

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สาหร่ายสีไปรูลิน่า (*Spirulina* sp.) เป็นวัตถุดิบสำคัญที่ใช้ในการสกัดไฟโคไซยานิน (phycocyanin) ซึ่งการค้า [Richmond, 1986] โดยมีไฟโคไซยานินประมาณร้อยละ 10-15 ของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง [Belay, 1997; Jaouen และคณะ, 1999] ไฟโคไซยานินเป็นรงควัตถุสีฟ้าอมน้ำเงิน จัดเป็นสารชีวเคมีที่มีศักยภาพสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายด้าน [Spolaore และคณะ, 2006; Eriksen, 2008] ดังนี้

1. ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น มีการผลิตไฟโคไซยานินภายใต้ชื่อการค้า Lina Blue ของบริษัท Dainippon Ink & Chemical of Japan เพื่อใช้เป็นสีผสมอาหารในผลิตภัณฑ์จำพวก chewing gums, dairy products, ice sherbets, popsicles, soft drink, jellies และ wasabi
2. ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยเป็นส่วนประกอบใน eye shadow, eyeliners และ lipstick [Dainippon Ink and Chemicals Inc., 1980; Cohen, 1997; Belay, 2002]
3. ใช้งานทางด้านทางการแพทย์ เนื่องจากไฟโคไซยานินมีบทบาทสำคัญคือ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย [Romay และคณะ, 1998; Romay และคณะ, 1999; Bhat และ Madyastha, 2000; Bhat และ Madyastha, 2001; Belay, 2002; Bermejo-Bescós และคณะ, 2008]
4. ใช้ในงานวิเคราะห์เนื่องจากไฟโคไซยานินมีคุณสมบัติเป็นสารเรืองแสงจึงใช้เป็นสารติดตาม (immunoassays) ในงานด้านชีวเคมี [Kronick, 1986; Glazer, 1994]

กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสาหร่าย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี มีความพร้อมด้านเทคโนโลยีการสกัดสารต่างๆ จากสาหร่าย และได้ทำการศึกษาการสกัดไฟโคไซยานินมาอย่างต่อเนื่อง โดยในระดับห้องปฏิบัติการได้ศึกษาการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ วิธีแช่แข็ง การบด การใช้คลื่นความถี่สูง การใช้ French press และการใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ซึ่งแต่ละวิธีให้ปริมาณไฟโคไซยานินและความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานินแตกต่างกัน รวมทั้งได้ศึกษาวิธีการทำให้สารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสีไปรูลิน่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชัน Ion-exchange chromatography และ Gel filtration นอกจากนี้ทางกลุ่มวิจัยฯ ได้ร่วมมือกับบริษัทกรีนไดมอนด์เพื่อทำการผลิตไฟโคไซยานินในระดับโรงงานต้นแบบโดยใช้หม้อเบรนเทคโนโลยี อย่างไรก็ตามปริมาณและคุณภาพของสารสกัดไฟโคไซยานินที่ได้ขึ้นกับคุณภาพของวัตถุดิบไปรูลิน่าที่นำมาใช้ในการสกัดและวิธีการสกัดไฟโคไซยานินด้วยเช่นกัน โดยคุณภาพของวัตถุดิบไปรูลิน่าขึ้นกับปุ๋ยที่ใช้เลี้ยงและการจัดการบ่อเพาะเลี้ยง ปัจจุบันในประเทศไทยมีผู้ผลิตสาหร่ายสีไปรูลิน่ารายย่อยหลายราย ซึ่งมีวิธีการเลี้ยงและการจัดการบ่อเลี้ยงที่ต่างกันไป ทำให้ได้ผลผลิตไปรูลิน่าที่มีคุณภาพแตกต่างกัน การนำสาหร่ายสีไปรูลิน่ามาสกัดไฟโคไซยานินนอกจากเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของสาหร่ายสีไปรูลิน่า ขณะเดียวกันยังช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพผลผลิตไปรูลิน่าของผู้ผลิตรายย่อยที่มีคุณภาพต่ำไม่สามารถขายในเกรดอาหารเสริมได้อีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้ทางกลุ่มวิจัยฯ มุ่งเน้นศึกษาผลของคุณภาพวัตถุดิบไปรูลิน่าต่อปริมาณและคุณภาพของสารสกัดไฟโคไซยานินที่ได้ โดยศึกษาว่าเมื่อวัตถุดิบไปรูลิน่ามีปริมาณโปรตีนและไฟโคไซยานินแตกต่างกัน ผลผลิตไฟโคไซยานินที่สกัดได้จะแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด เพราะทั้งปริมาณวัตถุดิบไปรูลิน่าที่ใช้และปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดได้มี

ผลต่อต้นทุนการผลิตไฟโคไซยานิน โดยผลการศึกษาจากโครงการนี้จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกวัตถุดิบสไปรูulinaได้อย่างเหมาะสมต่อการผลิตไฟโคไซยานินเกรดอาหารในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทราบรายละเอียดคุณลักษณะ (specification) ของวัตถุดิบสไปรูulinaที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้สกัดไฟโคไซยานินเกรดอาหาร

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของวิธีการทำแห้งสไปรูulinaต่อปริมาณและคุณภาพของไฟโคไซยานินที่สกัดได้
2. ศึกษาคุณภาพวัตถุดิบสไปรูulinaโดยวิเคราะห์ปริมาณไฟโคไซยานิน ปริมาณโปรตีน และโลหะหนักก่อนนำไปสกัดไฟโคไซยานิน
3. ศึกษาปริมาณและคุณภาพของไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากวัตถุดิบสไปรูulinaที่มีปริมาณโปรตีน และไฟโคไซยานินแตกต่างกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบรายละเอียดคุณลักษณะ (specification) ของวัตถุดิบสไปรูulinaที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้สกัดไฟโคไซยานิน ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการพิจารณาเลือกวัตถุดิบสไปรูulinaที่จะนำมาใช้ผลิตไฟโคไซยานินเกรดอาหารในระดับอุตสาหกรรม
2. ทราบว่าการทำแห้งสไปรูulinaด้วยวิธีอบแห้งแบบแช่แข็ง วิธีอบแห้งด้วยตู้อบและการตากแดด มีผลต่อปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดได้มากน้อยเพียงใด
3. เป็นการเพิ่มศักยภาพของการใช้ประโยชน์จากสไปรูulinaที่นอกจากใช้เป็นอาหารเสริมแล้ว สามารถนำมาสกัดสารไฟโคไซยานินเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่น เช่น อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง เป็นต้น

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina* sp.)

สาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina* sp.) มีไฟโคไซยานินประมาณร้อยละ 10-15 ของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง [Belay, 1997; Jaouen และคณะ, 1999] จึงจัดเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพแหล่งหนึ่งที่ถูกนำมาใช้สกัดสารไฟโคไซยานิน (phycocyanin) เพื่อผลิตเชิงการค้า [Richmond, 1986; Eriksen, 2008] ปัจจุบันการผลิตสไปรูลิน่าเชิงการค้ามีวัตถุประสงค์หลักคือ เป็นอาหารเสริมของมนุษย์ และใช้ผสมในอาหารสัตว์ ซึ่งการผลิตสาหร่ายสไปรูลิน่าเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมของมนุษย์นั้น มีการกำหนดมาตรฐานไว้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์กรประกอบพื้นฐานของสาหร่ายสไปรูลิน่าและการควบคุมคุณภาพภายในโดยบริษัทและเกณฑ์ทั่วไปที่กำหนดร่วมกัน

องค์กรประกอบพื้นฐาน	การควบคุมคุณภาพภายในโดยบริษัท* (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)	เกณฑ์ทั่วไปที่กำหนดร่วมกัน** (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)		
		แบบที่ 1	แบบที่ 2	แบบที่ 3
โปรตีน	50-70	มากกว่า 55	มากกว่า 55	มากกว่า 55
คาร์โบไฮเดรต	15-20			
ไขมัน	6-13			
ความชื้น	3-7	น้อยกว่า 7	น้อยกว่า 7	น้อยกว่า 7
กรดไขมันจำเป็น				
กรดไขมันทั้งหมด		มากกว่า 4.5	มากกว่า 4.5	
กรดลิโนลิอิก	0.8	0.8		
กรดแกมมาลิโนเลนิก	1.0	1.0		
รงควัตถุ				
คลอโรฟิลล์	1-1.5	มากกว่า 1		
ไฟโคไซยานิน	10-15	มากกว่า 10		
ความปลอดภัยด้านโลหะหนัก	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg; ppm)	(mg/kg; ppm)	(mg/kg; ppm)	(mg/kg; ppm)
ตะกั่ว (Pb)	น้อยกว่า 1.0	น้อยกว่า 1.0	น้อยกว่า 1.0	น้อยกว่า 1.0
สารหนู (As)	น้อยกว่า 1.0	น้อยกว่า 1.0	น้อยกว่า 1.0	น้อยกว่า 1.0
แคดเมียม (Cd)	น้อยกว่า 0.05	น้อยกว่า 0.1	น้อยกว่า 0.1	น้อยกว่า 0.1

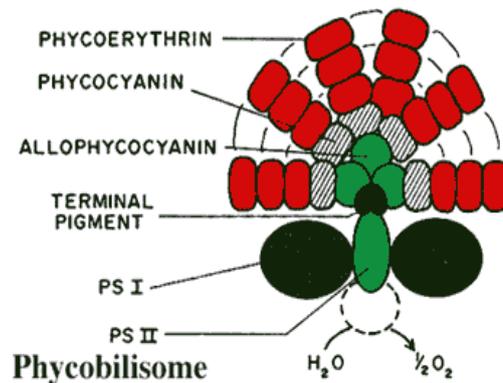
หมายเหตุ: * เป็นค่ามาตรฐานที่มีการรายงานและกำหนดโดยหน่วยงานต่างประเทศ [Beley, 1997]

** เป็นค่าเกณฑ์มาตรฐานที่กลุ่ม *Spirulina* consortium กำหนดร่วมกัน [บุษยา และคณะ, 2546]

ไฟโคไซยานิน

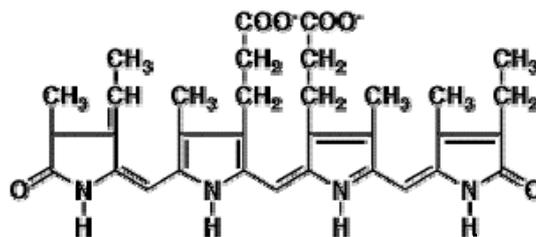
ซีไฟโคไซยานิน (C-phycoyanin) หรือไฟโคไซยานินเป็นองค์ประกอบหลักของไฟโคบิลิโปรตีน และมีอัลโลไฟโคไซยานินเป็นองค์ประกอบย่อยดังรูปที่ 1 ไฟโคไซยานินอยู่บริเวณผิวด้านนอกของเยื่อไทลาคอยด์ มีหน้าที่รับและสะสมพลังงานแสงและถ่ายทอดพลังงานให้กับคลอโรฟิลล์เอเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง [Borogad, 1975] ซีไฟโคไซยานินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100-200,000 ดาลตัน และประกอบด้วย อัลฟา(α) และเบต้าซับยูนิต (β subunits) ที่มีน้ำหนักประมาณ 20,000 ดาลตัน [Abalde และคณะ, 1998] โดยมักพบไฟโคไซยานินอยู่ในรูป hexamers ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสุดเท่ากับ 260 กิโลดาลตัน รูป trimers มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 132 กิโลดาลตัน และรูปอื่น ๆ เช่น monomer มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสุด 44 กิโลดาลตัน [MacColl, 1998] ไฟโคไซยานินเป็นรงควัตถุที่มีสีฟ้าอมน้ำเงิน คุณสมบัติละลายน้ำได้ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 618-620 นาโนเมตร ขณะที่อัลโลไฟโคไซยานินมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

(ก)



ที่มา; www.palaeos.com/Eukarya/Lists/EuGlossary/Images/phycobilisome.gif

(ข)



ประโยชน์ของไฟโคไซยานิน

ไฟโคไซยานินนอกจากนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางแล้ว ด้วยโครงสร้างของไฟโคไซยานินดังรูปที่ 1 (ข) ทำให้ไฟโคไซยานินมีคุณสมบัติเป็นสารเรืองแสง [Kronick, 1986] สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยต่างๆ เช่น ตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย [Sode และคณะ, 1991] ตรวจวัดความเป็นพิษของไซยาโนแบคทีเรียในน้ำดื่ม [Izydorczyk และคณะ, 2005] และใช้เป็น remote sensing ของไซยาโนแบคทีเรียในน้ำธรรมชาติ [Simis และคณะ, 2005] ได้อีกด้วย ไฟโคไซยานินจากสไปรูลินามีคุณสมบัติด้านการอักเสบและจับสารอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl) และเปอร์ออกซิล (peroxyl) ได้อย่างมีประสิทธิภาพและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ใน microsomal [Piñero-Estrada และคณะ, 2001; Bermejo-Bescós และคณะ, 2008] จึงมีรายงานถึงบทบาทของไฟโคไซยานินทางการแพทย์จำนวนมาก เช่น กระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย [Romay และคณะ, 1998; Romay และคณะ, 1999 และ Belay, 2002] ป้องกันกรดออกซาลิก (oxalic acid) ที่ทำให้เกิดนิ่วในไตของหนูทดลอง [Farooq และคณะ, 2004] ป้องกันคอเรสเตอรอลที่เป็นสาเหตุของโรคหลอดเลือดแข็งตัวโดยช่วยปรับปรุงกระบวนการต้านอนุมูลอิสระใน plasma lipoprotein ของหนู hamster [Riss และคณะ, 2007] ช่วยลดการงอกขยายตัว (proliferation) ของเซลล์มะเร็งใน human chronic myeloid leukemia cell line (K562) [Subhashini และคณะ, 2004] มีรายงานถึงการบริโภคอาหารที่มีไฟโคไซยานินเป็นส่วนประกอบเพียงเล็กน้อยทุกวันจะช่วยป้องกันมะเร็ง นอกจากนี้ไฟโคไซยานินจากสไปรูลินายังมีบทบาทช่วยป้องกันระบบประสาท โดยยับยั้งความเป็นพิษเนื่องจากธาตุเหล็กใน SH-SY5Y neuroblastoma cells ดังนั้นไฟโคไซยานินอาจมีศักยภาพและมีความเป็นไปได้ในการป้องกันโรคจากระบบประสาท เช่น โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) และโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นต้น [Bermejo-Bescós และคณะ, 2008] บทบาทของไฟโคไซยานินต่อยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ เช่น ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์อักเสบ [Reddy และคณะ, 2003] ลดกิจกรรมของเอ็นไซม์ myeloperoxidase และช่วยควบคุมการอักเสบของลำไส้ใหญ่ (colitis) ในหนู [González และคณะ, 1999]

ปริมาณไฟโคไซยานินในเซลล์สไปรูลินาขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการคือ 1. สายพันธุ์สไปรูลินาที่นำมาใช้เพาะเลี้ยง โดยทั่วไปสไปรูลินาแต่ละสายพันธุ์จะมีองค์ประกอบของสารชีวเคมีภายในเซลล์แตกต่างกัน 2. สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น การจัดการบ่อเลี้ยง คุณภาพของสารเคมีที่ใช้ อุณหภูมิและความเข้มแสง รวมทั้งอายุเซลล์สไปรูลินาที่ทำการเก็บเกี่ยว 3. วิธีการที่ใช้ในการทำแห้งสไปรูลินา

ผลของการทำแห้งสไปรูลินาต่อการสกัดไฟโคไซยานิน

งานวิจัยของหลายกลุ่มวิจัยที่ศึกษาผลของการทำแห้งสไปรูลินาต่อการสกัดไฟโคไซยานิน ตัวอย่างเช่น Sarada และคณะ (1999) ศึกษาการทำแห้งด้วยวิธีแบบไหลตามขวาง (cross flow) ทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dried) และทำแห้งด้วยตู้อบ (oven dried) ต่อปริมาณไฟโคไซยานินและเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับปริมาณไฟโคไซยานินในเซลล์สไปรูลินาเปียก พบว่า การทำแห้งทั้ง 3 วิธี มีผลทำให้เซลล์สไปรูลินาสูญเสียไฟโคไซยานินประมาณร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับปริมาณไฟโคไซยานินในเซลล์สไปรูลินาเปียก

ตารางที่ 2 ปริมาณไฟโคไซยานินในเซลล์สไปรูลินาที่ผ่านกระบวนการทำแห้งโดยวิธีที่แตกต่างกัน

วิธีการทำแห้ง สไปรูลินา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาของการทำแห้ง (ชั่วโมง)	% Phycocyanin recovery
เซลล์เปียก (Control)	-	-	100
Cross flow	60	7	55
Spray dried	150	-	55.5
Oven dried	60	7	54

Doke (2005) ทำการศึกษาโดยปรับปรุงวิธีการทำแห้งเพื่อให้ได้เซลล์สไปรูลินาที่เหมาะสมสำหรับนำไปสกัดไฟโคไซยานิน พบว่า การทำแห้งสไปรูลินาด้วยลมร้อน (air dried) เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด เพราะเมื่อนำเซลล์สไปรูลินาที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีดังกล่าวมาสกัดไฟโคไซยานิน จะได้สารสกัดไฟโคไซยานินที่มีความเข้มข้นสูง 80.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ และมีค่าความบริสุทธิ์ 1.80 ซึ่งสูงกว่าค่าความบริสุทธิ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินที่ได้จากการใช้เซลล์สไปรูลินาที่ผ่านการทำแห้งโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) และการตากแดด (sun dried) ประมาณ 2 เท่า ดังข้อมูลในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบวิธีการทำแห้งสไปรูลินาต่อค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของสารไฟโคไซยานิน เมื่อทำการสกัดไฟโคไซยานินด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีการทำแห้ง สไปรูลินา	อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ใน การทำแห้ง	ความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัม/กรัม)	ความบริสุทธิ์ (A_{620}/A_{280})
Water bath	50°C; 1 ชั่วโมง	16.5±0.8	0.95±0.07
Sun dried	35°C±2°C; 1 ชั่วโมง	64.8±1.71	0.85±0.03
Air dried	25°C±2°C; 1 ชั่วโมง	80.0±1.9	1.80±0.06

สินินาฏและศศิธร (2551) ศึกษาผลของการทำแห้งสไปรูลินาต่อปริมาณซี-ไฟโคไซยานินชนิดหยาบ (crude c-phycocyanin) และซี-ไฟโคไซยานินชนิดบริสุทธิ์ (pure c-phycocyanin) พบว่า การทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dried) จะมีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินทั้งสองชนิดสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 37.1 และ 79.9 ตามลำดับ รองลงมาคือ วิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dried) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าความบริสุทธิ์และปริมาณสารสกัดไฟโคไซยานินของตัวอย่างสไปรูลิनाที่แห้งด้วยวิธีอบแห้งโดยใช้ลมร้อน (tray dried) อบแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dried) และทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dried)

วิธีการทำแห้ง สไปรูลิना	Pure C-Phycocyanin (%)	Crude C-Phycocyanin (%)
Tray dried-1*	5.47±0.12	11.88±0.19
Tray dried-2**	4.25±0.05	9.16±0.15
Freeze dried	37.1±0.04	79.90±0.09
Spray dried	30.8±0.29	66.20±6.21

*การอบแห้งโดยใช้ลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

**การอบแห้งโดยใช้ลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นบดให้เป็นผงและอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ลักษณะ และคณะ (2540) ศึกษาผลของวิธีทำแห้งต่อปริมาณองค์ประกอบต่าง ๆ ในสไปรูลิना คือ การทำแห้งโดยการตากแดด การทำแห้งโดยการพ่นฝอย และการทำแห้งโดยการแช่แข็ง พบว่า สไปรูลิनाที่ผ่านการทำแห้งโดยการแช่แข็งมีปริมาณโปรตีน คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และไฟโคไซยานินสูงที่สุด รองลงมาคือ การทำแห้งโดยการพ่นฝอยและการทำแห้งโดยการตากแดด ตามลำดับ Oliveira และคณะ (2009) ศึกษาผลของการทำแห้งสไปรูลินำด้วยวิธี conventional spouted bed , jet spouted bed และ thin layer ต่อปริมาณโปรตีนและไฟโคไซยานินในเซลล์สไปรูลินำ พบว่า วิธีการทำแห้งทั้ง 4 สภาวะ ไม่มีผลต่อค่าการละลายของโปรตีน ขณะที่การทำแห้งด้วยวิธี thin layer ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ได้สาหร่ายสไปรูลินำที่มีปริมาณไฟโคไซยานินมากที่สุดคือ ร้อยละ 15.6 แสดงข้อมูลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าการละลายของโปรตีนและปริมาณไฟโคไซยานินของเซลล์สไปรูลินำที่แห้งด้วยวิธี conventional spouted bed, jet spouted bed และ thin layer

วิธีและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้ง	การละลายของโปรตีน (%)	ไฟโคไซยานิน (%)
Conventional spouted bed (110°C)	35.1±4.5	14.7±1.1
Jet spouted bed (98°C)	37.9±2.6	10.1±0.8
Thin layer (50°C)	38.4±3.2	15.6±0.5
Thin layer (60°C)	37.8±2.5	12.6±1.1

ขณะที่ Morist และคณะ (2001) พบว่า การทำแห้งสาหร่ายสไปรูลินำด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย และเครื่องอบแห้งแบบแช่แข็ง ได้เซลล์สไปรูลินำที่มีโปรตีนร้อยละ 56 และ 53 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีไฟโคไซยานินร้อยละ 1.4 และ 4.0 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

การนำสาหร่ายสไปรูลินามาสกัดไฟโคไซยานินนอกจากเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของสาหร่ายสไปรูลินาแล้ว ขณะเดียวกันยังช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพผลผลิตสไปรูลินาของผู้ผลิตรายย่อยที่คุณภาพต่ำไม่สามารถขายเป็นเกรตอาหารเสริมได้อีกด้วย ดังเช่นประเทศจีนซึ่งผลิตสาหร่ายสไปรูลินาประมาณ 1,000 ตัน คิดเป็น 1 ใน 3 ของกำลังการผลิตสไปรูลินาทั่วโลก การเพาะเลี้ยงสไปรูลินาในระดับใหญ่ (large-scale cultivation) ของจีนประสบปัญหาจากหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น การปนเปื้อนจากแบคทีเรีย โปรโตซัว และ โลหะหนัก เป็นต้น ทำให้เกิดปัญหาของผลผลิตสไปรูลินาคุณภาพต่ำจำนวนมาก ซึ่งไม่สามารถใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์ตามที่มาตรฐานกำหนดได้ จากปัญหาดังกล่าว Niu และคณะ (2007) เสนอแนวทางการทำให้ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับการผลิตขนาดใหญ่ โดยใช้หลาย ๆ เทคนิค ร่วมกันคือ expanded bed adsorption, anion-exchange chromatography และ hydroxyapatite chromatography ได้สารสกัดไฟโคไซยานินที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า 3.2 และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก 5 ชนิด คือ ตะกั่ว (Pb) โครเมียม (Cr) แคดเมียม (Cd)ปรอท (Hg) และสารหนู (As) ในสารสกัดไฟโคไซยานิน พบว่า ปริมาณของโลหะหนักทั้ง 5 ชนิด ไม่เกินค่าที่มาตรฐานกำหนด จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดไฟโคไซยานินดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง นอกจากนี้มีหลายกลุ่มวิจัยที่ให้ความสำคัญและศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารไฟโคไซยานินในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อความเป็นไปได้ในการนำไปขยายขนาดในระดับอุตสาหกรรม เช่น Moraes และคณะ (2010) พบว่าการสกัดไฟโคไซยานินโดยใช้เทคนิคการสกัดแบบ 2 ขั้นตอน (two stage-extraction) สกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใช้อัตราส่วนของเซลล์สาหร่ายสไปรูลินาต่อตัวทำละลายเป็น 0.16 ต่อ 1 ได้ผลผลิต (yield) ไฟโคไซยานิน 82.48 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ที่มีความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน 13.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าความบริสุทธิ์ 0.603

กระบวนการผลิตไฟโคไซยานิน

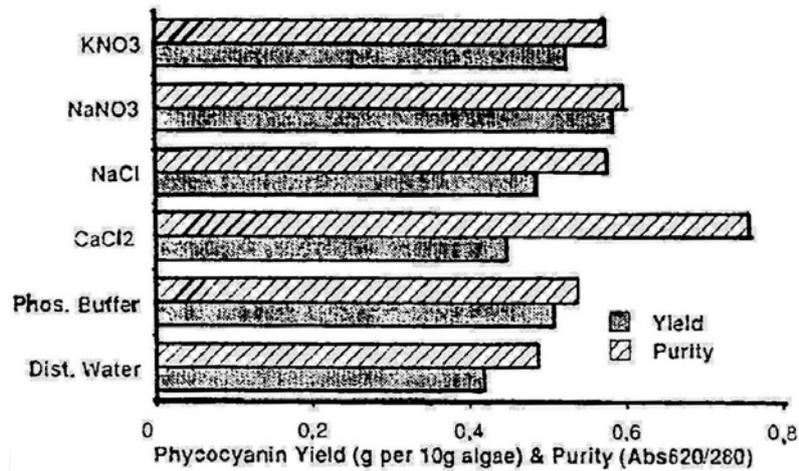
กระบวนการผลิตไฟโคไซยานิน ประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ ดังนี้ 1. การสกัดไฟโคไซยานินเพื่อทำให้เซลล์แตก 2. การเพิ่มความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของสารละลายไฟโคไซยานิน 3. การทำแห้งสารละลายไฟโคไซยานิน ซึ่งวิธีการสกัด รวมทั้งวิธีการเพิ่มความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของไฟโคไซยานินทำได้หลายวิธี โดยแต่ละวิธีจะได้สารไฟโคไซยานินที่มีค่าความบริสุทธิ์และความเข้มข้นแตกต่างกัน ขณะที่การทำแห้งไฟโคไซยานินมักนิยมใช้การทำแห้งแบบแช่แข็งเพราะเป็นการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำไม่มีผลทำให้สีของสารสกัดไฟโคไซยานินถูกทำลาย

1. การสกัดไฟโคไซยานิน

การสกัดไฟโคไซยานินใช้หลักการทำให้เซลล์แตกและทำการแยกกากเซลล์ออกจากสารละลายไฟโคไซยานิน การทำให้เซลล์แตกทำได้หลายวิธี คือ

1.1 การใช้เอนไซม์ เอนไซม์ที่นิยมใช้คือ ไลโซไซม์ (lysozyme) การศึกษาของ Bahaskar และคณะ (2005) ใช้เอนไซม์ไลโซไซม์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลินา โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้สารละลายไฟโคไซยานินที่มีค่าความบริสุทธิ์ 0.97 อย่างไรก็ตามการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีนี้ไม่เหมาะต่อการขยายขนาดการผลิต เนื่องจากเอนไซม์ไลโซไซม์มีราคาแพง

1.2 การใช้สารเคมี โดยสารเคมีที่นิยมใช้สกัดไฟโคไซยานิน ได้แก่ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) สารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂) สารละลายโซเดียมไนเตรต (NaNO₃) และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ Herrera และคณะ (1989) ศึกษาผลของการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่าสายพันธุ์ *maxima* ด้วยสารละลาย 6 ชนิด คือ โพแทสเซียมไนเตรต (KNO₃) โซเดียมไนเตรต โซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์และน้ำกลั่น ต่อค่าความบริสุทธิ์และผลผลิตของไฟโคไซยานินโดยใช้เซลล์แห้งของสาหร่ายสไปรูลิน่า 10 กรัม และสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ผลดังกราฟรูปที่ 2



รูปที่ 2 ผลผลิตและค่าความบริสุทธิ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่ายสไปรูลิน่าสายพันธุ์ *maxima* ด้วยสารละลาย 6 ชนิด และทำการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากกราฟรูปที่ 2 พบว่า การใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นตัวสกัดจะได้ไฟโคไซยานินที่มีความบริสุทธิ์สูงสุด แต่ให้ผลผลิตของไฟโคไซยานินต่ำ ขณะที่การสกัดไฟโคไซยานินด้วยสารละลายโซเดียมไนเตรตให้ผลผลิตไฟโคไซยานินสูงสุด ขณะเดียวกันไฟโคไซยานินที่สกัดได้มีค่าความบริสุทธิ์ 0.6 ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้สารละลายโพแทสเซียมไนเตรตและโซเดียมคลอไรด์เป็นตัวสกัด ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าโซเดียมไนเตรตเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่า

Silveira และคณะ (2007) ศึกษาผลของตัวทำละลาย 5 ชนิดต่อปริมาณไฟโคไซยานิน พบว่า การใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ความเข้มข้น 10 mM สกัดได้ไฟโคไซยานินที่มีความเข้มข้นสูงสุดประมาณ 4.2 mg/ml ขณะที่การสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5 ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 10 mM ได้ไฟโคไซยานินที่มีความเข้มข้นต่ำสุดประมาณ 1.84 mg/ml ทั้งนี้เพราะที่ pH 5 นั้นใกล้เคียงกับ isoelectric point ส่งผลให้การทำปฏิกิริยาของโปรตีนในน้ำต่ำ จึงสกัดไฟโคไซยานินได้น้อยมาก ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดได้ เมื่อทำการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลินาด้วย
ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 25 และสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตัวทำละลายที่ใช้สกัดไฟโคไซยานิน	ปริมาณไฟโคไซยานิน (mg/ml)
น้ำ	3.73±0.12
โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ความเข้มข้น 10 mM	4.20±0.72
โซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 5 ความเข้มข้น 10 mM	1.84±0.23
โซเดียมคลอไรด์ 0.15 M	3.32±0.26
แคลเซียมคลอไรด์ 10 g/L	3.48±0.74

1.3 การใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การใช้เครื่องความถี่สูง (sonication) และวิธีแช่แข็ง-ละลาย (freeze-thaw) ซึ่งจากการศึกษาของ Zhang และ Chen (1999) ใช้วิธี แช่แข็งที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส - ละลาย และนำไป sonicated เป็นเวลา 3 นาที หลังตกตะกอนกากเซลล์ได้สารละลายไฟโคไซยานินที่มีค่าความบริสุทธิ์ 1.14 ขณะที่ Duangsee และคณะ (2009) เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการทำให้เซลล์สไปรูลินาแตก ด้วยวิธีทางกายภาพคือ การใช้เครื่องความถี่สูงและวิธีแช่แข็ง-ละลาย กับการใช้เอนไซม์ไลโซไซม์สรุปได้ว่าการใช้เครื่องความถี่สูงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการขยายขนาดการผลิต เนื่องจากระบบสามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่องและใช้เวลาน้อย ขณะที่วิธีแช่แข็ง-ละลาย มีข้อจำกัดของค่าใช้จ่ายเรื่องพลังงาน และในทำนองเดียวกันการใช้เอนไซม์ไลโซไซม์แม้ว่าจะให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงแต่มีข้อจำกัดคือเอนไซม์มีราคาแพง

นอกจากนี้ Doke (2005) ทำการสกัดไฟโคไซยานินจากเซลล์เป็ยกสไปรูลินาโดยเปรียบเทียบการสกัดไฟโคไซยานินด้วยน้ำกับการสกัดด้วยวิธีทางกายภาพ 2 วิธีคือ วิธีโฮโมจีไนเซชัน (homogenization) และ วิธีแช่แข็ง-ละลาย พบว่า การสกัดไฟโคไซยานินจากเซลล์เป็ยกสไปรูลินาด้วยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -21 องศาเซลเซียส-ละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการสกัดที่ได้ปริมาณไฟโคไซยานินมากที่สุดและมีค่าความบริสุทธิ์สูงสุด ดังตารางที่ 7

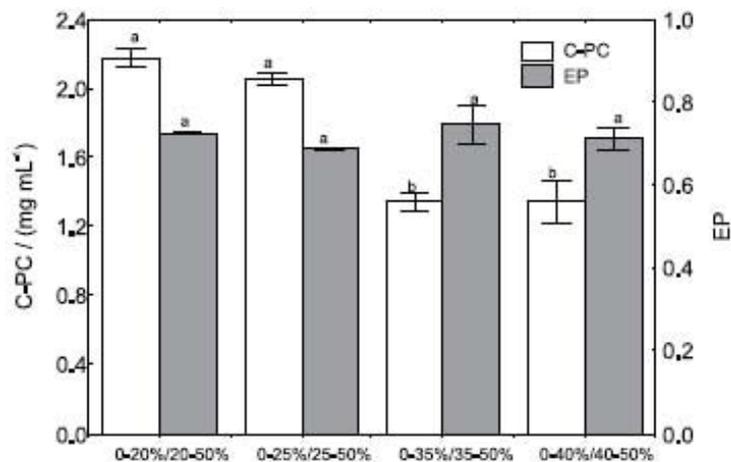
ตารางที่ 7 ผลของการสกัดไฟโคไซยานินจากเซลล์เป็ยกสาหร่ายสไปรูลินาด้วยวิธีต่าง ๆ ต่อปริมาณและค่าความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานิน

วิธีการสกัดไฟโคไซยานิน	ปริมาณไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัม/กรัม)	ค่าความบริสุทธิ์ (A ₆₂₀ /A ₂₈₀)
สกัดด้วยน้ำ	13.40±1.1	0.45±0.01
วิธีโฮโมจีไนเซชัน	82.10±0.8	0.62±0.03
วิธีแช่แข็ง-ละลาย	86.30±1.1	1.34±0.05

2. การเพิ่มความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของสารละลายไฟโคไซยานิน

เมื่อทำการสกัดไฟโคไซยานินโดยการทำให้เซลล์แตกและแยกตะกอนกากเซลล์ออกจากสารละลายไฟโคไซยานินแล้วขั้นตอนต่อไปคือ การเพิ่มความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของละลายไฟโคไซยานิน เพื่อให้ได้ไฟโคไซยานินที่มีค่าความบริสุทธิ์ตามต้องการและเหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้งานในลำดับต่อไป ซึ่งทำได้หลายวิธีคือ

2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต Silva และคณะ (2009) เพิ่มความบริสุทธิ์ของสารละลายไฟโคไซยานินโดยใช้เทคนิคการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่แตกต่างกันมีผลต่อค่าความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน และค่าความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานิน ดังกราฟรูปที่ 3



รูปที่ 3 ความเข้มข้นซี-ไฟโคไซยานินและค่าความบริสุทธิ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลินาที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการศึกษาสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงแฟรกชัน (fraction) 0-20%/20-50% เป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด โดยได้ซี-ไฟโคไซยานินที่มีความเข้มข้น 1.66 mg/ml และมีค่าความบริสุทธิ์ 0.88 ซึ่งเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 70 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าบริสุทธิ์จากขั้นตอนแรกของการสกัด และมีการ recovery สูงถึง 83.8 เปอร์เซ็นต์

2.2 วิธีโครมาโตกราฟี (chromatography) เป็นวิธีที่นิยมใช้เมื่อต้องการผลิตไฟโคไซยานินเกรดวิเคราะห์เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารละลายไฟโคไซยานินให้มีค่ามากกว่า 2 เช่น การใช้วิธี gel filtration chromatography ที่แพ้คด้วย Sephadex G-25 ได้ไฟโคไซยานินที่มีค่าความบริสุทธิ์ 4.1 [Minkowa และคณะ, 2003] ขณะที่ Bahaskar และคณะ (2005) ใช้ Sephadex G-25 และ Sephadex G-100 พบว่า สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินจาก 1.43 เป็น 3.73 และ 4.98 ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ค่าความบริสุทธิ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่าเมื่อผ่านขั้นตอนของการทำให้ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์

ขั้นตอน	โปรตีนทั้งหมด (ug/ml)	ไฟโคไซยานิน (ug/ml)	ไฟโคไซยานิน (%)	Impurity (%)	ค่าความบริสุทธิ์ (A ₆₂₀ /A ₂₈₀)
สารสกัดหยาบ	2.40	1.30	54.16	45.84	0.97
การตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต (50%, W/V)	1.70	1.41	82.94	17.06	1.43
ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25	1.81	1.57	85.08	14.92	3.73
ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100	1.75	1.59	90.85	9.15	4.98

การใช้ Sephacryl S-200 HR เป็นวิธีที่สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc. sp* จาก 1.5 เป็น 3.2 [Reis และ คณะ, 1998] และจากรายงานของ Santiago-Santos และคณะ (2004) ซึ่งศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินด้วยเทคนิค Ion exchange chromatography เช่น การใช้ Q Sepharose 4 fast flow ช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย *Calothrix sp.* จาก 0.4 เป็น 2.2

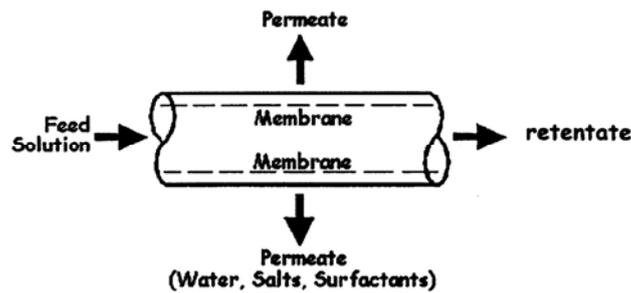
2.3. การใช้เทคโนโลยีเมมเบรน เป็นการแยกสารไฟโคไซยานินโดยใช้หลักการกรองแยกตามขนาด เช่น Herrera และคณะ (1989) นำวิธีอัลตราฟิลเตรชันโดยใช้เมมเบรนโพลีซัลโฟน (polysulphone) ขนาด 50 กิโลดาลตัน มาทำให้ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์ได้เป็นไฟโคไซยานินเกรดอาหาร ทำนองเดียวกัน Reis และคณะ (1998) ใช้วิธีอัลตราฟิลเตรชันเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานินและไฟโคอิริทินจากไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc sp* PCC 9202 โดยใช้ hollow-fiber membrane ขนาด 30 กิโลดาลตัน พบว่า ได้ค่าความบริสุทธิ์ของสารสกัดไฟโคไซยานินเท่ากับ 1

กระบวนการทางเทคโนโลยีเมมเบรน

กระบวนการทางเทคโนโลยีเมมเบรนเป็นกระบวนการแยก/การเพิ่มความเข้มข้น/การเพิ่มความบริสุทธิ์ที่มีศักยภาพใช้เพื่อแยกสารผสมที่อยู่ในรูปของเหลวที่ประกอบด้วยตัวทำละลายและตัวถูกละลาย รวมทั้งอนุภาคคอลลอยด์หรือสารแขวนลอย นิยมใช้แยกน้ำและ/หรือสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กออกจากสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่โดยใช้แรงขับดันสารผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนและมีคุณสมบัติในการเลือกสารผ่านเป็นตัวกั้นขวาง มักนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

กระบวนการไมโครฟิลเตรชัน (microfiltration) เป็นกระบวนการที่ใช้แยกสารที่มีขนาดระหว่าง 0.1-20 ไมครอน และใช้ความดันในการป้อนสารต่ำ ความดันที่ใช้ในระบบไม่เกิน 5 บาร์ ใช้หลักการคัดขนาดโดยเมมเบรนสามารถกักสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 300,000 ดาลตัน ลักษณะการกรองแยกสารในกระบวนการไมโครฟิลเตรชันแบ่งเป็น 2 แบบ คือ 1) การกรองแบบ dead-end เป็นการป้อนสารในทิศทางที่ตั้งฉากกับเมมเบรนทำให้เกิดการสะสมของอนุภาคบนผิวเมมเบรนที่เรียกว่า แค้ก (cake) ดังนั้นการกรองแบบ dead-end ควรใช้กับงานที่สารละลายประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็กและมีความเข้มข้นต่ำ และใช้การดำเนินงานแบบกะ 2) การกรองแบบไหลขวาง (cross flow) เป็นการป้อนสารละลายในทิศทางที่ขนานกับ

เมมเบรนเหมาะสำหรับสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง ขณะที่กระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) เป็นกระบวนการแยกโมเลกุลของตัวถูกละลายที่มีขนาดโมเลกุล 500-300,000 ดาลตัน และความดันที่ให้กับระบบสูงกว่ากระบวนการไมโครฟิลเตรชัน คือ อยู่ในช่วง 1-10 บาร์ [อำเภอ ชนะไชย, 2536] เมมเบรนที่ใช้กับกระบวนการอัลตราฟิลเตรชันมีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 2-20 ไมครอน หรือ molecular weight cut off (MWCO) 5-500 กิโลดาลตัน กลไกการแยกสารด้วยอัลตราฟิลเตรชันน้ำและตัวทำละลายที่มี MWCO ต่ำกว่าขนาดรูพรุนของเมมเบรนจะลอดและไหลผ่านเมมเบรนเรียกว่า เพอมีเอท (permeate) หรือฟิลเตรท (filtrate) ขณะเดียวกันตัวถูกละลายหรือสารที่ต้องการจะถูกกักไว้เรียกว่า รีเทนเตท (retentate) ซึ่งมีความบริสุทธิ์และความเข้มข้นเพิ่มขึ้น [วิโรจน์ และคณะ, 2550] ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 การแยกสารด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน [วิโรจน์ และคณะ, 2550]

การแยกสารด้วยเมมเบรนมีข้อได้เปรียบจากการแยกวิธีอื่นๆ คือ เป็นการแยกสารตามขนาดโมเลกุลหรือรูปร่าง หรือชนิดของประจุ ทำให้สามารถดำเนินการที่อุณหภูมิปกติได้ จึงเหมาะสำหรับแยกสารที่มีคุณสมบัติไวต่อความร้อนหรือสารที่จะเสื่อมสภาพเนื่องจากความร้อน เป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานค่อนข้างต่ำเพราะสามารถแยกสารได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนเฟส ไม่มีสารเหลือทิ้ง นอกจากนี้กระบวนการแยกสารด้วยเมมเบรนสามารถพัฒนาและขยายขนาดจากระดับต้นแบบไปสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ไม่ยุ่งยาก ปัญหาที่มักพบในกระบวนการไมโครฟิลเตรชันและอัลตราฟิลเตรชัน คือ การเกิดปรากฏการณ์คอนเซนเตรชันโพลาไรเซชัน (Concentration Polarization, CP คือการสะสมของสารที่ถูกกักบนผิวหน้าของเมมเบรน) และการเกิดฟาวลิง (fouling คือ การสะสมหรือการอุดตันของตัวถูกละลายทั้งบนผิวหน้าและ/หรือในรูพรุนของเมมเบรน) ประสิทธิภาพของเมมเบรนไมโครฟิลเตรชันและอัลตราฟิลเตรชัน มักใช้ค่าฟลักซ์และค่ากักกันสารเป็นตัวบ่งชี้ซึ่งค่าเหล่านี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างอาทิ เช่น ความเข้มข้นของสารสกัด อัตราการป้อนสารและขนาดรูพรุนของเมมเบรน เป็นต้น โดยถ้าระยะเวลาของการดำเนินการนานขึ้นจะมีผลให้ฟลักซ์ลดลง เมมเบรนเสื่อมสภาพเร็วขึ้นและลดประสิทธิภาพในการกรอง

การประยุกต์ใช้เมมเบรนเพื่อทำให้ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์

งานวิจัยที่นำเทคนิคทางด้านเมมเบรนมาใช้ทำให้ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์มีตัวอย่างดังนี้ กัญยาพร และคณะ (2552) ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลีนาโดยใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์ (membrane) พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายไฟโคไซยานินที่เหมาะสมคือ การใช้อัตราส่วนของสาหร่ายแห้งต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1:100 W/V และแยกไฟโคไซยานินโดยใช้เมมเบรนขนาด 5 ไมครอน ด้วยอัตราการป้อน 150 ml/min มีค่าฟลักซ์เฉลี่ย $16.26 \text{ ml/m}^2\text{s}$ ในการกรองรอบแรก และกรองผ่านเมมเบรน 0.8/0.2 ไมครอน ที่อัตราการป้อน 110 ml/min มีค่าฟลักซ์เฉลี่ย $93.32 \text{ ml/m}^2\text{s}$ ในการกรองรอบที่สองเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับระบบการกรองไมโครฟิลเตรชัน โดยสามารถลดปริมาณกากเซลล์สาหร่ายที่ปนอยู่ในสารละลายไฟโคไซยานินได้ร้อยละ 27.21 ของปริมาณกากเซลล์เริ่มต้น และทำให้ไฟโคไซยานินมีความบริสุทธิ์และเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยใช้เมมเบรนขนาด 50 กิโลดาลตัน ที่ความดันการป้อน 20 psi เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับระบบการกรองอัลตราฟิลเตรชันโดยมีค่าเพอมีเอทฟลักซ์ (permeate flux) $16.23 \text{ ml/m}^2\text{s}$ ค่าการกักกันสาร 99.63 เปอร์เซ็นต์ สามารถกำจัดน้ำออกได้ 89 เปอร์เซ็นต์ และได้ไฟโคไซยานินแห้งประมาณ 1.77 กรัม จากสาหร่ายสไปรูลีนาแห้งที่นำมาใช้สกัด 5 กรัม และมีค่าความบริสุทธิ์ 0.57 ขณะที่ Herrera และคณะ (1989) ได้ทำการสกัดไฟโคไซยานินจากสไปรูลีนาสายพันธุ์ *maxima* โดยใช้โซเดียมไนเตรต (NaNO_3) และนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชันผ่านเมมเบรนโพลีซัลฟอน (polysulphone) ขนาด 50 กิโลดาลตัน ได้ไฟโคไซยานินเกรดอาหารที่มีค่าความบริสุทธิ์ (A_{620}/A_{280}) 0.82 และได้ผลผลิตไฟโคไซยานินแห้งร้อยละ 13 ของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง การใช้วิธีอัลตราฟิลเตรชันเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานินและไฟโคอิริทินจากไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc sp PCC 9202* โดยใช้เมมเบรนชนิด hollow-fiber ขนาด 30 กิโลดาลตัน พบว่า ได้ความบริสุทธิ์ของสารสกัดเท่ากับ 1 [Rise และคณะ, 1998] นอกจากนี้ Jaouen และคณะ (1999) ใช้เทคโนโลยีทางเมมเบรนเพื่อแยกและเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลีนา โดยใช้เมมเบรน 5 ขนาด คือ 1) ไมโครฟิลเตรชันขนาด 0.2 ไมครอน 2) อัลตราฟิลเตรชันขนาด 300 กิโลดาลตัน 3) อัลตราฟิลเตรชันขนาด 100 กิโลดาลตัน 4) นาโนฟิลเตรชัน (nanofiltration) ขนาด 500 ดาลตัน 5) รีเวอร์สออสโมซิส (reverse osmosis) ขนาดน้อยกว่า 100 ดาลตัน ตามลำดับ โดยพบว่าสารละลายไฟโคไซยานินหลังผ่านกระบวนการนาโนฟิลเตรชันและรีเวอร์สออสโมซิสสามารถ recovery สารสกัดไฟโคไซยานินได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่า retention rate คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าการสูญเสียของเพอมีเอทฟลักซ์คิดเป็นร้อยละ 17 และ 2 ตามลำดับ

จากรายงานวิจัยการสกัดไฟโคไซยานิน การแยกไฟโคไซยานิน (separation) และการทำให้ไฟโคไซยานินมีความบริสุทธิ์ขึ้น (purification) เห็นได้ว่าใช้เทคนิคและวิธีการที่แตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไฟโคไซยานินไปใช้ประโยชน์ เช่น การใช้เทคโนโลยีทางเมมเบรน การใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี (ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography) การใช้วิธี aqueous two-phase extraction รวมทั้งการใช้วิธี aqueous two-phase extraction ร่วมกับวิธี ion exchange chromatography ซึ่งสรุปไว้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 วิธีการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่าและการทำให้ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์

การทำให้ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์	ความบริสุทธิ์ (A_{620}/A_{280})	ผลผลิต (เปอร์เซ็นต์)	ที่มา
วิธี Chromatography			
1. Buffer extraction	4.15	-	Boussiba และ Richmond (1979)
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation			
3. Hydroxyapatite chromatography			
4. Ion exchange chromatography			
1. Buffer extraction 0.05 M	5.06	-	Zhang และ Chen (1999)
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation			
3. Ion exchange chromatography			
4. Gel filtration chromatography			
1. Buffer extraction 0.01 M	4.42	-	Patel และคณะ (2005)
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation			
3. Ion exchange chromatography			
1. Expanded bed adsorption chromatography	3.64	8.7	Niu และคณะ (2007)
2. Anion exchange chromatography			
วิธี Aqueous two-phase extraction			
1. Aqueous two-phase extraction	3.80	29.5	Rito-Palomares และคณะ (2001)
2. Ultrafiltration			
3. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation			
1. Repeated aqueous two-phase extraction	4.05	85	Patil และ Raghavarao (2007)
2. Ultrafiltration			
1. Chitosan adsorption	5.1	66	Patil และคณะ (2006)
2. Aqueous two-phase extraction			
วิธี Two-phase aqueous extraction ร่วมกับวิธี chromatography			
1. Chitosan adsorption	6.69	-	Patil และคณะ (2006)
2. Aqueous two-phase extraction			
3. Ion exchange chromatography			

ความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานิน

การนำไฟโคไซยานินไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ นั้นขึ้นอยู่กับค่าความบริสุทธิ์ของสารสกัดไฟโคไซยานิน ซึ่งรายงานด้วยค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสง A_{620}/A_{280} การวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานินทำได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร 620 นาโนเมตร และ 652 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer [Herrera และคณะ, 1989; Rito-Palomares และคณะ, 2001; Bhaskar และคณะ, 2005; Patel และคณะ, 2005; Sun และคณะ, 2006; Narayan และ Raghavarao, 2007; Silveira และคณะ, 2007] และคำนวณตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{ความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานิน} &= A_{620}/A_{280} \\ \text{ปริมาณไฟโคไซยานิน (mg/ml)} &= [A_{620} - 0.474(A_{652})] / 5.34 \\ \text{ปริมาณอัลโลไฟโคไซยานิน (mg/ml)} &= [A_{652} - 0.208(A_{620})] / 5.09 \end{aligned}$$

โดย A_{280} เป็นค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
 A_{620} เป็นค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร
 A_{652} เป็นค่าการดูดกลืนแสงของอัลโลไฟโคไซยานินที่ความยาวคลื่น 652 นาโนเมตร

การกำหนดค่าความบริสุทธิ์และเกรดของไฟโคไซยานินที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางนั้นแต่ละบริษัท/หน่วยงานมีการกำหนดค่าแตกต่างกัน โดยมีค่าความบริสุทธิ์ตั้งแต่ 0.5 จนถึง 2.0 ส่วนความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานินเกรดวิเคราะห์หรือเกรดที่ใช้ในงานด้านเภสัชกรรมมีการกำหนดเท่ากัน คือ มากกว่าหรือเท่ากับ 4.0 ดังรายละเอียดในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่าความบริสุทธิ์ (A_{620}/A_{280}) ที่กำหนดโดยบริษัทต่างๆ และการนำไฟโคไซยานินไปใช้ประโยชน์

การนำไปใช้ประโยชน์/ค่าความบริสุทธิ์ (A_{620}/A_{280}) ที่กำหนด			
เกรดอาหารและเครื่องสำอาง		เกรดที่เป็นยา	
(Food and cosmetic grade)	A_{620}/A_{280}	(Medicine grade)	A_{620}/A_{280}
- Biodelta (Pty) LTD.	> 0.5	- Hangzhou Aowei bioengineering Co. Ltd	> 2
- Dainippon Ink and Chemical	> 0.5	- Bhaskar และคณะ (2005)	= 4
- Hangzhou Aowei bioengineering Co. Ltd.	> 0.7	- Cisnero และ Rito-Palomares (2004)	
- Rito-Palomares และคณะ (2001)	> 0.7	Reactive grade	= 3.9
- Patil และคณะ (2006)	> 0.7	Analytical grade	> 4
- Herrera และคณะ (1989)	> 0.82		
- Bhaskar และคณะ (2005)	= 2		

ปัจจุบันมีบริษัทเอกชนที่ผลิตและจำหน่ายไฟโคไซยานิน ไฟโคบิลิโปรตีนและอนุพันธ์ของไฟโคบิลิโปรตีนหลายบริษัท [Sekar และ Chandramahan, 2008] เช่น บริษัท Cyanotech ประเทศสหรัฐอเมริกา จำหน่ายไฟโคไซยานินสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร รวมทั้งผลิตภัณฑ์อัลโลไฟโคไซยานิน [Spolaore และ

คณะ, 2006] บริษัท Parry Nutraceuticals ประเทศอินเดียจำหน่ายไฟโคไซยานินที่สกัดจากออร์แกนิกสไปรูลิหน้า [http://www.parrynutraceuticals.com/products/phycoocyanin.aspx] บริษัท ProZyme ประเทศสหรัฐอเมริกาจำหน่ายซีไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่ายสไปรูลิหน้ามีความบริสุทธิ์ (A_{620}/A_{280}) มากกว่า 4.0 สำหรับใช้ในงานด้านการวิเคราะห์ [http://www.prozyme.com/products.html] บริษัท Sigma-Aldrich Co. ที่จำหน่ายไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิหน้าที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 40 นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์ไฟโคไซยานินของบริษัทอื่น ๆ ดังรูปที่ 5



ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ Nigiro™ Blue Tint
ของ บริษัท Green Energy Singapore Holdings
Pte Ltd ประเทศสิงคโปร์
ที่มา; <http://www.lanigro.com.sg/products.html>



ผลิตภัณฑ์สไปรูลิหน้าที่เคลือบด้วยไฟโคไซยานิน
ของ บริษัท Valensa International และ Parry
Nutraceuticals
ที่มา; <http://www.nutraingredients-usa.com/Industry>



ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพของบริษัท
SWISS BIOTECH
ที่มา; <http://www.excelbios.com/whatbluei>



สารสกัดไฟโคไซยานินที่ใช้เป็นสีผสมอาหาร
ของ บริษัท DIC LIFETEC ประเทศญี่ปุ่น
ที่มา; <http://www.dlt-spl.co.jp/business/en/spirulins/products.html>

รูปที่ 5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไฟโคไซยานิน