ราเชนทร์ ดวงศรี : การสกัดและความคงตัวของไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูไลนา (EXTRACTION AND STABILITY OF PHYCOCYANIN FROM *Spirulina* sp.) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์, 125 หน้า.

งานวิจัยนี้ ได้คัดเลือกสาหร่ายในสกุลสไปรูไลนาจากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Spirulina platensis* (IFRPD1178 1181 1190 1204 1208 1212 1213 และ 1216) และ *Spirulina maxima* (IFRPD1183 และ 1215) เพื่อคัดหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการนำไปสกัดสารไฟโคไซยานิน โดยพิจารณาจากลักษณะทั่วไปของเซลล์สาหร่าย ปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมด และผลผลิตของไฟโคไซยานินที่สกัดได้ จากการศึกษาพบว่า ทุกสายพันธุ์มีอัตราการเติบโตไม่แตกต่างกัน แต่สายพันธุ์ 1183 และ 1213 ได้รับการคัดเลือกเพื่อนำไปสกัดไฟโคไซยานิน เนื่องจากมีปริมาณไฟโคไซยานินสูง (ร้อยละ 17.53 และ 17.14 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ) ไม่แยกตัวจากอาหารที่ใช้เลี้ยง และผนังเซลล์ของสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ทนต่อแรงกลระหว่างการเก็บเกี่ยวได้ดี การศึกษาวิธีการสกัดไฟโคไซยานินทำโดยใช้วิธีการทำลายผนังเซลล์ 3 วิธี คือ (1) วิธีการใช้คลื่นอัลตราโซนิก (2) วิธีการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย (Repeatedly freezing and thawing, RFT) และ (3) การย่อยด้วยไลโซไซม์ เพื่อสกัดไฟโคไซยานิน โดยที่วิธีที่ (1) ทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเป็นเวลา 5, 12.5 และ 20 วินาที ที่ระดับความสูงของคลื่นร้อยละ70, 85 และ 100 ส่วนวิธีที่ (2) ใช้การแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 1–3 ชั่วโมง สลับกับการละลาย 1-3 รอบ และในวิธีที่ (3) ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 9.09 และ 18.17 มิลลิกรัมต่อกรัมของสาหร่ายแห้ง โดยการสกัดที่อุณหภูมิ 30 37 และ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า คลื่นอัลตราโซนิกสามารถทำลายผนังเซลล์สาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีกว่าวิธี RFT หลังจากทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเมื่อนำไปสกัดต่อพบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาสกัดมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด (Extraction efficiency, EE) ของทั้งสองสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ค่า EE ของทั้งสองสายพันธุ์ที่อุณหภูมิเท่ากันไม่แตกต่างกัน การสกัดสายพันธุ์ 1183 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะให้ค่า EE สูงกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากการสกัดโดยใช้เอนไซม์ พบว่าระยะเวลาและอุณหภูมิในการสกัด มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดไฟโคไซยานินและการปนเปื้อนของคลอโรฟิลล์ในสารละลายไฟโคไซยานินอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ปริมาณไลโซไซม์ มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดของสายพันธุ์ 1213 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อสายพันธุ์ 1183 และพบว่าตัวอย่างที่สกัดโดยใช้เอนไซม์จะให้ค่า EE สูงกว่าเมื่อสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียวเพียงร้อยละ 6.4 สำหรับสายพันธุ์ 1213 และการสกัดโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำอาร์โอ

ถึง 13 เท่า

การศึกษาผลของพีเอชและความร้อนที่มีต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่าย *Spirulina maxima* IFRPD1183 โดยทำในสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีไฟโคไซยานินเข้มข้น 123 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยบัฟเฟอร์มีค่าความเข้มข้นของประจุ (Ionic strength) 0.1 โมลต่อลิตร และปรับพีเอช เป็น 3.0 4.0 4.5 5.0 และ 6.0 พบว่าที่พีเอชต่างๆ ไฟโคไซยานินจะยังคงสภาพทางธรรมชาติได้ที่พีเอชสูงกว่าหรือเท่ากับ 5.0 ส่วนผลการให้ความร้อนอย่างต่อเนื่อง จาก 30 องศาเซลเซียส ถึง 68 องศาเซลเซียส ในเวลา 240 วินาที พบว่าสารละลายไฟโคไซยานินที่พีเอช 5.0 มีความคงตัวต่อความร้อนมากที่สุด

การศึกษาผลของมอลโตเดกซ์ตริน กลีเซอรอลและมอลติตอล ที่มีต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่าย *Spirulina maxima* IFRPD1183 ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง พบว่าไฟโคไซยานินที่ไม่มีสารให้ความคงตัวเมื่อผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง จะสูญเสียความคงตัวเมื่อพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 คิดเป็นร้อยละ 31.5 และ 5.5 ตามลำดับ การเติมกลีเซอรอลมากกว่า 0.3 กรัมต่อกรัมโปรตีนจะลดความคงตัวของไฟโคไซยานินในระหว่างกระบวนการทำแห้ง ความคงตัวของไฟโคไซยานินที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้งจะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณมอลโตเดกซ์ตริน แต่ไฟโคไซยานินที่ทำแห้งแบบพ่นฝอยจะมีความคงตัวมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณมอลติตอล

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินผงที่ได้จากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนแบบพ่นฝอย ซึ่งมีมอลโตเดกซ์ตริน และมอลติตอลเป็นสารให้ความคงตัวในอัตรา 2 กรัม และ 1 กรัมต่อกรัมโปรตีนตามลำดับ เมื่อเก็บไฟโคไซยานินผงในสภาวะมีอากาศ และในสภาวะเป็นสุญญากาศร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าบรรยากาศในการเก็บรักษาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370 ของไฟโคไซยานิน แต่การเปลี่ยนแปลงของค่าดังกล่าว ที่อุณหภูมิทั้งสองจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บและเป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงอันดับที่ 1 ซึ่งมีค่าอัตราคงที่เท่ากับ -9×10^{-4} และ -13×10^{-4} ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

เมื่อศึกษาผลของไฟโคไซยานินต่อดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ พบว่าไฟโคไซยานินผงที่ทำแห้งด้วยความร้อนไม่มีผลต่อดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตาม ไฟโคไซยานินผงที่ไม่มีสารให้ความคงตัวจะมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวได้ต่ำกว่าไฟโคไซยานินผงที่มีมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลเป็นสารให้ความคงตัวอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และจากการศึกษาความสามารถในการจับอนุมูลไฮดรอกซิล และ

อนุมูลของเหล็ก พบว่า ไฟโคไซยานินที่มีการสูญเสียสภาพธรรมชาติมากกว่าจะจับอนุมูลไฮดรอกซิลได้มากกว่า ตรงข้ามกับความสามารถในการจับอนุมูลของเหล็กซึ่งจะลดน้อยลง

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

RACHEN DUANGSI : EXTRACTION AND STABILITY OF PHYCOCYANIN FROM *Spirulina* sp. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUWAYD NINGSANOND, Ph.D., 125 PP.

PHYCOCYANIN/ *SPIRULINA* EXTRACTS/ DRYING/ MALTODEXTRIN/ MALTITOL/ GLYCEROL/ ANTIOXIDANT

This research selected suitable *Spirulina* from10 strains of *Spirulina platensis* (IFRPD1178, 1181, 1190, 1204, 1208, 1212, 1213, and 1216) and *Spirulina maxima* (IFRPD1183 and 1215) from the collection of the Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University for phycocyanin extraction. Selection criteria were based on their morphological properties, phycocyanin contents and extracted yields. The results showed that their growth rates were not different. However, IFRPD1183 and 1213 were selected for phycocyanin extraction because of their high phycocyanin contents (17.53 and 17.14%, respectively), good cell suspension in culturing media and adequate cell wall resistance to mechanical rupture during harvesting.

Three methods of cell wall breakages for phycocyanin extraction were conducted; (1) sonication, (2) repeatedly freezing and thawing (RFT), and (3) enzymolysis with lysozyme. Ultrasonic waves were employed for sonication for 5, 12.5 and 20 sec at 70, 85 and 100% amplitudes. Freezing at -20°C for 1 – 3 h with 1 to 3 thawing cycles were carried out for RFT. For enzymolysis, 9.09 and 18.17 mg lysozyme per g of algae dry weight at 30, 37 and 44°C for 1 – 4 h were studied. The results showed that sonication offered higher cell wall ruptures than RFT method.

After cell wall rupture by sonication, *Spirulina* phycocyanin was extracted at 25 and 37°C. It was found that extraction time significantly affected the extraction efficiency (EE) of both strains ($p<0.05$), but extraction temperature did not. The EE value of IFRPD1183 extracted at 37°C was higher than that at 25°C. From enzymolysis, the extraction time and extraction temperature significantly affected EE and chlorophyll contamination of crude phycocyanin ($p<0.05$). Lysozyme concentration was the only factor affecting phycocyanin extraction from IFRPD1213, with no effect on IFRPD1183. The EE of phycocyanin from IFRPD1213 using lysozyme was only 6.4% higher than that using only sodium phosphate buffer solution (0.1 M pH 7.0). The extraction phycocyanins at 37°C using only buffer solution also provided 13 fold EE higher than using RO water.

Effects of pH and heat on crude PC solution (0.123 μg/ml) from IFRPD1183 were determined in citrate-phosphate buffer with an ionic strength of 0.1 M at pH of 3.0, 4.0 4.5 5.0 and 6.0. Results showed that PC retained its native conformation at a $pH \geq 5.0$. Effects of heat under continuous heating from 30°C to 68°C in 240 seconds at each pH showed that PC exhibited the highest stability at pH 5.0.

Phycocyanin from IFRPD1183 was dried with and without maltodextrin glycerol and maltitol using spray drying and freeze drying. Results showed that phycocyanin without stabilizers treated by spray drying and by freeze drying lost its stability in term of A620/A370 changes at 31.5 and 5.5%, respectively. Phycocyanin loss increased with increased maltodextrin and glycerol, but this loss was decreased with increased maltitol.

Stability of dried phycocyanin with maltodextrin 2 g/g protein and maltitol 1 g/g protein in term of A620/A370 changes was studied during keeping at 35 and

45°C under air and 80% vacuum. Results showed that storage under air/vacuum packing had no effect on A620/A370 changes. Changes of A620/A370 of stored phycocyanin followed the first order reaction with the rate constant of -9×10^{-4}/h and 13×10^{-4}/h at 35 and 45°C, respectively.

Effects of thermally dried phycocyanin on oil stability index (OSI) of virgin coconut oil in term of induction time at 150°C were determined. Results showed that dried phycocyanin had no effect on OSI of virgin coconut oil. However, dried phycocyanin with stabilizers (maltodextrin and maltitol) significantly increased OSI of virgin coconut oil higher than dried phycocyanin without stabilizer ($p<0.05$). OH scavenging activity and iron chelating capacity of phycocyanin were studied. Results showed that high degree of denaturation of dried phycocyanin offered high OH scavenging activity, but it provided opposite results for iron radical chelating capacity.

School of Food Technology

Academic Year 2009

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature N. Phaopat