

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน
Stability studies on phycocyanin extract

คณะผู้วิจัย

นางสาวรัตนา ชัยกล้าหาญ

นางสาวณัฐยาภรณ์ ชีระสุวรรณ

นางบุษยา บุนนาค

สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ

คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ปีงบประมาณ 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การศึกษาความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน
(ภาษาอังกฤษ) **Stability studies on phycocyanin extract**

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ นางสาวรัตนา ชัยกล้าหาญ
หน่วยงานที่สังกัด สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
49 ซอยเทียนทะเล 25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
หมายเลขโทรศัพท์ 0 2470 7483 โทรสาร 0 2452 3455 e-mail ratana.cha@kmutt.ac.th

ผู้ร่วมโครงการ นางสาวณัฐยาภรณ์ ชिरะสุวรรณ
หน่วยงานที่สังกัด สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
49 ซอยเทียนทะเล 25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
หมายเลขโทรศัพท์ 0 2470 7484 โทรสาร 0 2452 3455 e-mail nattayaporn@pdti.kmutt.ac.th

ที่ปรึกษาโครงการ นางบุษยา บุญนาค
หน่วยงานที่สังกัด คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
49 ซอยเทียนทะเล 25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
หมายเลขโทรศัพท์ 0 2470 7355 โทรสาร 0 2452 3455 e-mail boosya.bun@kmutt.ac.th

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554
งบประมาณที่ได้รับ **318,500 บาท** ระยะเวลาทำการวิจัย **1 ปี**
เริ่มทำการวิจัยเมื่อ (เดือน ปี) **ตุลาคม 2553** ถึง (เดือน ปี) **กันยายน 2554**

บทคัดย่อ

ไฟโคไซยานินเป็นรงควัตถุสีฟ้า มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบบวม และต้านมะเร็ง สามารถใช้เป็นสารให้สีในผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องสำอาง และใช้เป็นสารติดตามในงานวิเคราะห์ เนื่องจากมีคุณสมบัติเรืองแสง

การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อทราบผลของอุณหภูมิ pH และความเข้มแสงต่อความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน รวมทั้งศึกษาชนิดและปริมาณความเข้มข้นของสารถนอมอาหาร (preservative) ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน ผลการศึกษาพบว่า อุณหภูมิ และความเข้มแสง มีผลอย่างมากต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน เมื่อไฟโคไซยานินสัมผัสแสงที่มีความเข้มแสงสูง หรือได้รับความร้อนจากอุณหภูมิเพิ่มขึ้น อัตราการเสถียรภาพของไฟโคไซยานินจะเกิดเร็วขึ้น อุณหภูมิ 47°C เป็นอุณหภูมิวิกฤตสำหรับความคงตัวของไฟโคไซยานิน ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ (C_R) และค่าครึ่งชีวิตของไฟโคไซยานินจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 47°C ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ในสารละลายมีค่าลดลงเหลือประมาณร้อยละ 50 ของปริมาณเริ่มต้น หลังสารละลายถูกบ่มที่อุณหภูมิ 59°C นาน 30 นาที อย่างไรก็ตาม การเก็บสารละลายไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิต่ำ 4°C มีแสงเล็กน้อยหรือที่มืด สามารถยืดอายุการเก็บไฟโคไซยานินนานกว่า 120 วัน

ไฟโคไซยานินมีความคงตัวสูงในสารละลายที่มีค่า pH 5.5-6.0 โดยชนิดบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน ในสภาวะเร่งการทำลายไฟโคไซยานินด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C พบว่า การเติมน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 20% หรือการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 2.5% สามารถป้องกันและยืดระยะเวลาการเสถียรภาพของไฟโคไซยานินได้ ซึ่งปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์และค่าครึ่งชีวิตของไฟโคไซยานินในสารละลายที่เติมสารดังกล่าวมีค่าสูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญ

Abstract

Phycocyanin is a natural blue colorant. It has been used in food industries as food colorant, cosmetics and biochemical tracers in immunoassays due to its fluorescent properties. Phycocyanin has been proved to have therapeutic properties such as antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer.

The purpose of this study was to investigate the influence of temperature, pH and light intensity on the stability of phycocyanin extract and to determine the suitable preservative to maintain the stability of food grade phycocyanin. Temperature and light intensity play an important role on the stability of phycocyanin. The high degradation rate of phycocyanin was observed, when phycocyanin was exposed to high light or high temperature. This study demonstrated that the temperature of 47°C was the critical point for stability of phycocyanin solutions a sharp drop in the C_R and half-life values was detected at temperature above 47°C. The C_R value remained at approximately 50% after 30 min of heating at 59°C. The stability of phycocyanin was possible to preserve more than 120 days at low temperature (4°C) with dim light or dark.

The stability of phycocyanin extract in three buffers (citrate buffer, citrate-phosphate buffer and phosphate buffer) were not significantly different at 60°C. The maximum stability of phycocyanin extract was observed in the range of pH 5.5-6.0. Glucose, sucrose and sodium chloride showed potential for protection and delay of the degradation process. After 15 min of heating at 60°C, the C_R value of samples with the addition of glucose or sucrose at the concentration of 20%, or sodium chloride at 2.5% (w/v) were significantly higher than in the control (0%).

สารบัญ

	หน้า
ปก	1
บทคัดย่อ	2
สารบัญ	4
บทนำ	8
ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	8
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	9
ขอบเขตของโครงการวิจัย	9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
การดำเนินงานวิจัย	19
ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล	28
1. ผลของอุณหภูมิ	28
2. ผลของความเข้มข้น	32
3. ผลของชนิดบัฟเฟอร์ และผลของ pH	37
4. ผลของการเติมสารถนอมอาหาร (preservative)	42
สรุปผลการดำเนินงาน	49
ผลงานที่ได้รับจากโครงการนี้	51
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	56
ภาคผนวก ก	56
ภาคผนวก ข	57
ภาคผนวก ค	59
ภาคผนวก ง	60
ภาคผนวก จ	61
ภาคผนวก ฉ	62
ภาคผนวก ช	63
เอกสารแนบ	

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะโมเดลของไฟโคบิลิโพรตีน (ก) และโครงสร้างของซีไฟโคไซยานิน จาก <i>S. platensis</i> (ข)	10
รูปที่ 2 ลักษณะอัลฟา-และเบต้า-ซับยูนิต ของซีไฟโคไซยานิน (ก) และ อัลฟา-และเบต้า-ซับยูนิตของอัลโลไฟโคไซยานิน (ข)	11
รูปที่ 3 โครงสร้างการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานิน โมโนเมอร์	12
รูปที่ 4 ยูนิตเซลล์ (unit cell) ของไฟโคไซยานิน 612	12
รูปที่ 5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไฟโคไซยานิน	14
รูปที่ 6 สเปกตร้าของไฟโคไซยานินก่อนนำไปไว้ที่ 55°C (A) และหลังไว้ที่ 55°C นาน 15 นาที (B)	17
รูปที่ 7 ผลของสารอาหารต่อสีของไฟโคไซยานินหลังเก็บที่ อุณหภูมิ 35 ± 5°C นาน 45 วัน	20
รูปที่ 8 ผลของสารอาหารต่อสีของไฟโคอิริทรินหลังเก็บที่ อุณหภูมิ 35 ± 5°C นาน 45 วัน	21
รูปที่ 9 เครื่อง Temperature gradient box	24
รูปที่ 10 ลักษณะการวางตัวอย่างสารสกัดไฟโคไซยานินที่ความเข้มแสงต่างๆ	25
รูปที่ 11 ปริมาณไฟโคไซยานินหลังบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที	28
รูปที่ 12 ลักษณะการตกตะกอนของสารละลายไฟโคไซยานิน	31
รูปที่ 13 ลักษณะสีไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 7.0 หลังบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 15 นาที	32
รูปที่ 14 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์กับความเข้มแสง 10 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A) 40 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B) และ 80 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (C)	33
รูปที่ 15 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินแห่งที่ความเข้มแสงต่างๆ	36
รูปที่ 16 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ pH 5.0 (A) pH 6.0 (B) และ pH 7.0 (C)	38
รูปที่ 17 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์ในสารละลาย pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 60°C	39

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 18 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์ในสารละลาย pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50°C (A) และ 60°C (B)	41
รูปที่ 19 สารละลายไฟโคไซยานินไม่ได้เติมสาร (control) (A) เติมโซเดียมคลอไรด์ 2.5% (B) เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.25% (C)	44
รูปที่ 20 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์ในสารละลายที่เติมสารความเข้มข้นต่างๆ หลังบ่มที่ 60°C นาน 15 นาที	46
รูปที่ 21 ลักษณะภายใต้กล้อง SEM images (กำลังขยาย 500X) ของไฟโคไซยานินที่สภาวะปกติ (A) ไฟโคไซยานินที่เสียสภาพ (B) ไฟโคไซยานินที่เติม sucrose 20% (C) และไฟโคไซยานินที่เติม sodium chloride 2.5% (D) ภาพเล็กมุมขวาของรูป A C และ D เป็นภาพขยายที่ 3500X	47

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ความบริสุทธิ์สารสกัดไฟโคไซยานินที่กำหนดโดยหน่วยงานต่างๆ	13
ตารางที่ 2 ราคาไฟโคไซยานินของบริษัทต่าง ๆ	14
ตารางที่ 3 สารกั้นเสียที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร	19
ตารางที่ 4 ค่า Degradation rate (k) และค่าครึ่งชีวิต (half-life values; $t_{1/2}$) ของไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0.	30
ตารางที่ 5 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ในสารละลายที่อุณหภูมิต่างๆ	31
ตารางที่ 6 ค่า Degradation rate (k) และค่าครึ่งชีวิต (half-life values; $t_{1/2}$) ของไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0.	35
ตารางที่ 7 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ที่สภาวะต่างๆ	35
ตารางที่ 8 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ในสารละลายที่เติมสารชนิดต่างๆ	43
ตารางที่ 9 ค่า pH และปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ในสารละลายที่เติมสารความเข้มข้นต่างๆ	45
ตารางที่ 10 ค่า Degradation rate (k) และค่าครึ่งชีวิต (half-life values; $t_{1/2}$) ของไฟโคไซยานินในสารละลายที่เติมสารความเข้มข้นต่างๆ	46

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ไฟโคไซยานินเป็นสารประเภทโปรตีน ละลายน้ำ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบ บวม ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และมีคุณสมบัติเป็นสารเรืองแสง ไฟโคไซยานินเป็นสารชีวเคมีจากสาหร่ายที่มีศักยภาพเชิงการค้าชนิดหนึ่ง ตลาดไฟโคไซยานินมีมูลค่าประมาณปีละ 5-10 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้เป็นสีผสมอาหาร เครื่องสำอาง และมีส่วนถูกนำไปใช้ในงานวิเคราะห์ (Eriksen, 2008; Bhaskar et al., 2005) ราคาของไฟโคไซยานินขึ้นกับค่าความบริสุทธิ์ที่วิเคราะห์จากค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ต่อค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{620}/A_{280}) ไฟโคไซยานินเกรดอาหารมีความบริสุทธิ์ (A_{620}/A_{280}) ระหว่าง 0.7-2.0 ราคา กิโลกรัมละประมาณ 500-578 ดอลลาร์สหรัฐ ขณะที่ไฟโคไซยานินเกรดวิเคราะห์มีความบริสุทธิ์ (A_{620}/A_{280}) มากกว่า 4.0 ราคา กิโลกรัมละประมาณ 15 ดอลลาร์สหรัฐ หรือกรัมละ 5,000-33,000 ดอลลาร์สหรัฐ (Sekar & Chandramohan, 2008; Cisneros & Rito-Palomers, 2004; Mary Leema et al., 2010)

ปัจจุบันผู้บริโภคมีความตื่นตัวและนิยมบริโภคผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เนื่องจากมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้ผลิตภัณฑ์สังเคราะห์ แต่ผลิตภัณฑ์และสีธรรมชาติมักพบปัญหาเรื่องความคงตัว ซึ่งสีธรรมชาติแต่ละชนิดมีความคงตัวแตกต่างกันขึ้นกับแหล่งวัตถุดิบที่ใช้สกัด กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสาหร่าย (กลุ่มสาหร่าย) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มจธ.) ร่วมกับบริษัทกรีนไดมอนด์ ผู้ประกอบการผลิตสไปรูulina ทำวิจัยเรื่อง “การผลิตไฟโคไซยานินจากสไปรูulina ด้วยเอนไซม์เทคโนโลยีในระดับโรงงานต้นแบบ” โดยได้รับทุนสนับสนุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ปีงบประมาณ 2550 ระหว่างการดำเนินงานทดสอบและพัฒนาผลิตภัณฑ์ในโครงการดังกล่าว พบสีของสารสกัดไฟโคไซยานินมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของไฟโคไซยานิน ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความเข้มแสง (Li et al., 2009; Sekar & Chandramohan, 2008)

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน และทดสอบใช้สารถนอมอาหารชนิดต่างๆ โดยคาดว่าจะได้แนวทางการเพิ่มความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน และสามารถนำผลที่ได้จากโครงการนี้ไปขยายผลเพื่อการใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทราบผลของอุณหภูมิ pH และความเข้มแสงต่อความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน
2. ได้แนวทางการเพิ่มความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

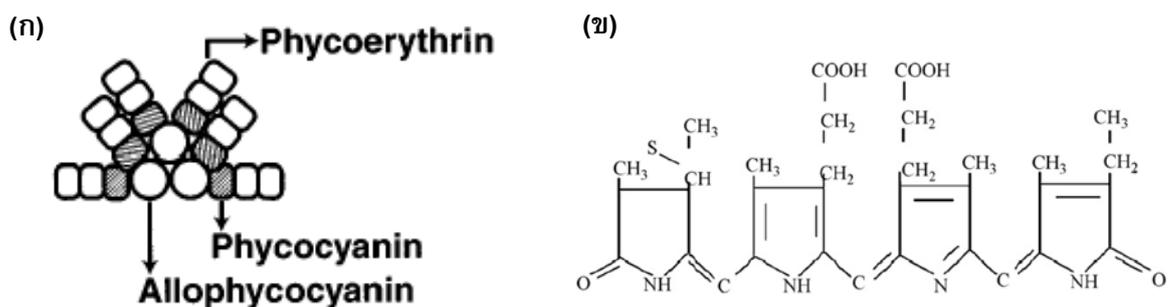
1. ศึกษาผลของอุณหภูมิ pH และความเข้มแสง ต่อความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน
2. ศึกษาผลการเติมสารอาหารชนิดต่างๆ ต่อความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน
3. สรุปและประมวลผล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

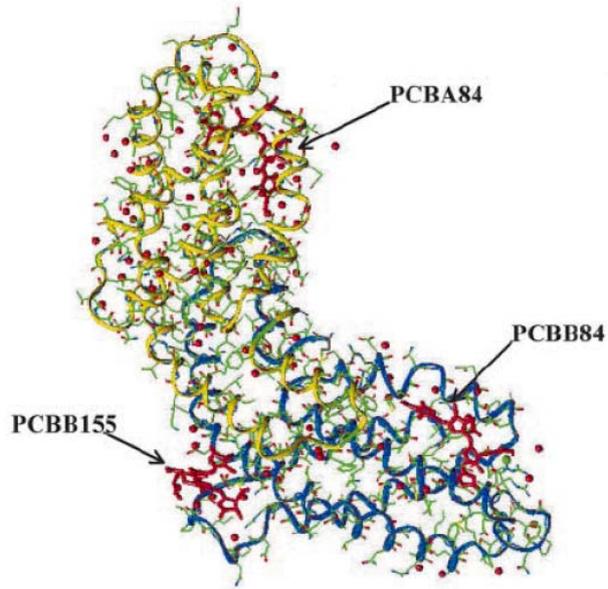
1. ทราบอุณหภูมิที่เป็นจุดวิกฤตต่อความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน ความเข้มแสง และ pH ที่ช่วยให้ไฟโคไซยานินมีความคงตัวสูงสุด
2. ทราบชนิด และปริมาณสารอาหารที่ช่วยเพิ่มความคงตัวของไฟโคไซยานิน ซึ่งสามารถนำไปขยายผลเพื่อการใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ได้
3. ได้แนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์ โดยข้อมูลเกี่ยวกับสภาวะที่ไฟโคไซยานินมีความคงตัวหรือเริ่มเสถียรภาพ สามารถนำไปใช้ปรับปรุงกระบวนการ การผลิตและพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ผสมไฟโคไซยานิน ตลอดจนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไฟโคไซยานิน
4. สามารถต่อ ยอดองค์ความรู้ด้านสารมูลค่าสูงจากสาหร่ายไปรูลิน่า

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

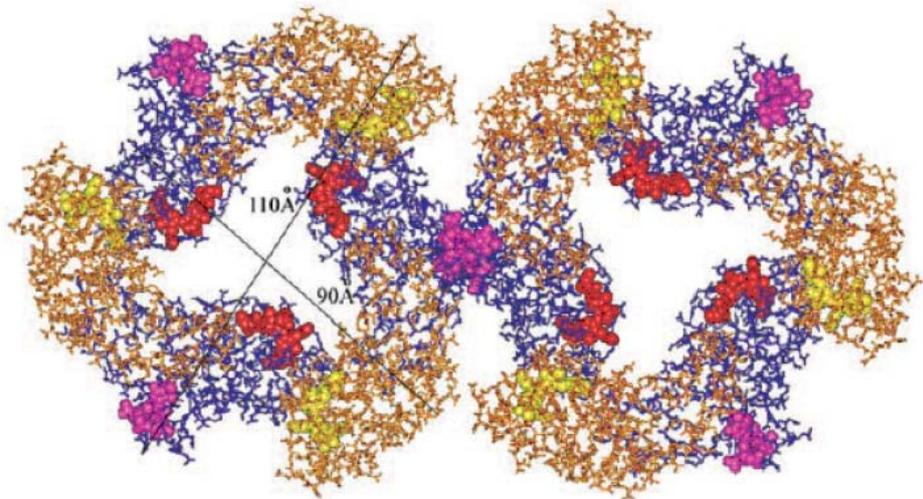
สไปรูลินามีไฟโคบิลิโปรตีนประมาณร้อยละ 20-28% ของน้ำหนักแห้ง (Mishra et al., 2008; Jaouen et al., 1999) ไฟโคบิลิโปรตีนมีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ ซีไฟโคไซยานิน (c-phycoyanin; สีฟ้า ละลายน้ำ) อัลโลไฟโคไซยานิน (allophycoyanin; สีฟ้า ละลายน้ำ) และไฟโคอีรีทริน (phycoerythrin; สีแดง ละลายน้ำ) (รูปที่ 1) สำหรับสไปรูลิน่าเป็นสาหร่ายในกลุ่ม Cyanophyceae ประกอบด้วยซีไฟโคไซยานิน และอัลโลไฟโคไซยานินเท่านั้น (Reis et al., 1998; Zhang & Chen, 1999) และมีซีไฟโคไซยานินเป็นองค์ประกอบหลัก (Patil et al., 2006; Minkova et al., 2003) อัลฟา-และเบต้า-หน่วย (α- และ β-subunit) ของซีไฟโคไซยานินมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 20.5 kDa และ 23.5 kDa ตามลำดับ ขณะที่อัลฟา-และเบต้า-หน่วยของอัลโลไฟโคไซยานินมีขนาดเล็กกว่า คือ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18 kDa และ 20 kDa ตามลำดับ (รูปที่ 2) โดยทั่วไปมักพบซีไฟโคไซยานินอยู่ในรูปของเฮกซะเมอร์ (Hexamers, α₆β₆; มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสุดเท่ากับ 260 kDa) ไตรเมอร์ (Trimers, α₃β₃; มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 132 kDa) และโอลิโกเมอร์ (Oligomers) อื่นๆ ซึ่งซีไฟโคไซยานินที่อยู่ในรูปโมโนเมอร์ (Monomer, αβ) มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสุด 44 kDa (MacColl, 1998)



รูปที่ 1 ลักษณะโมเดลของไฟโคบิลิโปรตีน (ก) และ โครงสร้างของซีไฟโคไซยานินจาก *S. platensis* (ข)
(MacColl, 1998; Mishra et al., 2008)



รูปที่ 3 โครงสร้างการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานิน โมโนเมอร์ (Adir et al., 2001)



รูปที่ 4 ยูนิตเซลล์ (unit cell) ของไฟโคไซยานิน 612 (Adir & Lerner, 2003)

การก่อรูปตติยภูมิดังกล่าวอัลฟา-และเบต้า-ซัพยูนิต แต่ละยูนิตจะถูกตรึงด้วยแรงแวนเดอวาล์ (Van der Waals) และอันตรกิริยาไฟฟ้าสถิต (Electrostatic interactions) โดยแกนกลางของเฮกซะ-เมอร์มีสนามไฟฟ้าสถิต (Electrostatic field) เป็นลบ ขณะที่บริเวณผิวด้านนอกเป็นบวก (Stecet al., 1999) ณ สภาวะสมดุลหนึ่งๆ สารละลายไฟโคไซยานินจะประกอบด้วยส่วนผสมระหว่างโมโนเมอร์

ไทรเมอร์ และเฮกซะเมอร์ ที่สามารถเปลี่ยนรูประหว่างกันได้ (Berns & MacColl, 1989) ขึ้นกับความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน pH ความแรงไอออน (Ionic strength, I) และอุณหภูมิ เป็นต้น

การกำหนดคุณภาพเกรดไฟโคไซยานินพิจารณาจากค่าความบริสุทธิ์ (A_{620}/A_{280}) โดยความบริสุทธิ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินที่ใช้ในงานวิเคราะห์และงานด้านเภสัชกรรม (analytical reagent และ pharmaceutical grade) มีการกำหนดค่าความบริสุทธิ์เท่ากัน คือ มีค่าความบริสุทธิ์ประมาณ 4.0 แต่ไฟโคไซยานินเกรดอาหารและเครื่องสำอางแต่ละบริษัท/หน่วยงานมีการกำหนดค่าแตกต่างกัน ดังตารางที่ 1 สำหรับราคา และผลิตภัณฑ์ไฟโคไซยานินของบริษัทต่างๆ ดังตารางที่ 2 และรูปที่ 5

ตารางที่ 1 ความบริสุทธิ์สารสกัดไฟโคไซยานินที่กำหนดโดยหน่วยงานต่างๆ

งานที่นำไปใช้	ความบริสุทธิ์	ที่มา
เกรดอาหารและเครื่องสำอาง (Food and cosmetic grade)	> 0.5	Biodelta (Pty) Ltd.
เกรดสีผสมอาหาร	> 0.5	Dainippon ink and chemical, phycocyanin leaflet
เกรดสีผสมอาหาร	0.82	Herrera et al., 1989, J. Appl. Phyco. 1: 323-331.
เกรดอาหาร (Food grade)	> 0.7	Hangzhou Aowei Bioengineering Co., LTD.
เกรดที่ใช้เป็นยา (Medicine grade)	> 2.0	
เกรดอาหาร (Food industry)	2.0	Bhaskar et al., 2005, Indian J Exp Biol. 43(3):
ด้านเภสัชกรรม (Pharmaceutical industry)	4.0	277-279.
เกรดอาหาร (Food grade)	0.7	Patil et al., 2006, J. Chromatogr. A,1127:76-81.
Reactive grade	3.9	Cisneros&Rito-Palomares, 2004, Chem. Biochem.
Analytical grade	> 4.0	Eng. Q. 18(4) : 385-380.

ตารางที่ 2 ราคาของไฟโคไซยานินของบริษัทต่าง ๆ

ผลิตภัณฑ์ไฟโคไซยานิน	ราคา	ที่มา
เกรดอาหาร (purity 0.7) Reactive grade (purity 3.9) Analytical grade (purity > 4.0)	0.13 US\$/mg 1-5 US\$/mg ~ 15 US\$/mg	Cisneros&Rito-Palomares, 2004, Chem. Biochem. Eng. Q. 18(4): 385-380.
ไฟโคไซยานินเกรดอาหาร	578 US\$ /kg	Pharm Chemical/Shanghai Lansheng Corporation (China) (สอบถาม โดยตรงปี 2003)
ไฟโคไซยานินเกรดอาหาร อัลโลไฟโคไซยานิน	3-25 US\$/mg 6-17 US\$ /mg	Cyanotech ข้อมูลจาก. Spolaore et al., 2006. J. Biosci. Bioeng. 101:87-96
Partially purified Highly purified	79.9 US\$/10mg 250 US\$ /5mg	Sigma-Aldrich Co.,
ไฟโคไซยานินเกรดอาหาร	500 Australian \$ /kg	Leema et al., 2010, Bioresour. Technol. 101: 9221-9227.



Lyoflogen APC^a

(Lyophilized allophycocyanin)

$$A_{651}/A_{280} \geq 5.0$$

$$A_{651}/A_{620} > 1.5$$



Phycocyanin^b

(lyophilized powder)

$$A_{620}/A_{280} > 4.5$$

โปรตีนประมาณ 30%



Phycobiliprotein (PB)^c

$$A_{620}/A_{280} > 2.0$$

โปรตีน 40-50 %

ความชื้น < 3%



Deltablue^{TMd}

รูปที่ 5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไฟโคไซยานิน

ที่มา: ^a www.febico.com.tw

^b www.aowei21.com/eng_product

^c www.aowei21.com/eng_product

^d www.biodelta.net

ไฟโคไซยานินเป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดลำดับแรกที่สกัดได้จากสไปรูลีนา กลุ่มสาหร่าย มจธ. ได้ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการสกัดไฟโคไซยานินอย่างต่อเนื่อง โดยศึกษาการใช้สารละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เพื่อสกัดไฟโคไซยานิน การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการเช่น Freeze-Thawing การบด การใช้คลื่นความถี่สูง การใช้ French Press และการกวน การเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการใช้เยื่อแผ่น Microfiltration และ Ultrafiltration เพื่อผลิตไฟโคไซยานินเกรดอาหาร การเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยวิธี Gel filtration และ Ion exchange chromatography เพื่อผลิตไฟโคไซยานินเกรดวิเคราะห์ การศึกษาคุณภาพวัตถุดิบสไปรูลีนาที่เหมาะสมเพื่อใช้ผลิตไฟโคไซยานิน รวมทั้งได้ศึกษาขยายขนาดการผลิตไฟโคไซยานินเกรดอาหารไปในระดับโรงงานต้นแบบ และนำไฟโคไซยานินที่ผลิตได้ไปทดสอบพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่โดยบริษัทกรีนโดมอนด์จำกัด ซึ่งระหว่างการพัฒนาและผลิตผลิตภัณฑ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินมีการเปลี่ยนแปลง

ลักษณะที่บ่งบอกความไม่คงตัวของผลิตภัณฑ์ที่สังเกตได้ง่ายคือ สีของผลิตภัณฑ์ที่เปลี่ยนแปลงไปจากสีเริ่มต้น ผลิตภัณฑ์สีธรรมชาติแต่ละชนิดจะมีความคงตัวแตกต่างกันขึ้นกับแหล่งวัตถุดิบที่ใช้สกัด อาทิเช่น สีฟ้าที่ใช้กับลูกกวาดและเครื่องดื่ม ที่สกัดจากแหล่งวัตถุดิบต่างกัน 3 ชนิดคือ สี Gardinia blue สีไฟโคไซยานิน และสีคราม (Indigo) จะพบสี Gardinia blue และสีครามทนความร้อนได้สูงกว่าสีไฟโคไซยานิน และที่ความเข้มข้นเดียวกันสีไฟโคไซยานินมีการสูญเสียสูงสุดถึงร้อยละ 80 อย่างไรก็ตาม แม้ว่าสีไฟโคไซยานินจะมีความคงตัวต่ำ แต่ผลการทดสอบผสมในผลิตภัณฑ์ soft drink, jelly gum, hard candy และ sugar coating พบว่า สีไฟโคไซยานินมีความเหมาะสม และให้สีดีกว่าสี Gardinia blue และสีคราม (Jespersen et al., 2005)

ความคงตัวของสารสีธรรมชาตินอกจากขึ้นกับแหล่งวัตถุดิบที่ใช้สกัด ยังขึ้นกับรูปแบบหรือวิธีการเก็บ การศึกษาความคงตัวของสารสีแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Haematococcus pluvialis* พบว่า การเก็บเซลล์สาหร่ายแห้งแบบสูญญากาศ สามารถรักษาปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ในเซลล์สาหร่ายทั้งสองชนิดไว้ได้นาน 1.5 ปี โดยปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ที่เหลือในเซลล์มีอยู่ถึงร้อยละ 80-90 แต่กรณีที่เก็บสารสีแคโรทีนอยด์ในรูปสารสกัดจะพบปัญหาความไม่คงตัวเช่นกัน โดยสีของสารสกัดแคโรทีนอยด์จาก *Chlorella vulgaris* มีการสลายตัวหลังเก็บนาน 15 วัน ขณะที่สีแคโรทีนอยด์จาก *Haematococcus pluvialis* สลายตัวหลังเก็บนาน 30 วัน (Gouveia & Empis. 2003)

ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน

ปัจจัยหลักที่เร่งให้สีธรรมชาติสลายตัวของ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเข้มแสง (Li et al., 2009; Sekar & Chandramohan, 2008) เป็นต้น

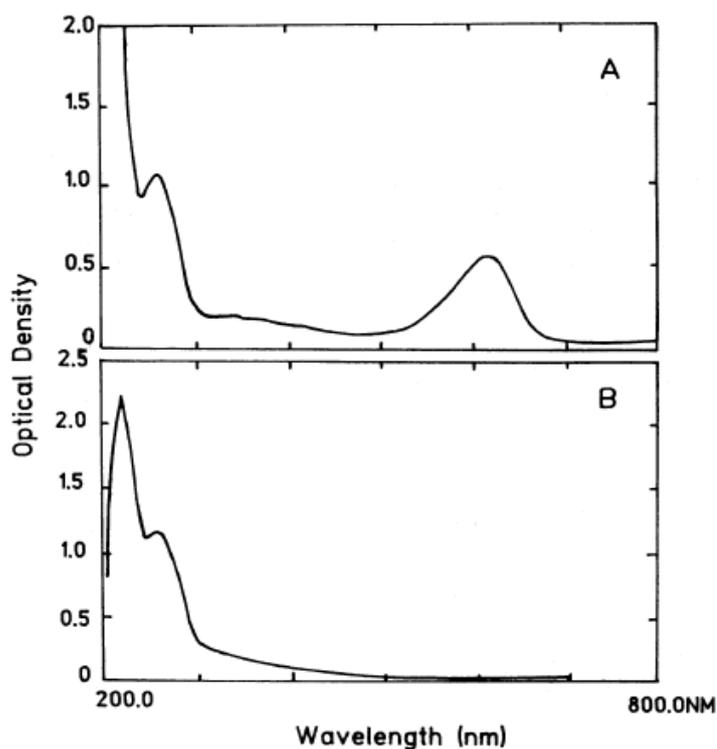
การปรากฏรูปร่างโมโนเมอร์ ไตรเมอร์ หรือเฮกซะเมอร์ของไฟโคไซยานินขึ้นกับ pH ความแรงไอออน (ionic strength, I) และความเข้มข้นของไฟโคไซยานินในสารละลาย (Kao et al., 1975; Adams et al., 1979; Mishra et al., 2008) ในสารละลาย pH 5.0 ไฟโคไซยานินส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปเฮกซะเมอร์ แต่สามารถเปลี่ยนรูป (dissociates) กลายเป็นไตรเมอร์เมื่อ pH ของสารละลายสูงขึ้น เช่นที่ pH 6.0 ไฟโคไซยานินประมาณร้อยละ 77 อยู่ในรูปเฮกซะเมอร์ และร้อยละ 23 อยู่ในรูปไตรเมอร์ แต่เมื่อ pH เพิ่มขึ้นเป็น 7.0 จะพบไฟโคไซยานินเปลี่ยนรูปอยู่ในรูปไตรเมอร์ประมาณร้อยละ 82 สำหรับกรณีที่ pH ลดลง เช่น จาก pH 5.0 ความแรงไอออน 0.1 (I, mol/l) ลดลงเป็น pH 4.0 ความแรงไอออน 0.1 จะพบจำนวนไฟโคไซยานินที่อยู่ในรูปเฮกซะเมอร์เปลี่ยนรูปกลายเป็นโมโนเมอร์อย่างมีนัยสำคัญ (Adams et al., 1979; Berns & MacColl, 1989)

การศึกษาค่าจลนศาสตร์ (kinetic studies) ต่อการเสียดสภาพ (denaturation) ของไฟโคไซยานิน Patel et al. (2004) รายงานว่า ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 ก่อนข้างมีความคงตัวสูงกว่า pH อื่นๆ ที่ศึกษา (4.0-8.0) และการศึกษาค่าเอ็นโทรปี (entropy) แสดงค่าที่ใกล้เคียงกับโครงสร้างของโปรตีนที่ pH 5.0 ซึ่งเพิ่มความคงตัวหรือเสถียรภาพของ native structure ขณะที่ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 7.0 ไม่มีความคงตัวและไวต่อความร้อน นอกจากนี้มีรายงานว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นไฟโคไซยานินกลับมีความคงตัวที่ pH ต่ำลง ที่อุณหภูมิ 50-55°C ไฟโคไซยานินมีความคงตัวที่ pH 6.0 แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอยู่ในช่วง 57-65°C ไฟโคไซยานินกลับมีความคงตัวที่ pH 5.0 (Antelo et al., 2008) และที่อุณหภูมิสูงมีผลทำให้ไฟโคไซยานินเกิดการสลายตัวเร็วขึ้นโดยที่อุณหภูมิ 65°C พบไฟโคไซยานินมีอัตราการเสียดสภาพ (denaturation rate) สูงกว่าที่อุณหภูมิ 55°C (Patel et al., 2004)

อย่างไรก็ตาม การเก็บไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิต่ำ สามารถยืดระยะเวลาการเก็บได้นานขึ้น Doke (2005) รายงานว่า การเก็บสารสกัดไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิต่ำ 4-9°C สามารถรักษาความคงตัวของไฟโคไซยานินได้นานกว่า 4 เดือน นอกจากนี้ การเก็บไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิต่ำอาจทำให้ไฟโคไซยานินมีความคงตัวใน pH ช่วงกว้างขึ้น ดังรายงานผลการศึกษาของ Silva et al. (2009) กล่าวว่า ไฟโคไซยานินมีความคงตัวในช่วง pH 5.0-7.0 ที่อุณหภูมิ 10°C และ 25°C เช่นเดียวกับ Sarada et al. (1999) รายงานว่า ไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิต่ำ ($9\pm 1^\circ\text{C}$) สามารถเก็บได้เป็นระยะเวลานานและมีความคงตัวสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm 2^\circ\text{C}$) โดยพบสีของไฟโคไซยานินเริ่มหายไปเมื่อ pH ต่ำกว่า 5.0 หรือสูงกว่า 7.5 ทั้งนี้ไฟโคไซยานินไม่มีความคงตัว และเกิดการเสียดสภาพเมื่อ

อุณหภูมิสูงกว่า 45°C ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Jespersen et al. (2005) ที่พบไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 และ pH 7.0 เกิดการเสียสภาพ และมีสีเปลี่ยนแปลงไปจากเริ่มต้นเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 45°C

ไฟโคไซยานินที่เสียสภาพเนื่องจากความร้อน อาจมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) ค่าเดิม หรือความยาวคลื่นที่เบี่ยงเบนไปจากเดิม การศึกษาของ Jespersen et al. (2005) พบว่า ความร้อนหรืออุณหภูมิสูงมีผลทำให้ค่า λ_{max} ของไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 มีค่าลดลงจาก 620 นาโนเมตร เป็น 617 นาโนเมตร (ขึ้นกับอุณหภูมิ) ขณะที่ค่า λ_{max} ของไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 7.0 ไม่เปลี่ยนแปลง หรือบางครั้งสารละลายไฟโคไซยานินที่เสียสภาพเนื่องจากความร้อนอาจไม่ปรากฏความยาวคลื่นของไฟโคไซยานินดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 สเปกตรานของไฟโคไซยานินก่อนนำไปไว้ที่ 55°C (A) และหลังไว้ที่ 55°C นาน 15 นาที (B) (Sarada et al., 1999)

แสง เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเสถียรภาพของไฟโคไซยานิน เมื่อไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 และ pH 7.0 สัมผัสแสงที่มีความเข้ม 3×10^5 ลักซ์ นาน 24 ชั่วโมง ไฟโคไซยานินเกิดการเสถียรภาพประมาณร้อยละ 80 (Jespersen et al., 2005) ขณะที่มีการตรึง (entrapment) ไฟโคไซยานินกับซิลิกา (silica matrix) สามารถรักษาคุณสมบัติทางชีววิทยา (biological activity) และเพิ่มความคงตัวของไฟโคไซยานินต่อแสง (photostability) และแม้ว่าค่า lifetime ของไฟโคไซยานินที่ตรึงกับซิลิกาและไฟโคไซยานินในสารละลายมีค่าเท่ากัน แต่ไฟโคไซยานินที่ตรึงกับซิลิกามีค่า photodamage rate constant ต่ำกว่าไฟโคไซยานินในสารละลายถึง 25 เท่า (Li et al., 2009)

การเพิ่มความคงตัวของไฟโคไซยานิน

การเพิ่มความคงตัวของไฟโคไซยานินอาจทำได้ด้วยการเติมสารบางชนิด หรือปรับปรุงร่างโครงสร้างโมเลกุลของไฟโคไซยานิน การศึกษาของ Fukui et al. (2004) พบว่า การปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลไฟโคไซยานินบริเวณกลุ่มอะมิโนไลซีน (lysine) ด้วยสาร dithiobis (succinimidyl propionate (DSP) เมื่อสาร DSP เกิด cross-link กับกลุ่มอะมิโนในโมเลกุลไฟโคไซยานิน มีผลทำให้ไฟโคไซยานินมีความคงตัวเพิ่มขึ้น

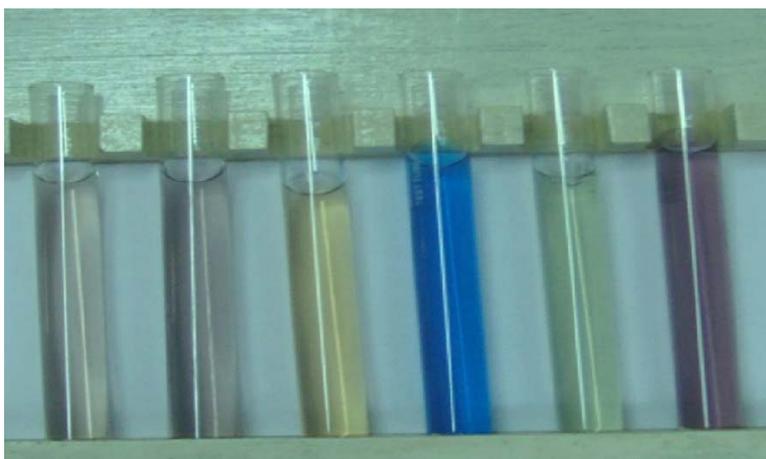
สารที่ใช้ทั่วไปเพื่อรักษาสภาพไฟโคไซยานินเพื่อการวิเคราะห์ ได้แก่ โซเดียมเอไซด์ (sodium azide, NaN_3) และดีทีที (dithiothreitol, DTT) แต่เนื่องจากสารทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษ จึงไม่เหมาะสมนำไปใช้ยืดอายุการเก็บไฟโคไซยานินเกรดอาหาร สารถนอมอาหารหรือสารกันเสีย (preservatives) ที่มีความปลอดภัยและมีการใช้แพร่หลายเพื่อยืดอายุผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ น้ำตาล เกลือ และน้ำส้ม นอกจากนี้ยังมีสารถนอมอาหารอีกหลายชนิดที่มีการอนุญาตและได้รับการรับรองจาก U.S. FDA (U.S. Food and Drug Administration) ให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ โดยไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายใดๆต่อผู้บริโภค ทั้งนี้มีการกำหนดปริมาณที่ใช้เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ตัวอย่างสารที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สารกันเสียที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร (Gould, 1996)

สารกันเสีย (preservative)	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้
กรดอินทรีย์อ่อน (Weak organic acid) และเอสเทอร์ (Ester) โพรไพโอเนท ซอร์เบท เบนโซเอท เบนโซเอทเอสเทอร์ (Benzoate esters (parabens))	ขนมปัง เค้ก ชีส ธัญพืช ชีส ไชรับ เค้ก น้ำสลัด ผักดอง น้ำสลัด soft drink ผลิตภัณฑ์ Marinaded fish
กรดอินทรีย์ (Organic acid acidulants) แลคติก ซิตริก มาลิก อะซิติก อื่นๆ	ซอสปรุงรส pH ต่ำ มายองเนส น้ำสลัด เครื่องดื่ม น้ำผลไม้ และ น้ำผลไม้เข้มข้น
สารกันเสียนินทรีย์ (Inorganic acid preservative) ซัลไฟต์ (sulphite) ไนไตรท์	ผลไม้แห้ง ไวน์ ไส้กรอก ผลิตภัณฑ์ cured meat
กรดแร่ (Mineral acid acidulants) ฟอสฟอริก ไฮโดรคลอริก	เครื่องดื่ม
ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) ไนซิน นาตามัยซิน (ไพมาริซิน) รมควิน	ชีส อาหารกระป๋อง Soft fruit เนื้อสัตว์ และปลา

การเพิ่มความคงตัวไฟโคไซยานินสามารถทำได้โดยใช้สารให้ความคงตัว (Stabilizing agents) ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแอลกอฮอล์ (Polyols) หรือที่เรียกว่าโพลีไฮดรอกซีแอลกอฮอล์ เช่น ซอร์บิทอล (sorbitol) (Arakawa & Timasheff, 1982) หรือการใช้เกลือ สารเด็กซ์แทรน (Dextran) สารพอลิเมอร์ และตัวทำละลายร่วม (Cosolvents) เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะเข้าไปแทนที่โมเลกุลของน้ำ และเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโครงสร้างของโปรตีนส่วนที่มีขั้วและห่อหุ้มโมเลกุลของโปรตีน (ราเชนทร์, 2552)

การเติมซอร์บิทอลในไฟโคไซยานินประมาณร้อยละ 10-50 (w/w) สามารถเพิ่มค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของสารสกัดไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ 62°C (Antelo et al., 2008) และการเติมกรดซิตริก (citric acid) 4 mg/ml สามารถคงสภาพไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 35 ± 5°C ได้นาน 45 วัน ขณะที่การเติมซูโครสและแคลเซียมคลอไรด์ สามารถคงสภาพไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 7.0 ได้เช่นกัน แต่ต้องเก็บสารละลายไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิต่ำ 0 ± 5°C (รูปที่ 7) (Mishra et al., 2008) สำหรับการศึกษากับสารสีอื่นๆ Mishra et al. (2010) รายงานว่า การเติมกรดซิตริก 4 mg/ml สามารถเพิ่มความคงตัวของไฟโคอีริทริน (phycoerythrin, สีแดง) ที่สกัดจากสาหร่าย *Pseudanabaena* sp. โดยปริมาณไฟโคอีริทรินในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 35 ± 5°C และ 0 ± 5°C ลดลงเหลือประมาณร้อยละ 37.8 และร้อยละ 54.2 ตามลำดับหลังเก็บนาน 45 วัน (รูปที่ 8)



รูปที่ 7 ผลของสารถนนอมอาหารต่อสีของไฟโคไซยานินหลังเก็บที่อุณหภูมิ 35 ± 5°C นาน 45 วัน (จากซ้ายไปขวา; control, แคลเซียมคลอไรด์, ซูโครส, กรดซิตริก, แคลเซียมคลอไรด์+ซูโครส (0.1g) และแคลเซียมคลอไรด์+ซูโครส (0.05g; Mishra et al., 2008)



รูปที่ 8 ผลของสารถนอมอาหารต่อสีของไฟโคอิริทรินหลังเก็บที่อุณหภูมิ $35 \pm 5^{\circ}\text{C}$ นาน 45 วัน (จากซ้ายไปขวา; control, กรดซิตริก, ซูโครส, โซเดียมคลอไรด์, แคลเซียมคลอไรด์) (Mishra et al., 2010)

การศึกษาความคงตัวของโปรตีน หรือผลของสารให้ความคงตัว (Stabilizing agents) มักอธิบายโดยใช้คุณสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์ (Thermodynamics) ของปฏิกิริยาการดำเนินจากซ้ายไปขวา หรือขวาไปซ้าย โดยพลังงานอิสระกิบบส์ (Gibbs free energy, G) เป็นฟังก์ชันทางเทอร์โมไดนามิกส์ที่สำคัญ มีคำนิยามตามสมการที่ (1)

$$G = H + TS \quad (1)$$

- H คือ เอนทัลปี (enthalpy) และมีลักษณะคล้ายกับพลังงานภายใน
- T เป็นอุณหภูมิ (absolute temperature)
- S หมายถึง เอนโทรปี (entropy) หมายถึงความไร้ระเบียบ (disorder)

สำหรับปฏิกิริยาเคมีของการเปลี่ยนแปลงของสาร A เป็น B ตามสมการที่ (2) แนวโน้มของปฏิกิริยาจะไปทางซ้ายหรือขวาก็ขึ้นกับผลต่างของพลังงานอิสระกิบบส์ (Gibbs' free energy change, ΔG) ซึ่งมีค่าเท่ากับพลังงานอิสระของ B ลบด้วยพลังงานอิสระของ A ดังสมการ (3)

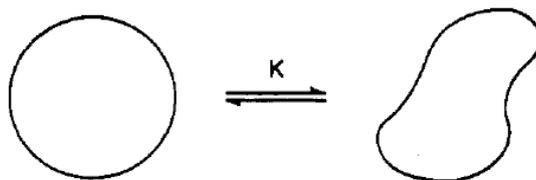


$$\Delta G = G_B - G_A \quad (3)$$

ถ้า ΔG มีค่าเป็นลบ แสดงว่า พลังงานอิสระของ B มีค่าต่ำกว่า A ปฏิกริยาจะดำเนินไปได้เองจาก A ไป B แต่ถ้า ΔG มีค่าเป็นบวก ปฏิกริยาไม่สามารถดำเนินจาก A ไป B นอกจากจะได้รับพลังงานหรือแรงผลักดันจากภายนอก และในกรณีที่ ΔG มีค่าเป็นศูนย์ ปฏิกริยาจะอยู่ที่จุดสมดุล (equilibrium) ทั้งนี้ ΔG ของปฏิกริยาเคมีขึ้นกับ อุณหภูมิ ความดัน ความเข้มข้นของสารที่ทำปฏิกริยา และปัจจัยอื่นๆ

การอธิบายผลของน้ำตาลในการช่วยเพิ่มความคงตัวของโปรตีนอาศัยหลักการเดียวกัน ดังภาพ Scheme I เมื่อ state I เป็นโปรตีนที่อยู่ในรูป native form และ state II เป็นโปรตีนที่อยู่ในรูป denature form และ K เป็น equilibrium constant ของปฏิกริยาการเสื่อมสภาพ (denaturation reaction) การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนจาก state I ไป state II จะมีการเปลี่ยนแปลงของพลังงานอิสระกิบส์ กรณีที่ ΔG มีค่าเป็นลบ โปรตีนจะอยู่ในรูป denature form หาก ΔG มีค่าเป็นบวก โปรตีนจะอยู่ในรูป native form ซึ่งการเติมน้ำตาลทำให้เกิดพลังงานบวก (positive free energy change) และพลังงานบวกนี้จะรวมเข้าไปในปฏิกริยาส่งผลให้ ΔG มีค่าเป็นบวก ทำให้โปรตีนมีโอกาสอยู่ในรูป native form มากขึ้น นั่นคือน้ำตาลจะไปเพิ่มเสถียรภาพของโปรตีน

Scheme I (Arakawa & Timasheff, 1982)



State I (native form)

State II (denatured form)

ในระหว่างที่โปรตีนเปลี่ยนสถานะจาก native form เป็น denature form โมเลกุลของโปรตีนจะเกิดการคลายตัวออก (unfold) พลังงานที่โปรตีนใช้ในการเปลี่ยนแปลงจาก native เป็น denature มีความสัมพันธ์กับ (1) ปริมาตร หรือพื้นที่ผิวที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากการขยายตัวเนื่องจากการ unfold ของโมเลกุลของโปรตีน และ (2) แรงตึงผิว (surface tension) ที่เปลี่ยนไป ดังนั้น การศึกษาผลของสารเพิ่มความคงตัว (stabilizing agent) หรือน้ำตาลจึงทำการวิเคราะห์

ค่าแรงดึงผิว แรงดึงระหว่างผิว พื้นที่ผิว หรือปริมาตรของโมเลกุลที่เปลี่ยนแปลง โดยเปรียบเทียบระหว่างโปรตีนที่อยู่ในน้ำกับโปรตีนที่อยู่ในสารละลายที่มีน้ำตาล หากโปรตีนในสารละลายที่มีน้ำตาลมีการหดตัวและมีปริมาตรน้อยกว่าโปรตีนในน้ำ แสดงว่าโปรตีนในสารละลายน้ำตาลมีความคงตัว (stability) สูงกว่า หรือกรณีที่โปรตีนในสารละลายน้ำตาลมีค่าแรงดึงผิวสูงกว่าโปรตีนในน้ำ แสดงว่าโปรตีนมีความคงตัว (stability) ในสารละลายน้ำตาลสูงกว่าในน้ำ เนื่องจากต้องใช้พลังงานเพิ่มขึ้นในการ unfold เพื่อเปลี่ยนจาก native form เป็น denature form

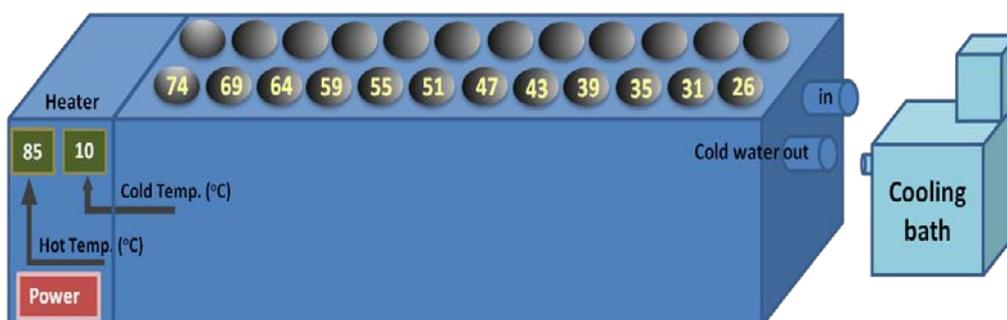
การดำเนินงานวิจัย

1. การสกัดไฟโคไซยานินจากสาปรูลิน่า

ทำการสกัดไฟโคไซยานินด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ กวนสกัดด้วยความเร็ว 300 รอบ/นาที นาน 4 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยความเร็วสูงเพื่อแยกสารละลายไฟโคไซยานินและตะกอนกากสาหร่าย สารละลายไฟโคไซยานินที่ได้นำไปกรองผ่านระบบไมโครฟิลเตรชันด้วยเมมเบรนขนาด $5\ \mu\text{m}$ และ $0.8/0.2\ \mu\text{m}$ เพื่อกำจัดกากสาหร่ายที่เหลือค้างในสารละลาย จากนั้นนำไปกรองผ่านระบบอัลตราฟิลเตรชันด้วยเมมเบรนขนาด 50 kDa เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ และกำจัดน้ำ นำสารละลายไฟโคไซยานินเข้มข้นที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dry (Chaiklahan et al., 2011)

2. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน

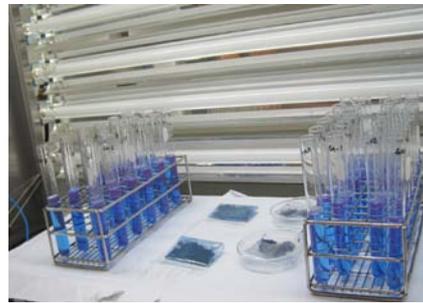
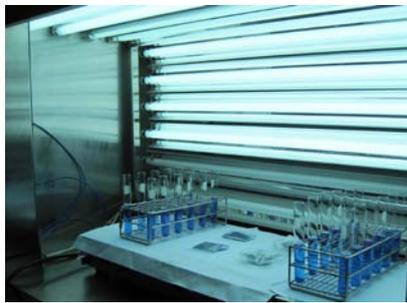
นำสารสกัดไฟโคไซยานินแห้งที่ได้จากข้อ (1) ละลายในสารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 โดยความเข้มข้นของไฟโคไซยานินในสารละลายมีค่าเริ่มต้นประมาณ 0.20 mg/ml (ทุกการทดลอง) จากนั้นนำไปบ่มในเครื่อง Temperature gradient box (รูปที่ 9) ที่ตั้งค่าอุณหภูมิต่ำสุดเท่ากับ 10°C และอุณหภูมิสูงสุดที่ 85°C อุณหภูมิแต่ละช่องในเครื่อง Temperature gradient box มีค่าเรียงจากอุณหภูมิต่ำไปสูงดังนี้ 26°C 31°C 35°C 39°C 43°C 47°C 51°C 55°C 59°C 64°C 69°C และ 74°C อุณหภูมิแต่ละจุดมีค่าเบี่ยงเบนประมาณ 1°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) บ่มนาน 30 นาที และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณไฟโคไซยานิน



รูปที่ 9 เครื่อง Temperature gradient box

3. การศึกษาผลของความเข้มแสงต่อความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน

การศึกษาผลของความเข้มแสงใช้ตัวอย่าง 2 ลักษณะ คือ สารสกัดไฟโคไซยานินแห้ง และ สารละลายไฟโคไซยานิน ซึ่งเตรียมเช่นเดียวกับการศึกษาข้อ (2) จากนั้นนำสารสกัดไฟโคไซยานินแห้ง และไฟโคไซยานินในสารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 ไปวางในที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 ± 2 °C และมีความเข้มแสงต่างกัน 3 ระดับ คือ ความเข้มแสงต่ำ ประมาณ 10 ± 3 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ความเข้มแสงปานกลางประมาณ 40 ± 8 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ และความเข้มแสงสูงประมาณ 80 ± 10 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 ลักษณะการวางตัวอย่างสารสกัดไฟโคไซยานินที่ความเข้มแสงต่างๆ

4. การศึกษาผลของชนิดบัฟเฟอร์ และผลของ pH

4.1 การศึกษาชนิดบัฟเฟอร์

ชนิดบัฟเฟอร์ที่ศึกษาได้แก่ สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ (citrate buffer) สารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (citrate-phosphate buffer) และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) สารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดสามารถใช้เตรียม pH ที่ช่วงต่างกัน กล่าวคือ สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ใช้เตรียมช่วง pH 3.0 – 6.2 สารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใช้เตรียมช่วง pH 2.6 – 7.0 และ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใช้เตรียมช่วง pH 5.7 – 8.0 ดังนั้นชนิดบัฟเฟอร์ที่ศึกษา คือ

pH 5.0 ทดสอบสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ และสารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

pH 6.0 ทดสอบสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ สารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

pH 7.0 ทดสอบสารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

และทดสอบในสภาวะเร่งการทำลายไฟโคไซยานินด้วยอุณหภูมิ โดยวางตัวอย่างใน water bath อุณหภูมิ 60 ± 1 °C

4.2 การศึกษาผลของ pH

การศึกษาผลของ pH ต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน ศึกษาในช่วง pH 3.0 ถึง pH 8.0 โดยละลายสารสกัดไฟโคไซยานินแห้งในสารละลาย pH ต่างๆ ดังนี้

pH 3.0 และ 4.0 ใช้สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์

pH 5.0- 7.0 ใช้สารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

pH 8.0 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

จากนั้นวางตัวอย่างใน water bath ที่อุณหภูมิ $60 \pm 1^{\circ}\text{C}$

5. การศึกษาผลของสารอนอมอาหาร

การทดลองทำโดยละลายสารสกัดไฟโคไซยานินแห้งในสารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 และ pH 7.0 จากนั้นเติมสารชนิดต่างๆที่เลือกไว้และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $60 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ชนิดและปริมาณสารที่เติมพิจารณาจากงานวิจัยที่ผ่านมาและข้อมูลที่ค้นได้จากสื่ออิเล็กทรอนิกส์ มีดังนี้

สารกลุ่มน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ ได้แก่

กลูโคส (glucose) ความเข้มข้น 2% และ 20 %

ซูโครส (sucrose) ความเข้มข้น 0.4 % และ 20 %

ซอร์บิทอล (sorbitol) ความเข้มข้น 0.4 % และ 20 %

สารกลุ่มกรด ได้แก่

กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) กรดซิตริก (citric acid) กรดซอร์บิก (sorbic acid) และ

กรดเบนโซอิก (benzoic acid) ความเข้มข้น 0.4 %

สารกลุ่มเกลือ ได้แก่

โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) และแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride)

ความเข้มข้น 20%

สารอื่นๆ ได้แก่

โซเดียมเอไซด์ (sodium azide) ความเข้มข้น 0.05%

โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ความเข้มข้น 1.8 % และ 20%

กลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 20%

สารที่แสดงให้เห็นศักยภาพช่วยเพิ่มความคงตัวของไฟโคไซยานินจะนำไปศึกษาที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป

6. การวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

ปริมาณไฟโคไซยานินในการศึกษานี้ หมายถึง ผลรวมของปริมาณซีไฟโคไซยานิน (CPC) กับปริมาณอัลโลไฟโคไซยานิน (APC) การวิเคราะห์ทำโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และ 652 นาโนเมตร และคำนวณดังสมการ (4) และ (5) (Bennett & Bogorad, 1973; Patel et al., 2005):

$$\text{CPC (mg/ml)} = [A_{620} - 0.474 (A_{652})] / 5.34 \quad (4)$$

$$\text{APC (mg/ml)} = [A_{652} - 0.208 (A_{620})] / 5.09 \quad (5)$$

เมื่อ A_{620} เป็นค่าการดูดกลืนแสงของ CPC

A_{652} เป็นค่าการดูดกลืนแสงของ APC

ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ (Relative Phycocyanin concentration, C_R ; %) คำนวณตามสมการ (6) (Antelo et al., 2008):

$$C_R (\%) = [C_t / C_0] \times 100 \quad (6)$$

เมื่อ C_0 คือ ปริมาณไฟโคไซยานิน (CPC+APC, C) ที่เวลาเริ่มต้น

C_t คือ ปริมาณไฟโคไซยานินที่เหลือที่เวลาใดๆ

การวิเคราะห์ค่า degradation rate constant (k , min^{-1}) ของไฟโคไซยานินตรวจสอบโดยใช้ kinetics first order ที่คำนวณตามสมการ (7) (Patel et al., 2004; Koca et al., 2006):

$$\ln (C_t / C_0) = -kt \quad (7)$$

โดย t เป็นเวลาใดๆ

สำหรับค่าครึ่งชีวิต (half-life values, $t_{1/2}$) หมายถึง ระยะเวลาที่ปริมาณไฟโคไซยานินลดลงร้อยละ 50 จากเริ่มต้น คำนวณตามสมการ (8) (Koca et al., 2006; Antelo et al., 2008):

$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad (8)$$

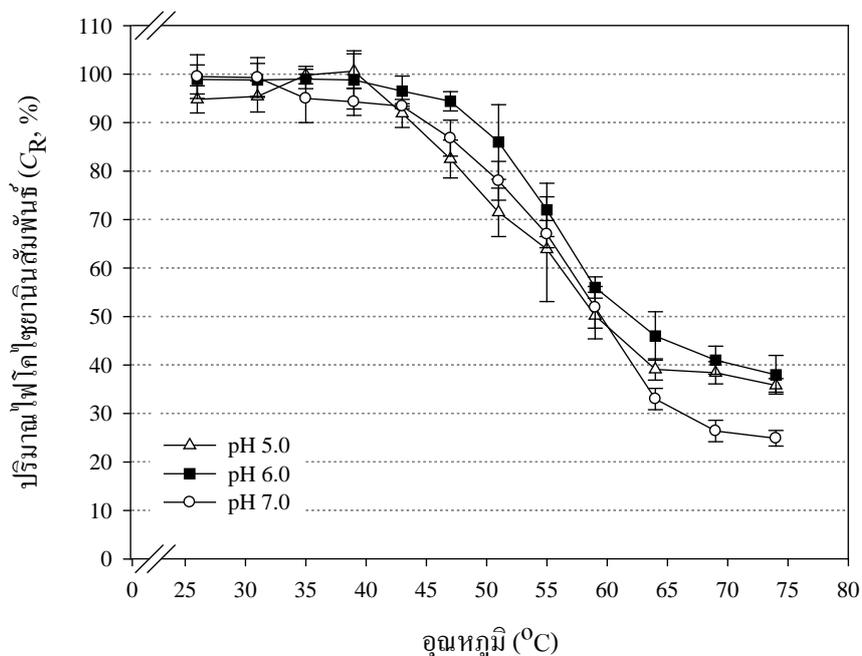
ทุกการทดลองทำซ้ำ 4 ครั้ง และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม ANOVA: single factor ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล

1. ผลของอุณหภูมิ

หลังนำสารละลายไฟโคไซยานินวางในเครื่อง Temperature gradient box ที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน 12 ค่า เป็นเวลา 30 นาที พบว่า อุณหภูมิมีผลต่อปริมาณไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 ในลักษณะเดียวกัน รูปที่ 11 ค่าปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ (C_R value) ที่เหลือในสารละลาย แสดงให้เห็นการเสถียรภาพของไฟโคไซยานินมีลักษณะแบ่งออกเป็น 3 ช่วง ตามอุณหภูมิ ช่วงแรกอุณหภูมিরะหว่าง 26-43°C ไฟโคไซยานินมีการเสถียรภาพเพียงเล็กน้อย ช่วงที่สองอุณหภูมিরะหว่าง 47-64°C ค่า C_R ในสารละลายทั้ง 3 pH มีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว และเริ่มลดลงอย่างช้าๆ ในช่วงที่สามเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 64°C

ค่า C_R ที่เหลือในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 47°C มีค่าประมาณร้อยละ 83 ร้อยละ 94 และร้อยละ 87 ของปริมาณเริ่มต้น ตามลำดับ จากนั้นจะลดลงเหลือประมาณร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ 59°C และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 74°C ค่า C_R ที่เหลือในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 มีค่าประมาณร้อยละ 36 ร้อยละ 38 และร้อยละ 25 ของปริมาณเริ่มต้น ตามลำดับ



รูปที่ 11 ปริมาณไฟโคไซยานินหลังบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที (ข้อมูลดิบภาคผนวก ก.)

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะเร่งให้ไฟโคไซยานินเกิดการเสียด่างเร็วขึ้น สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่าครึ่งชีวิต (half-life values; $t_{1/2}$) ของไฟโคไซยานิน ที่พบมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วจาก 116.5 นาที (pH 5.0) 309.4 นาที (pH 6.0) และ 128.6 นาที (pH 7.0) ที่อุณหภูมิ 47°C เหลือประมาณ 9.4 นาที (pH 5.0) 28.1 นาที (pH 6.0) และ 8.9 นาที (pH 7.0) ที่อุณหภูมิ 64°C (ตารางที่ 4)

เมื่อพิจารณาความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 พบว่า ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 6.0 มีความคงตัวสูงสุด สำหรับไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 และ pH 7.0 พบว่า ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 43-59°C ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 7.0 มีความคงตัวสูงกว่าที่ pH 5.0 แต่หลังอุณหภูมิ 59°C ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 กลับมีความคงตัวสูงกว่าที่ pH 7.0 ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Antelo et al. (2008) ที่รายงานว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นไฟโคไซยานินจะคงตัวที่ pH ต่ำลง

ในอุตสาหกรรมอาหารมักใช้ความร้อนในการทำลายจุลินทรีย์ ความร้อนที่ใช้คือ อุณหภูมิระหว่าง 60-80°C วิธีการนี้เรียกว่า การพาสเจอร์ไรส์ (Pasteurization) เป็นการถนอมอาหารชั่วคราว การพาสเจอร์ไรส์มี 2 วิธี คือ (Grant et al., 2002)

1. การใช้ความร้อนต่ำ-เวลานาน (LTLT: Low Temperature-Long Time) วิธีนี้ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 62.8 - 65.6 °C นาน 30 นาที
2. การใช้ความร้อนสูง-เวลาสั้น (HTST: High Temperature-Short Time) วิธีนี้ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 72 °C นาน 15 วินาที

การนำไฟโคไซยานินไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มความคงตัวของไฟโคไซยานินภายใต้สภาวะที่ใช้พาสเจอร์ไรส์เป็นสิ่งที่ต้องพิจารณา ผลการทดลองในตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่า สภาวะที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST ไม่มีผลต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน นั่นคือหากผสมไฟโคไซยานินในผลิตภัณฑ์อาหารแล้วนำไปพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST ไฟโคไซยานินในผลิตภัณฑ์ยังคงมีปริมาณเหลือเกือบร้อยเปอร์เซ็นต์ โดยค่า C_R ที่เหลือในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 มีค่าประมาณร้อยละ 96-100 หลังอยู่ที่อุณหภูมิ 74 °C นาน 1 นาที อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถนำไฟโคไซยานินไปพาสเจอร์ไรส์ภายใต้สภาวะแบบ LTLT ได้ เนื่องจากไฟโคไซยานินเกิดการเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว

ตารางที่ 4 ค่า Degradation rate (k) และค่าครึ่งชีวิต (half-life values; $t_{1/2}$) ของไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0.

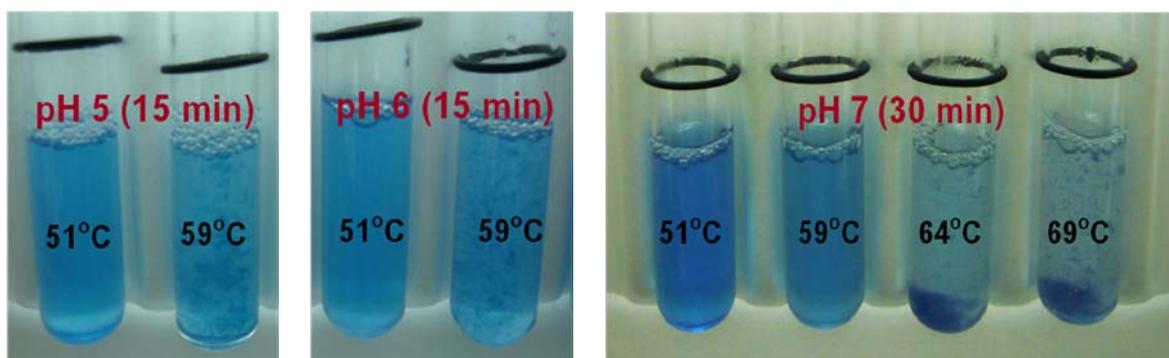
อุณหภูมิ (°C)	pH 5.0			pH 6.0			pH 7.0		
	k (min ⁻¹) × 10 ⁻³	$t_{1/2}$ (min)	r^2	k (min ⁻¹) × 10 ⁻³	$t_{1/2}$ (min)	r^2	k (min ⁻¹) × 10 ⁻³	$t_{1/2}$ (min)	r^2
47	6.0 ± 1.3	116.5 ± 22.3	0.91	2.2 ± 0.1	309.4 ± 12.0	0.93	5.4 ± 0.5	128.6 ± 13.3	0.90
51	11.2 ± 0.6	62.1 ± 3.1	0.94	4.1 ± 2.0	167.0 ± 39.1	0.97	6.4 ± 0.3	108.3 ± 28.0	0.92
55	20.2 ± 1.3	34.4 ± 2.2	0.90	7.5 ± 1.8	92.7 ± 23.2	0.90	14.6 ± 3.4	47.5 ± 8.9	0.96
59	32.0 ± 5.1	21.6 ± 3.6	0.94	15.0 ± 3.1	46.4 ± 9.7	0.94	30.9 ± 4.2	22.8 ± 2.7	0.89
64	73.5 ± 3.0	9.4 ± 2.6	0.93	24.7 ± 5.2	28.1 ± 5.4	0.93	77.6 ± 6.6	8.9 ± 0.9	0.98
69	92.8 ± 10.2	7.5 ± 1.7	0.94	48.1 ± 6.4	14.5 ± 4.2	0.94	115.6 ± 32.8	6.0 ± 1.7	0.93
74	106.8 ± 23.2	6.5 ± 1.4	0.91	70.7 ± 3.0	9.7 ± 1.6	0.91	136.1 ± 25.6	5.3 ± 1.0	0.84

ตารางที่ 5 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ในสารละลายที่อุณหภูมิต่างๆ

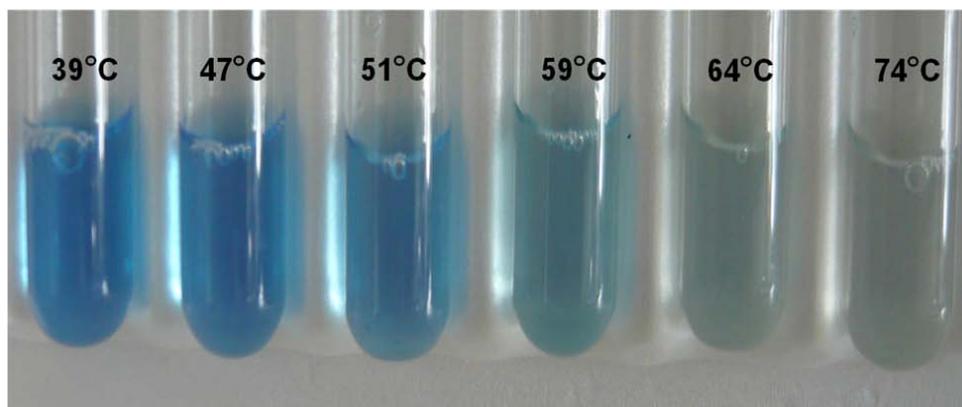
อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ (C_R , %) ที่								
	pH 5.0			pH 6.0			pH 7.0		
	1 (min)	2.5 (min)	5 (min)	1 (min)	2.5 (min)	5 (min)	1 (min)	2.5 (min)	5 (min)
51	nd ^a	nd	95 ± 6	nd	nd	97 ± 5	nd	nd	99 ± 2
55	nd	nd	84 ± 5	nd	nd	95 ± 5	nd	nd	96 ± 4
59	nd	nd	72 ± 9	nd	nd	91 ± 5	nd	nd	81 ± 12
64	98 ± 3	87 ± 6	62 ± 4	101 ± 4	99 ± 3	81 ± 7	101 ± 8	88 ± 7	75 ± 10
69	97 ± 1	83 ± 8	53 ± 4	100 ± 4	97 ± 3	73 ± 11	101 ± 7	86 ± 14	54 ± 10
74	96 ± 4	78 ± 11	47 ± 3	98 ± 3	91 ± 6	61 ± 4	101 ± 7	76 ± 15	41 ± 5

^a nd = ไม่ได้วิเคราะห์

อุณหภูมินอกจากทำให้ไฟโคไซยานินเกิดการสลายตัว ยังทำให้ไฟโคไซยานินในสารละลายเกิดการตกตะกอนด้วย โดยไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 และ pH 6.0 เริ่มสังเกตเห็นการจับตัวกันเกิดเป็นตะกอนสีเทาน้ำเงินหลังสารละลายอยู่ที่อุณหภูมิ 59°C นาน 15 นาที ขณะที่ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 7.0 เริ่มสังเกตเห็นตะกอนเมื่อบ่มสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 64°C นาน 30 นาที (รูปที่ 12) การศึกษาของ Jespersen et al. (2005) ก็พบไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 and pH 7.0 มีการตกตะกอนหลังบ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 45°C 50°C และ 55°C นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงถึงการเสียสภาพของโปรตีน โดยหากไฟโคไซยานินเสียสภาพมาก ลักษณะสีปรากฏของสารละลายจะมีลักษณะจางจนเกือบใส ดังรูปที่ 13



รูปที่ 12 ลักษณะการตกตะกอนของสารละลายไฟโคไซยานิน

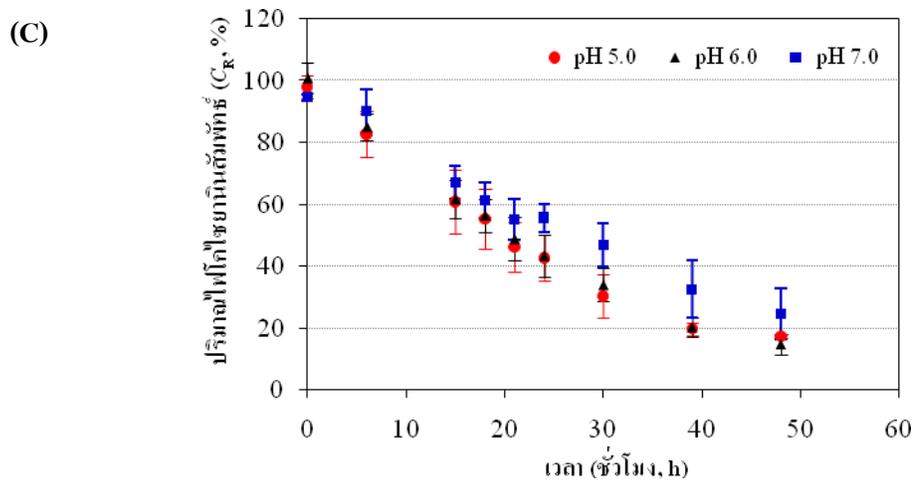
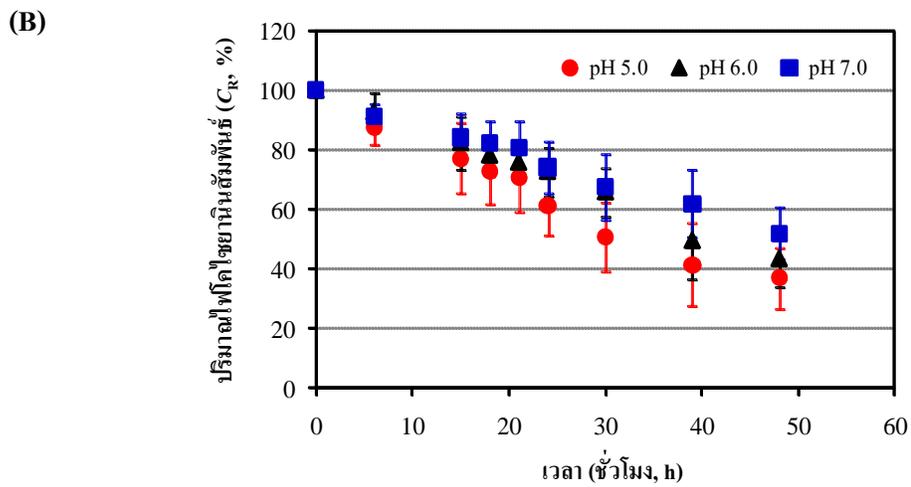
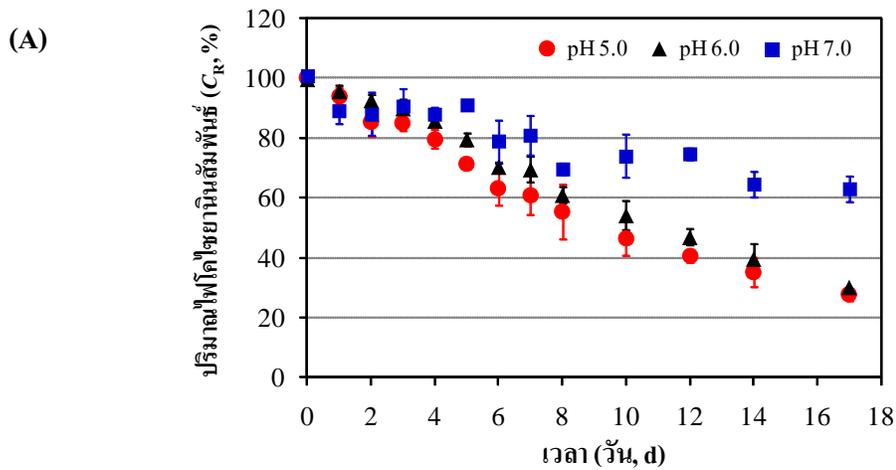


รูปที่ 13 ลักษณะสีสารละลายไฟโคไซยานิน pH 7.0 หลังบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 15 นาที

2. ผลของความเข้มแสง

ความเข้มแสงเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการเสถียรภาพของไฟโคไซยานิน เมื่อนำไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 ไปไว้ที่ความเข้มแสงต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ที่ความเข้มแสงทุกระดับไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 7.0 มีความคงตัวสูงกว่า pH 5.0 และ pH 6.0 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) หลังเก็บไฟโคไซยานินที่ความเข้มแสง $10 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ นาน 7 วัน ค่า C_R ที่เหลือในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 มีค่าประมาณร้อยละ 61 ร้อยละ 70 และร้อยละ 81 ของปริมาณเริ่มต้น ตามลำดับ และลดลงเหลือประมาณร้อยละ 35 ร้อยละ 40 และร้อยละ 65 ของปริมาณเริ่มต้น ตามลำดับ หลังเก็บนาน 14 วัน (รูปที่ 14A)

เมื่อความเข้มแสงสูงขึ้นจะเร่งให้ไฟโคไซยานินเกิดการเสถียรภาพเร็วขึ้น โดยเฉพาะในสารละลาย pH 5.0 ที่ค่า C_R ลดลงเหลือร้อยละ 62 และร้อยละ 43 หลังเก็บที่ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ และ $80 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และค่า C_R ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 37 และร้อยละ 18 ของปริมาณเริ่มต้น เมื่อเก็บที่ความเข้มแสงดังกล่าวตามลำดับนาน 48 ชั่วโมง (รูปที่ 14B และ 14C) และลักษณะสีฟ้าของไฟโคไซยานินในสารละลายมีลักษณะจางจนเกือบใส



รูปที่ 14 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ที่ความเข้มแสง $10 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A)

$40 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B) และ $80 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (C) (ข้อมูลดิบภาคผนวก ข)

การศึกษาค่า kinetic first order พบว่า ค่า degradation rate constant (k) ของไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 ที่ความเข้มแสง $10 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ $40 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ และ $80 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ มีค่าประมาณ 67.7×10^{-3} ต่อวัน (d^{-1}) 22.1×10^{-3} ต่อชั่วโมง (h^{-1}) และ 37.5×10^{-3} ต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยค่า degradation rate constant ของไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 6.0 มีค่าต่ำกว่า pH 5.0 ขณะที่ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 7.0 มีค่า degradation rate constant ต่ำที่สุด คือมีค่าประมาณ 36.5×10^{-3} ต่อวัน 14.6×10^{-3} ต่อชั่วโมง และ 26.4×10^{-3} ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ค่าครึ่งชีวิตของไฟโคไซยานินพบว่า ที่ความเข้มแสงสูงสุดไฟโคไซยานินจะมีค่าครึ่งชีวิตต่ำสุด ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 มีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 10.7 วัน 13.1 วัน และ 22.5 วัน ตามลำดับ ที่ความเข้มแสง $10 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ เมื่อไฟโคไซยานินสัมผัสแสงที่ความเข้มเพิ่มขึ้นเป็น $40 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ค่าครึ่งชีวิตของไฟโคไซยานินลดลงเหลือประมาณ 33.9 ชั่วโมง 43.7 ชั่วโมง และ 48.7 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้นเป็น $80 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ค่าครึ่งชีวิตของไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 ลดลงเหลือเพียง 19.9 ชั่วโมง 20.7 ชั่วโมง และ 28.0 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า หากไฟโคไซยานินสัมผัสแสงที่ความเข้มสูงขึ้น อัตราการเสียหายของไฟโคไซยานินก็เกิดเร็วขึ้น การศึกษาของ Jespersen et al. (2005) ก็ให้ผลทำนองเดียวกัน กล่าวคือเมื่อไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 และ pH 7.0 สัมผัสแสงที่ความเข้มสูงถึง 3×10^5 ลักซ์ หรือประมาณ $6600 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ไฟโคไซยานินจะเสียหายอย่างรวดเร็วถึงร้อยละ 80 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบเก็บสารละลายไฟโคไซยานินในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง และในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4°C มีแสงเล็กน้อยความเข้มแสงต่ำกว่า $10 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ พบว่าสามารถยืดอายุการเก็บสารละลายไฟโคไซยานินได้ โดยค่า C_R ที่เหลือในสารละลายที่เก็บในที่มืดนาน 10 วัน มีค่าลดลงจากปริมาณเริ่มต้นเพียงร้อยละ 12-20 (ตารางที่ 7) ขณะที่การเก็บสารละลายไฟโคไซยานินที่ความเข้มแสง $10 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ เป็นระยะเวลา 10 วัน เท่ากัน ค่า C_R มีค่าลดลงจากปริมาณเริ่มต้นถึงร้อยละ 30-50 (รูปที่ 14A) สำหรับการเก็บสารละลายไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ 4°C แสงเล็กน้อยพบว่า สารละลายไฟโคไซยานินที่เก็บนาน 60 วัน ค่า C_R มีค่าลดลงจากปริมาณเริ่มต้นเพียงร้อยละ 5-14 เท่านั้น และสามารถเก็บได้นานประมาณ 120 วัน โดยค่า C_R ที่เหลือในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 มีค่าประมาณร้อยละ 73 ร้อยละ 88 และร้อยละ 83 ของปริมาณเริ่มต้นตามลำดับ (ตารางที่ 7)

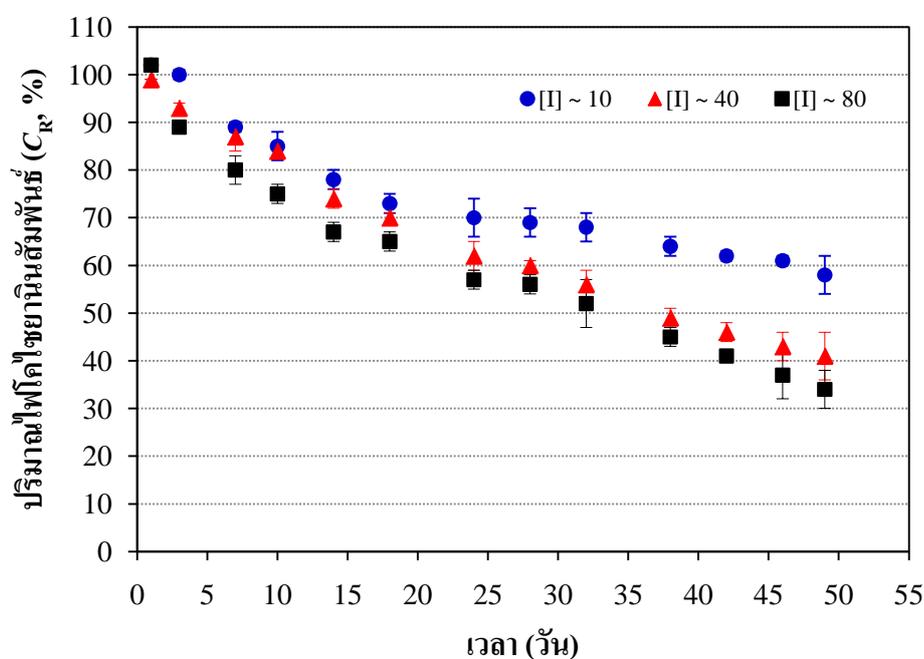
ตารางที่ 6 ค่า Degradation rate (k) และค่าครึ่งชีวิต (half-life values; $t_{1/2}$) ของไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0.

pH	ความเข้มแสง 10 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$			ความเข้มแสง 40 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$			ความเข้มแสง 80 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$		
	$k(\text{d}^{-1}) \times 10^{-3}$	$t_{1/2}(\text{d})$	r^2	$k(\text{h}^{-1}) \times 10^{-3}$	$t_{1/2}(\text{h})$	r^2	$k(\text{h}^{-1}) \times 10^{-3}$	$t_{1/2}(\text{h})$	r^2
5.0	67.7 \pm 15.0	10.7 \pm 2.5	0.99	22.1 \pm 5.6	33.9 \pm 11.0	0.99	37.5 \pm 11.7	19.9 \pm 5.9	0.98
6.0	56.4 \pm 14.7	13.1 \pm 4.5	0.98	16.5 \pm 5.1	43.7 \pm 11.2	0.99	35.0 \pm 7.3	20.7 \pm 4.6	0.97
7.0	36.5 \pm 24.7	22.5 \pm 6.9	0.84	14.6 \pm 4.9	48.7 \pm 13.9	0.98	26.4 \pm 6.3	28.0 \pm 8.2	0.96

ตารางที่ 7 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์ที่สภาวะต่างๆ

pH	ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์ (C_R , %) ที่							
	อุณหภูมิห้อง-มืด			4 ^o C- แสงเล็กน้อย				
	1 วัน	2 วัน	10 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน	120 วัน	
5.0	95 \pm 3	90 \pm 5	88 \pm 4	99 \pm 3	86 \pm 5	77 \pm 11	73 \pm 17	
6.0	98 \pm 1	91 \pm 3	84 \pm 8	101 \pm 3	92 \pm 5	90 \pm 5	88 \pm 6	
7.0	96 \pm 3	92 \pm 4	79 \pm 16	103 \pm 4	95 \pm 7	89 \pm 19	83 \pm 24	
การวิเคราะห์เชิงสถิติ	pH 5.0 6.0 และ 7.0, P value = 0.6167			pH 5.0 6.0 และ 7.0, P value = 0.0005, pH 5.0 และ 6.0, P value = 0.0002				
				pH 5.0 และ 7.0, P value = 0.0258, pH 6.0 และ 7.0, P value = 0.8414				

สำหรับความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานินแห้งพบว่า สารสกัดไฟโคไซยานินแห้งมีอัตราการเสถียรภาพสูงกว่าสารสกัดไฟโคไซยานินที่อยู่ในรูปสารละลาย หลังเก็บสารสกัดไฟโคไซยานินแห้งที่ความเข้มแสง $10 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ และ $40 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ นาน 10 วัน ค่า C_R ลดลงจากปริมาณเริ่มต้นเพียงร้อยละ 15 แต่หากเก็บสารสกัดไฟโคไซยานินแห้งที่ความเข้มแสง $80 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ระยะเวลาการเก็บเท่ากัน พบว่า ไฟโคไซยานินมีการเสถียรภาพมากกว่า โดยค่า C_R ลดลงจากปริมาณเริ่มต้นประมาณร้อยละ 25 และเมื่อเก็บสารสกัดไฟโคไซยานินแห้งที่ความเข้มแสง $10 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ $40 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ และ $80 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ นานเป็นเวลา 32 วัน ค่า C_R มีค่าลดลงเหลือประมาณร้อยละ 68 ร้อยละ 56 ร้อยละ 52 ของปริมาณเริ่มต้น ตามลำดับ (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินแห้งที่ความเข้มแสงต่างๆ (ข้อมูลดิบภาคผนวก ค)

3. ผลของชนิดบัฟเฟอร์ และผลของ pH

3.1 ผลของชนิดบัฟเฟอร์

การสืบค้นงานวิจัยที่ผ่านมา การศึกษาความคงตัวของไฟโคไซยานินมีการใช้ชนิดบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน การศึกษานี้จึงต้องการทดสอบว่า สารละลายบัฟเฟอร์คนละชนิด แต่มีค่า pH เท่ากัน จะมีผลต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินแตกต่างกันหรือไม่ ชนิดบัฟเฟอร์ที่ศึกษาคือ

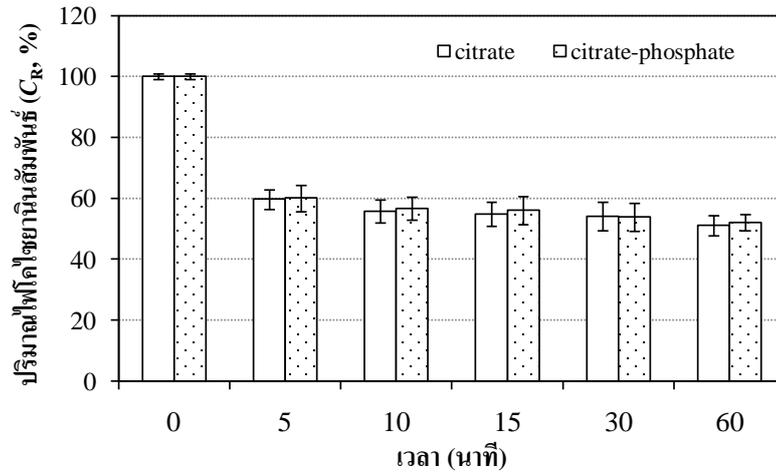
pH 5.0 ใช้สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ และสารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

pH 6.0 ใช้สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ สารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

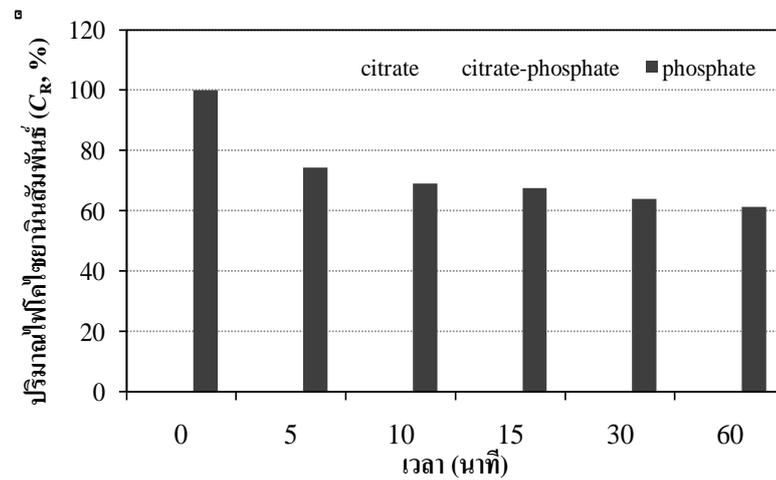
pH 7.0 ใช้สารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

หลังละลายสารสกัดไฟโคไซยานินแห้งในสารละลาย pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 ชนิดต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 60°C พบว่า ทุกค่า pH ที่ศึกษา ความคงตัวของไฟโคไซยานินในสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ภายในระยะเวลา 5 นาที หลังบ่มสารละลายไฟโคไซยานินที่ 60°C ค่า C_R ที่เหลือในสารละลาย pH 5.0 ทั้งสองชนิด และสารละลาย pH 7.0 ทั้งสองชนิด มีค่าประมาณร้อยละ 60 ของปริมาณเริ่มต้น ขณะที่ค่า C_R ที่เหลือในสารละลาย pH 6.0 ทั้งสามชนิด มีค่าประมาณร้อยละ 70-74 ของปริมาณเริ่มต้น (รูปที่ 16) นั่นคือ ชนิดของบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน

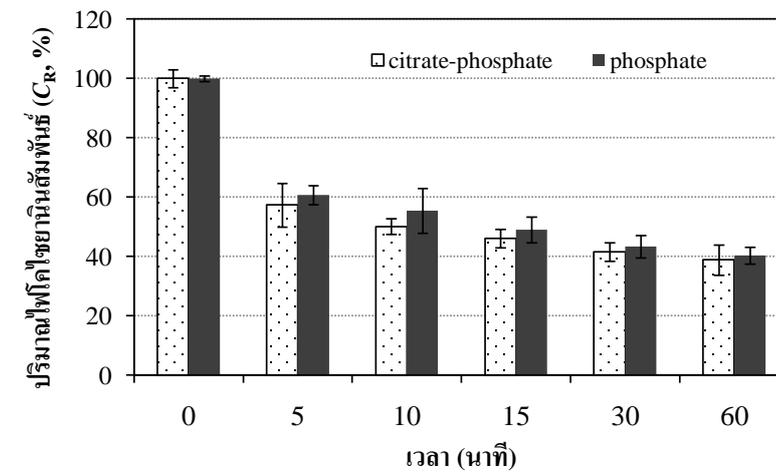
(A) pH 5.0



(B) pH 6.0



(C) pH 7.0



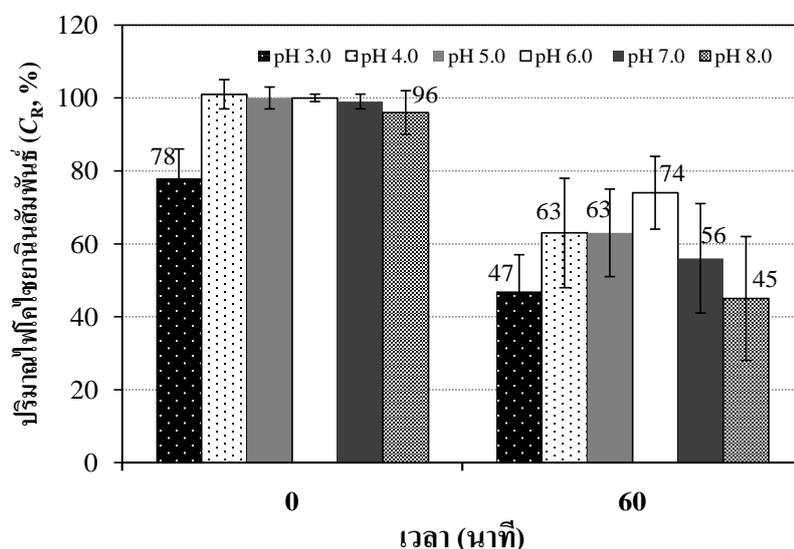
รูปที่ 16 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ในบัพเฟอร์ชนิดต่างๆที่ pH 5.0 (A) pH 6.0 (B) และ pH 7.0 (C)
(ข้อมูลดิบภาคผนวก ง)

3.2 ผลของ pH

การศึกษาผลของ pH ต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน เป็นการทดสอบตั้งแต่ pH 3.0 จนถึง pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 60°C โดย pH 3.0 และ pH 4.0 ใช้สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 5.0 pH 6.0 และ pH 7.0 ใช้สารละลายซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์และ pH 8.0 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งสามชนิดไม่มีความแตกต่างกันดังผลที่แสดงข้างต้น

ผลการทดลองพบว่า สารสกัดไฟโคไซยานินไม่ละลายในสารละลายที่มีค่า pH เป็นกรด คือ pH 3.0 และ pH 4.0 โดยค่า C_R ที่เหลือในสารละลาย pH 3.0 มีค่าลดลงทันทีหลังละลายถึงร้อยละ 22 และจากการสังเกตลักษณะสารละลายจะพบไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 4.0 มีลักษณะเป็นสีฟ้าขุ่น ขณะที่ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 7.0 มีลักษณะสีฟ้าใส บ่งบอกความสามารถในการละลายของไฟโคไซยานิน และเนื่องจากไฟโคไซยานินสามารถละลายได้ดีที่ pH 7.0 จึงทำให้การสกัดไฟโคไซยานินมักนิยมสกัดด้วยสารละลายที่มีค่า pH 7.0 (Antelo et al., 2008)

หลังบ่มสารละลายไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ 60°C นาน 60 นาที ค่า C_R ที่เหลือในสารละลาย pH 3.0 และ pH 8.0 มีค่าประมาณร้อยละ 45-47 สารละลาย pH 7.0 มีค่าประมาณร้อยละ 56 และในสารละลาย pH 4.0 และ pH 5.0 มีค่าประมาณร้อยละ 63 ขณะที่ในสารละลาย pH 6.0 มีค่า C_R สูงสุด โดยมีประมาณร้อยละ 74 ของปริมาณเริ่มต้น (รูปที่ 17)



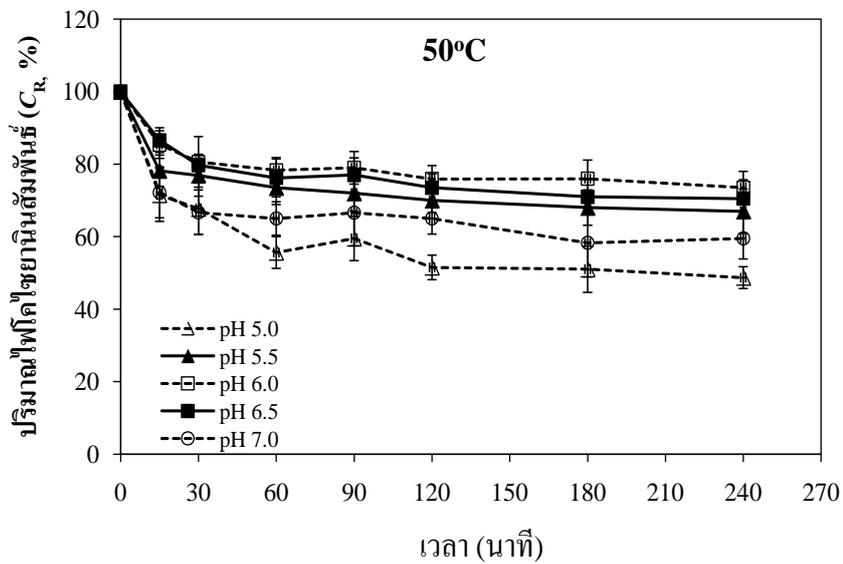
รูปที่ 17 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ในสารละลาย pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 60°C (ข้อมูลดิบภาคผนวก จ)

จากผลการทดลองด้านอุณหภูมิและการสืบค้นงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ไฟโคไซยานินกลับมีความคงตัวที่ pH ต่ำลง และผลการทดลองข้างต้นที่ไฟโคไซยานินไม่ละลายในสภาวะกรด รวมทั้งไม่มีความคงตัวที่ pH 8.0 ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงทดสอบความคงตัวของไฟโคไซยานินในสารละลายที่มีค่า pH ต่างกัน 5 ค่า คือ pH 5.0 pH 5.5 pH 6.0 pH 6.5 และ pH 7.0 โดยใช้สารละลายชนิดเดียวกันคือ สารละลายซิงเกิล-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทดสอบที่อุณหภูมิ 50 °C และ 60°C

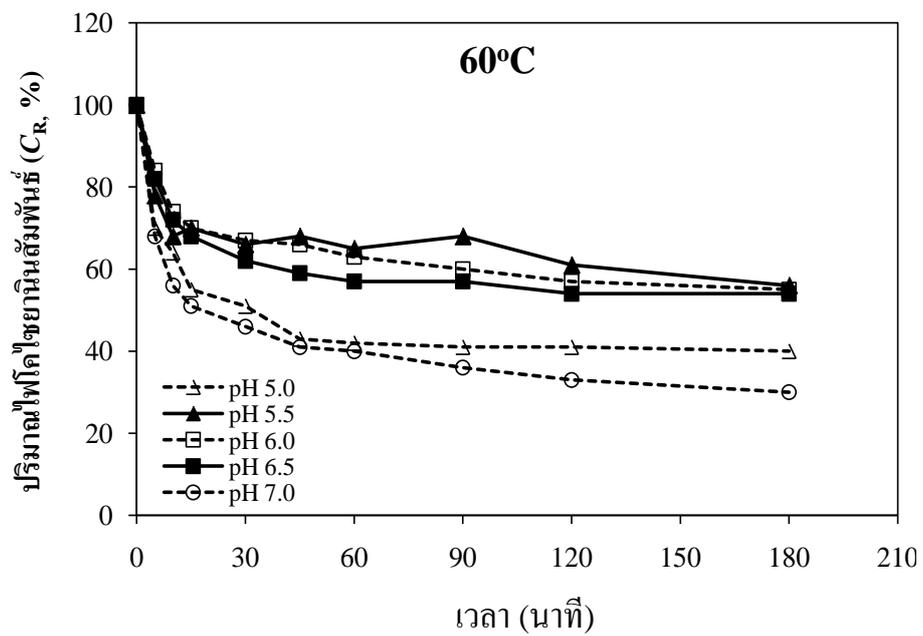
ผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 50 °C ไฟโคไซยานินมีความคงตัวสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ในสารละลาย pH 6.0 และมีความคงตัวต่ำสุดที่ pH 5.0 หลังบ่มที่ 50°C นาน 120 นาที ค่า C_R ในสารละลาย pH 5.5 และ pH 6.5 มีค่าลดลงจากปริมาณเริ่มต้นประมาณร้อยละ 30 (รูปที่ 18A) สำหรับที่อุณหภูมิ 60°C ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.5 มีความคงตัวสูงกว่าไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 6.0 และ pH 6.5 อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 และ pH 7.0 มีความคงตัวต่ำ หลังบ่มที่ 60°C นาน 15 นาที ค่า C_R ในสารละลาย pH 5.5 จะลดลงอย่างรวดเร็วจาก 100 ในตอนเริ่มต้นเหลือร้อยละ 70 และค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่องจนเหลือประมาณร้อยละ 55 ของปริมาณเริ่มต้นหลังจากผ่านไป 180 นาที (รูปที่ 18B)

ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Antelo et al. (2008) ที่รายงานว่า ระหว่างอุณหภูมิ 50-55°C ไฟโคไซยานินมีความคงตัวในสารละลาย pH 6.0 แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นคือ ระหว่างอุณหภูมิ 57-65°C ไฟโคไซยานินกลับมีความคงตัวสูงสุดในสารละลาย pH 5.0 ทั้งนี้มีรายงานว่า ค่า pH และความเข้มข้นของไฟโคไซยานินในสารละลายมีผลต่อการปรากฏรูปเป็นโมโนเมอร์ ไตรเมอร์ หรือ เฮกซะเมอร์ โดยไฟโคไซยานินในรูปเฮกซะเมอร์มีความคงตัวสูงสุด อย่างไรก็ตาม ไฟโคไซยานินในรูปเฮกซะเมอร์สามารถเปลี่ยนรูปเป็นไตรเมอร์ได้เมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น อาทิเช่น ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 6.0 จะพบรูปไตรเมอร์ประมาณร้อยละ 23 และรูปเฮกซะเมอร์ประมาณร้อยละ 77 แต่เมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นเป็น 7.0 จะพบรูปไตรเมอร์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 82 (Kao et al., 1975; Adams et al., 1979) ถึงแม้งานวิจัยส่วนใหญ่พบว่า pH ของสารละลายในช่วง 5.0-6.0 เหมาะสมกับการรักษาคุณสมบัติของไฟโคไซยานิน และไฟโคไซยานินมีความคงตัวสูงสุด เนื่องจากมักพบไฟโคไซยานินในรูปเฮกซะเมอร์ในช่วง pH ดังกล่าว ขณะที่การศึกษานี้พบไฟโคไซยานินมีความคงตัวสูงสุดในช่วง pH 5.5- 6.0 และมีความคงตัวต่ำในสารละลาย pH 5.0 ซึ่งอาจมาวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน โดยงานวิจัยที่ผ่านมาใช้การตกตะกอนไฟโคไซยานินด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ขณะที่การศึกษานี้ใช้การแยกไฟโคไซยานินด้วยเยื่อแผ่นสังเคราะห์ จึงอาจทำให้ได้ไฟโคไซยานินที่ได้มีคุณสมบัติและอยู่ในรูปต่างๆปนกัน

(A)



(B)



รูปที่ 18 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ในสารละลาย pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50°C (A) และ 60°C (B)
(ข้อมูลดิบภาคผนวก ก)

4. ผลการเติมสารถนอมอาหาร (preservative)

สารพวกน้ำตาล เกลือ และน้ำส้ม นิยมนำมาใช้ถนอมอาหารมาเป็นเวลานาน ปัจจุบันมีสารถนอมอาหารหรือสารกันเสีย (preservatives) อื่นๆอีกหลายชนิดที่ได้รับอนุญาตให้ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร โดยกำหนดปริมาณการใช้ของสารแต่ละชนิดเพื่อไม่ให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้บริโภค งานวิจัยที่ผ่านมาักเติมโซเดียมเอไซด์ความเข้มข้น 0.05% ในสารสกัดไฟโคไซยานิน เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แต่เนื่องจากสารนี้มีความเป็นพิษ จึงไม่นิยมใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้จะทดสอบใช้โซเดียมเอไซด์โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นสารเปรียบเทียบกับสารถนอมอาหารอื่นๆ ต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน

ผลการทดสอบเติมสารชนิดต่างๆ ในสารละลายไฟโคไซยานิน pH 6.0 และ pH 7.0 พบว่า สารกลุ่มน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์คือ กลูโคส ซูโครส ซอร์บิทอล และเกลือโซเดียมคลอไรด์ สามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของไฟโคไซยานินในสารละลาย โดยหลังบ่มสารละลายไฟโคไซยานิน ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที ปริมาณไฟโคไซยานินที่เหลือในสารละลายที่เติมสารดังกล่าวมีค่าสูงกว่า control (พิจารณาจากค่าปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์, C_R) ค่า C_R ที่เหลือในสารละลาย pH 6.0 ที่เติม กลูโคส 20% ซูโครส 20% ซอร์บิทอล 20% มีค่าสูงกว่า control ประมาณร้อยละ 5-10 ขณะที่ค่า C_R ที่เหลือในสารละลาย pH 7.0 ที่เติมกลูโคส 20% ซูโครส 20% ซอร์บิทอล 20% มีค่าสูงกว่า control ประมาณร้อยละ 27-38 สำหรับ ค่า C_R ที่เหลือในสารละลายที่เติมโซเดียมคลอไรด์มีค่าสูงกว่า control มากกว่าร้อยละ 20 ทั้งที่ pH 6.0 และ pH 7.0 (ตารางที่ 8) อย่างไรก็ตามพบว่า การเติมกลูโคส ซูโครส ซอร์บิทอล และโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 20% มีผลทำให้ปริมาณไฟโคไซยานินในสารละลายที่เวลาเริ่มต้นลดลงประมาณร้อยละ 15 เมื่อเทียบกับ control ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของน้ำตาลและเกลือที่เติมมีค่าสูง จึงส่งผลทำให้ไฟโคไซยานินเสถียรภาพได้เช่นกัน นอกจากนี้ การเติมโซเดียมคลอไรด์ยังมีผลทำให้ค่า pH ของสารละลายลดลงด้วย

สารกลุ่มกรดที่ทดสอบคือ กรดแอสคอร์บิก กรดซิตริก และกรดเบนโซอิก พบว่า การเติมกรดดังกล่าวที่ความเข้มข้น 0.4% มีผลทำให้ค่า pH ของสารละลายลดลงประมาณ 1.0-1.5 ยกเว้น กรดซอร์บิกที่ไม่มีผลต่อค่า pH ของสารละลาย โดยสารกลุ่มกรดทุกชนิดที่ทดสอบไม่มีผลช่วยเพิ่มความคงตัวของไฟโคไซยานิน แม้ว่าค่า C_R ที่เหลือในสารละลาย pH 7.0 ที่เติมกรดซิตริกจะมีค่าสูงกว่า control นั่นเป็นผลมาจากค่า pH ของสารละลายที่ลดลงจาก 7.1 เหลือ 5.7 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับค่า pH (5.5) ที่ไฟโคไซยานินมีความคงตัวสูงสุดที่อุณหภูมิ 60°C เพราะเมื่อเติมกรดซิตริกที่ความเข้มข้นเดียวกันในสารละลาย pH 6.0 เมื่อค่า pH ของสารละลายลดลงจาก 6.0 เหลือ 4.5 ปริมาณไฟโคไซยานินในสารละลายมีการเสถียรภาพมากกว่า control

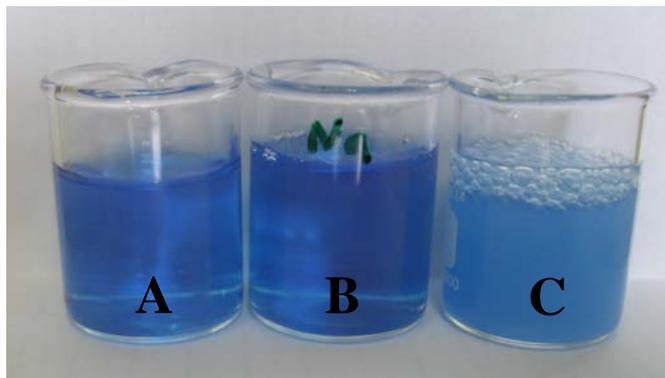
สำหรับสารชนิดอื่นๆที่ทดสอบ นอกจากไม่มีผลช่วยเพิ่มความคงตัวของไฟโคไซยานิน ยังพบว่า การเติมโพลีเอธิลีนไกลคอล 20% และกลีเซอรอล 20% มีผลทำให้ปริมาณไฟโคไซยานินในสารละลายที่เวลาเริ่มต้นลดลงด้วยเมื่อเทียบกับ control

ตารางที่ 8 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ในสารละลายที่เติมสารชนิดต่างๆ

สารที่เติม (w/v)	ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ (C_R , %) ที่					
	pH 6.0			pH 7.0		
	pH ^a	0 นาที	30 นาที	pH ^a	0 นาที	30 นาที
control	6.0 ± 0.1	100	63 ± 6	7.1 ± 0.1	100	44 ± 3
กลูโครส 2%	6.0 ± 0.1	95 ± 7	63 ± 6	-	-	-
กลูโครส 20 %	6.0 ± 0.1	86 ± 6	68 ± 7	6.8 ± 0.1	88 ± 4	61 ± 4
ซูโครส 0.4 %	6.2 ± 0.1	97 ± 9	65 ± 11	-	-	-
ซูโครส 20 %	6.0 ± 0.1	85 ± 8	66 ± 6	6.9 ± 0.1	87 ± 4	56 ± 5
ซอร์บิทอล 0.4 %	6.2 ± 0.1	96 ± 6	63 ± 8	-	-	-
ซอร์บิทอล 20 %	6.0 ± 0.1	88 ± 7	64 ± 5	6.9 ± 0.1	85 ± 4	59 ± 3
กรดแอสคอร์บิก 0.4 %	5.1 ± 0.1	90 ± 10	43 ± 5	6.6 ± 0.0	100 ± 6	55 ± 3
กรดซิตริก 0.4 %	4.5 ± 0.0	93 ± 7	47 ± 7	5.7 ± 0.1	100 ± 4	76 ± 6
กรดซอร์บิก 0.4%	6.2 ± 0.1	94 ± 8	60 ± 5	7.1 ± 0.1	100 ± 2	42 ± 4
กรดเบนโซอิก 0.4%	4.5 ± 0.1	91 ± 15	60 ± 8	-	-	-
โซเดียมคลอไรด์ 20%	4.7 ± 0.0	85 ± 6	82 ± 7	5.7 ± 0.0	91 ± 5	79 ± 4
โซเดียมเอไซด์ 0.05%	6.3 ± 0.0	98 ± 6	65 ± 6	7.1 ± 0.1	98 ± 3	43 ± 0
โพลีเอธิลีนไกลคอล 1.8 %	5.9 ± 0.1	98 ± 8	63 ± 5	7.1 ± 0.1	99 ± 3	42 ± 4
โพลีเอธิลีนไกลคอล 20%	6.3 ± 0.1	81 ± 6	58 ± 6	7.3 ± 0.0	83 ± 6	35 ± 4
กลีเซอรอล 20%	6.1 ± 0.1	76 ± 4	57 ± 7	7.1 ± 0.1	78 ± 3	47 ± 2

^a pH หลังเติมสารจนมอาหาร

ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Antelo et al. (2008) ที่รายงานว่า การเติมซอร์บิทอล 10-50% สามารถเพิ่มค่าครึ่งชีวิตของไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ 62°C เช่นเดียวกับ Mishra et al. (2008) พบว่า แคลเซียมคลอไรด์ และซูโครสช่วยรักษาความคงตัวของไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ ต่ำ (0°C) และการเติมกรดซิตริก 0.4% ในสารละลาย pH 7.0 สามารถรักษาความคงตัวของไฟโคไซยานินที่ 35°C ขณะที่การศึกษานี้พบว่า ไม่สามารถใช้แคลเซียมคลอไรด์กับสารสกัดไฟโคไซยานินที่เตรียมได้ โดยทันทีที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ไฟโคไซยานินในสารละลายจะเกิดการจับตัวกันคล้ายเจล (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 สารละลายไฟโคไซยานินไม่ได้เติมสาร (control) (A) เติมโซเดียมคลอไรด์ 2.5% (B) เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.25% (C)

เมื่อพิจารณาผลการทดลองข้างต้นและราคาของสารที่ทดสอบ ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงนำเฉพาะกลูโคส ซูโครส และโซเดียมคลอไรด์ ไปทดสอบผลที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน และทดสอบเฉพาะที่สารละลาย pH 7.0 โดยมีแนวคิดที่ว่า เมื่อทราบชนิดและปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสม สามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับสารสกัดไฟโคไซยานินเข้มข้นที่อยู่ในสารละลาย pH 7.0 (ที่ได้หลังจากขั้นตอน microfiltration และ ultrafiltration) ได้เลยโดยไม่ต้องผ่านการทำแห้ง

ผลการทดลองพบว่า การเติมกลูโคส ซูโครส และโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10% เริ่มมีผลทำให้ค่า C_R ในสารละลายลดลงทันทีหลังเติมสารจากปริมาณเริ่มต้น 100 เหลือร้อยละ 93 ร้อยละ 89 และร้อยละ 95 ตามลำดับ และเมื่อความเข้มข้นของสารที่เติมเพิ่มขึ้น ค่า C_R ในสารละลายก็ลดลงมากขึ้น ทั้งนี้การเติมโซเดียมคลอไรด์ยังมีผลทำให้ค่า pH ของสารละลายลดลงตั้งแต่การเติมที่ความเข้มข้น 2.5% (ตารางที่ 9)

หลังบ่มสารละลายไฟโคไซยานินที่เติมสารที่ความเข้มข้นต่างๆที่อุณหภูมิ 60°C นาน 15 นาที พบว่าค่า C_R ที่เหลือในสารละลายที่เติมกลูโคสหรือซูโครสที่ความเข้มข้น 20% หรือการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 2.5% มีค่าสูงกว่า control (0%) อย่างมีนัยสำคัญ ค่า C_R ที่เหลือในสารละลายที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5% มีค่าสูงสุดประมาณร้อยละ 82 ขณะที่สารละลายที่เติมกลูโคสหรือซูโครสที่ความเข้มข้น 10-40% จะมีค่า C_R เหลือในสารละลายประมาณร้อยละ 54-74 ซึ่งสูงกว่า control ที่เหลือเพียงร้อยละ 47 ของปริมาณเริ่มต้น (รูปที่ 20)

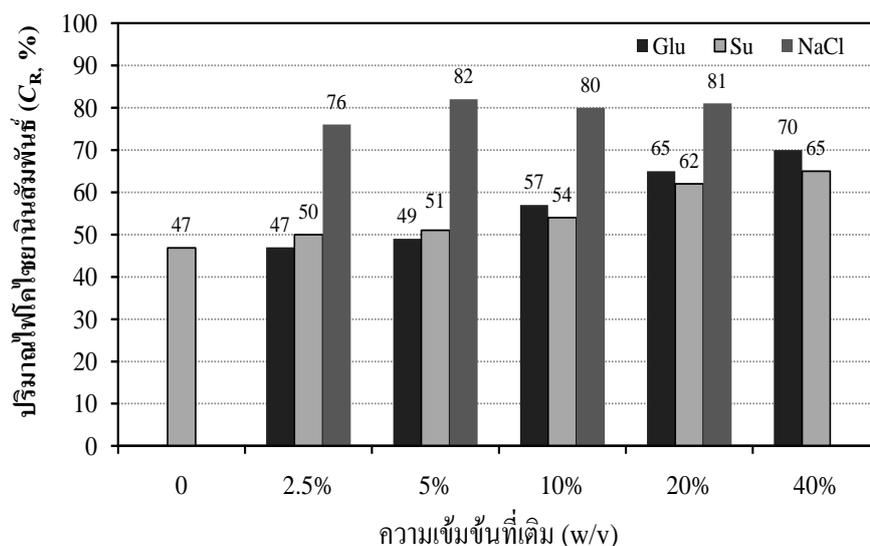
นอกจากนี้ ค่าครึ่งชีวิตของไฟโคไซยานินในสารละลายที่เติมกลูโคสหรือซูโครสที่ความเข้มข้น 10-40% ก็มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 19 นาที เป็นประมาณ 21.2-44.2 นาที ตามความเข้มข้นที่เติม ขณะที่ค่าครึ่งชีวิตของไฟโคไซยานินในสารละลายที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2.5% มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 67.7 นาที (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 ค่า pH และปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ในสารละลายที่เติมสารความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (%, w/v)	กลูโคส		ซูโครส		โซเดียมคลอไรด์	
	pH ^a	ค่า C_R (%) ^b	pH ^a	ค่า C_R (%) ^b	pH ^a	ค่า C_R (%) ^b
0	7.0 ± 0.1	100	7.0 ± 0.1	100	7.0 ± 0.1	100
2.5	7.0 ± 0.1	98 ± 6	7.0 ± 0.1	99 ± 6	6.7 ± 0.1	101 ± 3
5	6.9 ± 0.1	97 ± 5	7.0 ± 0.1	96 ± 3	6.5 ± 0.1	99 ± 3
10	6.9 ± 0.1	93 ± 5	6.9 ± 0.1	89 ± 5	6.2 ± 0.1	95 ± 2
20	6.8 ± 0.1	89 ± 4	6.7 ± 0.2	85 ± 4	5.8 ± 0.1	92 ± 4
40	6.6 ± 0.1	83 ± 7	6.7 ± 0.1	79 ± 5	-	-

^a pH หลังเติมสารอาหาร

^b ค่า C_R เริ่มต้นหลังเติมสารอาหาร



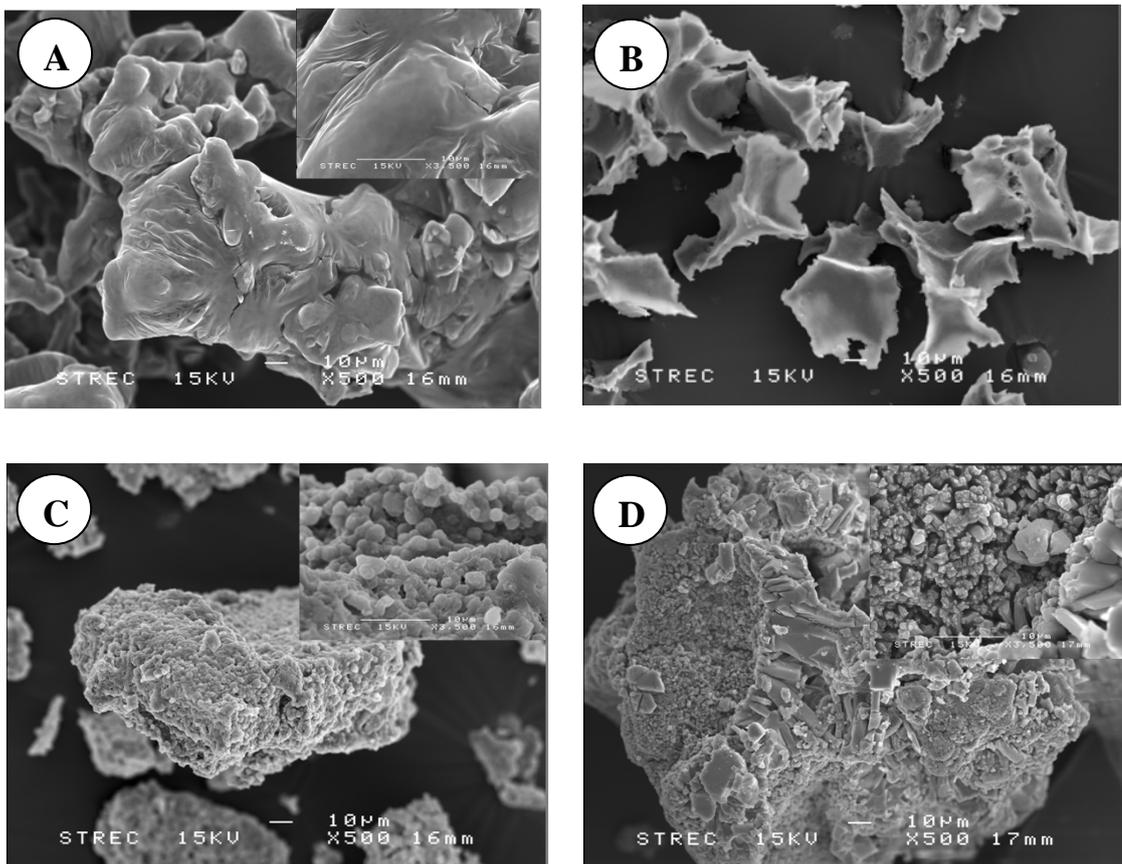
รูปที่ 20 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ในสารละลายที่เติมสารความเข้มข้นต่างๆ หลังบ่มที่ 60°C นาน 15 นาที (ข้อมูลดิบภาคผนวก ข)

ตารางที่ 10 ค่า Degradation rate (k) และค่าครึ่งชีวิต (half-life values; $t_{1/2}$) ของไฟโคไซยานินในสารละลายที่เติมสารความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (% w/v)	กลูโครส			ซูโครส			โซเดียมคลอไรด์		
	k (min^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)	k (min^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)	k (min^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)
0	0.0362	0.99	19.1 ± 6.1	-	-	-	-	-	-
2.5	0.0362	0.95	19.1 ± 5.0	0.0352	0.99	19.7 ± 2.8	0.0102	0.94	67.7 ± 1.0
5	0.0365	0.98	19.0 ± 2.8	0.0311	0.81	22.3 ± 2.0	0.0079	0.93	87.8 ± 6.6
10	0.0327	0.97	21.2 ± 4.6	0.0296	0.93	23.4 ± 3.2	0.0088	0.95	78.2 ± 10.6
20	0.0206	0.93	33.6 ± 5.0	0.0231	0.82	30.0 ± 4.6	0.0101	0.95	68.5 ± 14.6
40	0.0157	0.98	44.2 ± 6.1	0.0173	0.96	40.0 ± 5.9	-	-	-

แม้ว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ 5% จะช่วยให้ค่า C_R ที่เหลือในสารละลายมีค่าสูงสุด แต่การเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นดังกล่าว พบว่า ไฟโคลิซานินเริ่มมีการตกตะกอนเล็กน้อย โดยสารละลายมีลักษณะขุ่น ดังนั้นชนิดและความเข้มข้นสารที่คาดว่าเหมาะสมคือ การเติมกลูโคส หรือซูโครสที่ความเข้มข้น 20% หรือเติมโซเดียมคลอไรด์ 2.5% เพื่อเพิ่มความคงตัวของไฟโคลิซานิน

การศึกษาคุณลักษณะภายใต้กล้อง scanning electron microscopic (SEM) พบว่า ไฟโคลิซานินที่อยู่ในสภาวะอุณหภูมิปกติจะมีผิวค่อนข้างเรียบ (รูปที่ 21A) เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C ความร้อนจะทำให้ไฟโคลิซานินเสียสภาพโดยมีลักษณะแตกหัก (รูปที่ 21B) ขณะที่ไฟโคลิซานินในสารละลายที่เติมน้ำตาลหรือเกลือจะพบมีน้ำตาลหรือเกลือไปเคลือบที่บริเวณผิวของไฟโคลิซานิน (รูปที่ 21C และ D) ซึ่งช่วยรักษาป้องกันและยืดระยะเวลาการเสถียรภาพของไฟโคลิซานินจากความร้อน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไฟโคลิซานินหลังบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 15 นาที จึงพบค่า C_R ที่เหลือในสารละลายที่เติมน้ำตาลหรือเกลือ มีค่าสูงในสารละลายที่ไม่ได้เติมสาร



รูปที่ 21 ลักษณะภายใต้กล้อง SEM images (กำลังขยาย 500X) ของไฟโคลิซานินที่สภาวะปกติ (A) ไฟโคลิซานินที่เสถียรภาพ (B) ไฟโคลิซานินที่เติมซูโครส 20% (C) และไฟโคลิซานินที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2.5% (D) ภาพเล็กมุมขวาของรูป A C และ D เป็นภาพขยายที่ 3500X

การศึกษาความคงตัวของโปรตีนโดยการเติมน้ำตาล Arakawa and Timasheff (1982) พบว่าการเติมน้ำตาลทำให้เกิดพลังงานอิสระบวก (positive free-energy change) ซึ่งพลังงานบวกนี้จะรวมเข้าไปในปฏิกิริยา ส่งผลให้ ΔG มีค่าเป็นบวก ทำให้โปรตีนมีโอกาสอยู่ในรูป native form มากขึ้น นอกจากนี้ โปรตีนในสารละลายน้ำตาลจะมีค่าแรงดึงผิวสูงกว่าโปรตีนในน้ำ ซึ่งการ unfold เพื่อเปลี่ยนจาก native form เป็น denature form ต้องใช้พลังงานที่เพิ่มขึ้น โอกาสที่จะเปลี่ยนเป็น denature form จึงมีน้อย แสดงว่าน้ำตาลจะช่วยเพิ่มความคงตัวของโปรตีนให้มีเสถียรภาพมากขึ้น สำหรับผลของเกลือในการช่วยเพิ่มความคงตัวของโปรตีน Kaushik and Bhat (1999) อธิบายในลักษณะเดียวกับผลของน้ำตาลคือ การเติมเกลือจะช่วยเพิ่มแรงดึงผิว ทำให้โปรตีนในสารละลายเกลือมีค่าแรงดึงผิวสูงกว่าโปรตีนในน้ำ รวมทั้งเกลือจะช่วยเพิ่มค่า thermal stability ของโปรตีนด้วย นอกจากนี้ Adams et al. (1979) รายงานว่า ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 7.0 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 โมลาร์ ไฟโคไซยานินเกือบทั้งหมดจะเปลี่ยนรูปอยู่ในรูปเฮกซะเมอร์ทำให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้น

สรุปผลการดำเนินงาน

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิ 47°C เป็นอุณหภูมิวิกฤต (critical point) สำหรับความคงตัวของไฟโคไซยานิน เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 47°C ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ (C_R) ที่เหลือในสารละลาย และค่าครึ่งชีวิตของไฟโคไซยานินจะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยไฟโคไซยานินมีความคงตัวสูงสุดในสารละลาย pH 6.0 ที่ทุกอุณหภูมิ และไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 7.0 มีความคงตัวสูงกว่าในสารละลาย pH 5.0 ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 43-59°C แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 59°C ไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 กลับมีความคงตัวสูงกว่าในสารละลาย pH 7.0 ค่าปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ (C_R) ในสารละลายลดลงเหลือประมาณร้อยละ 50 ของปริมาณเริ่มต้น หลังบ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 59°C นาน 30 นาที ความร้อนจากอุณหภูมิสูงนอกจากทำให้ไฟโคไซยานินในสารละลายเสียสภาพมีปริมาณลดลง ไฟโคไซยานินยังเกิดการจับตัวกันตกตะกอนด้วย โดยไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 และ pH 6.0 เกิดการตกตะกอนเร็วกว่าไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 7.0 อย่างไรก็ตาม ในสภาวะการพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST พบว่าไม่มีผลต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน

การเก็บไฟโคไซยานินในรูปผงสารสกัดแห้ง พบว่า มีอัตราการเสื่อมสภาพช้ากว่าการเก็บในรูปสารละลาย และไฟโคไซยานินที่สัมผัสแสงที่ความเข้มแสงสูงก็จะมีอัตราการเสื่อมสภาพสูงกว่าที่ความเข้มแสงต่ำ การเก็บไฟโคไซยานินในรูปผงสารสกัดแห้งเป็นระยะเวลาประมาณ 30 วัน ที่ความเข้มแสงประมาณ $10 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ยังคงสามารถรักษาปริมาณไฟโคไซยานินไว้ได้ประมาณร้อยละ 68 แต่หากเก็บไฟโคไซยานินในที่มืดหรือที่อุณหภูมิ 4°C และมีแสงน้อยกว่า $10 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ พบว่าสามารถยืดอายุการเก็บไฟโคไซยานินได้นาน 120 วัน แม้จะเก็บในรูปสารละลาย

การศึกษาคผลของชนิดบัฟเฟอร์ พบว่า ชนิดบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินที่ค่า pH เดียวกัน ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ (C_R) ในสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยไฟโคไซยานินไม่ละลายในสารละลายที่มีค่า pH เป็นกรด (pH 3.0 และ pH 4.0) และไม่มี ความคงตัวที่ pH 8.0 การทดสอบความคงตัวของไฟโคไซยานินในสารละลาย pH 5.0 pH 5.5 pH 6.0 H 6.5 และ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 50°C และ 60°C พบว่า ที่อุณหภูมิ 50°C ไฟโคไซยานินมีความคงตัวสูงสุดในสารละลาย pH 6.0 อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่อุณหภูมิ 60°C ไฟโคไซยานินมีความคงตัวสูงสุดในสารละลาย pH 5.5 อย่างมีนัยสำคัญ

สารนอมอาหารพวกน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และซอร์บิทอล และเกลือโซเดียมคลอไรด์ สามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของไฟโคไซยานิน สำหรับสารกลุ่มกรด นอกจากนี้ไม่มีผลช่วยเพิ่มความคงตัวของไฟโคไซยานินยังมีผลทำให้ค่า pH ของสารละลายลดลง ประมาณ 1.0-1.5 ขณะที่โพลิเอธิลีนไกลคอล และกลีเซอรอล มีผลทำให้ไฟโคไซยานินในสารละลายมีปริมาณลดลงทันทีหลังเติมสาร

หลังบ่มสารละลายไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15 นาที ปริมาณไฟโคไซยานินในสารละลายที่เติมกลูโคสหรือซูโครสที่ความเข้มข้น 20% หรือเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 2.5% มีปริมาณสูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญ และมีค่าครึ่งชีวิตเพิ่มขึ้น ค่าปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ (C_R) ที่เหลือในสารละลายที่เติมกลูโคสหรือซูโครสที่ความเข้มข้น 20-40% มีค่าประมาณร้อยละ 62-70 ของปริมาณเริ่มต้น ขณะที่ control เหลือเพียงร้อยละ 47 ของปริมาณเริ่มต้น และสามารถเพิ่มค่าครึ่งชีวิตจาก 19 นาที เป็น 30-44 นาที ขณะที่การเติมโซเดียมคลอไรด์สามารถรักษาปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ (C_R) ที่เหลือในสารละลายได้ร้อยละ 76 และเพิ่มค่าครึ่งชีวิตเป็น 67 นาที น้ำตาลและเกลือโซเดียมคลอไรด์ช่วยป้องกันการเสถียรภาพของไฟโคไซยานินจากความร้อนโดยจะไปเคลือบบริเวณผิวของไฟโคไซยานิน และเพิ่มค่าแรงตึงผิวของไฟโคไซยานินทำให้เสถียรภาพมากขึ้น

ผลงานที่ได้รับจากโครงการนี้

1. Chaiklahan R., N. Chirasuwan and B. Bunnag. Effect of Temperature on Stability of Phycocyanin Extract from *Spirulina* sp. Presentation at the 5th National Conference on Algae and Plankton, March 16-18, 2011. BP Samila Beach Hotel, Songkhla, Thailand. (เอกสารแนบ 1)
2. Chaiklahan R., N. Chirasuwan and B. Bunnag. Influence of light intensity on stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp. Presentation at the 23rd Annual Meeting of the Thai Society of Biotechnology Systems Biotechnology, October 27-28, 2011, The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand. (เอกสารแนบ 2)
3. Chirasuwan N., R. Chaiklahan and B. Bunnag. Effect of pH on stability of the phycocyanin extracted from *Spirulina* sp. Presentation at the 23rd Annual Meeting of the Thai Society of Biotechnology Systems Biotechnology, October 27-28, 2011, The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand. (เอกสารแนบ 3)

เอกสารอ้างอิง

- ราเชนทร์ ดวงศรี 2552 การสกัดและความคงตัวของไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่า
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- Abalde, J., Betancourt, L., Torres, E., Cid, A., Barwell, C., 1998. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Sci.* 136, 109-120.
- Adams, S.M., Kao, O.H.W., Berns, D.S., 1979. Psychrophile c-phycocyanin. *Plant Physiol.* 64, 525-527.
- Adir, N., Dobrovetsky, Y., Lerner, N., 2001. Structure of c-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 angstroms: structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly. *J. Mol. Biol.* 313, 71-81.
- Adir, N., Lerner, N., 2003. The crystal structure of a novel unmethylated form of c-phycocyanin, a possible connector between cores and rods in phycobilisomes. *J. Bio. Chem.* 278(28), 25926-25932.
- Antelo, F.S., Costa, J.A.V., Kalil, S.J., 2008. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem. Eng. J.* 41, 43-47.
- Arakawa, T., Timasheff, S.N., 1982. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry.* 21, 6536-6544.
- Bennett, A., Bogorad, L., 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue green alga. *J. Cell Biol.* 58, 419-435.
- Berns, D.S., MacColl, R., 1989. Phycocyanin in physical-chemical studies. *Chem. Rev.* 89, 807-825.
- Bhaskar, S.U., Gopalswamy, G., Raghu, R., 2005. A simple method for efficient extraction and purification of c-phycocyanin from *Spirulina platensis* Geitler. *Indian J. Exp. Biol.* 43, 277-279.
- Borowitzka, M.A., 1992. Algal biotechnology products and processes: matching science and economics. *J. Appl. Phycol.* 4, 267-279.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S., Bunnag, B., 2011. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process, *Bioresour. Technol.* 102, 7159-7164.
- Cisneros, M., Rito-Palomares, M., 2004. A simplified strategy for the release and purity recovery of c-phycocyanin produced by *Spirulina maxima*. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 18 (4), 385-390.

- Eriksen, N.T., 2008. Production of phycocyanin-a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 1-14.
- Fukui, K., Saito, T., Noguchi, Y., Kodera, Y., Matsushima, A., Nishimura, H., Inada, Y., 2004. Relationship between color development and protein conformation in the phycocyanin molecule. *Dyes Pigm.* 63, 89-94.
- Gould, W.G., 1996. Methods for preservation and extension of shelf life. *Int. J. Food Microbiology* 33, 51-64.
- Gouveia, L., Empis, J., 2003. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* 4, 227-233.
- Grant, I.R., Hitchings, E.I., McCartney, A., Ferguson, F., Rowe, M.T., 2002. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 602-607.
- Herrera, A., Boussiba, S., Napoleone, V., Hohlberg, A., 1989 Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *J. Appl. Phycol.* 1, 325-331.
- Jaouen, P., Lépine, B., Rossignol, N., Royer, R., Quéméneur, F., 1999. Clarification and concentration with membrane technology of a phycocyanin solution extracted from *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Tech.* 13, 877-881.
- Jespersen, L., Strømdahl, L.D., Olsen, K., Skibsted, L.H., 2005. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionary and beverages. *Eur. Food. Res. Technol.* 220, 261-266.
- Kao, O.H.W., Edwards, M.R., Berns, D.S., 1975 Physical-chemical properties of c-phycocyanin isolated from an acido-thermophilic eukaryote, *Cyanidium caldarium*. *J. Biochem.* 147: 63-70.
- Kaushik, J.K., Bhat, R., 1999. A mechanistic analysis of the increase in the thermal stability of proteins in aqueous carboxylic acid salt solutions. *Protein Sci.* 8, 222-233.
- Koca, N., Karadeniz, F., Burdurlu, H.S., 2006. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. *Food Chem.* 100, 609-615.
- Leema, J.T., Kirubakaran, R., Vinithkumar, N.V., Dheenan, P.S., Karthikayulu, S., 2010. High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. *Bioresour. Technol.* 101, 9221-9227.
- Li, Y., Yang, H., Cao, F.M., 2009. Effect of ultraviolet irradiation on photostability of c-phycocyanin in a silica matrix. *Res. Chem. Intermed.* 35, 607-613.

- MacColl, R., 1998. Cyanobacterial phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* 124, 311-334.
- Minkova, K.M., Tchernov, A.A., Tchorbadjieva, M.I., Fournadjieva, S.T., Antova, R.E., Busheva, M.Ch., 2003. Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *J. Biotechnol.* 102: 55-59.
- Mishra, S.K., Shrivastav, A., Mishra, S., 2008. Effect of preservatives for food grade c-pec from *Spirulina platensis*. *Process Biochem.* 43, 339-345.
- Mishra, S.K., Shrivastav, A., Pancha, I., Jain, D., Mishra, S., 2010. Effect of preservative for food grade c-phycoerythrin, isolated from marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. *Int. J. Biol. Macromol.* 47, 597-602.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., Ghosh, P.K., 2005. Purification and characterization of c-phycoerythrin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purif.* 40, 248-255.
- Patel, A., Pawar, R., Mishra, S., Sonawane, S., Ghosh, P.K., 2004. Kinetic studies on thermal denaturation of c-phycoerythrin. *Indian J. Biochem. Biophys.* 41, 254-257.
- Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A.S., Raghavarao, K.S.M.S., 2006. Method to obtain c-phycoerythrin of high purity, *J. Chromatogr. A.* 1127: 76-81.
- Petersen, S.B., Jonson, V., Fojan, P., Wimmer, R., Pedersen, S., 2004. Sorbitol prevents the self-aggregation of unfolded lysozyme leading to an up to 13 °C stabilisation of the folded form. *J. Biotechnol.* 114, 269-278.
- Reis, A., Mendes, A., Lobo-Fernandes, H., Empis, J.A., Maggiolly Novais, J., 1998 Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. *Bioresour. Technol.*, 66, 181-187.
- Sarada, R., Pillai, G.M., Ravishankar, G.A., 1999 Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochem.* 34, 795-801.
- Sekar, S., Chandramohan, M., 2008 Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *J. Appl. Phycol.* 20, 113-136.
- Silveira, S.T., Burkert, J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V., Kalil, S.J., 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresour. Technol.* 98, 1629-1634.

- Spolaore, P., Joannis—Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101(2), 87-96.
- Stec, B., Troxler, R.F., Teeter, M.M., 1999. Crystal structure of c-phycoyanin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective on phycobilisome assembly. *Biophys. J.* 76, 2912–2921.
- Vonshak, A., 1997. *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology.* Taylor & Francis, London.
- Zhang, Y.M., Chen, F., 1999. A simple method for efficient separation and purification of c-phycoyanin and allophycoyanin from *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Tech.* 13, 601-603.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. ปริมาณไฟโตไซยานินสัมพันธ์ (C_R) หลังเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที

อุณหภูมิ (°C)	ค่า C_R (%) ในสารละลาย		
	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0
26	95 ± 3	99 ± 3	100 ± 5
31	95 ± 3	99 ± 3	99 ± 4
35	100 ± 2	99 ± 2	95 ± 5
39	101 ± 4	99 ± 6	94 ± 3
43	92 ± 3	97 ± 3	93 ± 1
47	83 ± 4	94 ± 2	87 ± 4
51	72 ± 5	86 ± 8	78 ± 4
55	64 ± 11	72 ± 6	67 ± 3
59	50 ± 5	56 ± 2	52 ± 4
64	39 ± 2	46 ± 5	33 ± 2
69	38 ± 2	41 ± 3	26 ± 2
74	36 ± 1	38 ± 4	25 ± 2

ภาคผนวก ข1 ปริมาณไฟโตไซยานินสัมพันธ์ ที่ความเข้มแสง $10 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$

เวลา	ค่า C_R (%) ในสารละลาย	หมายเหตุ
------	--------------------------	----------

(วัน)	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	
0	100 ± 0	100 ± 1	101 ± 1	
1	94 ± 3	96 ± 2	89 ± 4	
2	86 ± 5	93 ± 2	88 ± 7	
3	85 ± 3	90 ± 3	90 ± 6	
4	80 ± 3	86 ± 1	88 ± 2	
5	72 ± 1	80 ± 1	91 ± 1	
6	63 ± 6	70 ± 1	79 ± 7	
7	61 ± 7	70 ± 4	81 ± 7	เมื่อพิจารณาค่าทางสถิติ
8	56 ± 9	61 ± 3	70 ± 1	pH 5 pH 6 และ pH 7 มีค่า P value = 0.0006
10	47 ± 6	54 ± 5	74 ± 7	pH 5 และ pH 6 มีค่า P value = 0.1927
12	41 ± 1	47 ± 3	75 ± 1	pH 6 และ pH 7 มีค่า P value = 0.0088
14	35 ± 5	40 ± 5	65 ± 4	pH 5 และ pH 7 มีค่า P value = 7.1E-05
17	28 ± 1	30 ± 3	63 ± 4	

ภาคผนวก ข2 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์ ที่ความเข้มแสง 40 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$

เวลา (ชั่วโมง)	ค่า C_R (%) ในสารละลาย			หมายเหตุ
	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	
0	100 ± 2	100 ± 2	100 ± 2	
6	87 ± 6	93 ± 6	91 ± 4	
15	77 ± 12	82 ± 9	84 ± 8	
18	73 ± 11	78 ± 7	82 ± 7	
21	71 ± 11	76 ± 6	81 ± 9	เมื่อพิจารณาค่าทางสถิติ
24	62 ± 10	73 ± 8	74 ± 8	pH 5 pH 6 และ pH 7 มีค่า P value = 0.0137
30	51 ± 11	66 ± 8	68 ± 11	pH 5 และ pH 6 มีค่า P value = 0.0728
39	42 ± 14	50 ± 13	62 ± 11	pH 6 และ pH 7 มีค่า P value = 0.2866
48	37 ± 10	43 ± 9	52 ± 9	pH 5 และ pH 7 มีค่า P value = 0.0040

ภาคผนวก ข3 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์ ที่ความเข้มแสง 80 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$

เวลา	ค่า C_R (%) ในสารละลาย	หมายเหตุ
------	--------------------------	----------

(ชั่วโมง)	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	
0	98 ± 4	101 ± 5	100 ± 1	
6	83 ± 8	85 ± 4	90 ± 7	
15	61 ± 10	62 ± 6	67 ± 5	
18	55 ± 10	57 ± 5	61 ± 6	
21	46 ± 8	49 ± 7	55 ± 7	เมื่อพิจารณาค่าทางสถิติ
24	43 ± 7	43 ± 7	56 ± 5	pH 5 pH 6 และ pH 7 มีค่า P value = 0.0104
30	30 ± 7	34 ± 5	47 ± 7	pH 5 และ pH 6 มีค่า P value = 0.5857
39	20 ± 2	20 ± 3	33 ± 9	pH 6 และ pH 7 มีค่า P value = 0.0157
48	18 ± 1	15 ± 3	25 ± 8	pH 5 และ pH 7 มีค่า P value = 0.0045

ภาคผนวก ค ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินแห้ง ที่ความเข้มแสงต่างๆ

เวลา	ค่า C_R (%) ที่ความเข้มแสง (I , $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	หมายเหตุ
------	--	----------

(วัน)	10	40	80	
1	102 ± 1	99 ± 0	102 ± 1	
3	100 ± 1	93 ± 2	89 ± 2	
7	89 ± 1	87 ± 3	80 ± 3	
10	85 ± 3	84 ± 1	75 ± 2	
14	78 ± 2	74 ± 2	67 ± 2	
18	73 ± 2	70 ± 1	65 ± 2	
24	70 ± 4	62 ± 3	57 ± 2	
28	69 ± 3	60 ± 1	56 ± 2	เมื่อพิจารณาค่าทางสถิติ
32	68 ± 3	56 ± 3	52 ± 5	[I] = 10, [I] = 40 และ [I] = 80
38	64 ± 2	49 ± 2	45 ± 2	มีค่า P value = 0.2154
42	62 ± 1	46 ± 2	41 ± 1	
46	61 ± 1	43 ± 3	37 ± 5	
49	58 ± 4	41 ± 5	34 ± 4	

ภาคผนวก ง ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์ในบัพเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 60 °C

เวลา (นาที)	ค่า C_R (%) ในสารละลาย						
	pH 5.0		pH 6.0			pH 7.0	
	ซีเตรท	ซีเตรท-ฟอสเฟต	ซีเตรท	ซีเตรท-ฟอสเฟต	ฟอสเฟต	ซีเตรท-ฟอสเฟต	ฟอสเฟต
0	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 2	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 3
5	60 ± 3	60 ± 4	73 ± 7	70 ± 3	74 ± 3	57 ± 7	61 ± 3
10	56 ± 4	57 ± 4	69 ± 6	66 ± 3	69 ± 3	50 ± 3	58 ± 8
15	55 ± 4	56 ± 5	69 ± 3	66 ± 2	68 ± 3	46 ± 3	49 ± 4
30	54 ± 5	54 ± 5	70 ± 5	63 ± 5	64 ± 2	42 ± 3	43 ± 4
60	51 ± 3	52 ± 3	65 ± 2	66 ± 6	61 ± 3	39 ± 5	40 ± 3
<i>P</i> value = 0.6546		<i>P</i> value = 0.1279			<i>P</i> value = 0.2989		

ภาคผนวก จ ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์ในสารละลาย pH ต่างๆ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 60°C

pH	ค่า C_R (%) หลังบ่มเป็นเวลา	
	0 นาที	60 นาที
3.0	78 ± 8	47 ± 10
4.0	101 ± 4	63 ± 15
5.0	100 ± 3	63 ± 12
6.0	100 ± 1	74 ± 10
7.0	99 ± 2	56 ± 15
8.0	96 ± 6	45 ± 17

ภาคผนวก ฉ1 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ในสารละลาย pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50°C

เวลา (นาที)	ค่า C_R (%) ในสารละลาย				
	pH 5	pH 5.5	pH 6	pH 6.5	pH 7
0	100	100	100	100	100
15	72 ± 7	78 ± 4	85 ± 4	87 ± 3	72 ± 7
30	68 ± 7	77 ± 6	81 ± 7	80 ± 3	67 ± 6
60	56 ± 4	74 ± 5	78 ± 4	76 ± 5	65 ± 5
90	60 ± 6	72 ± 5	79 ± 5	77 ± 5	67 ± 9
120	52 ± 3	70 ± 3	76 ± 4	74 ± 4	65 ± 4
180	51 ± 6	68 ± 5	76 ± 5	71 ± 5	58 ± 9
240	49 ± 3	67 ± 6	74 ± 5	71 ± 5	60 ± 6

pH 5.5 pH 6.0 และ pH 6.5 มีค่า P value = 0.003

ภาคผนวก ฉ2 ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพัทธ์ในสารละลาย pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 60°C

เวลา (นาที)	ค่า C_R (%) ในสารละลาย				
	pH 5	pH 5.5	pH 6	pH 6.5	pH 7
0	100	100	100	100	100
5	70 ± 7	78 ± 4	84 ± 7	82 ± 6	68 ± 7
10	64 ± 2	68 ± 2	74 ± 8	72 ± 3	56 ± 5
15	55 ± 9	70 ± 4	70 ± 8	68 ± 6	51 ± 4
30	51 ± 6	66 ± 3	67 ± 4	62 ± 3	46 ± 3
45	43 ± 2	68 ± 3	66 ± 5	59 ± 5	41 ± 3
60	42 ± 3	65 ± 7	63 ± 2	57 ± 4	40 ± 2
90	41 ± 3	68 ± 4	60 ± 5	57 ± 5	36 ± 4
120	41 ± 3	61 ± 9	57 ± 3	54 ± 4	33 ± 3
180	40 ± 3	56 ± 6	55 ± 6	54 ± 3	30 ± 3

pH 5.5 pH 6.0 และ pH 6.5 มีค่า P value = 0.002

ภาคผนวก ข ปริมาณไฟโคไซยานินสัมพันธ์ในสารละลายที่เติมกลูโครส ซูโครส และโซเดียมคลอไรด์
ที่ความเข้มข้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 15 นาที

ความเข้มข้น (%, w/v)	ค่า C_R (%) ในสารละลายที่เติม		
	กลูโครส (Glu)	ซูโครส (Su)	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
0	47 ± 3	47 ± 3	47 ± 3
2.5	47 ± 3	50 ± 2	76 ± 5
5	49 ± 4	51 ± 4	82 ± 3
10	57 ± 3	54 ± 2	80 ± 2
20	65 ± 3	62 ± 3	81 ± 3
40	70 ± 4	65 ± 3	ไม่ละลาย
	Glu 0-10% $P = 0.058$	Su 0-10% $P = 0.3104$	NaCl 0-2.5% $P = 7.16E-21$
	Glu 0-20% $P = 3.41E-07$	Su 0-20% $P = 0.0009$	
	Glu 10-20% $P = 0.0111$	Su 10-20% $P = 0.0277$	