

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การคัดกรองไซยาโนแบคทีเรียที่มีไฟโคไซยานินทนอุณหภูมิสูง

คัดกรองไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฟโคไซยานินทนอุณหภูมิสูง จากตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียของห้องปฏิบัติการสาหร่ายประยุกต์ 5 สายพันธุ์ และตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากธรรมชาติในพื้นที่ 4 จังหวัดภาคเหนือ ได้แก่ น้ำพุร้อนท่าปาย จังหวัดแม่ฮ่องสอน น้ำพุร้อนสันกำแพง น้ำพุร้อนเทพพนม จังหวัดเชียงใหม่ น้ำพุร้อนแม่จัน จังหวัดเชียงราย และ น้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง มาวัดปริมาณไฟโคไซยานิน ได้ผลดังแสดงในภาพ 4.1 โดยในแต่ละตัวอย่างมีปริมาณไฟโคไซยานินแตกต่างกัน คัดเลือกตัวอย่างที่มีปริมาณไฟโคไซยานินสูงสุด 10 ลำดับ ตามตาราง 4.1

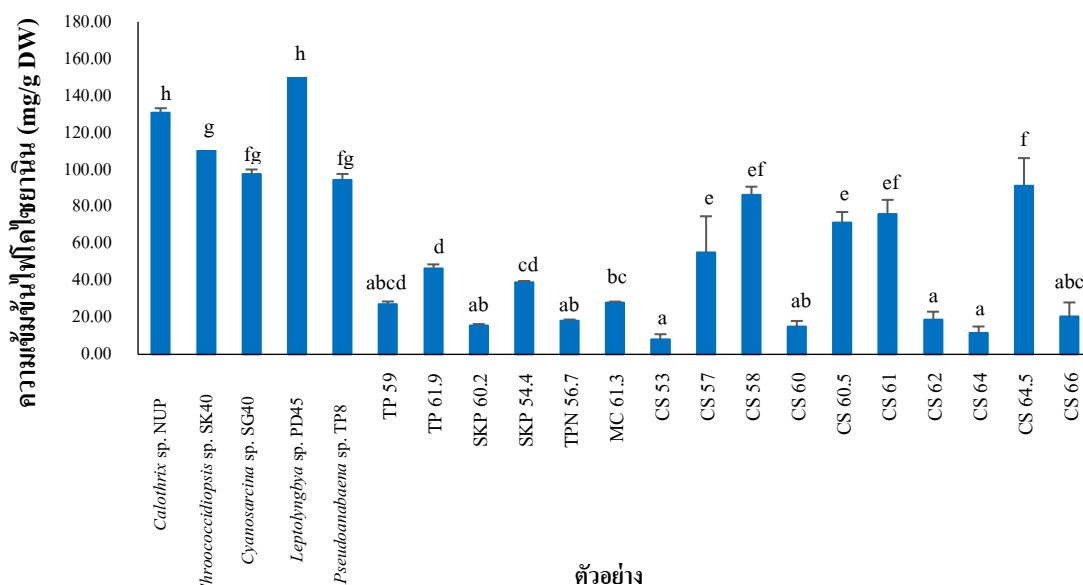
ตาราง 4.1 ปริมาณไฟโคไซยานินเริ่มต้น (mg/g DW) ของตัวอย่างที่มีปริมาณไฟโคไซยานินเริ่มต้นสูงสุด 10 ลำดับ

ตัวอย่าง	ปริมาณไฟโคไซยานินเริ่มต้น (mg/g DW)
<i>Calothrix</i> sp. NUP	131.77
<i>Chroococidiopsis</i> sp. SK40	105.24
<i>Cyanosarcina</i> sp. SG40	100.06
<i>Leptolyngbya</i> sp. PD45	153.20
<i>Pseudanabaena</i> sp. TP8	95.47
CS57	55.30
CS58	86.91
CS60.5	70.18
CS61	76.09
CS64.5	91.20

หมายเหตุ: CS: น้ำพุร้อนแจ้ซ้อน ตัวเลขต่อท้ายแสดงอุณหภูมิของจุดเก็บตัวอย่าง

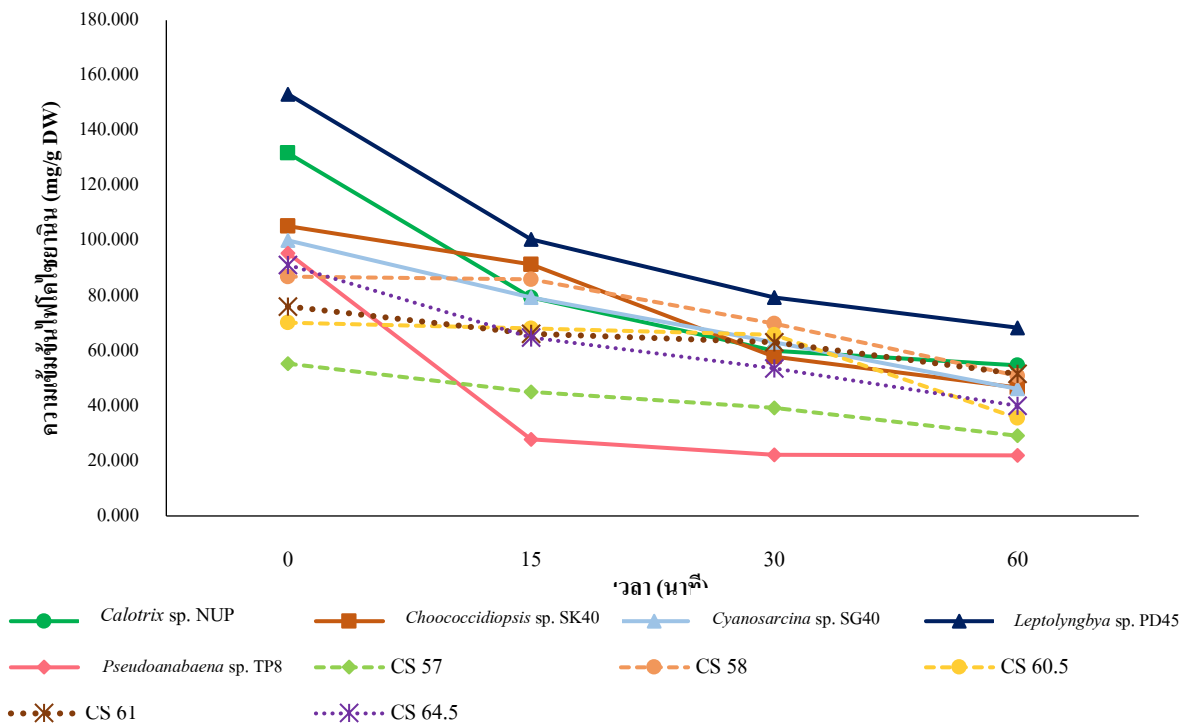
จากนั้นนำสารสกัดจากทั้ง 10 ตัวอย่างมาทดสอบคุณสมบัติการทนอุณหภูมิสูงโดยบ่มที่อุณหภูมิ 70°C วัดปริมาณไฟโคไซยานินหลังบ่มเวลา 15, 30 และ 60 นาที ปริมาณไฟโคไซยานินแสดงดังภาพ 4.2 และทำการคำนวณร้อยละไฟโคไซยานินคงเหลือ ผลการทดลองดังตาราง 4.2

จากตาราง 4.2 พบว่าหลังผ่านการทดสอบความทนร้อนที่ 70°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีเพียงตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากน้ำพุร้อนแจ้ซ้อนที่อุณหภูมิ 57°C 58°C 60.5°C และ 61°C เท่านั้นที่ยังมีปริมาณไฟโคไซยานินคงเหลือปริมาณมาก คือ 52.69% 58.61% 49.35% และ 67.78% ตามลำดับ ซึ่ง supernatant หลังการบ่มมีสีซีดจางลงจากเดิมเล็กน้อยดังแสดงในภาพ 4.3



ภาพ 4.1 ความเข้มข้นไฟโคไซยานินจาก 21 ตัวอย่าง (TP: น้ำพุร้อนท่าปาย, MC: น้ำพุร้อนแม่จัน, SKP: น้ำพุร้อนสันกำแพง, TPN: น้ำพุร้อนเทพพนม, CS: น้ำพุร้อนแจ้ซ้อน) ตัวหนังสือภาษาอังกฤษ แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 0.05 ด้วยการทดสอบแบบ Turkey

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

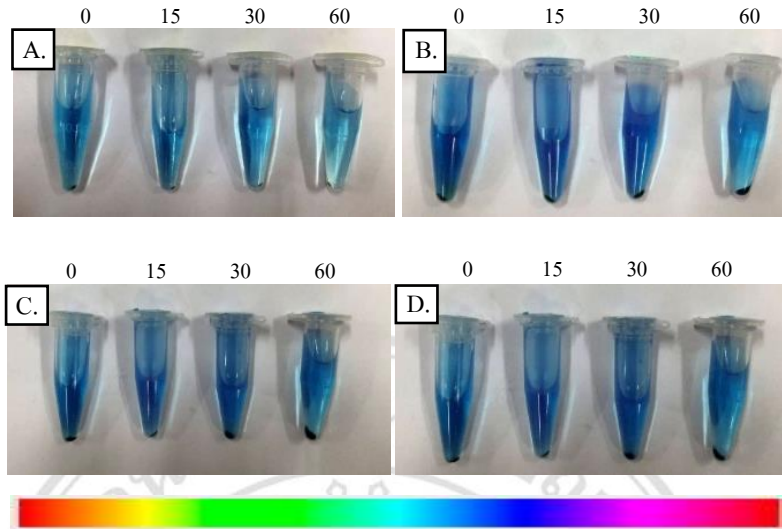


ภาพ 4.2 ความเข้มข้นของไฟโคไซยานินหลังผ่านการบ่มที่อุณหภูมิสูง 70°C นาน 1 ชั่วโมง ของตัวอย่างจากน้ำพุร้อนที่มีค่าความเข้มข้นไฟโคไซยานินเริ่มต้นสูงสุด 10 ตัวอย่าง (CS: น้ำพุร้อนแจ้ซ้อน ตัวเลขต่อท้ายแสดงอุณหภูมิของจุดเก็บตัวอย่าง)

ตาราง 4.2 ร้อยละของไฟโคไซยานินที่เหลือหลังบ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 1 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ร้อยละของไฟโคไซยานินที่เหลือหลังบ่มที่ 70°C			
	0 นาที	15 นาที	30 นาที	60 นาที
<i>Calothrix</i> sp. NUP	100	60.14	45.56	41.51
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. SK40	100	86.76	54.98	44.33
<i>Cyanosarcina</i> sp. SG40	100	79.21	63.09	46.14
<i>Leptolyngbya</i> sp. PD45	100	65.52	51.79	44.63
<i>Pseudoanabaena</i> sp. TP8	100	29.05	23.27	23.05
CS57	100	81.54	70.92	52.69
CS58	100	98.91	80.28	58.61
CS60.5	100	97.36	91.38	49.35
CS61	100	86.99	82.90	67.78
CS64.5	100	71.12	58.74	43.89

หมายเหตุ: CS: น้ำพุร้อนแจ้ซ้อน ตัวเลขต่อท้ายแสดงอุณหภูมิของจุดเก็บตัวอย่าง



ภาพ 4.3 ลักษณะของสารสกัดไฟโคไซยานินที่เปลี่ยนแปลงหลังทดสอบที่อุณหภูมิ 70°C นาน 1 ชั่วโมง (A: CS57 B: CS58 C: CS60.5 และ D: CS61 โดย CS: น้ำพุร้อนแจ้ซ้อน ตัวเลขต่อท้ายแสดงอุณหภูมิของจุดเก็บตัวอย่าง)

จากการศึกษาประชากรไซยาโนแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำร้อนทั้ง 4 ตัวอย่าง ได้แก่ CS57 CS58 CS60.5 และ CS61 พบว่าประชากรไซยาโนแบคทีเรียใน 4 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงกัน ดังตาราง 4.3

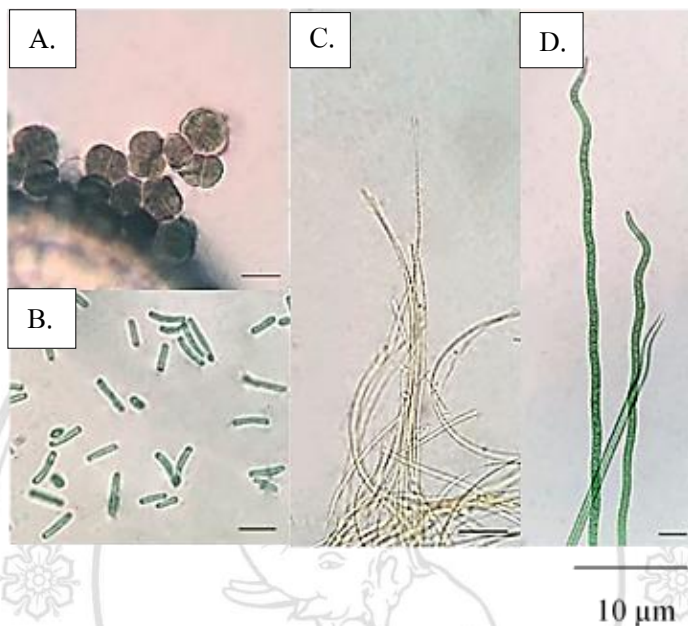
ตาราง 4.3 จำนวนประชากรไซยาโนแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างที่เก็บจากน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน

ตัวอย่าง	สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่พบ			
	<i>Phormidium</i> sp.	<i>Leptolyngbya</i> sp.	<i>Synechococcus</i> sp.	<i>Cyanosarcina</i> sp.
CS57	+++	++	+++	+
CS58	++++	+++	+++	+
CS60.5	+++	++	++	+
CS61	++++	++	+++	+

หมายเหตุ: CS: น้ำพุร้อนแจ้ซ้อน ตัวเลขต่อท้ายแสดงอุณหภูมิของจุดเก็บตัวอย่าง, เครื่องหมาย + แสดงจำนวนไซยาโนแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างต่อการสุ่มตรวจ 500 μ L โดย

- (++++) = พบไซยาโนแบคทีเรียในตัวอย่างประมาณ 60-80 เซลล์/ โคโลนี/ ตรัยโครม
- (+++) = พบไซยาโนแบคทีเรียในตัวอย่างประมาณ 41-60 เซลล์/ โคโลนี/ ตรัยโครม
- (++) = พบไซยาโนแบคทีเรียในตัวอย่างประมาณ 21-40 เซลล์/ โคโลนี/ ตรัยโครม
- (+) = พบไซยาโนแบคทีเรียในตัวอย่างประมาณ 1-20 เซลล์/ โคโลนี/ ตรัยโครม

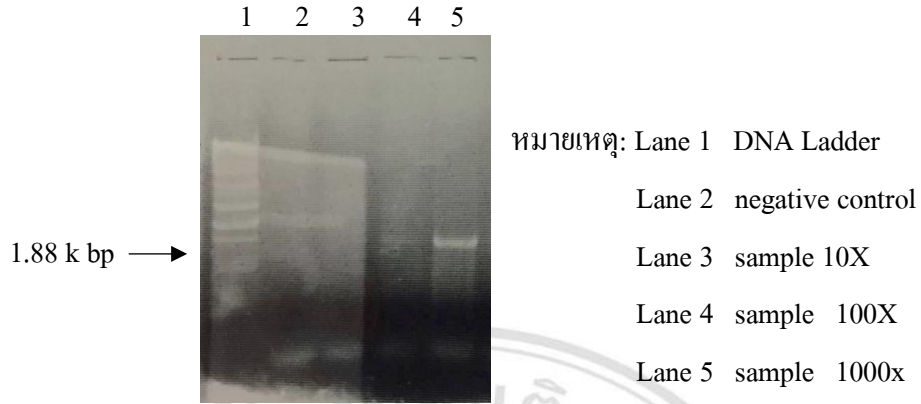
โดยพบไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์เด่น 4 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ *Phormidium* sp. และพบ *Leptolyngbya* sp., *Synechococcus* sp., *Cyanosarcina* sp. ในปริมาณลดลงตามลำดับ (ภาพ 4.4)



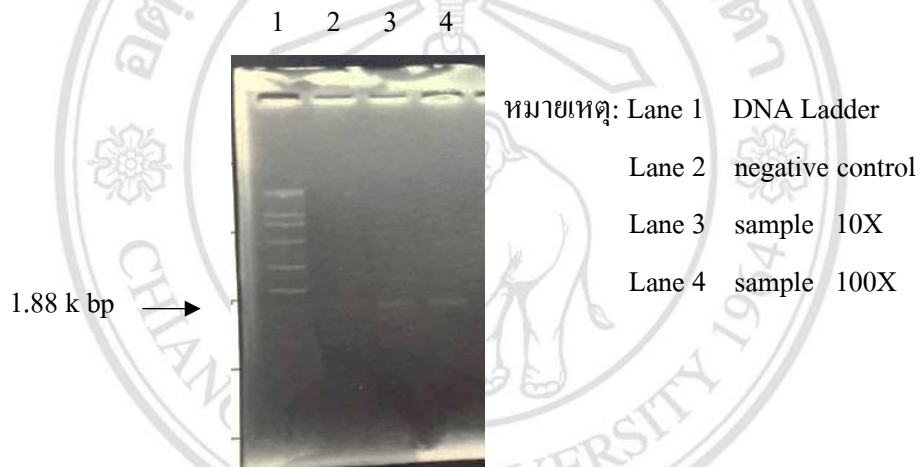
ภาพ 4.4 ประชากรไซยาโนแบคทีเรียในตัวอย่างที่มีไฟโคไซยานินปนร้อน

(A: *Cyanosarcina* sp. B: *Synechococcus* sp. C: *Leptolyngbya* sp. D: *Phormidium* sp.)

จากการศึกษาประชากรไซยาโนแบคทีเรียในตัวอย่างทั้ง 4 พบไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์เด่น 4 สายพันธุ์ จึงคาดการณ์ว่าสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตไฟโคไซยานินที่มีคงตัวที่อุณหภูมิสูง โดยเฉพาะ *Phormidium* sp. และ *Synechococcus* sp. ที่พบมากในตัวอย่าง จึงทำการแยกเชื้อ และเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ดังกล่าวในอาหาร BG11 แต่มีไซยาโนแบคทีเรียเพียงหนึ่งสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ หลังจากการวิเคราะห์ 16S rDNA sequence analysis เพื่อระบุชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย พบว่ามีความคล้ายกับ *Thermosynechococcus elongatus* 97% จากการทำ phylogenetic tree โดยวิธี Neighbor-joining พบว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว อยู่ในวิวัฒนาการกลุ่มเดียวกับ *T. elongatus* ดังแสดงในภาพ 4.5-4.8 จึงระบุเป็น *T. elongatus* AARLT012 ลักษณะเซลล์แสดงดังภาพ 4.9



ภาพ 4.5 Agarose gel ของการสกัด genomic DNA ของตัวอย่าง



ภาพ 4.6 Agarose gel ของการสกัด genomic DNA ของตัวอย่างที่ผ่านการ PCR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Sequences producing significant alignments:

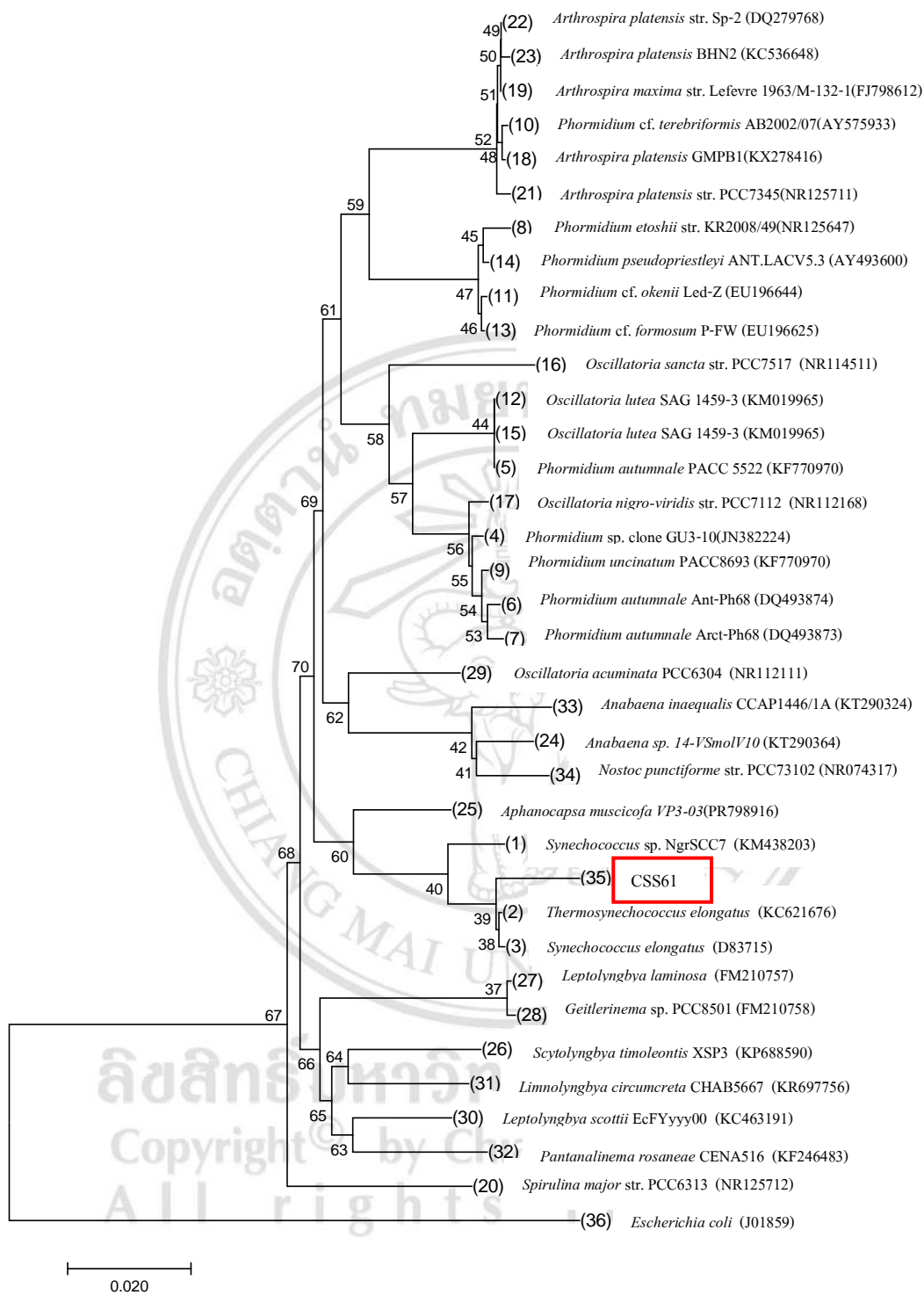
Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

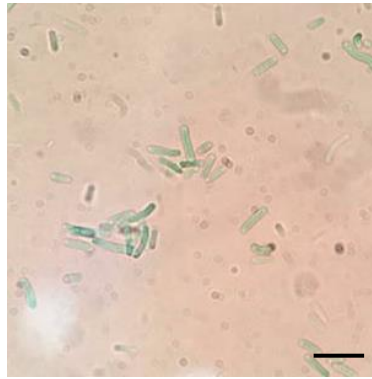
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Thermosynechococcus elongatus</i> WFW.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1945	1945	99%	0.0	97%	KC621876.1
<input type="checkbox"/> <i>Thermosynechococcus</i> sp. NK55 genome	1939	1939	99%	0.0	97%	CP006735.1
<input type="checkbox"/> Uncultured cyanobacterium clone 9B-28.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1939	1939	99%	0.0	97%	JX298774.1
<input type="checkbox"/> <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1 DNA, complete genome	1936	1936	99%	0.0	97%	BA000039.2
<input type="checkbox"/> <i>Synechococcus elongatus</i> gene for 16S rRNA	1936	1936	99%	0.0	97%	D83715.1
<input type="checkbox"/> Uncultured <i>Synechococcus</i> sp. partial 16S rRNA gene, clone GMMC_16S_171	1920	1920	99%	0.0	97%	ER681774.1
<input type="checkbox"/> Uncultured cyanobacterium clone MPB15.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1920	1920	99%	0.0	97%	EF429505.2

ภาพ 4.7 ผล nucleotide blast แสดงใน <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>

พบว่ามีความเหมือน *Thermosynechococcus elongatus* 97%



ภาพ 4.8 Phylogenetic tree จาก 16S rDNA sequencing analysis ของตัวอย่าง และกลุ่มแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันจากการใช้ NCBI BLAST สร้าง phylogenetic tree จาก neighbor-joining ด้วยโปรแกรม MEGA7 ตัวเลขแสดง %bootstrap ที่มากกว่า 50 จำนวน 1000 ซ้ำ

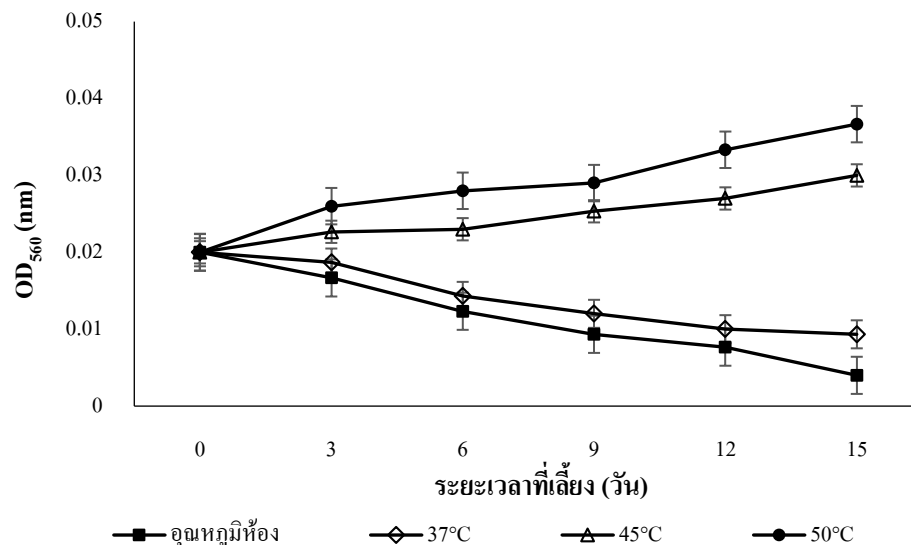


10 μ L

ภาพ 4.9 เซลล์ *T. elongatus* AARLT012 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X

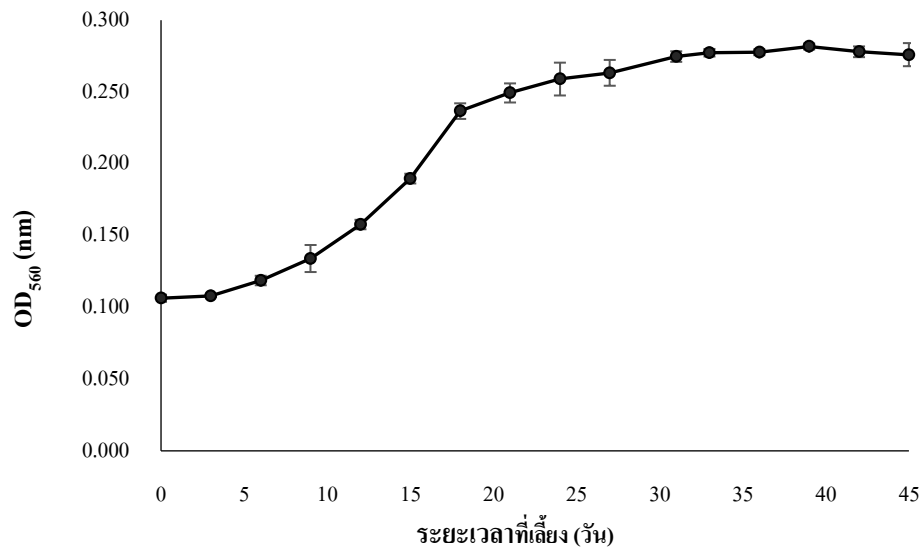
4.2 การเพาะเลี้ยงและการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *T. elongatus* AARLT012 ที่อุณหภูมิห้อง 37°C 45°C และ 50°C โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm เริ่มต้นเท่ากับ 0.02 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 37°C มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 15 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.004 และ 0.009 ตามลำดับ แตกต่างจากค่าการดูดกลืนแสงของการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45°C และ 50°C ที่มีค่าเพิ่มขึ้นในวันที่ 15 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.030 และ 0.037 ตามลำดับ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคืออุณหภูมิที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด คือที่อุณหภูมิ 50°C ดังแสดงในภาพ 4.10



ภาพ 4.10 การเจริญของ *T. elongatus* AARLT012 ปริมาตร 300 mL ในอาหาร BG11 ที่อุณหภูมิห้อง 37°C 45°C และ 50°C นาน 15 วัน

ขยายขนาด *T. elongatus* AARLT012 โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 pH 8.2 ที่อุณหภูมิ 50°C ขนาด 10 L โดยกำหนดหัวเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 1 ผลการเจริญแสดงดังภาพ 4.11 ในการเพาะเลี้ยง 5 วันแรกมีค่าการดูดกลืนแสงค่อนข้างคงที่ จากนั้นเริ่มเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วใน ระยะ exponential phase ในช่วงวันที่ 6-24 หลังจากนั้นจึงเพิ่มจำนวนอย่างช้าๆ จนถึงวันที่ 30 และมีจำนวนค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 45 ของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีขนาดเล็ก จึงเก็บเกี่ยว เซลล์โดยการ centrifuge พบว่าได้เซลล์สดจำนวน 24.8 g จากนั้นทำให้แห้งโดยวิธี lyophilization เพื่อให้ เซลล์เสียหายน้อยที่สุดและไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน หลังจากการทำแห้งพบว่าเหลือเซลล์แห้งเท่ากับ 1.57 g



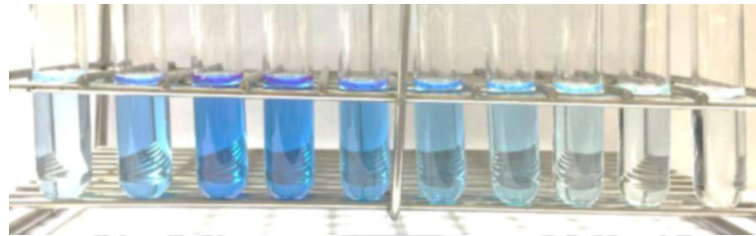
ภาพ 4.11 กราฟการเจริญของ *T. elongatus* AARLT012 ปริมาตร 10L ในอาหาร BG11 ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 45 วัน

4.3 การทำไฟโคไซยานินให้บริสุทธิ์

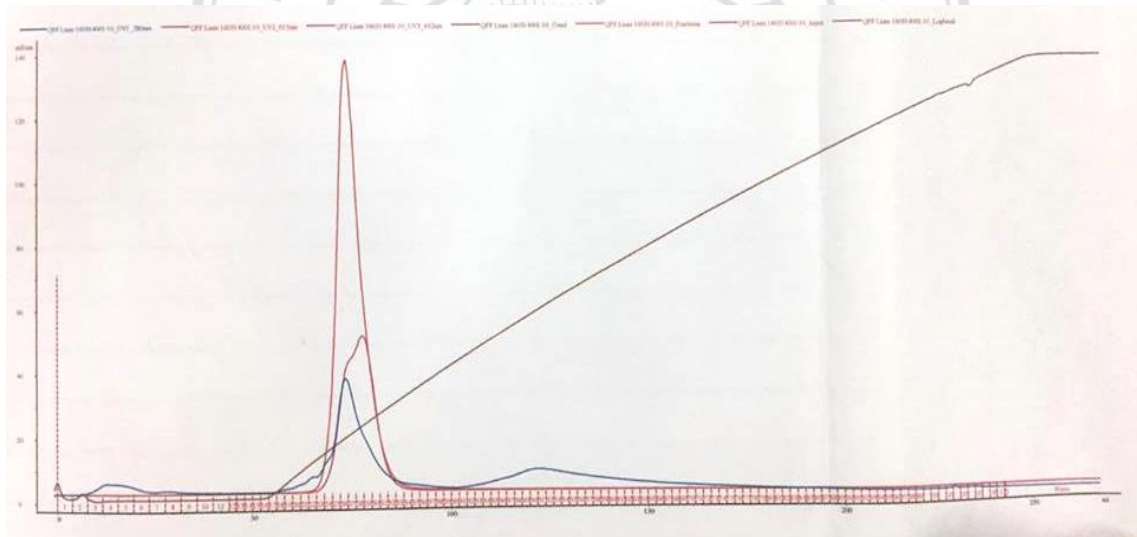
ทำการสกัดไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย *T. elongatus* AARLT012 โดยใช้วิธี sonication ทำให้เซลล์แตก แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดเศษเซลล์ จากนั้นนำ cell free extract มาทำบริสุทธิ์ตามขั้นตอนต่างๆ หลังจากผ่านตัวอย่างใน Q-sepharose™ fast flow ion-exchange column chromatography ตัวอย่างโปรตีนถูกชะออกมามากที่สุดช่วง fraction 24-33 (ภาพ 4.12-4.13) นำ fraction ที่ 22-26 มารวมกันแล้วทำบริสุทธิ์ในขั้นต่อไป คือ โดยวิธีผ่าน Sephadex-75 gel filtration column chromatography ตัวอย่างโปรตีนถูกชะออกมามากที่สุดช่วง fraction 55-64 (ภาพ 4.14-4.15) จากนั้นนำ cell free extract ในขั้นตอนต่างๆ

มาวัดปริมาณโปรตีนได้ผลดังตาราง 4.4 และจากการตรวจสอบความบริสุทธิ์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และหาขนาดของโปรตีนเปรียบเทียบกับ protein marker ชนิด Prestain protein marker (ภาคผนวก ฐ) พบแถบโปรตีน 2 แถบ ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 19.19 kDa และ 14.52 kDa (ภาพ 4.16)

Fraction 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33

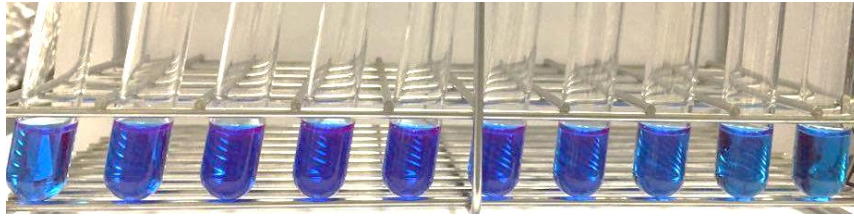


ภาพ 4.12 ไฟโคไซยานินจาก *T. elongatus* AARLT012 หลังผ่าน Q-sepharose™ fast flow ion-exchange column chromatography fraction ที่ 24-33

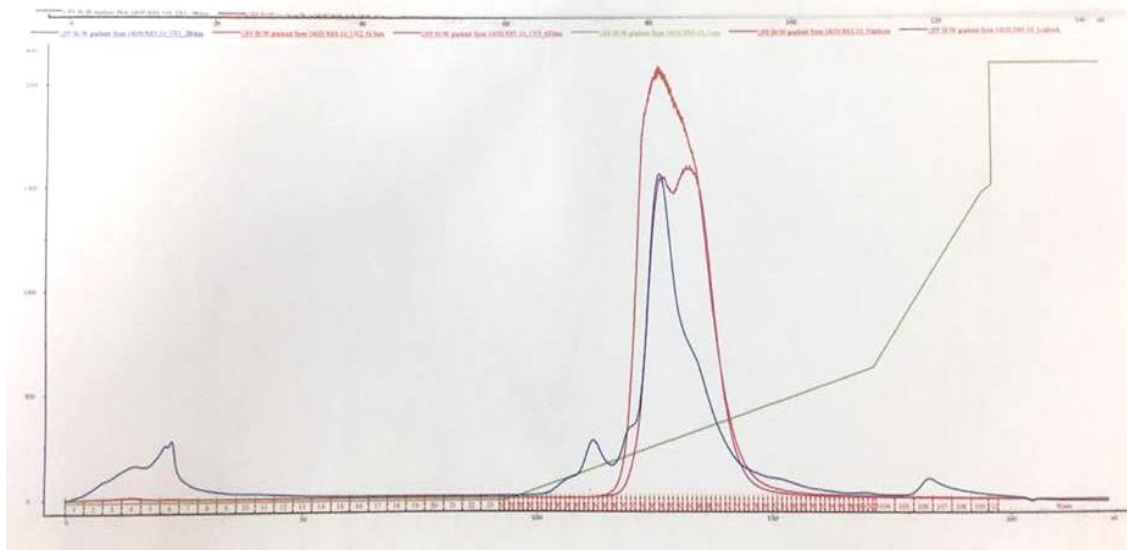


ภาพ 4.13 กราฟแสดงปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *T. elongatus* AARLT012 หลังผ่าน Q-sepharose™ fast flow ion-exchange column chromatography (— แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ค่าการดูดกลืนแสง 280 nm, — แสดงปริมาณไฟโคไซยานินที่ค่าการดูดกลืนแสง 615 nm, — แสดงปริมาณอัลโลไฟโคไซยานินที่ค่าการดูดกลืนแสง 652 nm, — แสดงค่าความเข้มข้น NaCl)

Fraction 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64



ภาพ 4.14 ไฟโคไซยานินจาก *T. elongatus* AARLT012 หลังผ่าน Sephadex-75 gel filtration column chromatography fraction ที่ 55-64



ภาพ 4.15 กราฟแสดงปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *T. elongatus* AARLT012 หลังผ่าน Sephadex-75 gel filtration column chromatography (— แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ค่าการดูดกลืนแสง 280 nm, — แสดงปริมาณไฟโคไซยานินที่ค่าการดูดกลืนแสง 615 nm, — แสดงปริมาณอัลโลไฟโคไซยานินที่ค่าการดูดกลืนแสง 652 nm, — แสดงค่าความเข้มข้น NaCl)

ตาราง 4.4 ค่าความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *T. elongatus* AARLT012 หลังผ่านขั้นตอนต่างๆ

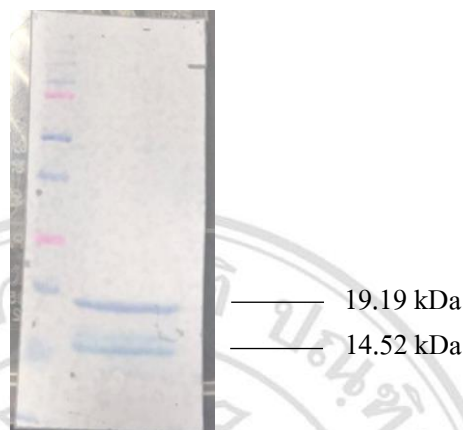
ขั้นตอน	ปริมาตร (mL)	ปริมาณ โปรตีน (mg)	ปริมาณ PC (mg)	Specific PC (mg PC/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)	A615/ A280
Supernatant	3	22.260	0.915	0.041	1.000	100.000	0.190
Ammonium sulfate precipitation	1	2.186	0.228	0.104	2.537	24.906	0.215
Q-sepharose TM	1	0.702	0.086	0.123	2.989	9.427	2.136
Sephadex-75	1	0.395	0.098	0.247	6.006	10.653	3.573



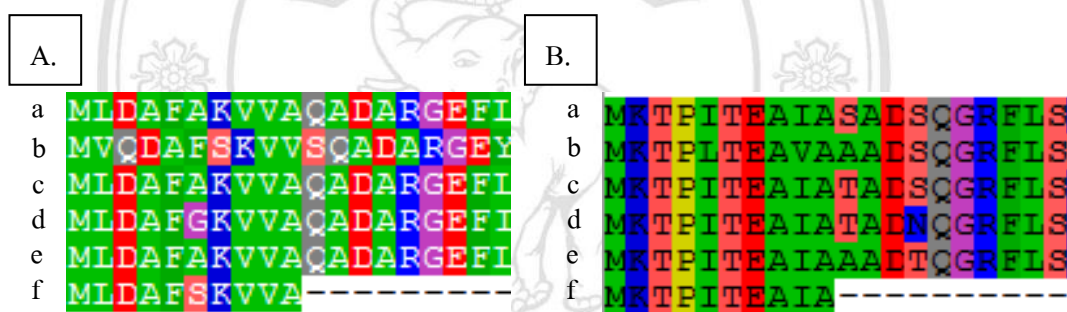
ภาพ 4.16 SDS-PAGE (M: marker S: supernatant A: ammonium sulfate precipitation Q: Q-sepharoseTM S-75: sephadex-75)

จากตาราง 4.4 ทราบว่าโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนสุดท้ายเหลือ yield เพียง 10.653% ไม่สามารถนำไปศึกษาต่อได้ ดังนั้น จึงทำการสกัดไฟโคไซยานินจากตัวอย่าง CS61 ที่เก็บจากธรรมชาติ เนื่องจากมีปริมาณไฟโคไซยานินสูงและมีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูงได้ดีที่สุด และทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนข้างต้น ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นทำการ blotting ลงบน PVDF membrane (ภาพ 4.17) เพื่อนำไปทำ N-terminal amino acid sequencing พบว่า แถบโปรตีนขนาด 19.19 kDa มีลำดับกรดอะมิโน คือ methionine (M) leucine (L) aspartic acid (D) alanine (A) phenylalanine (F) serine (S) lysine (K) valine (V) valine (V) และ alanine (A) และ แถบโปรตีนขนาด 14.52 kDa มีลำดับกรดอะมิโน คือ methionine (M) lysine (K) threonine (T) proline (P) isoleucine (I) threonine (T) glutamic acid (E) alanine (A) isoleucine (I) และ alanine (A) จากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Gen bank พบว่า แถบโปรตีนขนาด

19.19 kDa มีความใกล้เคียงกับโปรตีน หน่วยย่อย β ของไฟโคไซยานิน และแถบโปรตีนขนาด 14.52 kDa มีความใกล้เคียงกับโปรตีนหน่วยย่อย α ของไฟโคไซยานิน ของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ดังภาพ 4.18



ภาพ 4.17 PVDF membrane ที่ผ่านการ blotting



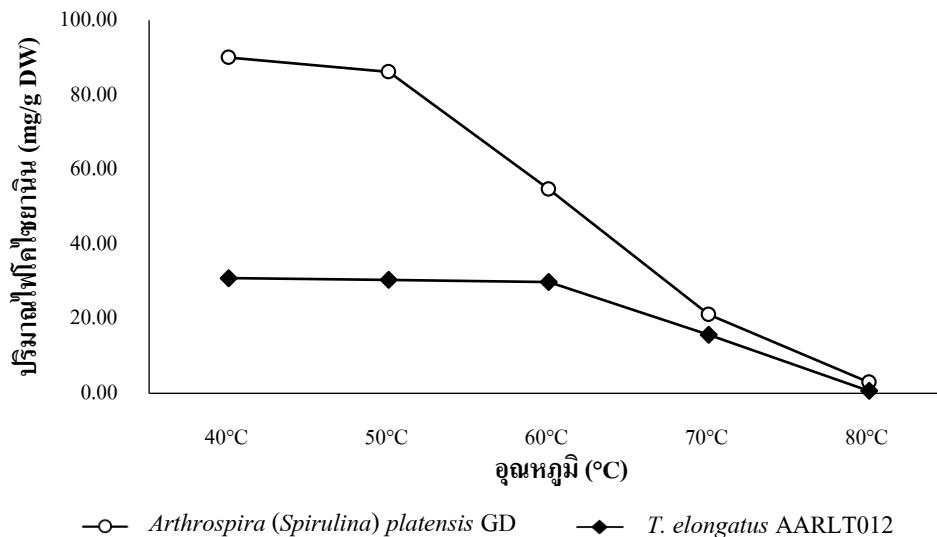
ภาพ 4.18 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนปลาย N ของแถบโปรตีนจาก SDS-PAGE กับสายพันธุ์อื่น โดย (a) *Pyropia yezoensis*, (b) *Tolypotrix* sp. PCC7601, (c) *Cyanidium caldarium*, (d) *Cyanophora paradoxa*, (e) *T. elongatus* BP-1 และ (f) *T. elongatus* AARLT012 (A: แถบโปรตีนขนาด 19.19 kDa B: แถบโปรตีนขนาด 14.52 kDa)

4.4 การศึกษาคุณสมบัติของไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง

ในการศึกษาคุณสมบัติของไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ ทำการศึกษาคุณสมบัติทั้งในด้านการทนอุณหภูมิสูง *in vitro* digestibility และคุณสมบัติด้านการต้านอนุมูลอิสระ โดยจะเปรียบเทียบกับไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD จากบุญสมฟาร์ม ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้ในทางการค้า

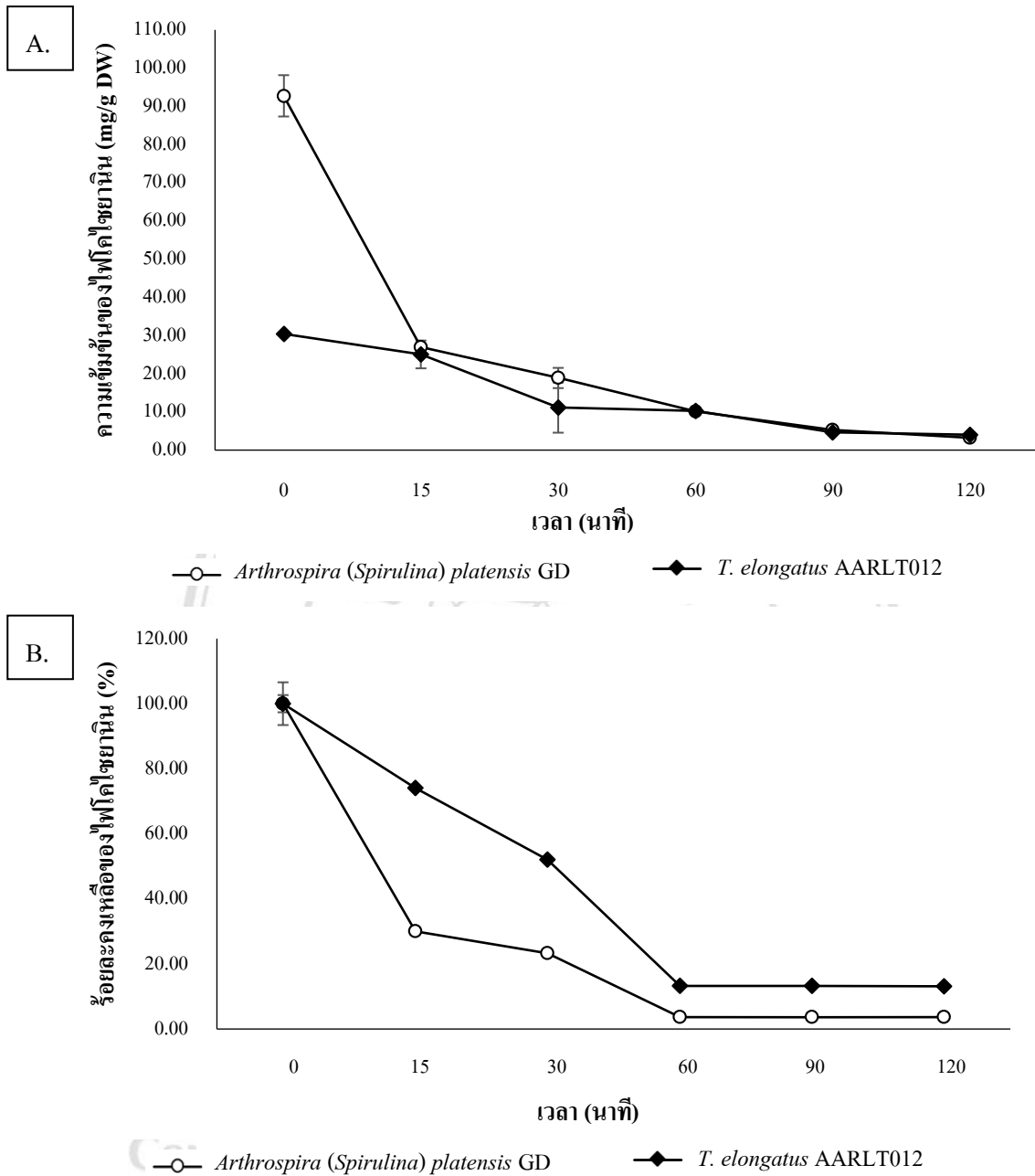
4.4.1 คุณสมบัติทนร้อน

การทดสอบคุณสมบัติทนร้อนของไฟโคไซยานินที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ จะแบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นแรกคือจะทดสอบที่อุณหภูมิ 40°C-80°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อหาช่วงอุณหภูมิสูงสุดที่ไฟโคไซยานินในทั้ง 2 ตัวอย่างสามารถคงตัวดังแสดงในภาพ 4.19 ผลการทดลองพบว่าปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD มีปริมาณสูงถึง 90 mg/g DW เมื่อบ่มที่ 40°C และลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 60°C ในขณะที่ปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *T. elongatus* AARLT012 มีปริมาณน้อยกว่าคือ 30.88 mg/g DW แต่มีปริมาณค่อนข้างคงที่จนถึงอุณหภูมิ 60°C แล้วมีปริมาณลดลงที่อุณหภูมิ 70°C คือมีปริมาณ 15.65 mg/g DW เมื่อคำนวณ จากภาพ 4.19 จะเห็นว่าช่วงอุณหภูมิ 70°C-80°C ปริมาณไฟโคไซยานินในทั้งสองตัวอย่างมีแนวโน้มลดลงใกล้เคียงกัน จึงเลือกช่วงอุณหภูมิ 70°C เพื่อศึกษาต่อไป



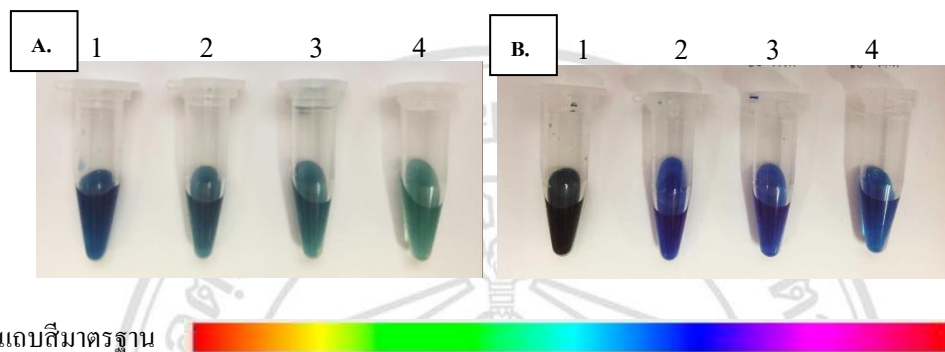
ภาพ 4.19 ปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD และ *T. elongatus* AARLT012 หลังบ่มที่ 40°C-80°C เป็นเวลา 30 นาที

จากการศึกษาคุณสมบัติทนร้อนของไฟโคไซยานินที่ช่วงอุณหภูมิ 70°C นาน 120 นาที โดยเปรียบเทียบเป็นร้อยละไฟโคไซยานินคงเหลือ พบว่า ไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD ลดลงอย่างรวดเร็วหลังการบ่ม 15 นาที มีร้อยละไฟโคไซยานินคงเหลือเท่ากับ 29.06% แต่ไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *T. elongatus* AARLT012 มีความคงตัวสูงกว่า (ภาพ 4.20)



ภาพ 4.20 ไฟโคไซยานินคงเหลือ (A: ความเข้มข้นของไฟโคไซยานินคงเหลือที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD และ *T. elongatus* AARLT012 หลังบ่มที่ 70°C เป็นเวลา 120 นาที B: ร้อยละไฟโคไซยานินคงเหลือที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD และ *T. elongatus* AARLT012 หลังบ่มที่ 70°C เป็นเวลา 120 นาที)

สีของไฟโคไซยานินที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 ตัวอย่างหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 70°C แสดงดังภาพ 4.21 โดยสีของไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD ก่อนการบ่มจะมีสีฟ้าสด หลังจากผ่านการบ่มไป 15 นาทีสีจะซีดจางลงอย่างชัดเจน เป็นสีฟ้าหม่น และเมื่อครบ 60 นาที สีที่ปรากฏเป็นสีเขียวอมฟ้า ซึ่งแตกต่างจากสีของไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *T. elongatus* AARLT012 ที่สีเริ่มต้นเป็นสีน้ำเงินปนเขียวเข้ม หลังจากการทดลองบ่ม 15 นาที สีของไฟโคไซยานินเป็นสีฟ้าสด และบ่มจนถึง 60 นาที สีของไฟโคไซยานินยังเป็นสีฟ้าสดอยู่ มีความซีดจางลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น



ภาพ 4.21 สีของสารสกัดไฟโคไซยานินหลังผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 70°C ทำการเจือจาง 2 เท่า (A: สารสกัดไฟโคไซยานินจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD และ B: สารสกัดไฟโคไซยานินจาก *T. elongatus* AARLT012)

หลอดที่ 1 = ไฟโคไซยานินก่อนการทดสอบความทนร้อน

หลอดที่ 2 = ไฟโคไซยานินหลังบ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 15 นาที

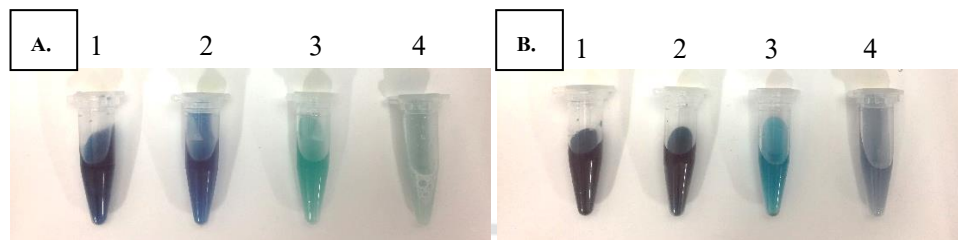
หลอดที่ 3 = ไฟโคไซยานินหลังบ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 30 นาที

หลอดที่ 4 = ไฟโคไซยานินหลังบ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 60 นาที

4.4.2 *In vitro* digestibility

สกัดไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์คือ *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD และ *T. elongatus* AARLT012 โดยใช้ตัวอย่างในการสกัดไฟโคไซยานินปริมาณเท่ากันคือ 2 mg DW/40 mL จากนั้นทำการทดสอบ *in vitro* digestibility ผลพบว่า ตัวอย่างทั้ง 2 มีการเปลี่ยนแปลงในการย่อยแต่ละขั้นตอน (ภาพ 4.22) คือ ไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD มีสีน้ำเงินเข้ม เมื่อผ่านการย่อยด้วยน้ำลายมีสีอ่อนลง หลังผ่านการย่อยด้วยน้ำย่อยจากกระเพาะสีที่ปรากฏเหลือเพียงสีเขียวอมฟ้าอ่อน และในขั้นตอนการย่อยขั้นสุดท้ายเหลือเพียงสีฟ้าอ่อนอมเทา ส่วนไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *T. elongatus* AARLT012 มีสีน้ำเงินเข้มปนเขียวเข้ม เมื่อผ่านการย่อยด้วยน้ำลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มที่มีสีเขียวปนเล็กน้อย หลังจากผ่านการย่อยด้วยน้ำย่อยจากกระเพาะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า และในขั้นตอนการย่อยขั้นสุดท้ายเหลือสีม่วงอมเทา เมื่อนำสารละลายในแต่ละขั้นไป วัดค่าการดูดกลืนแสงแบบ spectra

scan ได้ผลดังภาพ 4.23- 4.24 และวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณปริมาณไฟโคไซยานินก่อน และหลังทำการย่อยแต่ละขั้นตอนได้ผลการทดลองดังตาราง 4.5



แถบสีมาตรฐาน



ภาพ 4.22 สีของสารสกัดไฟโคไซยานินหลังผ่านการทดสอบ *in vitro* digestibility (A: สารสกัดไฟโคไซยานินจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD และ B: สารสกัดไฟโคไซยานินจาก *T. elongatus* AARLT012)

หลอดที่ 1 = ไฟโคไซยานินก่อนการทดสอบ *in vitro* digestibility

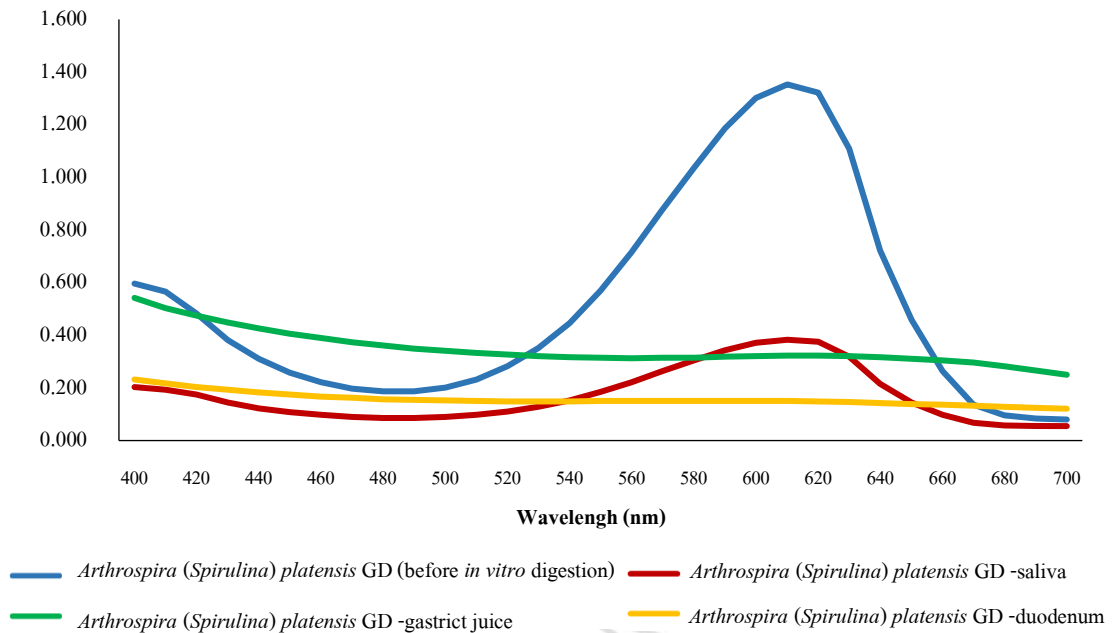
หลอดที่ 2 = ไฟโคไซยานินหลังการย่อยด้วยน้ำลาย (saliva)

หลอดที่ 3 = ไฟโคไซยานินหลังการย่อยด้วยน้ำย่อยจากกระเพาะ (gastric juice)

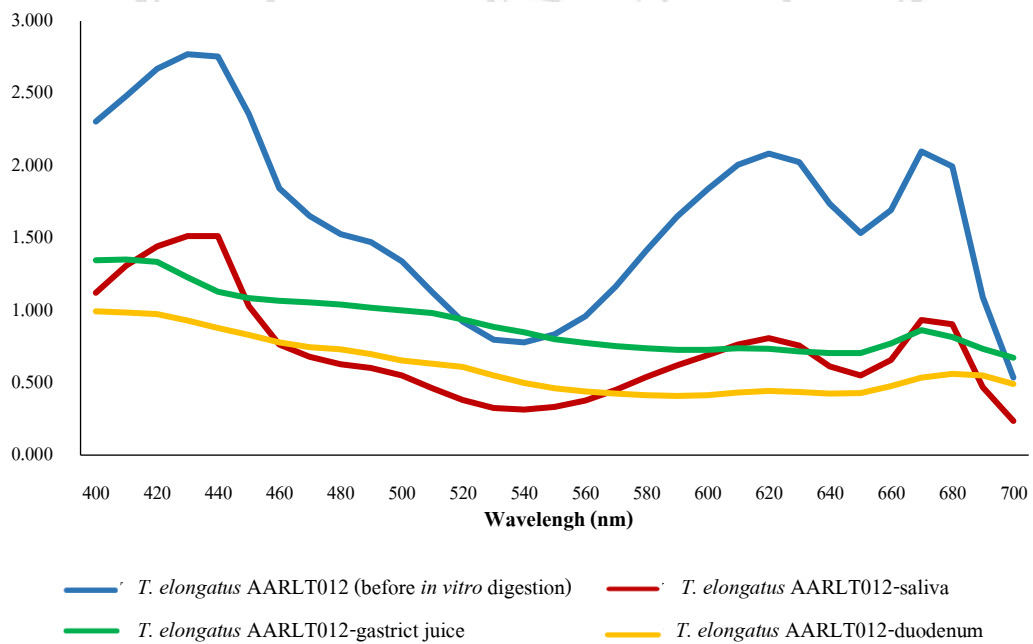
หลอดที่ 4 = ไฟโคไซยานินหลังการย่อยด้วยน้ำย่อยบริเวณลำไส้เล็ก (duodenal juice)

ตาราง 4.5 ปริมาณไฟโคไซยานินและ%phycocyanin remaining ก่อน-หลัง ทดสอบ *in vitro* digestibility

Samples	PC contents (mg/mL)				% PC remaining			
	<i>In vitro</i> before digestion steps	saliva	Gastric juice	duodenum	before	saliva	Gastric juice	duodenum
<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> GD	17.43	6.35	2.61	0.87	100	36.39	14.97	4.98
<i>T. elongatus</i> AARLT012	39.51	17.00	9.11	4.59	100	43.04	23.06	11.62



ภาพ 4.23 ค่าการดูดกลืนแสงของ *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD ในการทดสอบ *in vitro* digestibility



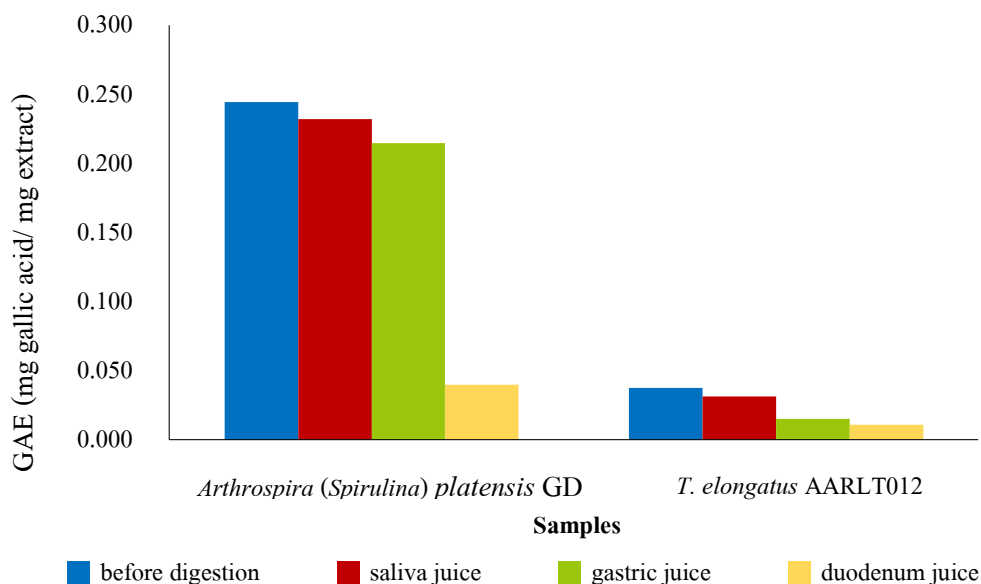
ภาพ 4.24 ค่าการดูดกลืนแสงของ *T. elongatus* AARLT012 ในการทดสอบ *in vitro* digestibility

เมื่อเปรียบเทียบกราฟการดูดกลืนแสงของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ทำให้ทราบว่าปริมาณไฟโคไซยานินในทั้ง 2 ตัวอย่าง ลดลงอย่างรวดเร็วหลังผ่านขั้นตอน saliva สังกัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 620 nm ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานิน

ลดลงในทั้ง 2 ตัวอย่าง และลักษณะกราฟในภาพ 4.24 จะแตกต่างจากกราฟในภาพ 4.23 คือมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 420-440 nm ซึ่งเป็นช่วงการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์ เนื่องจากลักษณะเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *T. elongatus* AARLT012 มีเยื่อหุ้มค่อนข้างหนาและมีขนาดเล็ก จึงต้องใช้วิธีการ sonicate ในการสกัด ซึ่งทำให้มีสารอื่นปนอยู่ในสารสกัดด้วย

4.4.3 การทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของไฟโคไซยานินจากตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ หลังผ่านการทดสอบ *in vitro* digestibility ในแต่ละขั้นตอน โดยวิธี DPPH ได้ผลดังภาพ 4.25 จากกราฟพบว่า ไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า ไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *T. elongatus* AARLT012 มาก โดยมีค่า GAE เริ่มต้นเท่ากับ 0.245 mg gallic acid/mg extract หลังจากผ่านการย่อยด้วยน้ำลาย และน้ำย่อยจากกระเพาะ ฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระลดลงเพียงเล็กน้อย คือ ค่า GAE เท่ากับ 0.232 และ 0.245 mg gallic acid/mg extract แต่เมื่อผ่านการย่อยด้วยน้ำย่อยจากผนังลำไส้เล็ก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะลดลงอย่างรวดเร็ว เหลือค่า GAE เท่ากับ 0.04 mg gallic acid/mg extract ในขณะที่ค่า GAE ของสารสกัดจาก *T. elongatus* AARLT012 มีค่าเท่ากับ 0.038, 0.031, 0.015 และ 0.011 mg gallic acid/mg extract ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบร้อยละคงเหลือของค่า GAE (ภาพ 4.26) พบว่า สารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD มีร้อยละคงเหลือของ GAE ในแต่ละขั้นตอนการย่อย เท่ากับ 95, 88 และ 16% ซึ่งมีความคงตัวมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดจาก *T. elongatus* AARLT012 ที่มีร้อยละคงเหลือของค่า GAE ในแต่ละขั้นเท่ากับ 83, 40 และ 29% ตามลำดับ

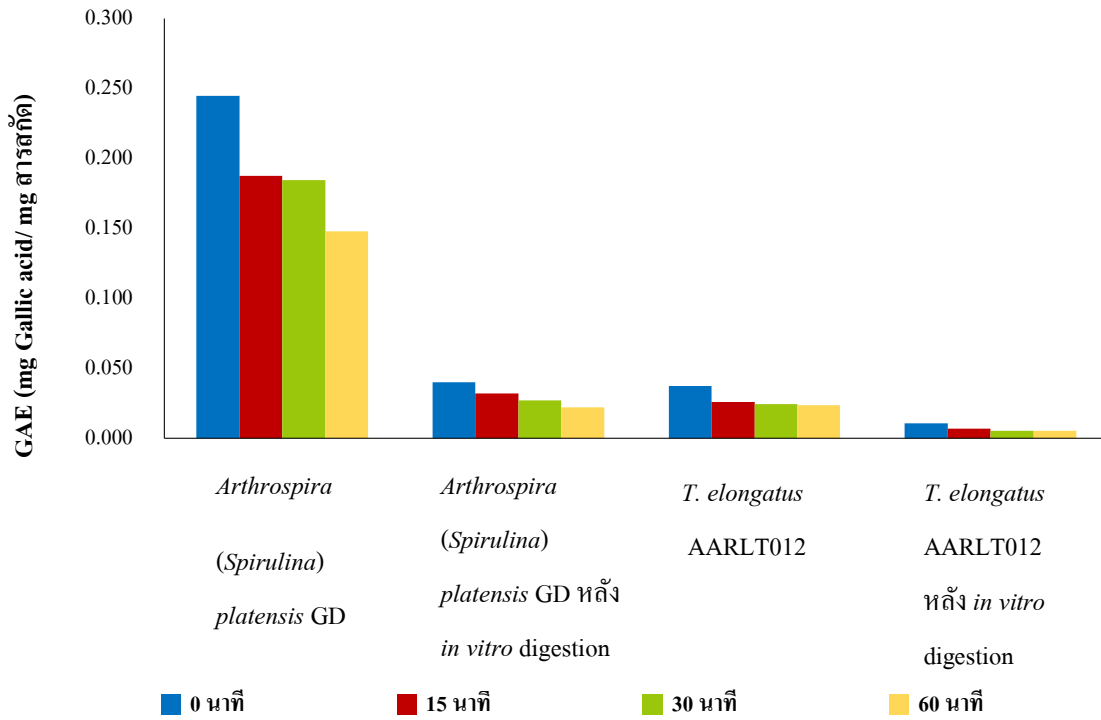


ภาพ 4.25 เปรียบเทียบค่า GAE ของตัวอย่างไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD และ *T. elongatus* AARLT012 หลังการทดสอบ *in vitro* digestion แต่ละขั้น

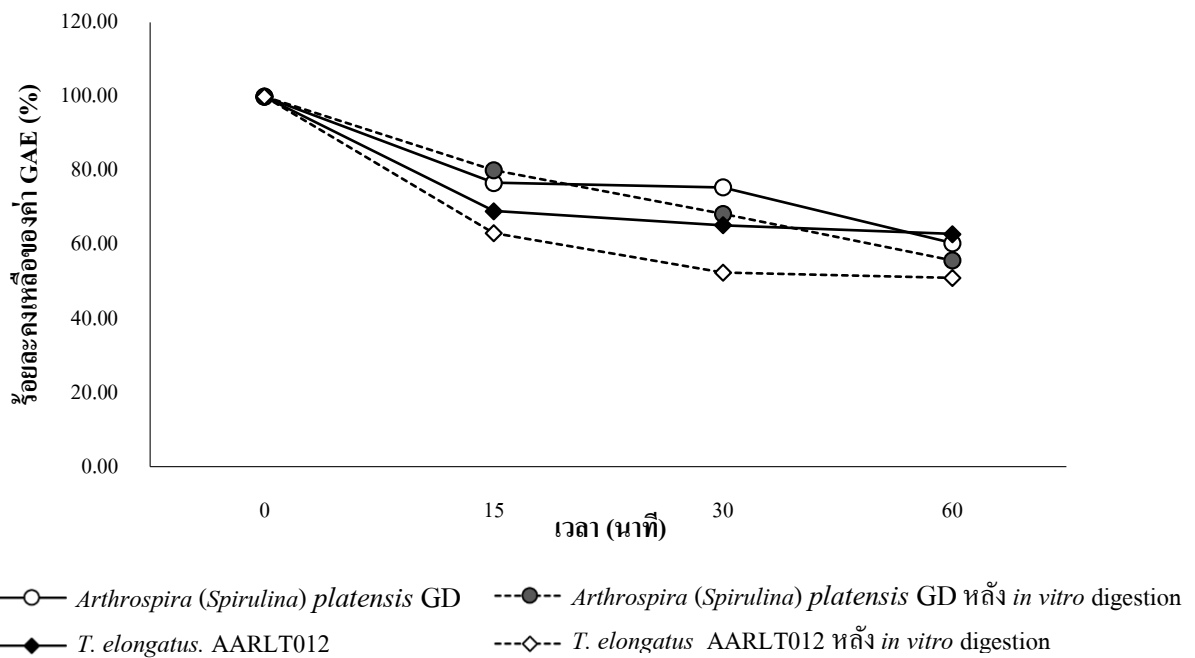


ภาพ 4.26 ร้อยละคงเหลือของ GAE ของตัวอย่างไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD และ *T. elongatus* AARLT012 หลังการทดสอบ *in vitro* digestion แต่ละขั้น

เมื่อเปรียบเทียบค่า GAE ก่อนและหลังการทดสอบ *in vitro* digestion ได้ผลดังภาพ 4.27 ไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD ก่อนทดสอบการย่อย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงถึง 0.245 mg gallic acid/ mg extract เมื่อต้มที่อุณหภูมิ 70°C หลังการต้ม 15 และ 30 นาที มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 0.188 และ 0.185 mg gallic acid/ mg extract เมื่อต้มต่อไปจนครบ 1 ชั่วโมง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงเหลือ 0.148 mg gallic acid/ mg extract ซึ่งมีค่ามากกว่าไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD หลังถูกย่อย ส่วนไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *T. elongatus* AARLT012 นั้น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำมากทั้งก่อนและหลังถูกย่อย โดยวัดค่า GAE ก่อนถูกย่อยได้เท่ากับ 0.038 mg gallic acid/ mg extract และหลังถูกย่อยมีค่า GAE เท่ากับ 0.011 mg gallic acid/ mg extract ร้อยละคงเหลือของค่า GAE ของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดจากทั้ง 2 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดของทั้ง 2 ตัวอย่างก่อนถูกย่อยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงเมื่อต้มที่อุณหภูมิ 70°C แต่ก็ยังมีความคงตัวมากกว่าสารสกัดหลังถูกย่อย (ภาพ 4.28)



ภาพ 4.27 เปรียบเทียบค่า GAE ของตัวอย่างไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD และ *T. elongatus* AARLT012 หลังบ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 60 นาที



ภาพ 4.28 ร้อยละคงเหลือของ GAE ของตัวอย่างไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira (Spirulina) platensis* GD และ *T. elongatus* AARLT012 หลังบ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 60 นาที