บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

5.1 การคัดกรองไซยาโนแบคทีเรียที่มีไฟโคไซยานินทนอุณหภูมิสูง

การวิจัยในครั้งนี้เริ่มจากการคัดกรองไซยาโนแบคทีเรียที่มีปริมาณไฟโคไซยานินในเซลล์สูงโดยตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยได้รับจากห้องปฏิบัติการสาหร่ายประยุกต์ 5 สายพันธุ์คือ *Calothix* sp. NUP, *Chroococcidiopsis* sp. SK40, *Cyanosarcina* sp. SG40, *Leptolyngbya* sp. PD45 และ *Pseuanabaena* sp. TP8 และตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนในภาคเหนือ 16 ตัวอย่าง จาก น้ำพุร้อนน้ำพุร้อนท่าปาย จังหวัดแม่ฮ่องสอน น้ำพุร้อนแม่จัน จังหวัดเชียงราย น้ำพุร้อนสันกำแพง น้ำพุร้อนเทพพนม จังหวัดเชียงใหม่ และน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง โดยสายพันธุ์ที่มีปริมาณไฟโคไซยานินสูงที่สุดคือ *Leptolyngbya* sp. PD45 มีไฟโคไซยานินเท่ากับ 153.203 mg/g DW *Calothrix* sp. NUP และ *Chroococcidiopsis* sp. SK40 มีปริมาณไฟโคไซยานิน 131.77 mg/g DW และ 105.24 mg/g DW ตามลำดับ (ตาราง 4.1) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณไฟโคไซยานินจาก *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD ที่เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ทางการค้าซึ่งมีปริมาณไฟโคไซยานินเท่ากับ 92.74 mg/g DW

เหตุผลที่ปริมาณไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการมีค่ามากกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหลายสาเหตุ อาจเป็นเพราะสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นคนละชนิดกัน หรือขนาดการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีขนาดเล็กกว่า ทำให้สามารถควบคุมสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงได้ง่ายกว่า เช่น ปริมาณสารอาหาร ปริมาณแสง ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ รชนิมุขและคณะ (2558) ที่ศึกษาผลของความเข้มแสงต่อปริมาณ ซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. พบว่า ปริมาณไฟโคไซยานินใน *Arthrospira* sp. มีมากกว่า *Synechocystis* sp. เมื่อเลี้ยงในสภาวะความเข้มแสงสูง จะมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าสภาวะความเข้มแสงปกติ แต่จะมีปริมาณไฟโคไซยานินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pumas *et al*. (2011) ที่ศึกษาไฟโคบิลิโปรตีนในไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน พบว่าในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Leptolyngbya* sp. มีปริมาณไฟโคบิลิโปรตีนสูงสุด โดยไฟโคบิลิโปรตีนชนิดหลักที่พบปริมาณสูงสุดคือ ไฟโคอีริธริน และรองลงมาคือไฟโคไซยานินมีปริมาณประมาณ 50 mg/g DW ปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดจากตัวอย่างจากน้ำพุร้อน มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 8.54 mg/g DW และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 91.20 mg/g DW ซึ่งตัวอย่างที่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณไฟโคไซยานินสูงสุดและต่ำสุด เป็นตัวอย่างที่เก็บจากน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง ซึ่งน้ำพุร้อนแหล่งนี้ยังเป็นแหล่งน้ำพุร้อนธรรมชาติ มีช่วงอุณหภูมิค่อนข้างกว้าง ความหลากหลายของปริมาณไฟโคไซยานินมีความสอดคล้องกับความหลากหลายของอุณหภูมิ แต่น้ำพุร้อนแหล่งอื่น ซึ่งเป็นบ่อประดิษฐ์จะมีอุณหภูมิของจุดเก็บตัวอย่างไม่สูงมากและอุณหภูมิของน้ำค่อนข้างคงที่ คือมีอุณหภูมิระหว่างมีค่าระหว่าง 50-62°C จะมีปริมาณไฟโคไซยานินอยู่ระหว่าง 15.68-46.70 mg/g DW

จากการคัดเลือกตัวอย่างที่มีปริมาณไฟโคไซยานินสูงสุด 10 ตัวอย่างได้แก่ *Calothix* sp. NUP, *Chroococcidiopsis* sp. SK40, *Cyanosarcina* sp. SG40, *Leptolyngbya* sp. PD45 และ *Pseuanabaena* sp. TP8 และ ตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากน้ำพุร้อนแจ้ซ้อนที่อุณหภูมิ 57°C 58°C 60.5°C 61°C และ 64.5°C นำมาทดสอบคุณสมบัติทนร้อนด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า ไฟโคไซยา-นิน จาก *Pseudanabaena* sp. TP8 ลดลงเหลือ 29.05% หลังการบ่ม 15 นาที ในขณะที่ตัวอย่างอื่นๆ มีปริมาณไฟโคไซยานินเหลืออยู่มากกว่า 60% เมื่อทำการบ่มต่อไป ตัวอย่างทุกชนิดมีปริมาณไฟโคไซยานินลดลง นอกจากตัวอย่างจากน้ำพุร้อนแจ้ซ้อนที่ยังมี ปริมาณไฟโคไซยานินเหลืออยู่มากกว่า 50% หลังการบ่ม 1 ชั่วโมง โดยตัวอย่างที่มีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูงที่สุด คือ CS61 ที่เก็บจากน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปางที่อุณหภูมิ 61°C มีปริมาณไฟโคไซยานินเหลืออยู่ 67.78% ซึ่งมีความทนร้อนมากกว่าไฟโคไซยา-นินจาก *Anacystis* sp. ที่มีปริมาณลดลงหลังบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เพียง 8 นาที (Zhao and Brand, 1989) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Cyanidioschyzon merolae* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีแดงที่พบใน น้ำพุร้อนที่มีความเป็นกรดสูง มีไฟโคไซยานินทนร้อนที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 80°C และเริ่มเสียสภาพเมื่ออุณหภูมิ 83°C ขึ้นไป (Rahman *et al*., 2017) จากผลการทดลองดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษาประชากรไซยาโนแบคทีเรียจากตัวอย่าง CS61 และทำการเพาะเลี้ยงจากตัวอย่างดังกล่าว

5.2 การเลี้ยงและการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาประชากรไซยาโนแบคทีเรียในตัวอย่างที่ทนอุณหภูมิสูง พบไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์เด่น 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Phormidium* sp., *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp., *Cyanosarcina* sp. (ตาราง 4.3) ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับผลของวิจัยของอุดมลักษณ์ (2544) รายงานว่าพบไซยาโนแบคทีเรีย *Phormidium* sp. และ *Leptolyngbya* sp. ที่อุณหภูมิช่วง 40-60°C เท่านั้น แต่เพาะเลี้ยงได้ที่อุณหภูมิปานกลางคือ 30°C ในการวิจัยครั้งนี้ พบไซยาโนแบคทีเรียที่อุณหภูมิสูงกว่าช่วงดังกล่าว แสดงว่าไซยาโน-แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ สามารถทนอุณหภูมิสูงกว่าสายพันธุ์ที่มีการรายงานไปแล้ว เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ศึกษาไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน ระบุว่า *Leptolyngbya* sp., *Mastigocladus laminosus, Phomidium* sp. และ *Pseudanabaena galeata* เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ (thermotolerant cyanobacteria) (วราภรณ์, 2545)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อทำการคัดแยกและเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูง และทำการจัดจำแนกชนิดโดยวิธี 16S rDNA sequencing analysis พบว่าเป็นสายพันธุ์ *Thermosynechococcus elongatus* AARLT012 เช่นเดียวกับการวิจัยของ Suwanmanee (2015) ที่ทำการการคัดแยกและเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญในน้ำพุร้อนจังหวัดสุราษฎร์ธานีพบไซยาโนแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ และทำการเพาะเลี้ยงได้เพียงหนึ่งสายพันธุ์คือ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เพาะเลี้ยงได้ง่าย

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของ *T. elongatus* AARLT012 ที่อุณหภูมิห้อง 37°C, 45°C และ 50°C พบว่าที่อุณหภูมิ 50°C มีอัตราการเจริญสูงสุด โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.037 ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าว สอดคล้องกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. lividus* SKP50, *S. lividus* DSK74 และ *S. bigranulatus* (คนึงกานต์, 2547) และงานวิจัยเรื่อง การเลี้ยงสาหร่าย *Synechococcus* sp. ในน้ำสกัดชีวภาพจากมูลไส้เดือน โดยศึกษาการเจริญที่อุณหภูมิ 40 50 และ 60°C พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Synechococcus* sp. คือ 50°C ให้ปริมาณเซลล์ 2.84 g/L (สาวิตรีและคณะ, 2553) ทั้งนี้เนื่องจาก *Synechococcus* sp. และ *Thermosynechococcus* sp. เป็น thermophilic cyanobacteria ซึ่งเป็น ไซยาโนแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *T. elongatus* AARLT012 ปริมาตร 10 L ในอาหาร BG11 ที่อุณหภูมิ 50°C โดยให้ค่า OD_{560} เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 นาน 45 วัน จากภาพ 4.11 พบว่าในช่วงวันที่ 10-20 ของการเพาะเลี้ยง จะมีอัตราการเจริญสูงขึ้นมาก และเริ่มคงที่หลังจากการเพาะเลี้ยงวันที่ 24 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เท่ากับ 0.259 มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.108 ต่อวัน มีปริมาณเซลล์หลังเก็บเกี่ยว 24.8 g คิดเป็น 2.48 g/L ซึ่งอัตราการเจริญดังกล่าวมีค่าน้อยกว่าอัตราการเจริญจำเพาะของ *Thermosynechococcus* sp. TUBT-T01 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.155 ต่อวัน (Suwanmanee, 2015) ปัจจัยที่ทำให้การเจริญของไซยาโน-แบคทีเรียในการวิจัยครั้งนี้มีอัตราการเจริญต่ำกว่ารายงานที่ผ่านมา อาจเนื่องมาจากสภาวะเพาะเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม การกวนผสมอาจไม่เพียงพอ จนเกิดการบดบังแสงของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งในการเพาะเลี้ยงขนาด 10 L ไม่ได้มีการกวนผสมอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการตกตะกอนบางส่วน หรือสารอาหารที่ใช้ยังไม่เหมาะสมที่สุด โดยธาตุอาหารที่มีผลได้แก่แหล่งไนโตรเจน เนื่องจากมีรายงานว่า *T. elongatus* BP-1 และ *Thermosynechococcus* sp. NK55a ไม่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน (Nakamura *et al.*, 2002; Stolyar *et al.*, 2014) โดยงานวิจัยของ Suwammanee (2015) พบว่าการเติมปริมาณ $NaNO_3$ เป็น 3 g/L ทำให้มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าในการวิจัยครั้งนี้

5.3 การทำไฟโคไซยานินให้บริสุทธิ์บางส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการทำไฟโคไซยานินให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีปริมาณโปรตีนเหลือ 2.186 mg ปริมาณไฟโคไซยานินเหลือ 0.228 mg คิดเป็น %yield เท่ากับ 24.91% เมื่อเปรียบเทียบค่า A_{615}/A_{280} ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินกับโปรตีนทั้งหมด ระหว่าง supernatant และ หลังตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตดังตาราง 4.4 พบว่าค่า A_{615}/A_{280} มีค่ามากขึ้น แสดงให้เห็นว่าในขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเกลือ สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานินได้

จากการทำ ion exchange chromatography ที่ใช้ Q-sepharose™ เป็นตัวกลาง พบว่าไฟโคไซยานินถูกชะออกมาในช่วง fraction ที่ 24-33 นำมาตกตะกอนรวมกันแล้ววัดปริมาณโปรตีน เปรียบเทียบกับขั้นตอนการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าการทำ ion exchange chromatography สามารถทำให้ไฟโคไซยานินมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยมีอัตราส่วนระหว่างไฟโคไซยานินกับโปรตีนทั้งหมด เท่ากับ 2.136 ทำบริสุทธิ์ในขั้นต่อไปด้วย gel filtration chromatography ที่มี Sephadex-75 เป็นตัวกลาง พบว่าไฟโคไซยานินถูกชะออกมาในช่วง fraction ที่ 55-64 หลังจากวัดปริมาณโปรตีน พบว่ามีปริมาณโปรตีนเหลือ 0.395 mg ปริมาณไฟโคไซยานิน 0.098 mg คิดเป็น %Yield เท่ากับ 10.653% และสัดส่วนระหว่างไฟโค-ไซยานินกับโปรตีนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 3.573 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำบริสุทธิ์ของงานวิจัยนี้กับงานวิจัยก่อนหน้าดังตาราง 5.1 พบว่า มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับงานวิจัยก่อนหน้า คือ A_{615}/A_{280} ในช่วง 3-4 ซึ่งไฟโคไซยานินที่มีความบริสุทธิ์ระดับนี้เหมาะสมในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งหากต้องการใช้ในงานด้านสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ต้องการความบริสุทธิ์สูงกว่านี้ (Kuddus *et al*., 2013) อย่างไรก็ตาม %yield ที่ได้ในการทดลองนี้ยังไม่สูงมาก จึงจำเป็นต้องพัฒนากระบวนการทำให้บริสุทธิ์ หากต้องการผลิตไฟโคไซยานินทางการค้าต่อไป โดยอาจจะใช้วิธีการกำจัดโปรตีนวิธีอื่นนอกเหนือจากการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตในการทดลองนี้ เช่น การใช้ ultracentrifuge จะทำให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นและโปรตีนจะไม่เสียหายเนื่องจากความเข้มข้นเกลือที่สูงเกิน

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพ 4.16) พบว่าสามารถทำบริสุทธิ์ไฟโคไซยานินได้ โดยแยกเป็นโปรตีน 2 แถบ คือแถบบนมีขนาดใหญ่กว่า คือมีขนาด 19.19 kDa และแถบล่างมีขนาดเล็กกว่า คือมีขนาด 14.52 kDa

หลังจากทำ N-terminal amino acid sequencing ทำให้ทราบลำดับกรดอะมิโนของแถบโปรตีนทั้ง 2 แล้วเปรียบเทียบฐานข้อมูล Gen bank พบว่าโปรตีนแถบบนเป็นหน่วยย่อย β และ โปรตีนแถบล่างเป็นหน่วยย่อย α ซึ่งโดยทั่วไปขนาดของหน่วยย่อย β จะมีขนาดระหว่าง 11-24.4 kDa และหน่วยย่อย α จะมีขนาดระหว่าง 13-20.5 kDa (Sonani *et al*., 2014) โดยขนาดของหน่วยย่อยโปรตีนจะแตกต่างกันไปตาม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย และวิธีการสกัด (MacColl, 1998) ซึ่งขนาดของแถบโปรตีนทั้ง 2 หน่วยย่อย มีขนาดแตกต่างจากในงานวิจัยก่อนหน้าเล็กน้อย ดังตาราง 5.2

ตาราง 5.1 เปรียบเทียบการทำบริสุทธิ์ไฟโคไซยานิน

สายพันธุ์	ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	Yield (%)	A_{615}/A_{280}	อ้างอิง
Synechococcus sp. IO9201	- Butyl-sepharose - Q-sepharose	76.56	4.85	Abalde *et al.* (1998)
Spirulina sp.	- $(NH_4)_2SO_4$ precipitaion 25, 50% - Dialysis - Sephadex G-25	3.27	2.317	Kamble *et al.* (2013)
Spirulina platensis (CCC540)	- $(NH_4)_2SO_4$ precipitaion 25, 50% - Dialysis - DEAE column chromatography	4.58	14	Kumar *et al.* (2014)
Galdieria sulphuraria	- $(NH_4)_2SO_4$ precipitaion 25, 50%	80	4	Moon *et al.* (2014)
Nostoc sp. str. HKAR-2	- $(NH_4)_2SO_4$ precipitaion - Gel filtration chromatography	75	3.18	Kannaujiya and Sinha (2016)
T. elongatus AARLT012	- $(NH_4)_2SO_4$ precipitaion - Q-sepharose™ - Sephadex-75	10.56	3.57	งานวิจัยนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5.2 เปรียบเทียบขนาดของหน่วยย่อยโปรตีนของไฟโคไซยานิน

สายพันธุ์	ขนาดของหน่วยย่อยโปรตีน (kDa)		อ้างอิง
	α	β	
Synechococcus sp. IO9201	18.98	21.36	Abalde *et al*. (1998)
Spirulina sp.	24.4	17	Patel *et al.* (2005)
Phormidium sp.	24.4	19.1	Patel *et al.* (2005)
Lyngbya sp.	24.4	15.2	Patel *et al.* (2005)
Galdieria sulphuraria	17.6	18.14	Moon *et al.* (2014)
Spirulina platensis (CCC540)	16	17	Kumar *et al.* (2014)
T. elongatus AARLT012	14.52	19.19	งานวิจัยนี้

5.4 ศึกษาคุณสมบัติของไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง

เปรียบเทียบคุณสมบัติทนร้อน *in vitro* digestibility และ คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ระหว่างไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ทางการค้าคือ *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD และไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *T. elongatus* AARLT012

5.4.1 คุณสมบัติทนร้อน

ทดสอบคุณสมบัติทนร้อนที่อุณหภูมิ 40°C-80°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อหาช่วงอุณหภูมิที่ปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เริ่มลดลง จากภาพ 4.19 จะเห็นว่าปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD ลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 60°C ในขณะที่ปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *T. elongates* AARLT012 จะเริ่มลดลงที่อุณหภูมิ 70°C จึงเลือกช่วงอุณหภูมิ 70°C เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป โดยเมื่อระยะเวลาในการบ่มผ่านไป 15 นาที ปริมาณไฟโคไซยานินจาก *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD ลดลงอย่างชัดเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยเหลือไฟโคไซยานินเพียง 29.06% และลดลงเล็กน้อยจนเหลือ 0.63% หลังผ่านไป 2 ชั่วโมง แต่สารสกัดจาก *T. elongatus* AARLT012 มีปริมาณลดลงคงที่ตั้งแต่ 15 นาที คือเหลือไฟโคไซยานิน 74.05% หลังผ่านไป 30 นาทีก็ยังคงเหลือไฟโคไซยานินมากกว่า 50% และลดลงจนเหลือ 5.20% หลังผ่านไป 2 ชั่วโมง แสดงว่ามีคุณสมบัติการทนอุณหภูมิสูงกว่าไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD อย่างชัดเจน จึงมีความน่าสนใจที่จะนำไปประยุกต์ใช้งานในด้านอื่นๆ ต่อไป เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทนร้อนกับงานวิจัยก่อนหน้า ได้แก่ งานวิจัยของของ Pumas *et al*. (2012) ที่ศึกษาความคงตัวของไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนพบว่าไฟโคไซยานินที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Phormidium* sp. มีความเสถียรที่ 50°C เท่านั้น และปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Galdieria sulphuraria* ในงานวิจัยของ Moon *et al.* (2014) ซึ่งทำการทดลองที่บ่มอุณหภูมิ 25-85°C พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินเริ่มมีค่าลดลงที่อุณหภูมิ 55°C และมีสีซีดจางลงอย่างรวดเร็วหลังบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า 65°C และผลการวิจัยอุณหภูมิที่มีผลต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินในงานวิจัยของ Rastogi *et al.* (2015) พบว่าไฟโคไซยานินจะเริ่มสลายตัวตั้งแต่อุณหภูมิมากกว่า 40°C

5.4.2 *In vitro* digestibility

จากการทดสอบ *in vitro* digestibility เพื่อศึกษาปริมาณไฟโคไซยานินที่เหลือจากการย่อยในแต่ละขั้นตอน โดยการย่อยปกติจะผ่านขั้นตอนหลักๆ 3 ขั้นตอนคือน้ำลาย (saliva) เป็นตัวแทนของการย่อยบริเวณปาก น้ำย่อยจากกระเพาะ (gastric juice) เป็นตัวแทนของการย่อยบริเวณกระเพาะที่มีสภาวะเป็นกรดสูงมาก และ น้ำย่อยจากผนังลำไส้ (duodenum juice) เป็นตัวแทนของการย่อยบริเวณลำไส้ ผลการทดลองพบว่า ในขั้นตอนการย่อยด้วยน้ำลาย ทำให้ปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD และ *T. elongatus* AARLT012 มีค่าลดลงเหลือ 36.39 และ 43.04% ตามลำดับ ซึ่งในน้ำลาย มียูเรีย (urea) เป็นส่วนประกอบ (ตาราง 3.2) ทำให้โปรตีนเสียสภาพลงในขั้นตอนนี้ และในขั้นถัดมาคือการย่อยด้วยน้ำย่อยจากกระเพาะ มีปริมาณไฟโคไซยานินลดลงเหลือ 14.97 และ 23.06% ตามลำดับ (ภาพ 4.22) โดยสีของไฟโคไซยานินของทั้ง 2 ตัวอย่างหลังผ่านการย่อยขั้นตอนนี้มีสีเปลี่ยนไปอย่างชัดเจน เนื่องจากเอนไซม์เพปซิน (pepsin) ย่อยพันธะเพปไทด์ ทำให้โปรตีนเสียสภาพกลายเป็นหน่วยย่อยที่เล็กลง การสลายของไฟโคไซยานินจากการย่อยในขั้นตอนนี้มีค่ามากกว่าการศึกษาของ Miyamoto *et al*. 2009 ที่ศึกษาการสลายของวิตามิน B12 จาก *Porphyra* sp. ที่พบว่าน้ำย่อยจากกระเพาะทำให้วิตามินสลายไปเพียง 50%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังการย่อยขั้นสุดท้าย สีของไฟโคไซยานินสลายไปเกือบทั้งหมด เนื่องจากโปรตีนถูกทำลายด้วยเอนไซม์เพปซิน ในน้ำย่อยจากกระเพาะ และ เอนไซม์แพนครีเอติน (pancreatin) ในน้ำย่อยจากผนังลำไส้ พบว่ามีร้อยละของไฟโคไซยานินคงเหลือในสารสกัดไฟโคไซยานินจาก *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD เหลือ 4.98% ซึ่งน้อยกว่า *T. elongatus* AARLT012 ที่มีค่าเท่ากับ 11.62%

5.4.3 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity ซึ่งเป็นการวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง ผลการเปรียบเทียบค่า IC_{50} และค่า GAE ของไฟโคไซยานินที่สกัดจาก *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD และ *T. elongatus* AARLT012 แสดงดังตาราง ฎ.18 พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไฟโคไซยานินทั้ง 2 ตัวอย่างมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.024 และ 0.154 mg/mL เมื่อผ่านการย่อยด้วยน้ำย่อยจากกระเพาะ คือมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.027 และ 0.386 mg/mL ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับการวิจัยของ Wu *et al.* (2015) ที่ศึกษาผลของการย่อยและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ อาร์-ไฟโคอีรีธรินจากสาหร่ายสีแดง *Bungia fusco-purpurea* พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.47 mg/mL หลังผ่านการย่อยด้วยน้ำย่อยจากกระเพาะแล้วมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.422 mg/mL ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารสกัดไฟโคไซยานินในการวิจัยนี้ เมื่อเปรียบเทียบร้อยละของ GAE จากสารสกัดทั้ง 2 ตัวอย่าง (ภาพ 4.26) ทำให้ทราบว่า สารต้านอนุมูลอิสระจาก *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD มีค่า GAE ลดลงอย่างรวดเร็วหลังผ่านการย่อยด้วยน้ำย่อยจากผนังลำไส้ ซึ่งมี เอนไซม์แพนครีเอติน ซึ่งเป็นเอนไซม์รวมที่ประกอบด้วยเอนไซม์อะไมเลส (amylase) เอนไซม์ไลเปส (lipase) และเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ที่สามารถย่อยสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมันได้ (Kayoko *et al*., 2003) แต่สารต้านอนุมูลอิสระจาก *T.elongatus* AARLT012 มีค่า GAE ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากถูกย่อยด้วยน้ำย่อยจากกระเพาะ ซึ่งมีเอนไซม์เพปซิน ที่สามารถย่อยโปรตีนได้ เนื่องจากสารสกัดไฟโคไซยานินที่นำมาทดสอบเป็นสารสกัดที่ไม่ได้ผ่านการทำบริสุทธิ์ ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่า สารต้านอนุมูลอิสระจาก *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD อาจเป็นสารกลุ่มโปรตีนและไขมัน ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระจาก *T. elongatus* AARLT012 อาจเป็นโปรตีน

ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ก่อน และ หลังถูกย่อย ของไฟโคไซยานินที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 ตัวอย่าง มีความสอดคล้องการวิจัยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในไซยาโนแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Spirulina* sp., *Pseudanabaena* sp. และ *Lyngbya* sp. โดยทำการสกัดตัวอย่างด้วยน้ำและเมทานอล พบว่า สารสกัดน้ำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดเมทานอล หลังการย่อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยน้ำย่อยจากลำไส้ สารสกัดน้ำจากทุกตัวอย่าง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงมาก แต่สารสกัดเมทานอลจากตัวอย่าง *Pseudanabaena* sp. และ *Lyngbya* sp. หลังผ่านการย่อยมีค่าคงที่ แสดงว่าสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง เป็นกลุ่มไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) (Wang *et al.,* 2012)

เมื่อเปรียบเทียบค่า GAE ของสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ก่อนและหลังทดสอบ *in vitro* digestibility และหลังบ่มที่อุณหภูมิ 70°C ในเวลาต่างๆ ผลแสดงดังภาพ 4.28 พบว่าสารสกัดจาก *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD มีค่า GAE สูงมาก เมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น คือมีค่าเท่ากับ 0.245 mg gallic acid/mg สารสกัด หลังผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 70°C ผ่านไป 15 และ 30 นาที ค่า GAE ในทุกตัวอย่างมีค่าลดลงเล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างกันมาก ที่อุณหภูมิ 70°C ความสามารถในการต้านอิสระของสารสกัดไฟโคไซยานินจะลดลงที่ 15 นาทีแรก จากนั้นจะค่อนข้างคงที่ในช่วงเวลา 15-30 นาทีต่อมา และลดลงอีกเล็กน้อยหลังครบ 1 ชั่วโมง ค่า GAE ของสารสกัด *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD หลังผ่านการทดสอบ *in vitro* digestibility มีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดจาก *T. elongatus* AARLT012

จากการทดลองดังกล่าวทำให้ทราบว่า สารสกัดจาก *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* GD มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดจาก *T. elongatus* AARLT012 และสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทนอุณหภูมิสูง ซึ่งเมื่อเทียบกับปริมาณไฟโคไซยานินในการทดสอบคุณสมบัติทนร้อนพบว่ามีผลขัดแย้งกัน เนื่องจากเมื่อบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70°C ปริมาณไฟโคไซ-ยานินสลายไป ซึ่งแตกต่างกับสารต้านอนุมูลอิสระในการทดลองขั้นนี้ ดังนั้น สารต้านอนุมูลอิสระจากไซยาโนแบคทีเรียอาจเป็นสารชนิดอื่นที่ไม่ใช่ไฟโคไซยานิน

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาประชากรไซยาโนแบคทีเรียที่พบในน้ำพุร้อนธรรมชาติในการวิจัยครั้งนี้ ยังไม่สามารถสรุปด้านความหลากหลายของประชากรได้ เนื่องจากเป็นการเก็บตัวอย่างเพียง 1 ครั้ง และการสุ่มเก็บตัวอย่างยังไม่ครอบคลุม หากต้องการศึกษาในด้านความหลากหลาย จะต้องเพิ่มจำนวนซ้ำในการเก็บตัวอย่าง และฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย

การทดลองนี้คัดกรองไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนธรรมชาติมาเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจทำให้การเจริญและคุณสมบัติต่างๆไม่เท่ากับการทดสอบจากตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติ เนื่องจากในสภาวะภายนอกนั้นมีตัวแปรอื่นๆที่ไม่สามารถควบคุมได้ และอาจมีผลต่อคุณสมบัติที่ต้องการทดสอบได้ เช่น การอยู่ร่วมกันแบบ co-culture ของจุลินทรีย์อื่น แร่ธาตุในน้ำ อัตราการไหล และปริมาณแสง ดังนั้น หากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพดังกล่าว อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อหาสภาวะที่ส่งเสริมให้ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *T. elongatus* AARLT012 สร้างสารที่มีคุณสมบัติที่ต้องการ เช่น อาจมีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไปในอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการทำบริสุทธิ์ ใช้ตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย ทำให้สารที่เหลือหลังการทำบริสุทธิ์มีปริมาณน้อยมาก ไม่สามารถนำไปใช้ศึกษาต่อได้ หากต้องการศึกษาครั้งต่อไป จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียให้มีปริมาณมาก เพื่อที่จะสกัดสารได้ปริมาณมาก จึงนำมาทำบริสุทธิ์แล้วได้สารที่มีความบริสุทธิ์สูงไปใช้งานต่อไป เช่น นำไปใช้เป็น probe label หรือใช้ร่วมกับสารอื่นเพื่อเสริมฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

จากการทดลอง *in vitro* digestibility พบว่าเอนไซม์ที่อยู่ในน้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร และผนังลำไส้ มีผลต่อสารต้านอนุมูลอิสระในไฟโคไซยานินจากทั้ง 2 ตัวอย่าง และมีการรายงานเปรียบเทียบการสกัดสารด้วยน้ำและเมทานอล พบว่าการใช้น้ำในการสกัดจะได้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการใช้เมทานอล แต่หลังจากผ่านการย่อยขั้นสุดท้าย ค่าการต้านอนุมูลอิสระจากสารที่สกัดด้วยน้ำและเมทานอลมีค่าไม่ต่างกัน แสดงว่าเอนไซม์จากน้ำย่อยสามารถสลายสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความชอบน้ำได้ดี ดังนั้นหากจะนำสารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ อาจต้องมีการเคลือบด้วยเซลลูโลส หรือแป้ง เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารต้านอนุมูลอิสระก่อนถึงอวัยวะเป้าหมาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved