# ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่า โดยวิธีแช่แข็งสลับกับการละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค

# Factors affecting phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* by using freezing and thawing combined with ultrasonic method

**ทิพาพร เรืองยศ[1] สมเกียรติ จตุรงค์ล้ำเลิศ[1] ชนวัฒน์ นิทัศน์วิจิตร[1] และจตุรภัทร วาฤทธิ์[1]**

Thiphaporn Ruangyot[1] Somkiat Jaturonglumlert[1]Chanawat Nitatwichit[1] and Jaturapatr Varith[1]

[1]คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

[1]Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Agro-Industry,

Maejo University, Chiang Mai, 50290, Thailand

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาเทคนิคการสกัดสารไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยวิธีแช่แข็งสลับกับการละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่า มีตัวแปรที่ศึกษาคือความถี่ของคลื่นอัลตร้าโซนิค (28, 45, 100 kHz) ระยะเวลาในการอัลตร้าโซนิค (15, 30, 60 min) และปริมาณตัวอย่าง (25, 50, 100 g) พบว่าการสกัดสารไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่า โดยใช้วิธีแช่แข็งสลับกับการละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค โดยใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคที่ความถี่ 45 kHz ระยะเวลาในการอัลตร้าโซนิค 15 min ปริมาณตัวอย่างในการสกัด 50 g ที่ระดับการถ่ายโอนพลังงาน 600 J/g ให้ความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน ความบริสุทธิ์ และปริมาณของไฟโคไซยานินสูงสุด 3.72±0.19 mg/ml, 1.54±0.39 และ 1.15±0.93 mg/g ตามลำดับ

## Abstract

This study aims to evaluate the alternative method, which used a combination of repeated freezing and thawing (RFT) with ultrasonic-assisted extraction, (UAE). The extraction varied at different ultrasonic frequencies (28 kHz, 45 kHz, 100 kHz) with sonication times of 15, 30, and 60 minutes and volume samples of 25, 50 and 100 g. at transmitted energy 600 J/g to obtain concentrations of phycocyanin, extraction purity, and extraction yield. It was found that the best condition for ultrasonic frequency was 45 kHz, with an extraction time of 15 minutes and a volume sample 50 g. The concentration was 3.72±0.19 mg/ml with a purity of 1.54±0.39 and a yield of 1.15±0.93 mg/g. respectively.

## คำนำ

"สไปรูลิน่า" (*Spirulina* sp.) เป็นไซยาโนแบคทีเรีย ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในระดับอุตสาหกรรมมีมากขึ้น จึงทำให้สาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ดังนั้นจึงมีความต้องการเพิ่มมูลค่าของสาหร่ายสไปรูลิน่า โดยการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ หนึ่งในผลิตภัณฑ์แปรรูปที่เป็นที่ต้องการของตลาดภายในประเทศ และต่างประเทศ คือ อาหารเสริม ซึ่งต้องผ่านการอบแห้ง เพื่อคงคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายสไปรูลิน่าไว้ (Jaturonglumlert and Varith, 2013) สาหร่ายสไปรูลิน่าที่สามารถช่วยบำรุง และเสริมการรักษาโรคต่างๆ เนื่องจากสาหร่ายสไปรูลิน่ามีองค์ประกอบหลายอย่างที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น มีโปรตีนสูงถึง 60% ของน้ำหนักแห้ง และเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดี อีกทั้งยังเป็นแหล่งของวิตามิน โดยเฉพาะวิตามินบี 12 นอกจากนี้ยังมีเบตาแคโรทีน (Beta-Carotene) ธาตุเหล็ก และกรดไขมันจำเป็นที่ หายาก เช่น กรดแกมม่าไลโนลิก (Gamma linolenic) ที่พบในพืชบางชนิดเท่านั้น (Boonsom, 1990)

นอกจากนี้สาหร่ายสไปรูลิน่ายังมีสารไฟโคไซยานิน (Phycocyanin: PC) เป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่มีรงควัตถุเกาะอยู่บนโมเลกุล พบได้ทั่วไปในสาหร่ายในคลาส Cyanophyceae สารที่สกัดจากสาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นสารที่มีสีฟ้า เรืองแสงได้ ละลายได้ดีในน้ำ มีคุณสมบัติเป็นสารเพื่อโภชนะบำบัด (Nutraceutical) และมีมูลค่าสูง ในปัจจุบันสารไฟโคไซยานินถูกใช้เป็นสีผสมอาหาร ใช้ในงานวิเคราะห์ เนื่องจากไฟโคไซยานินมีคุณสมบัติเป็นสารเรืองแสงจึงใช้เป็นสารติดตาม (Immunoassays) ในงานด้านชีวเคมี นอกจากนี้ในทางการค้ามีการผลิตสารไฟโคไซยานินทั้งในรูปของเหลว และผงแห้งในชื่อต่าง ๆ กัน เช่น Bioprex's PC ในรูปผง มีทั้งชนิดที่ใช้ในอาหารซึ่งจะมีค่าความบริสุทธิ์ต่ำ และชนิดที่ใช้ในการตรวจสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาซึ่งมีความบริสุทธิ์ และมีราคาสูงกว่า (Kronick, 1986)

ปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานในการสกัดสารไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่า แต่โดยทั่วไปจะต้องทำให้ผนังเซลล์แตกก่อน จึงจะสามารถแยกไฟโคไซยานินออกมาได้ จากการศึกษาของ Sarada *et al.* (1999) พบว่าเซลล์ของสาหร่ายสดจะให้ผลผลิตไฟโคไซยานินสูงกว่าการใช้เซลล์แห้ง โดยที่การทำแห้งสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยวิธีต่าง ๆ กัน เช่น การทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย และการทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนจะสูญเสียไฟโคไซยานินถึง 45 % เมื่อเทียบกับการใช้เซลล์สด การสกัดไฟโคไซยานินสามารถทำได้โดยการทำลายผนังเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลิน่า การทำลายผนังเซลล์สามารถทำได้หลายวิธี แต่สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) การใช้แรงกล เช่น เครื่องบด คลื่นอัลตร้าโซนิค และการใช้แรงดันสูง (2) การทำลายทางกายภาพ เช่น ความร้อน หรือการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย 2 ถึง 3 รอบ (Rachen, 2009) และ (3) การย่อยด้วยเอนไซม์หรือสารเคมี (Hatti and Mattiasson, 2003)

ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่า จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาปัจจัยในการสกัดโดยการใช้เทคนิคการแช่แข็งสลับกับการละลาย ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการทำลายผนังเซลล์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย มาประยุกต์ใช้ในการสกัดไฟโคไซยานินร่วมกับการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิค เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดให้ดียิ่งขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสกัดเชิงการค้า เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับสาหร่ายสไปรูลิน่าต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. **การเตรียมตัวอย่างสาหร่ายสไปรูลิน่า** ตัวอย่างสาหร่ายสไปรูลิน่าที่นำมาศึกษาเพาะเลี้ยงที่คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยได้เพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการ และสูตรอาหารของคณะเทคโนโลยีประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (Promya *et al.,* 2009) ซึ่งสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการทดลองคือ *Spirulina* sp. โดยการทดลองจะทำการเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า โดยให้มีค่าความหนาแน่นของเซลล์ (Optical density: OD) เริ่มต้น 0.5±0.05 เลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างสาหร่ายโดยทำการวัดค่า OD ของสาหร่ายสไปรูลิน่าให้มีค่าสุดท้าย 1.2±0.05 ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (ยี่ห้อ HACH รุ่น DR/4000, USA) ที่ความยาวคลื่น 560 nm จากนั้นทำการกรองโดยใช้ผ้ากรองขนาด 30 μm พร้อมกับล้างทำความสะอาด และวัดความชื้นมาตรฐานเปียกให้อยู่ในช่วง 85-90%wb จากนั้นนำไปบรรจุในขวดป้องกันแสงที่มีฝาปิด เก็บรักษาในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -10°C ก่อนนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2. **การสกัดด้วยเทคนิคแช่เยือกแข็งสลับกับการละลายร่วมกับการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิค** การสกัดไฟโคไซยานินสามารถสกัดได้โดยดัดแปลงวิธีการสกัดจากวิธีของ Patel et al. (2005)

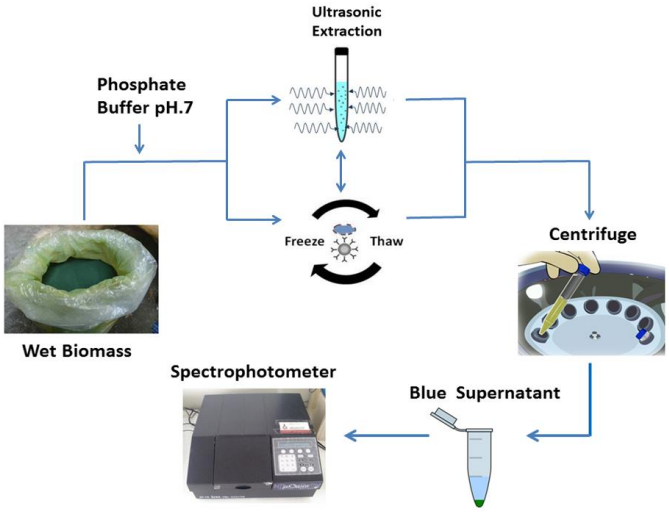


**Figure 1** The phycocyanin extraction process from *Spirulina platensis*

ชั่งสาหร่ายสดปริมาณ 25, 50 และ 100 g ใส่ในขวดป้องกันแสงขนาด 45 ml เติมสารละลาย sodium phosphate buffer (pH 7.0) ความเข้มข้น 0.1 mol/L ปริมาณ 5, 25 และ 125 ml ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาทำลายผนังเซลล์โดยใช้คลื่นอัลตร้าโซนิค (ยี่ห้อ Honda ขนาด 100 วัตต์ รุ่น W-113, Japan) โดยให้คลื่นอัลตร้าโซนิคที่ความถี่ 28 45 และ 100 kHz ระยะเวลาการรับคลื่นอัลตร้าโซนิค (Sonication time) นาน 15, 30 และ 60 min นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 °C จากนั้นนำมาละลายโดยทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำ 3 ครั้ง (Fig. 1) แล้วเติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาณ 10 ml นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 1 hr จากนั้นนำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่อง Centrifuge (Universal centrifuge รุ่น PLC–012E, Taiwan) ที่อุณหภูมิห้อง 25 °C ด้วยความเร็วรอบ 20,000 RPM นาน 20 min นำของเหลวใสสีฟ้าที่ได้ (Figure 2) มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 1.0 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer (ยี่ห้อ HACH รุ่น DR/4000, USA) โดยวัดที่ความยาวคลื่น 280, 620 และ 652 nm

โดยใช้ Cuvette แบบควอตซ์ (Quartz cell) ขนาดกว้าง 1 cm คำนวณปริมาณไฟโคไซยานิน ความบริสุทธิ์ ความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน และค่าการถ่ายโอนพลังงาน

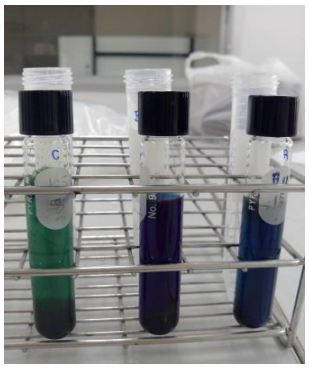

**Figure 2** The blue dye color of phycocyanin after the extraction process

3. **การเก็บรวบรวม และวิเคราะห์ข้อมูล** ผลที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280, 620 และ 652 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการ 1-3 และระดับการถ่ายโอนพลังงานตามสมการ 4

4.1 ค่าความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน (Concentration of phycocyanin: C-PC) จาก Silveira *et al*., (2007) คำนวณด้วยสมการ

$$\text{C-PC (mg/ml)} = [A_{620} - 0.474(A_{652})]/\ 5.34 \qquad (1)$$

4.2 ค่าความบริสุทธิ์ของสารไฟโคไซยานิน (Extract Purity: EP) จาก Silveira *et al*., (2007) คำนวณด้วยสมการ

$$EP = A_{620} / A_{280} \qquad (2)$$

4.3 ค่าปริมาณของสารไฟโคไซยานิน (Extraction Yield: Y) จาก Silveira *et al*., (2007) คำนวณด้วยสมการ

$$Y\ (mg/g) = (C\text{-}PC)\ V/\ DB \qquad (3)$$

เมื่อ $A_{280}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm

$A_{620}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm

$A_{652}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 652 nm

C-PC คือ ค่าความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน (mg/ml)

V คือ ปริมาตรของบัฟเฟอร์ (ml)

DB คือ มวลของตัวอย่าง (g)

4.4. ค่าการถ่ายโอนพลังงาน (Transmitted energy: $E_t$) จาก Chisti (2003) คำนวณด้วยสมการ

$$E_t\ (J/g) = (P \times t) / m \qquad (4)$$

เมื่อ P คือ กำลังของเครื่องอัลตร้าโซนิค ในหน่วย วัตต์ (W)

t คือ เวลาที่ให้พลังงานกับสาหร่าย ในหน่วย วินาที (s)

m คือ ปริมาณตัวอย่าง ในหน่วย กรัม (g)

4. **การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ** การทดลองทั้งหมดทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±S.D) จากนั้นนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

### ความเข้มข้น ความบริสุทธิ์ และปริมาณของสารไฟโคไซยานิน

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสกัดสารไฟโคไซยานินในสาหร่ายสไปรูลิน่า คือ ความถี่ของคลื่นอัลตร้าโซนิค ระยะเวลาในการอัลตร้าโซนิค และปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด ซึ่งเมื่อทำการเปลี่ยนสภาวะในการสกัด จากนั้นทำการวัดค่าความเข้มข้น ความบริสุทธิ์ และปริมาณของสารไฟโคไซยานิน เมื่อทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่า ค่าที่ได้จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ตัวอย่างในการสกัด 25 g เปลี่ยนแปลงความถี่ของคลื่นอัลตร้าโซนิค และระยะเวลาในการอัลตร้าโซนิคจะส่งผลต่อความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน ที่ความถี่ของคลื่นอัลตร้าโซนิค 28 kHz ระยะเวลาในการอัลตร้าโซนิค 60 min ให้ค่าความเข้มข้น ค่าความบริสุทธิ์ และปริมาณไฟโคไซยานินสูงสุด และการสกัดโดยใช้คลื่นอัลตร้าโซนิค 28 kHz ระยะเวลาในการอัลตร้าโซนิค 15 min ให้ค่าที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 1)

**Table 1** Effect of frequency and extraction time on concentration, purity and yield of phycocyanin at sample weight 25 g.

| Frequency (kHz) | Sonication Time (min) | C-PC (mg/ml) | EP | Y (mg/g) |
|---|---|---|---|---|
| Control | - | 0.41±0.31[a] | 0.58±0.16[a] | 0.08±0.08[a] |
| 28 | 15 | 2.80±0.37[c] | 0.52±0.26[a] | 0.50±0.13[b] |
| 28 | 30 | 1.77±0.05[b] | 0.29±0.04[a] | 0.29±0.05[b] |
| 28 | 60 | 2.94±0.19[c] | 0.94±0.19[a] | 0.77±0.06[c] |
| 45 | 15 | 2.30±0.33[c] | 1.78±0.04[c] | 0.59±0.00[b] |
| 45 | 30 | 1.86±0.67[b] | 0.98±0.36[b] | 0.34±0.11[b] |
| 45 | 60 | 2.76±0.57[c] | 0.88±0.04[b] | 0.51±0.07[b] |
| 100 | 15 | 0.41±0.23[a] | 0.48±0.05[a] | 0.13±0.00[a] |
| 100 | 30 | 1.71±0.46[b] | 0.95±0.06[b] | 0.42±0.17[b] |
| 100 | 60 | 1.02±0.30[b] | 0.67±0.11[b] | 0.66±0.00[c] |

The different alphabets (a, b, c) in the same column indicate statistical significant difference ($p<0.05$).

ค่าความเข้มข้น ความบริสุทธิ์ และปริมาณของสารไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากตัวอย่างของสาหร่ายสไปรูลิน่า 50 g พบว่าเมื่อเปลี่ยนแปลงความถี่ของคลื่นอัลตร้าโซนิค และระยะเวลาในการอัลตร้าโซนิคมีผลต่อความเข้มข้นของไฟโคไซยานินที่ความถี่ของคลื่นอัลตร้าโซนิค 28 และ 100 kHz ให้ค่าความเข้มข้นที่ไม่แตกต่าง

กันทางสถิติ ส่วนความบริสุทธิ์ และปริมาณของไฟโคไซยานินที่ได้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2)

**Table 2** Effect of frequency and extraction time on concentration, purity and yield of phycocyanin at sample weight 50 g.

| Frequency (kHz) | Sonication Time (min) | C-PC (mg/ml) | EP | Y (mg/g) |
|---|---|---|---|---|
| Control | - | 0.56±0.25[a] | 0.34±0.23[a] | 0.42±0.24[a] |
| 28 | 15 | 2.33±0.00[b] | 0.56±0.52[a] | 1.05±0.02[ab] |
| 28 | 30 | 2.10±0.60[b] | 0.27±0.05[a] | 0.71±0.02[a] |
| 28 | 60 | 2.75±0.08[b] | 0.43±0.21[a] | 0.70±0.06[a] |
| 45 | 15 | 3.72±0.19[c] | 1.54±0.39[c] | 1.15±0.93[ab] |
| 45 | 30 | 3.22±0.00[c] | 1.49±0.39[c] | 1.65±0.02[b] |
| 45 | 60 | 3.10±2.54[c] | 1.10±0.01[c] | 1.08±0.8[ab] |
| 100 | 15 | 1.51±0.02[b] | 0.55±0.29[a] | 0.59±0.29[a] |
| 100 | 30 | 1.23±0.01[b] | 0.83±0.10[b] | 0.86±0.01[a] |
| 100 | 60 | 1.19±0.03[b] | 0.81±0.05[b] | 0.64±0.19[a] |

The different alphabets (a, b, c) in the same column indicate statistical significant difference ($p<0.05$).

เมื่อทำการสกัดสารไฟโคไซยานินจากตัวอย่างของสาหร่ายสไปรูลิน่า 100 g พบว่าเมื่อเปลี่ยนแปลงความถี่ของคลื่นอัลตร้าโซนิค และระยะเวลาในการอัลตร้าโซนิคส่งผลต่อความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน โดยความถี่ของคลื่นอัลตร้าโซนิค 45 kHz ให้ค่าความเข้มข้นที่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับความถี่อื่นๆ ส่วนความบริสุทธิ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และปริมาณของไฟโคไซยานินที่ได้ที่ทุกความถี่ของคลื่นอัลตร้าโซนิคมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 3)

**Table 3** Effect of frequency and extraction time on concentration, purity and yield of phycocyanin at sample weight 100 g.

| Frequency (kHz) | Sonication Time (min) | C-PC (mg/ml) | EP | Y (mg/g) |
|---|---|---|---|---|
| Control | - | 0.59±0.32[a] | 0.48±0.13[a] | 0.09±0.52[a] |
| 28 | 15 | 2.23±0.02[c] | 0.36±0.03[a] | 0.98±0.00[ab] |
| 28 | 30 | 2.10±0.05[b] | 0.33±0.19[a] | 0.62±0.01[ab] |
| 28 | 60 | 2.78±0.62[bc] | 0.62±0.29[b] | 0.73±0.05[ab] |
| 45 | 15 | 2.87±0.12[c] | 0.60±0.14[b] | 1.11±0.89[b] |
| 45 | 30 | 2.48±0.22[b] | 0.85±0.18[c] | 0.94±0.60[ab] |
| 45 | 60 | 2.72±0.50[bc] | 0.57±0.23[b] | 1.03±0.82[ab] |
| 100 | 15 | 1.70±0.63[a] | 0.38±0.05[a] | 0.17±0.05[a] |
| 100 | 30 | 1.78±0.02[a] | 0.58±0.40[b] | 0.77±0.01[ab] |
| 100 | 60 | 2.20±0.54[b] | 0.41±0.25[a] | 0.84±0.09[ab] |

The different alphabets (a, b, c) in the same column indicate statistical significant difference ($p<0.05$).

ผลการศึกษาพบว่า การสกัดไฟโคไซยานินด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิค 45 kHz ระยะเวลาในการอัลตร้าโซนิค 15 min และใช้ปริมาณตัวอย่างในการสกัด 50 g (Figure 3) จะมีความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานิสูงสุด 3.72±0.19 mg/ml และ 1.54±0.39 ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมเพิ่มขึ้น 84.95% และ 77.92% ตามลำดับ แต่ในขณะที่ปริมาณของสารไฟโคไซยานินนั้น ได้ค่า 1.15±0.93 mg/g เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมมีค่าเพิ่มขึ้น 63.48 % และค่าที่ได้มีค่าน้อยกว่าการสกัดด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิค 45 kHz ระยะเวลาในการอัลตร้าโซนิค 30 min แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

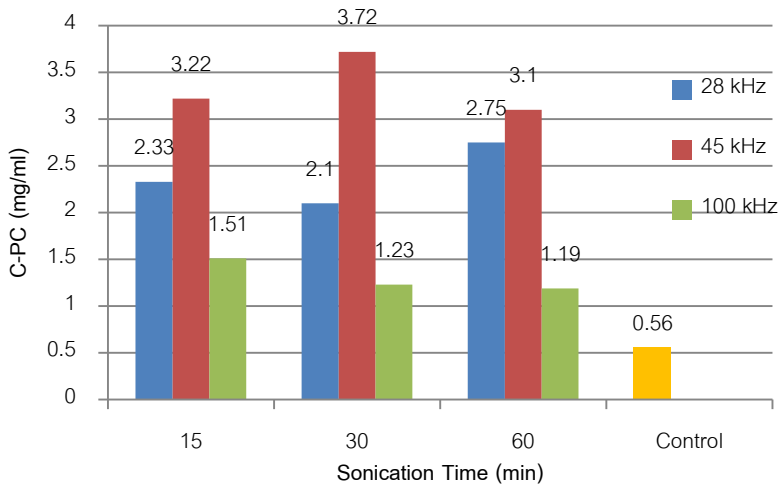


**Figure 3** Average concentration of phycocyanin extraction varied at different condition.

เมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการทำลายเซลล์ด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคมาส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า จะพบว่า เซลล์ของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ทำลายเซลล์โดยใช้ความถี่ 45 kHz เซลล์จะเกิดความเสียหายมากกว่าการใช้ความถี่อื่นๆ (Figure 4) เนื่องจากที่ความถี่ 100 kHz ซึ่งมีความถี่สูง แต่มีกำลังการถ่ายโอนต่ำ จึงทำให้ให้อนุภาคขนาดเล็กของฟองอากาศเกิดการสั่นแกว่งหลังจากที่ได้รับคลื่นอัลตร้าโซนิค แต่การสั่นแกว่งชนิดนี้ไม่เกิดการแตก จึงทำลายเซลล์ได้น้อยกว่าความถี่ 45 kHz ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น กล่าวคือเมื่อเซลล์เกิดความเสียหายมากจะทำให้สกัดสารไฟโคไซยานินได้ความเข้มข้นสูง และได้ปริมาณของไฟโคไซยานินสูงด้วยเช่นกัน

**Figure 4** Morphological examination of *Spirulina platensis*. after extraction varied at different ultrasonic frequencies (28 kHz, 45 kHz, and 100 kHz)

เมื่อทำการสกัดไฟโคไซยานินโดยใช้วิธีแช่แข็งสลับกับการละลาย อัลตร้าโซนิค และใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน พบว่า การสกัดโดยใช้การแช่แข็งสลับกับการละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค ให้ค่าความเข้มข้นของสารไฟโคไซยานินสูงกว่าการสกัดโดยใช้วิธีเดียว (Table 4)

**Table 4** Concentration of phycocyanin from different extraction method

| Extraction Method | C-PC (mg/ml) |
|---|---|
| Repeated freezing and thawing (RFT) | 2.34 |
| Ultrasonic-assisted extraction, (UAE) | 2.11 |
| RFT & UAE | 3.72 |

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้น ความบริสุทธิ์ และปริมาณของไฟโคไซยานิน ที่ระดับการถ่ายโอนพลังงาน 300 600 1,200 2,400 และ 4,800 J/g พบว่า ที่ระดับการถ่ายโอนพลังงาน 600 J/g ให้ค่าความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน และปริมาณไฟโคไซยานินสูงสุด และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับการถ่ายโอนพลังงานอื่น ๆ ส่วนค่าความบริสุทธิ์ ที่ระดับการถ่ายโอนพลังงาน 600 J/g ให้ค่าสูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อเทียบกับระดับการถ่ายโอนพลังงานที่ 1,200 J/g (Table 5)

**Table 5** Transmitted energy from different condition

| $E_t$ (J/g) | C-PC (mg/ml) | EP | Y (mg/g) |
|---|---|---|---|
| 300 | $2.87\pm0.12^{b}$ | $0.60\pm0.14^{a}$ | $1.11\pm0.89^{b}$ |
| 600 | $3.72\pm0.19^{c}$ | $1.54\pm0.39^{c}$ | $1.15\pm0.93^{b}$ |
| 1200 | $2.30\pm0.33^{a}$ | $1.78\pm0.04^{c}$ | $0.59\pm0.00^{a}$ |
| 2400 | $3.10\pm2.54^{b}$ | $1.10\pm0.01^{b}$ | $1.08\pm0.80^{b}$ |
| 4800 | $2.76\pm0.57^{b}$ | $0.88\pm0.04^{a}$ | $0.51\pm0.07^{a}$ |

The different alphabets in the same column (a, b, c) indicate statistical significant difference ($p<0.05$).

## สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่า ด้วยเทคนิคแช่แข็งสลับกับการละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค การสกัดโดยใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคที่ความถี่ 28, 45 และ 100 kHz เวลาในการอัลตร้าโซนิค 15, 30, 60 min และตัวอย่างในการสกัด 25, 50, 100 g พบว่าที่ระดับการถ่ายโอนพลังงาน 600 J/g การสกัดโดยใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคที่ 45 kHz ระยะเวลาในการอัลตร้าโซนิค 15 min และใช้ตัวอย่างในการสกัด 50 g จะให้ความเข้มข้นของไฟโคไซยานินสูงสุด 3.72±0.19 mg/ml นอกจากนี้ที่คลื่นอัลตร้าโซนิคที่ 45 kHz ระยะเวลาการอัลตร้าโซนิค 15 min ตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด 25 g ได้ค่าความบริสุทธิ์สูงสุด 1.54±0.39 และที่คลื่นอัลตร้าโซนิคที่ 45 kHz ระยะเวลาในการอัลตร้าโซนิค 30 min และตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด 50 g มีปริมาณของไฟโคไซยานินสูงสุด 1.65±0.02 mg/g ดังนั้นการสกัดคลื่นอัลตร้าโซนิคที่ความถี่ 45 kHz ร่วมกับการแช่แข็งสลับกับการละลาย ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารไฟโคไซยานินได้ดียิ่งขึ้น

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2558 และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้สนับสนุนทุนศิษย์ก้นกุฏิ ประจำปีการศึกษา 2557

## เอกสารอ้างอิง

Boonsom, J. 1992. The Secret of *Spirulina* sp. Bangkok: Kurusapa Printing Ladphrao. 56 p.

Chisti, Y. 2003. Trends Biotechnol. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. (21): 89–93.

Jaturonglumlert, S. and Varith, J. 2013. Effect of Drying with Heat Convection and Heat Radiation on Drying Kinetics of *Spirulina* sp. In Communications in Heat and Mass Transfer in Thermal equipment and Themal processes. The Imperial Golden Triangle Resort. (12): 55-67.

Hatti-Kaul, R. and Mattiasson, B. 2003. Release of Prote in from Biological Host. Cited in R. Hatti-Kaul and Mattiasson (eds). Isolation and Purification of Proteins. USA: Marcel Dekker. 1-27.

Kronick, M.N. 1986. The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay, Journal of Immunological Methods. 92: 1-13.

Patel, A., Mishra, S., Pawar, R. and Ghosh, P.K. 2005. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. Protein Expression and Purification. (40): 248 –255.

Promya, J., Srinolsom, K. and Chitmanat, C. 2009. Effects of *Spirulina* sp. and *Cladophora* sp. on growth performance, meat quality and immunity stimulating capacity of African Sharptooth Catfish (*Clarias gariepinus*). Thai fisheries gazette. 62 (6):511-518. [in Thai]

Rachen, D. 2009. Extraction and stability of phycocyanin from *Spirulina* sp. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Food Technology. Suranaree University of Technology. Nakhon Ratchasima. 13 p.

Sarada, R., Pillai, M.G. and 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 Biochemistry. (34): 795–801.

Silveira, S.T., Burkert, J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V. and Kalil, S.J. 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina* sp. using factorial design. Bioresource Technology. 98: 1629-1634.