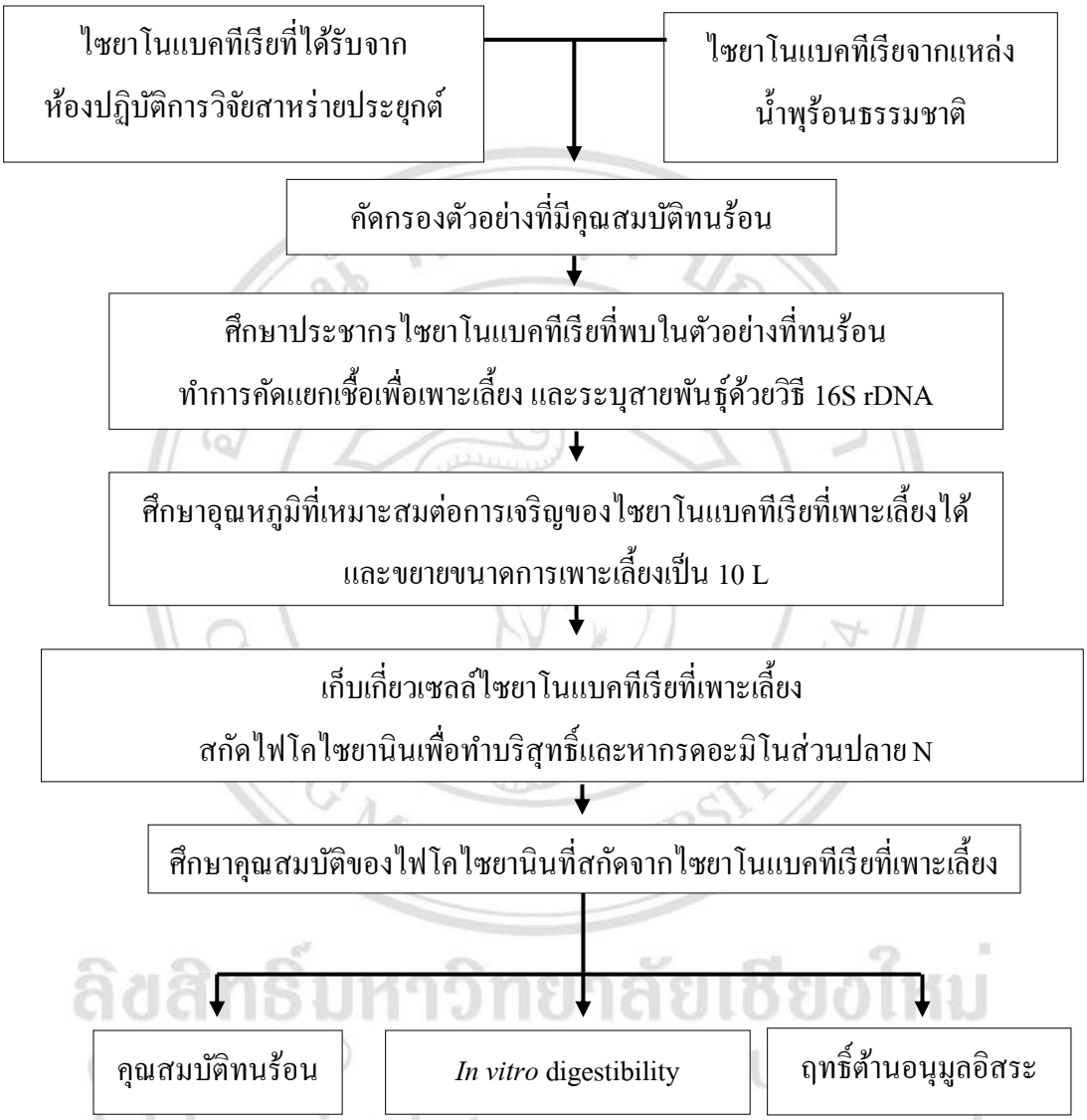
ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยจากห้องปฏิบัติการสาหร่ายประยุกต์

1) *Calothrix* sp. NUP
2) *Chroococcidiopsis* sp. SK40
3) *Cyanosarcin*a sp. SG40
4) *Leptolyngbya* sp. PD45
5) *Pseudanabaena* sp. TP8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการวิจัย

วิธีการวิจัยดำเนินตามแผนภาพแสดงขอบข่ายการวิจัย (ภาพ 3.1) โดยมีรายละเอียดดังนี้



ภาพ 3.1 แผนภาพแสดงขอบข่ายงานวิจัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
All rights reserved

3.1 การเก็บไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำพุร้อนธรรมชาติ

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากแหล่งน้ำพุร้อน 5 แหล่งใน 4 จังหวัดภาคเหนือของประเทศไทย ระหว่างเดือน มีนาคม ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2558 ได้แก่ น้ำพุร้อนท่าปาย (TP) จังหวัดแม่ฮ่องสอน น้ำพุร้อนแม่จัน (MC) จังหวัดเชียงราย น้ำพุร้อนสันกำแพง (SKP) และน้ำพุร้อนเทพพนม (TPN) จังหวัดเชียงใหม่ และน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน (CS) จังหวัดลำปาง (ภาพ 3.2 และภาพ 3.3) กำหนดจุดเก็บตัวอย่างดังตาราง 3.1 เลือกเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 50°C โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจุดละ 3 ซ้ำ ใช้ปากคีบทำการขูดหรือตัด คีบตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากสิ่งยึดเกาะ แบ่งตัวอย่างบางส่วนใส่ในกล่องพลาสติกขนาดเล็ก เพื่อใช้ศึกษารูปร่างเซลล์และแยกเชื้อเพื่อทำการเพาะเลี้ยง ตัวอย่างที่เหลือทำการซับน้ำให้แห้ง เก็บในอุณหภูมิ -20°C เพื่อสกัดไฟโคไซยานิน และศึกษาสมบัติของไฟโคไซยานินที่สกัดจากไซยาโน-แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในขั้นต่อไป

ภาพ 3.2 แผนที่แสดงแหล่งน้ำพุร้อนที่เก็บตัวอย่าง
(A: น้ำพุร้อนท่าปาย B: น้ำพุร้อนแม่จัน C: น้ำพุร้อนสันกำแพง
D: น้ำพุร้อนเทพพนม และ E: น้ำพุร้อนแจ้ซ้อน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.3 แหล่งน้ำพุร้อนที่เก็บตัวอย่าง
(A: น้ำพุร้อนท่าปาย B: น้ำพุร้อนแม่จัน C: น้ำพุร้อนสันกำแพง
D: น้ำพุร้อนเทพพนม และ E: น้ำพุร้อนแจ้ซ้อน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.1 พิกัดของจุดเก็บตัวอย่างและรหัสของตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

จุดเก็บตัวอย่าง	พิกัด	จำนวนตัวอย่าง	อุณหภูมิที่เก็บตัวอย่าง (°C)	รหัสตัวอย่าง
น้ำพุร้อนท่าปาย	N19.30822	2	59	TP59
อ. ท่าปาย จ. แม่ฮ่องสอน	E98.47343		61.9	TP61.9
น้ำพุร้อนสันกำแพง	N18.815133	2	60.2	SKP60.2
อ. แม่ออน จ. เชียงใหม่	E99.229567		54.4	SKP54.4
น้ำพุร้อนเทพพนม	N18.27127	1	56.7	TPN56.7
อ. แม่แจ่ม จ. เชียงใหม่	E98.39623			
น้ำพุร้อนแม่จัน	N20.11724	1	61.3	MC61.3
อ. แม่จัน จ. เชียงราย	E99.79865			
น้ำพุร้อนแจ้ซ้อน	N18.834409	10	53	CS53
อ. แจ้ห่ม จ. ลำปาง	E99.477167		57	CS57
			58	CS58
			60	CS60
			60.5	CS60.5
			61	CS61
			62	CS62
			64	CS64
			64.5	CS64.5
			66	CS66

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การคัดกรองไซยาโนแบคทีเรียที่มีไฟโคไซยานินทนอุณหภูมิสูง

3.2.1 แบ่งไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บมาจากจุดเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาหาน้ำหนักแห้ง โดยชั่งตัวอย่างก่อนอบด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จากนั้นนำไปอบที่ 55°C นาน 3 วัน แล้วน้ำหนักหลังอบเพื่อนำมาคำนวณน้ำหนักแห้งที่ใช้ในการสกัดดังสมการ

$$\%\ \text{น้ำหนักแห้ง (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักสดก่อนอบ (mg)} - \text{น้ำหนักแห้งหลังอบ (mg)}}{\text{น้ำหนักสดก่อนอบ (mg)}} \times 100$$

$$\text{น้ำหนักแห้งที่ใช้ในการสกัด (mg)} = \text{น้ำหนักสดที่ใช้สกัด (mg)} \times \%\ \text{น้ำหนักแห้ง (\%)}$$

3.2.2 สกัดไฟโคไซยานิน โดยผสมตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียสด 0.1 g ในสารละลาย phosphate buffer pH 6.2 ปริมาณ 40 mL ทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 6 kHz ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที (ทำงาน 15 วินาที พัก 30 วินาที) ตรวจสอบการแตกของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นปั่นเหวี่ยง ที่ 6000 g 4°C 30 นาที เก็บ supernatant เป็น cell free extract

3.2.3 วัดปริมาณไฟโคไซยานินในแต่ละตัวอย่าง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 615 nm และ 652 nm (Bennett and Bogorad, 1973) จากนั้นคำนวณปริมาณไฟโคไซยานินโดยดังสมการ

$$\text{ไฟโคไซยานิน (mg/mL)} = \frac{A_{615} - 0.474(A_{652})}{5.34}$$

A_{615} = ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของไฟโคไซยานิน

A_{625} = ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของอัลโลไฟโคไซยานิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4 ศึกษาคุณสมบัติการทนอุณหภูมิสูงของไฟโคไซยานิน (ดัดแปลงจาก Zhao and Brand, 1989) ด้วยการบ่ม cell free extract ที่ 70°C แบ่งเป็น 4 ช่วงเวลาได้แก่ 0 15 30 และ 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นวัดปริมาณไฟโคไซยานินหลังการบ่มแต่ละช่วงเวลา

3.2.5 เมื่อคัดกรองไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตไฟโคไซยานินทนร้อนได้ตามต้องการแล้ว ศึกษารูปร่างของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และจัดจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรียตามเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้อง (ยุวดี, 2556; Komárek and Anagnostidis, 2005)

3.2.6 ทำการแยกเชื้อโดยใช้วิธี pick cell ในอาหาร BG11 (ภาคผนวก ข)

3.2.7 ระบุสายพันธุ์ที่เจริญได้ โดยใช้วิธี 16S rDNA sequencing analysis (กาญจนา, 2558)

7.1) สกัด DNA ของ *Synechococcus* sp. ที่เพาะเลี้ยงได้ โดยใช้ Wizard® Genomic DNA Purification Kit ยี่ห้อ Promega

1.1 ผสมตัวอย่าง 0.5 g กับ lysis solution (BB) 950 µL และ lysis solution 50 µL อุ่นที่ 65°C นาน 20 วินาที

1.2 Beads beating 4-6 m/sec หรือ 4200-6500 rpm 5 sec บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 30 นาที

1.3 ปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง 12000 rpm 1 นาที

1.4 ดูดส่วนใส 600 µL ผสมกับ Purification solution 400 µL ผสมให้เข้ากันดีในหลอดใหม่

1.5 เติม chloroform 600 µL vortex 15 วินาที

1.6 ปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง 12000 rpm 15 นาที

1.7 ดูดส่วนใส 800 µL ผสมกับ Pricipitation solution 800 µL ปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ที่ 20,000 g นาน 15 นาที

1.8 เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนด้วย 1 mL wash solution ผสมเบาๆโดยการพลิกหลอด 2-3 ครั้ง ปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ที่ 20,000 g นาน 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง

1.9 เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนด้วย 1 mL 70% ethanol และ 2 µL ethachimate

1.10 ปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ที่ 20,000 g นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนใน TE buffer

7.2) Amplify 16S rDNA โดยวิธี PCR (ประกอบด้วยสารปริมาตรรวม 100 µL ดังนี้)

- น้ำ	78.5	µL
- 10x buffer	10	µL
- 2mM dNTP	8	µL
- Primer F (27F)	1	µL
- Primer R (1492R)	1	µL
- polymerase	0.5	µL
Total	99	µL
Template	1	µL

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สภาวะ PCR: 30 cycle	96°C นาน 2 นาที
	98°C นาน 20 วินาที
	56°C นาน 30 นาที
	72°C นาน 1.5 นาที
	72°C นาน 10 นาที
	4°C นาน 10 นาที

7.3 ทำ purification PCR product ด้วย Wizard® SV gel and PCR Clean-Up system ยี่ห้อ Promega

7.4 ตรวจสอบ genomic DNA, PCR product และ PCR product ที่บริสุทธิ์ด้วย agarose gel

- 1% Agarose 100 V นาน 30 นาที
- Loading dye 2 µL และ ตัวอย่าง DNA 3 µL
- แช่ Ethidium bromide นาน 5 นาที แล้วตรวจสอบด้วย Gel documentation

7.5 ส่งตรวจชิ้นส่วน DNA และวิเคราะห์โดยการ BLAST

7.6 ตัดชิ้นส่วนที่ไม่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม BioEdit และสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับแบคทีเรียมาตรฐานกับฐานข้อมูลของ GenBank ตามตาราง ค.1 ด้วยโปรแกรม MEGA7 วิธี neighbor-joining

3.3 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอุณหภูมิต่างๆ และการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง

3.3.1 ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.1 ในสูตรอาหาร BG11 ปริมาตร 300 mL ที่ 4 อุณหภูมิ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง 37°C 45°C และ 50°C เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง วัดการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm ทุก 2 วัน เป็นเวลา 15 วัน

3.3.2 ขยายขนาดการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหาร BG11 สู่ปริมาตร 10 ลิตร ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ตรวจวัดการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm ทุก 2 วัน

3.3.3 เมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ และนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง และสกัดไฟโคไซยานินเพื่อศึกษาคุณสมบัติในขั้นต่อไป

3.4 การทำไฟโคไซยานินให้บริสุทธิ์ (ดัดแปลงจาก Bermejo *et al*., 2001)

3.4.1 ทำการสกัดไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บเกี่ยวได้ และวัดปริมาณไฟโคไซยา-นิน และปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry protein assay (ภาคผนวก ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2 ตกตะกอนโปรตีนใน supernatant ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ (ภาคผนวก จ) การอิ่มตัวที่ 80% ทิ้งให้ตกตะกอนข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°C ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน จากนั้นละลายตะกอนที่ได้ด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7.0 และทำการ dialysis เพื่อกำจัดเกลือโดยใช้สัดส่วนของสารละลายในถุงต่อบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1: 100 ที่อุณหภูมิ 4°C โดยมีการกวนตลอดเวลา เปลี่ยนบัฟเฟอร์ใหม่ทุก 4 ชั่วโมง นาน 24 ชั่วโมง

3.4.3 ทำไฟโคไซยานินให้บริสุทธิ์โดยใช้ Q- sepharose™ fast flow ion-exchange column chromatography

3.1) ต่อคอลัมน์ Q-sepharose™ fast flow เข้ากับเครื่อง ÄKTA purifier system แล้วเปิดระบบปฏิบัติการ UNICORN 5.31

3.2) ล้างคอลัมน์ด้วย 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 อัตราการไหล 1 mL/min

3.3) โหลดตัวอย่างที่ต้องการทำบริสุทธิ์ 1 mL ลงในคอลัมน์ เพื่อทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี ion-exchange column chromatography

3.4) ชะตัวอย่างจากคอลัมน์โดยใช้ 1 mM phosphate buffer pH 7.4 ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 0-1 M อัตราการไหล 1 mL/min

3.5) เก็บตัวอย่างที่ชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย fraction collector ปริมาตร fraction ละ 2 mL

นำ fraction ที่มีไฟโคไซยานินสูงสุดมารวมกัน แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วย ammonium sulfate เพื่อทำบริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

3.4.4 ทำไฟโคไซยานินให้บริสุทธิ์โดยใช้ Sephadex G-75 gel filtration column chromatography

4.1) ต่อคอลัมน์ Sephadex G-75 เข้ากับเครื่อง ÄKTA purifier system แล้วเปิดระบบปฏิบัติการ UNICORN 5.31

4.2) ล้างคอลัมน์ด้วย 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 อัตราการไหล 1 mL/min

4.3) โหลดตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แบบ ion-exchange chromatography 1 mL ลงในคอลัมน์ เพื่อทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี gel filtration chromatography

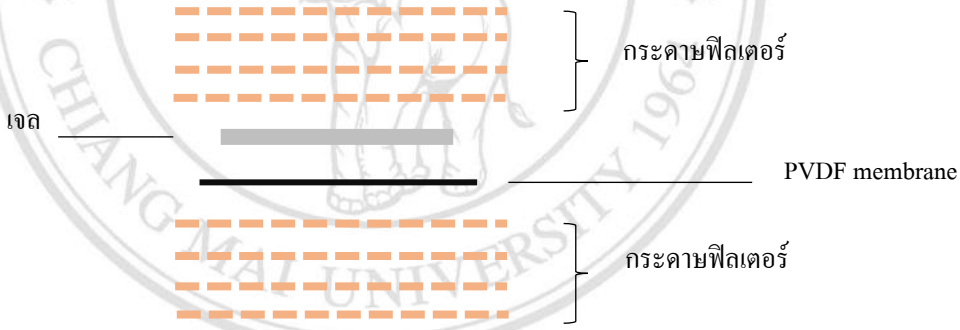
4.4) ชะตัวอย่างจากคอลัมน์โดยใช้ 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 0-1 M อัตราการไหล 1 mL/min เก็บตัวอย่างที่ชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย fraction collector ปริมาตร fraction ละ 0.5 mL

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.5 นำสารละลายที่ได้ในการทำบริสุทธิ์แต่ละขั้นมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานินด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) (Bermejo *et al*., 2001) (ภาคผนวก ฉ)

3.4.6 การหาลำดับกรดอะมิโนส่วนปลาย N

1) ทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ (กรรไกร คัตเตอร์) ให้สะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน น้ำปราศจากอิเล็กตรอนและเอทานอล
2) ตัด PVDF membrane ให้มีขนาดใกล้เคียงกับเจล
3) ตัดกระดาษฟิลเตอร์จำนวน 8 แผ่น โดยมีขนาดใหญ่กว่า PVDF membrane เล็กน้อย
4) เติมเมทานอลลงในภาชนะเพื่อแช่ PVDF membrane จากนั้นเทเมทานอลทิ้ง เติม towbin buffer เพื่อแช่ PVDF membrane และ กระดาษฟิลเตอร์ เขย่าเบาๆ 15 นาที
5) ทำ blotting โดยเรียงลำดับชั้นดังภาพ 3.4 ทำ electrophoresis ใช้กำลังไฟ 40 V. นาน 90 นาที โดยใช้กระแสไฟ 1.66 mA/cm^2 ต่อพื้นที่ของกระดาษฟิลเตอร์



ภาพ 3.4 ลำดับชั้นของการวางกระดาษฟิลเตอร์ เจล และ PVDF membrane ในการ blotting

6) ตัดขนาดของแถบที่ปรากฏบน PVDF membrane นำไปเข้าเครื่อง sequencing เพื่อหาลำดับเบสของกรดอะมิโนปลาย N

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การศึกษาคุณสมบัติของไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง

สกัดไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงและ *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD โดยชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง 2 g ละลายใน phosphate buffer pH 6.2 ปริมาณ 40 mL ทำให้เซลล์แตก แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 6000 g 4°C 30 นาที เก็บ supernatant จากนั้นนำมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer จากนั้นนำมาศึกษาคุณสมบัติที่สนใจดังนี้

3.5.1 ทดสอบคุณสมบัติทนร้อน โดย บ่มที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80°C ตามลำดับ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการศึกษา เมื่อทราบอุณหภูมิที่ปริมาณไฟโคไซยานินลดลงจนมีปริมาณใกล้เคียงกัน จึงทำการทดลองที่อุณหภูมิดังกล่าว โดยเพิ่มเวลาในการบ่มเป็น 120 นาที

3.5.2 การทดสอบ *in vitro* digestibility

2.1) เตรียมสารทดสอบโดยผสมสารอินทรีย์ และสารอินทรีย์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 mL ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมส่วนผสมเพิ่มเติมแล้วปรับ pH ตามตาราง 3.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ *in vitro* digestibility (ดัดแปลงจาก Versantvoort *et al*., 2005)

	Stock solution (g/L)	**ปริมาตรที่ใช้**			
		Saliva (mL)	**Gastric juice** (mL)	**Duodenal juice** (mL)	**Bile juice** (mL)
สารอนินทรีย์					
KCl	89.6	10	9.2	6.3	4.2
KSCN	20	10			
NaH_2PO_4	88.8	10	3.0		68.3
$NaSO_4$	57	10			
NaCl	175.3	1.7	15.7	40	30
$NaHCO_3$	84.7	20		40	
$CaCl_2$	29.4		18	9	10
NH_4Cl	30.6		10	180	150 µL
HCl	37%		6.5	10	
KH_2PO_4	8			10	
$MgCl_2{\cdot}6H_2O$	2.34				
สารอินทรีย์					
Urea	25	8	3.4	4	10
Glucose	65		10		
Glucuronic acid	2		10		
Glucoseamine hydrochloride	33		10		
เติมส่วนประกอบ หลังผสมสารละลายอินทรีย์และอนินทรีย์เข้าด้วยกัน					
α-amylase		290 mg			
Uric acid		15 mg			
Mucin		25 mg	3 g		
BSA			1 g	1 g	1.8 g
Pepsin			2.5 g		
Pancreatin				9 g	
Lipase				1.5 g	
Bile					30 g
pH		6.8 ± 0.2	1.3 ± 0.2	8.1 ± 0.2	8.1 ± 0.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2) ผสมสารสกัดไฟโคไซยานินปริมาณ 5 mL ลงในสารละลาย saliva ปริมาณ 5 mLจากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที

2.3) ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยไนโตรเจนเหลว

2.4) เติมสารละลาย gastric juice 12 mL จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง

2.5) ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์อีกครั้งด้วยไนโตรเจนเหลว

2.6) เติมสารละลาย duodenal juice 6 mL, bile juice 2 mL และ สารละลาย HCO_3 2 mL จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง

2.7) หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยง ที่ 3000×g นาน 5 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนที่เสียสภาพ แล้วนำสารละลายส่วนใสไปทดสอบในขั้นต่อไป

3.5.3 การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity (ดัดแปลงจาก Que *et al*., 2006) (ภาคผนวก ช)

3.1) เตรียม gallic acid standard ในความเข้มข้น 0-0.02 mg/mL ตามตาราง ช.1

3.2) เติมสารละลาย gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 µL เติม 260 µM DPPH methanol solution ปริมาตร 100 µL ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืด 20 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

3.3) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ที่ได้ไปคำนวณหา %inhibition ตามสมการดังนี้

$$\%\text{inhibition} = [(A_{517}\text{blank} - A_{517}\text{sample})/ A_{517}\text{blank}] \times 100$$

3.4) เตรียมตัวอย่างสารสกัดไฟโคไซยานินที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 µL และทำการทดลองตามข้อ 3.2) -3.3) ความสามารถในการยับยั้ง DPPH· radical คำนวณได้จากการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดกับ IC_{50} ของสารมาตรฐาน Gallic acid ดังสมการ

$$\text{GAE (mg gallic acid/ g extract)} = \frac{IC_{50} \text{ ของ gallic acid (mg/mL)}}{IC_{50} \text{ ของสารสกัดสาหร่าย (g/mL)}}$$

3.5.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองเป็นแบบสุ่มอิสระโดยสมบูรณ์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในการพิจารณานัยสำคัญทางสถิติวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS (Statistic Package for Social Science) เปรียบเทียบโดยใช้การทดสอบแบบ Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved