

สภาวะที่เหมาะสมต่อความคงตัวของสารสีคลอโรฟิลล์จากสาหร่ายก้ามกุ้งโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง Optimization for Stability of Chlorophyll Pigment from *Chara corallina* Using Response Surface Methodology

นพรัตน์ มะเห¹, ดาริกา อวะภาค² และดลฤดี พิชัยรัตน์¹

Nopparat Mahae¹, Darika Awapak² and Donrudee Pichairat¹

Received date: 12 ต.ค. 66 Revised date: 6 มี.ค. 67 Accepted date: 20 มี.ค. 67

DOI: <https://doi.org/10.55003/kmaj.2025.05.28.004>

บทคัดย่อ

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการรักษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายก้ามกุ้ง ด้วยสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) โดยวิธี RSM (Response Surface Methodology) ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาคือ ความเข้มข้นของ NaHCO_3 (X_1) อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา (X_2) และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา (X_3) วิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) และค่าสีเขียวของคลอโรฟิลล์ ($-a^*$) ผลการทดลองพบว่า เมื่อวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอย ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์พบว่า มีค่า R-Square (R^2) เท่ากับ 92.98% แสดงว่า ความเข้มข้นของ NaHCO_3 อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ได้ ร้อยละ 92.98 สำหรับการวัดค่าสีเขียวให้ผลในทำนองเดียวกันกับการวัดความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการรักษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์คือ ความเข้มข้นของ NaHCO_3 เท่ากับร้อยละ 0.3 อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา เท่ากับ 90°C และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา เท่ากับ 10 นาที ซึ่งสภาวะดังกล่าว ได้ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์สูงสุด ($7.647 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ผลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปใช้ในการรักษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายก้ามกุ้ง เพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์จากคลอโรฟิลล์ได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: สาหร่ายก้ามกุ้ง คลอโรฟิลล์ สารสี วิธีพื้นผิวตอบสนอง

Abstract

This experiment aimed to study the optimum conditions for maintaining the stability of chlorophyll in *Chara corallina* with sodium bicarbonate (NaHCO_3) solution using RSM (Response Surface Methodology). Factors used in the study were NaHCO_3 concentration (X_1), reaction temperature (X_2) and reaction time (X_3). Chlorophyll concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and green value of chlorophyll ($-a^*$) were analyzed. The results showed that the R-Square (R^2) value of the regression equation coefficients for chlorophyll concentration was 92.98%. This demonstrated that the concentration of NaHCO_3 , reaction temperature and reaction time could have explained 92.98% of the variation or change in chlorophyll concentration. For measuring green values, the results were similar to those for measuring chlorophyll concentration. The optimum conditions for maintaining the stability of chlorophyll were that the NaHCO_3 concentration was 0.3 %, the reaction temperature was 90°C , and the reaction time was 10 minutes. The above conditions yielded the highest chlorophyll concentration ($7.647 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). The results of this study can be used to maintain the stability of chlorophyll in *Chara corallina*. Maintaining the stability of chlorophyll allows for more efficient utilization of chlorophyll.

Keywords: *Chara corallina*, chlorophyll, pigment, response surface methodology

¹ สาขาวิชาอุตสาหกรรมอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย จังหวัดตรัง 92150

² สาขาวิชาเทคโนโลยีและการจัดการอุตสาหกรรมอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา 90110

¹ Food Industry Program, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang 92150

² Food Industrial Technology and Management Program, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110

* Corresponding author: email: nopparat.rmuts@gmail.com

คำนำ

ปัจจุบันความสนใจในการนำสารให้สีและกลิ่นรสจากธรรมชาติมาใช้มีมากขึ้น เนื่องจากความตระหนักในด้านความปลอดภัยของสารให้สีและกลิ่นรสที่ได้จากการสังเคราะห์ การใช้สีสังเคราะห์ทำให้เกิดปัญหาสำคัญเกี่ยวกับสุขภาพของมนุษย์ งานวิจัยของ McCann et al. (2007) พบว่าการรับประทานอาหารที่มีสีผสมอาหารจะเพิ่มอาการอยู่ไม่นิ่ง (Hyperactivity) ของเด็กในชุมชน อายุ 3 ปี และ อายุ 8/9 ปี เมื่อพิจารณาในแง่ของสุขภาพร่างกาย แม้ว่าจะไม่ได้รับการทดสอบก็ตาม นอกจากนี้ งานวิจัยของ Amin et al. (2010) พบว่า ทาร์ทราซีน (tartrazine) และ คาร์โมซิน (carmoisine) ซึ่งเป็นสีสังเคราะห์ที่ใช้ในอาหาร มีผลในอวัยวะสำคัญคือตับและไต โดยมีผลแม้มีปริมาณต่ำ แนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาข้างต้นคือการนำสารให้สีจากธรรมชาติมาใช้ในอาหารทดแทนสีสังเคราะห์

สาหร่ายก้ามกุ้ง (*Chara corallina*) นิยมบริโภคกันมากในบางจังหวัดของภาคใต้ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสาหร่ายก้ามกุ้งมีปริมาณคลอโรฟิลล์ในเซลล์สูงกว่าสาหร่ายน้ำจืดชนิดอื่นๆ ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่สูงจึงมีความน่าสนใจในการนำมาใช้เป็นสารให้สีจากธรรมชาติ ซึ่งการนำคลอโรฟิลล์มาใช้เป็นสารสีจากธรรมชาติมีการใช้กันมานานแล้ว (Shahid et al., 2013) ความต้องการคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามความตระหนักที่เพิ่มขึ้นในการใช้สารให้สีจากธรรมชาติ (Hung et al., 2014; Sigurdson et al., 2017) ในด้านสุขภาพ คลอโรฟิลล์และคลอโรฟิลลินมีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์ (Tumolo and Lanfer-Marquez, 2012; Ghidouche et al., 2013) คลอโรฟิลล์มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบที่ป้องกันโรคเรื้อรัง เช่น มะเร็ง (McQuistan et al., 2012; Subramoniam et al., 2012; Jokopriyambodo et al., 2014) อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างคลอโรฟิลล์เป็นอนุพันธ์ทำให้สูญเสียกิจกรรมไป (Albanese et al., 2007; Comunian et al., 2011; Benlloch-Tinoco et al., 2015; Yilmaz and Gokmen, 2016) คลอโรฟิลล์สามารถย่อยสลายเป็นอนุพันธ์ได้ง่ายเนื่องจากสูญเสียไอออน Mg^{2+} ในโมเลกุลคลอโรฟิลล์เมื่ออยู่ภายใต้อิทธิพลของสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสง ออกซิเจน ค่า pH และเอนไซม์ ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของคลอโรฟิลล์จนกลายเป็นสีน้ำตาลมะกอก (Yilmaz and Gokmen, 2016; Solymosi and Mysliwa-Kurdiel, 2017) เพื่อป้องกันการย่อยสลายเป็นอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ มักจะเติมเกลือที่มีไอออนของโลหะ เช่น Na^+ , Cu^{2+} หรือ Zn^{2+} ลงไป ไอออนของโลหะเหล่านี้ถูกนำเข้าสู่วงแหวนพอร์ไฟรินเพื่อสร้างปฏิกิริยาระหว่างไอออนของโลหะกับ Mg โดยการแทนที่ ทำให้มีความเสถียรมากขึ้นในนิวเคลียสของพอร์ไฟริน มีความทนทานต่อกรดและอุณหภูมิได้ดีกว่า จึงป้องกันการสูญเสียสีเขียวของพืช (Kidmose et al., 2002; Willows, 2004; Ngamwonglumlert et al., 2017) การเลือกใช้ $NaHCO_3$ ในการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากผลการศึกษาของ Kaur et al. (2018) ซึ่งศึกษาในบล็อกโคลีพบว่า $NaHCO_3$ ช่วยรักษาสีเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ potassium metabisulphite, sodium bicarbonate, sodium chloride และ calcium chloride และในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา $NaHCO_3$ ซึ่งเป็นเกลืออนินทรีย์ธรรมดาสามารถพลิกกลับค่า pH ของสภาพแวดล้อมจุลภาคของเนื้ออก และยับยั้งการบูกรุก การแพร่กระจาย การหลีกเลี่ยงภูมิคุ้มกัน การดื้อยา และภาวะขาดออกซิเจนของเซลล์เนื้ออก ดังนั้นการบำบัดโดยใช้ $NaHCO_3$ จึงเป็นแนวทางที่มีศักยภาพในการรักษาโรคมะเร็ง และมีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องมากขึ้น (Wang et al., 2021)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการรักษาความคงตัวของสารสีคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายก้ามกุ้งด้วย $NaHCO_3$ โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) ตัวแปรต้นที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นของ $NaHCO_3$ อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ผลการศึกษาที่ได้นำมาใช้รักษาความคงตัวของสารสีคลอโรฟิลล์เพื่อให้สามารถนำคลอโรฟิลล์ไปใช้ประโยชน์ได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของคลอโรฟิลล์จากสาหร่ายก้ามกุ้งและการวิเคราะห์ผลของความคงตัว

การเตรียมตัวอย่าง

ล้างสาหร่ายก้ามกุ้งให้สะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นลวกสาหร่ายในน้ำเดือด เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปบดตัวอย่างให้ละเอียด (เก็บตัวอย่างด้วยการแช่เยือกแข็งระหว่างการรอการดำเนินการต่อไป)

การสังเคราะห์ metal-chlorophyll complexes

ทำการสังเคราะห์ metal-chlorophyll complexes โดยดัดแปลงวิธีการของ Rahayuningsih et al. (2018) และ Salama and Moharram (2007) นำสาหร่ายที่ผ่านการลวกและบดแล้ว 70 กรัม มาทำปฏิกิริยาสารละลายเกลือของ NaHCO_3 ปริมาตร 280 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น อุณหภูมิ และระยะเวลาตามปัจจัยที่ศึกษา

การสกัด metal-chlorophyll complexes

สกัด metal-chlorophyll complexes โดยการนำตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จากการให้ความร้อน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 96% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask shaker ปิดปากพลาสติกด้วยอลูมิเนียมฟรอยด์นำไปใส่ใน shaker water bath ที่อุณหภูมิ 60 °C เขย่าด้วยความเร็ว 135 rpm เป็นเวลา 45 นาที

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์

วิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ตามวิธีการของ Rahayuningsih et al. (2018) โดยการนำสารสกัด 6 กรัม เจือจางด้วยอะซิโตน 30 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างด้วย magnetic stirrer ความเร็ว 1000 rpm เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำสารสกัดตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ไปทำการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที กรองสารสกัดที่ได้ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำสารละลายส่วนใสมาทำการวัดค่าความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 nm คำนวณความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ตามสมการของ Zhang et al. (2009)

$$\text{Chl}_a \text{ (ug.g}^{-1}\text{)} = 12.72 \text{ OD}_{663} - 2.59 \text{ OD}_{645} \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{Chl}_b \text{ (ug.g}^{-1}\text{)} = 22.90 \text{ OD}_{645} - 4.67 \text{ OD}_{663} \dots\dots\dots(2)$$

$$\text{Chl}_{\text{total}} \text{ (ug.g}^{-1}\text{)} = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b = 20.31 \text{ OD}_{645} + 8.05 \text{ OD}_{663} \dots\dots\dots(3)$$

การวัดค่าสี

วัดค่าสีด้วยเครื่องวัดค่าสี (Colorimeter) ยี่ห้อ HunterLab รุ่น ColorFlex EZ (ประเทศสหรัฐอเมริกา) ทำการวัดค่า L^* , a^* , b^* , เมื่อ ค่า L^* บ่งบอกถึงความสว่าง (100 = ขาว, 0 = ดำ), a^* value (+ a^* = red, - a^* = green), b^* value (+ b^* = yellow, - b^* = blue)

การออกแบบการทดลอง การวิเคราะห์ผลทางสถิติ และการหาสภาวะที่เหมาะสม

การกำหนดระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

ปัจจัยที่ศึกษามี 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของ NaHCO_3 (X_1) อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา (X_2) และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา (X_3) การกำหนดระดับของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย โดยพิจารณาจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง การทดลองเบื้องต้น และข้อจำกัดของเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองมี 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (1) ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Factors and levels of each factor used in the experiment

Factors	levels		
	-1	0	1
NaHCO_3 concentration (%)	0.00	0.15	0.30
reaction temperature (°C)	70	80	90
reaction time (minute)	10	15	20

การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการรักษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายก้ามกุ้ง ได้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Design expert version 13 กำหนดลำดับการทดลองและออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน ที่มี 3 ปัจจัย แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ และมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 5 ครั้ง ดังนั้นจึงมีจำนวนหน่วยทดลองทั้งหมด 17 หน่วยทดลอง แสดงดัง Table 2

Table 2 Experimental sequence of a 3-factor Box-Behnken experimental design, 3 levels per factor, and the midpoint was repeated 5 times

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	X ₁	X ₂	X ₃
8	1	2	1	1	0	1
1	2	2	1	-1	-1	0
12	3	2	1	0	1	1
4	4	2	1	1	1	0
15	5	0	1	0	0	0
17	6	0	1	0	0	0
3	7	2	1	-1	1	0
13	8	0	1	0	0	0
6	9	2	1	1	0	-1
14	10	0	1	0	0	0
11	11	2	1	0	-1	1
2	12	2	1	1	-1	0
5	13	2	1	-1	0	-1
16	14	0	1	0	0	0
7	15	2	1	-1	0	1
10	16	2	1	0	1	-1
9	17	2	1	0	-1	-1

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ และการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธี RSM

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตรวจสอบข้อมูลที่ได้จากการทดลองก่อนนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ และวิเคราะห์ความแปรปรวน วิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจโดยคำนวณจากสมการของ Hu (1999) จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อตรวจสอบแหล่งผันแปรของแบบจำลอง และสร้างสมการทำนาย โดยสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ และค่าสีเขียว (-a*) ด้วยการนำค่าของปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยมาเขียนให้อยู่ในรูปของสมการต่อไปนี้

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

การหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธี RSM

เมื่อได้สมการสำหรับทำนายความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ และค่าสีเขียว (-a*) แล้ว จึงนำมาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองและกราฟโครงร่างของความเข้มข้นคลอโรฟิลล์ และค่าสีเขียว (-a*) เทียบกับปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง และหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด เพื่อให้ได้คลอโรฟิลล์ที่มีความเข้มข้นมากที่สุด และค่าสีเขียว (-a*) สูงสุด โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ หลังจากที่ได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว นำสภาวะดังกล่าวไปใช้ในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของคลอโรฟิลล์จากสาหร่ายก้ามกุ้ง เพื่อหาความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ จำนวน 3 ซ้ำ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ปริมาณคลอโรฟิลล์ และการวัดค่าสีเขียวของสารประกอบเชิงซ้อน

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของสารสีจากสาหร่ายก้ามกุ้งในครั้งนี้ ประเมินความคงตัวจากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ และการวัดค่าสีเขียวของสารประกอบเชิงซ้อน metal-chlorophyll complexes ที่เกิดขึ้น ผลการทดลองแสดงดัง Table 3

Table 3 Chlorophyll concentration and green value (-a*) of the metal-chlorophyll complexes

Number Test	Factors			Chlorophyll concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Green value (-a*)
	NaHCO ₃ concentration (X ₁) (%)	reaction temperature (X ₂) (°C)	reaction time (X ₃) (minute)		
1	0.3	80	20	6.971	-8.54
2	0.0	70	15	4.995	-7.76
3	0.1	90	20	5.119	-7.94
4	0.3	90	15	6.724	-8.34
5	0.1	80	15	5.730	-8.08
6	0.1	80	15	5.338	-8.03
7	0.0	90	15	5.426	-8.08
8	0.1	80	15	5.244	-7.96
9	0.3	80	10	7.191	-8.71
10	0.1	80	15	6.035	-8.16
11	0.1	70	20	5.878	-8.14
12	0.3	70	15	6.278	-8.30
13	0.0	80	10	4.917	-8.63
14	0.1	80	15	5.779	-8.05
15	0.0	80	20	5.608	-7.98
16	0.1	90	10	6.216	-8.25
17	0.1	70	10	5.034	-7.92

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อความคงตัวของสารสีคลอโรฟิลล์จากสาหร่ายก้ามกุ้ง ทั้ง 17 หน่วยทดลอง และนำผลการทดลองที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลว่ามีความเหมาะสมหรือไม่ด้วยการวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง หากข้อมูลมีความเหมาะสมจึงนำมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square: R²) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การตรวจสอบคุณภาพข้อมูลมี 3 ขั้นตอนคือ (1) การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ (2) การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล (3) การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน จากการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลองพบว่า ค่าส่วนตกค้างของข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นไปตามสมมติฐานทั้ง 3 ข้อ คือ (1) ส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ (2) ค่าส่วนตกค้างมีความเป็นอิสระต่อกัน และ (3) ค่าความแปรปรวนมีเสถียรภาพ จึงสรุปได้ว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองชุดนี้มีความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน

การสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์และค่าสีเขียว

จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์พบว่า สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์มีค่า R² เท่ากับ 0.9298 (Table 4) แสดงว่า ความเข้มข้นของ NaHCO₃ อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ได้ร้อยละ 92.98 ซึ่งสามารถนำไปสร้างสมการทำนายเพื่อหาค่าความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายก้ามกุ้งได้ดังนี้

$$Y = 17.72 + 3.99 X_1 + 0.418 X_2 + 0.700 X_3 + 18.50 X_1^2 - 0.00154 X_2^2 + 0.00646 X_3^2 + 0.0025 X_1 X_2 - 0.304 X_1 X_3 - 0.01049 X_2 X_3 \quad \dots\dots\dots(1)$$

เมื่อ Y = ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

X_1 = ความเข้มข้นของ NaHCO_3 (Conc = 0.00 – 0.30%)

X_2 = อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา (Temp = 70 – 90 °C)

X_3 = ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา (Time = 10 – 20 นาที)

เมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (Lack of fit) พบว่าค่า P – value ของ Lack of Fit มีค่าเท่ากับ 0.5007 (Table 5) ซึ่งมีความมากกว่า 0.05 ทำให้สามารถสรุปได้ว่า แบบจำลองนี้มีความพอเพียงของตัวแปรในสมการ ดังนั้นจึงสามารถนำสมการข้างต้นมาใช้ในการทำนายความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในการรักษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์ด้วย NaHCO_3 ในสาหร่ายก้ามกุ้งได้

Table 4 Response surface regression analysis for chlorophyll concentration

Factor	Coefficient Estimate	p-value	VIF
Intercept	-17.7192	0.0028	
A-Conc	3.98533	0.0001	1
B-Temp	0.418303	0.1918	1
C-Time	0.700205	0.6499	1
AB	0.0025	0.9794	1
AC	-0.30367	0.1474	1
BC	-0.01049	0.0072	1
A ²	18.50444	0.0185	1.01
B ²	-0.00154	0.2946	1.01
C ²	0.006464	0.2745	1.01

$R^2 = 0.9298$, Adjusted $R^2 = 0.839$

Table 5 Analysis of variance for chlorophyll concentration

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	7.26	9	0.8064	10.31	0.0028
A-Conc	4.83	1	4.83	61.77	0.0001
B-Temp	0.1633	1	0.1633	2.09	0.1918
C-Time	0.0176	1	0.0176	0.2247	0.6499
AB	0.0001	1	0.0001	0.0007	0.9794
AC	0.2075	1	0.2075	2.65	0.1474
BC	1.1	1	1.1	14.07	0.0072
A ²	0.7299	1	0.7299	9.33	0.0185
B ²	0.1004	1	0.1004	1.28	0.2946
C ²	0.11	1	0.11	1.41	0.2745
Residual	0.5477	7	0.0782		
Lack of Fit	0.2262	3	0.0754	0.9385	0.5007
Pure Error	0.3214	4	0.0804		
Cor Total	7.8	16			

จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของค่าสีเขียวพบว่า สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของค่าสีเขียวมีค่า R^2 เท่ากับ เท่ากับ 0.9117 (Table 6) แสดงว่า ความเข้มข้นของ NaHCO_3 อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของค่าสีเขียวได้ร้อยละ 91.17 ซึ่งสามารถนำไปสร้างสมการทำนายเพื่อหาค่าสีเขียวในสาหร่ายก้ามกุ้งได้ดังนี้

$$Y = 4.67 + 0.58 X_1 - 0.3237 X_2 + 0.046 X_3 - 10.37 X_1^2 + 0.001692 X_2^2 - 0.00703 X_3^2 + 0.0467 X_1 X_2 - 0.1600 X_1 X_3 + 0.00265 X_2 X_3 \quad \dots\dots\dots(2)$$

เมื่อ Y = ค่าสีเขียว (ค่า $-a^*$)

X_1 = ความเข้มข้นของ NaHCO_3 (Conc = 0.00 – 0.30%)

X_2 = อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา (Temp = 70 – 90 °C)

X_3 = ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา (Time = 10 – 20 นาที)

เมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (Lack of fit) พบว่าค่า P – value ของ Lack of Fit มีค่าเท่ากับ 0.082 (Table 7) ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 ทำให้สามารถสรุปได้ว่า แบบจำลองนี้มีความพอเพียงของตัวแปรในสมการ ดังนั้นจึงสามารถนำสมการข้างต้นมาใช้ในการทำนายค่าสีเขียวในการศึกษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์ด้วย NaHCO_3 ในสาหร่ายก้ามกุ้งได้

Table 6 Response surface regression analysis for green value ($-a^*$)

Factor	Coefficient Estimate	p-value	VIF
Intercept	4.66975	0.0059	
A-Conc	0.576667	0.0035	1
B-Temp	-0.32368	0.1861	1
C-Time	0.04565	0.0297	1
AB	0.046667	0.2748	1
AC	-0.16	0.0818	1
BC	0.00265	0.0598	1
A^2	-10.3667	0.0049	1.01
B^2	0.001692	0.0217	1.01
C^2	-0.00703	0.0185	1.01

$R^2 = 0.9117$, Adjusted $R^2 = 0.7982$

Table 7 Analysis of variance for green value ($-a^*$)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	1.01	9	0.1122	8.03	0.0059
A-Conc	0.2592	1	0.2592	18.56	0.0035
B-Temp	0.03	1	0.03	2.15	0.1861
C-Time	0.1035	1	0.1035	7.41	0.0297
AB	0.0196	1	0.0196	1.4	0.2748
AC	0.0576	1	0.0576	4.13	0.0818
BC	0.0702	1	0.0702	5.03	0.0598
A^2	0.2291	1	0.2291	16.41	0.0049
B^2	0.1206	1	0.1206	8.64	0.0217
C^2	0.1301	1	0.1301	9.31	0.0185
Residual	0.0977	7	0.014		
Lack of Fit	0.0764	3	0.0255	4.78	0.0824
Pure Error	0.0213	4	0.0053		
Cor Total	1.11	16			

การสร้างพื้นผิวตอบสนอง

การสร้างพื้นผิวตอบสนองของความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ หรือสมการสำหรับทำนายความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ จากการศึกษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์ด้วย NaHCO_3 ในสาหร่ายก้ามกุ้ง สามารถนำมาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองของความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ได้ดัง Figure 1

จากกราฟ Response surface และ contour plot (Figure 1a) ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ เมื่อพิจารณาปัจจัยสองปัจจัยคือ ความเข้มข้นของ NaHCO_3 และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา โดยกำหนดให้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาอยู่ที่ระดับกลาง พบว่า ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ NaHCO_3 เพิ่มขึ้น และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาปัจจัยสองปัจจัยคือ ความเข้มข้นของ NaHCO_3 และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา โดยกำหนดให้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาอยู่ที่ระดับกลาง (Figure 1b) พบว่า ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ NaHCO_3 เพิ่มขึ้น และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ส่วนผลของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของ NaHCO_3 อยู่ที่ระดับกลาง (Figure 1c) พบว่า ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นในสองกรณีคือ เมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาลดลง และ เมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาลดลง และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น

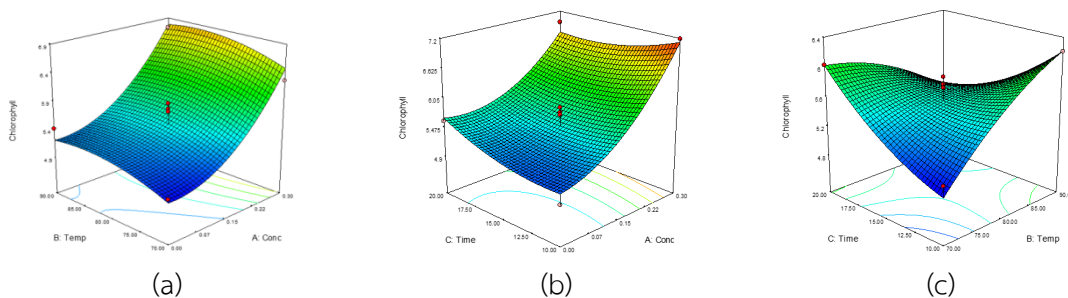


Figure 1 Factors effecting concentration of chlorophyll in *Chara corallina*, a: effect of NaHCO_3 concentration and reaction temperature, b: effect of NaHCO_3 concentration and reaction time and c: effect of reaction temperature and reaction time

เกลือของโลหะสามารถรักษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์ในเนื้อเยื่อพืชได้ เนื่องจากเกลือของโลหะเข้าไปแทนที่แมกนีเซียมไอออนในโมเลกุลของอนุพันธ์คลอโรฟิลล์ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเขียวสดเหมือนคลอโรฟิลล์ แต่จะมีความคงตัวในระหว่างกระบวนการแปรรูปและการเก็บรักษาที่สูงกว่าเนื้อเยื่อพืชที่ไม่เติมเกลือของโลหะ (Jones et al., 1977; Elbe et al., 1986; Tonucci and Elbe, 1992; LaBorde and Elbe, 1994) การศึกษาครั้งนี้ใช้ NaHCO_3 เนื่องจากผลการศึกษาของ Kaushal et al. (2013) ซึ่งศึกษาการลวกใบเผือก (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) พบว่า NaHCO_3 ช่วยลดการสูญเสียสีเขียวของใบเผือกได้ดีที่สุด และให้ค่า antioxidant activity สูงสุด เช่นเดียวกับการศึกษาในบล็อกโคลีของ Kaur et al. (2018) ซึ่งพบว่า NaHCO_3 ช่วยรักษาสีเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ potassium metabisulphite, sodium bicarbonate, sodium chloride และ calcium chloride

โดยทั่วไปสาเหตุหลักของการเปลี่ยนสีของผักสีเขียวในระหว่างกระบวนการผลิตคือการเปลี่ยนคลอโรฟิลล์เป็น ฟีโอไฟดิน โดยอิทธิพลของ pH สีเขียวของผักจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวมะกอกเมื่อถูกความร้อนหรือวางในสภาวะที่เป็นกรด (Gold and Weckel, 1959; Gunawan and Barringer, 2000) ผลของปริมาณ NaHCO_3 จากการศึกษาครั้งนี้อาจจะเกี่ยวเนื่องกับ pH เช่นกัน จึงทำให้ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์มากขึ้นเมื่อปริมาณของ NaHCO_3 มากขึ้น ร่วมกับอุณหภูมิที่สูงขึ้น และ ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์มากขึ้นเมื่อปริมาณของ NaHCO_3 มากขึ้น ร่วมกับระยะเวลาที่สูงขึ้น จากการศึกษาในถั่วเขียวของ Koca et al. (2007) พบว่าสีเขียวของถั่วเขียวลวกหายไปอย่างรวดเร็วพร้อมกับค่า pH ที่ลดลง สำหรับผลร่วมของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยานั้น ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นในสองกรณีดังกล่าวข้างต้น อุณหภูมิจึงน่าจะเป็นปัจจัยหลักเนื่องจากการสูญเสียสีเขียวของคลอโรฟิลล์เนื่องจากความร้อนและออกซิเดชันส่วนใหญ่เป็นไปตามปฏิกิริยาลำดับที่หนึ่งของ Arrhenius (Arrhenius first order reaction) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเพียงเล็กน้อยจะส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของคลอโรฟิลล์ (chlorophyll kinetic) (Aparicio-Ruiz and Gandul-Rojas, 2014) ปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่ออัตราและจลนศาสตร์ของการเสีย

สภาพคลอโรฟิลล์ เช่น ความร้อน ความเป็นกรด การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และความเข้มของแสง (Cuny et al., 1999; Gunawan and Barringer, 2000; Gaur et al., 2007; Erge et al., 2008; Inanc, 2016)

การสร้างพื้นผิวตอบสนองของค่าสีเขียว ($-a^*$)

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ หรือสมการสำหรับทำนายค่าสีเขียว ($-a^*$) ของคลอโรฟิลล์ จากการศึกษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์ด้วย NaHCO_3 ในสาหร่ายก้ามกุ้ง สามารถนำมาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองของค่าสีเขียวได้ดัง Figure 2

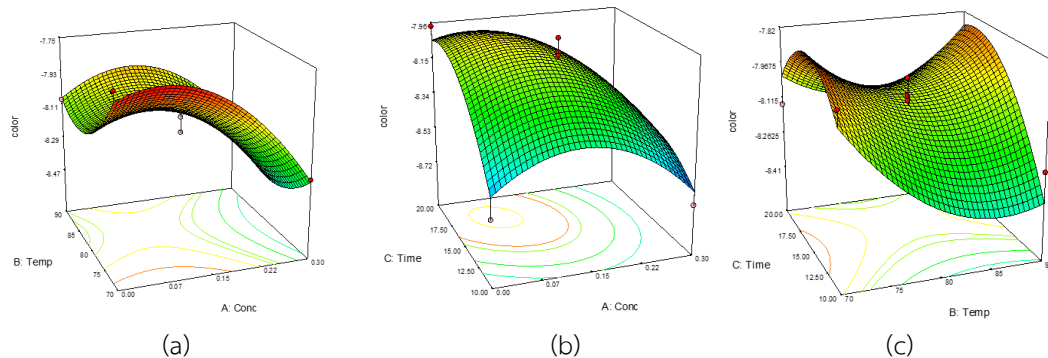


Figure 2 Factors effecting the green value ($-a^*$) in *Chara corallina*, a: effect of NaHCO_3 concentration and reaction temperature, b: effect of NaHCO_3 concentration and reaction time and c: effect of reaction temperature and reaction time

จากกราฟ Response surface และ contour plot (Figure 2a) ค่าสีเขียว ($-a^*$) เมื่อพิจารณาปัจจัยสองปัจจัยคือ ความเข้มข้นของ NaHCO_3 และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา โดยกำหนดให้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาอยู่ที่ระดับกลางพบว่า ค่าความเป็นสีเขียวเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ NaHCO_3 เพิ่มขึ้น และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาปัจจัยสองปัจจัยคือ ความเข้มข้นของ NaHCO_3 และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา โดยกำหนดให้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาอยู่ที่ระดับกลาง (Figure 2b) พบว่า ค่าความเป็นสีเขียวเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ NaHCO_3 เพิ่มขึ้น และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ส่วนผลของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของ NaHCO_3 อยู่ในระดับกลาง (Figure 2c) พบว่า ค่าความเป็นสีเขียวเพิ่มขึ้นในสองกรณีคือ เมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาลดลง และ เมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาลดลง และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น โดยให้ผลในทำนองเดียวกับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์

สำหรับกระบวนการสกัด อุณหภูมิมีผลต่อกระบวนการสกัด (Sinha et al. 2012; O'zkan and Ersus, 2015) Tijssens et al. (2001) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าสีของบล็อกโคลีและถั่วเขียวในระหว่างการลวก พบว่าในช่วงแรกของการลวกผักทั้ง 2 ชนิด ค่าสีเขียวมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นที่ไม่มีสีหรือมีสีเขียวน้อยเป็นสารที่มีสีเขียวที่มองเห็นได้ชัดเจน Lau et al. (2000) ศึกษาผลของการลวกหน่อไม้ฝรั่งพบว่าในช่วงแรกสีเขียวของหน่อไม้ฝรั่งเพิ่มขึ้นเมื่อให้ความร้อนในช่วง 70 และ 98 องศาเซลเซียส การศึกษาในสาหร่ายก้ามกุ้งครั้งนี้เนื่องจากศึกษาที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส การเพิ่มของอุณหภูมิจึงส่งผลทำให้ค่าความเป็นสีเขียวเพิ่มขึ้นหรือความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น ส่วนการศึกษาของ Pinsirodom (2003) ศึกษาผลของอุณหภูมิ (50, 75 และ 100 องศาเซลเซียส) ความเป็นกรด-ด่าง (4, 7 และ 10) และความเข้มข้นของซิงค์คลอไรด์ (100, 200 และ 300 ppm) ต่อความคงตัวของสีเขียวของสารสกัดใบเตย โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าสีด้วยเครื่อง Hunter color meter พบว่าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สีเขียวของสารสกัดใบเตยมีความคงตัวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 50 และ 75 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส การใช้ซิงค์คลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นมีผลในการเพิ่มความคงตัวของสีเขียวของสารสกัดใบเตย ซึ่งปัจจัยความเข้มข้นของสารนั้น Ngo and Zhao (2007) ได้ศึกษาโครงสร้างของ Zinc-chlorophyll-derivatives complexes ในการแปรรูปลูกแพร์ (green pear) ซึ่งทำการทดลองโดยลวกลูกแพร์ที่มีการเติมสารละลายซิงค์ไอออน (zinc ion solution) ซึ่งเตรียมจากซิงค์แลคเตต (zinc lactate) ความเข้มข้น 0, 1,300 และ 2,600 ppm ในแต่ละชุดการทดลอง ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12 และ 18 นาที พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายซิงค์ไอออนเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้จำนวนของซิงค์ฟิโอฟิตินเพิ่มขึ้น ทำให้ลูกแพร์ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปมีสีเขียวและความคงตัวมากขึ้น

การหาปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์ด้วย NaHCO_3 ในสาหร่ายก้ามกุ้ง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์สูงสุด โดยสถานะที่เหมาะสมมีดังนี้

- X_1 = ความเข้มข้นของ NaHCO_3 (%) = 0.3
- X_2 = อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา ($^{\circ}\text{C}$) = 90
- X_3 = ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา (นาที) = 10

จากสถานะที่เหมาะสมข้างต้นได้ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์สูงสุด เท่ากับ 7.647 ug.g^{-1} เมื่อนำสถานะที่เหมาะสมที่ได้มาทำการทดสอบความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์อีกครั้งพบว่า ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ เท่ากับ $7.329 \pm 0.007 \text{ ug.g}^{-1}$ สำหรับสถานะที่เหมาะสมในการสกัดคลอโรฟิลล์จากพืชชนิดอื่น เช่น สถานะที่เหมาะสมในการสกัดคลอโรฟิลล์จากใบ suji (*Pleomele angustifolia* Roxb.) โดยใช้ ZnCl_2 เป็นตัวรักษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์พบว่าสถานะที่เหมาะสมคือ pH 7 ความเข้มข้นของ ZnCl_2 เท่ากับ 700 ppm อุณหภูมิ 85°C โดยมีปริมาณ total chlorophyll content (TCC) เท่ากับ $47.2975 \text{ mg/100 g fw}$ (Rahayuningsih et al., 2018)

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการรักษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายก้ามกุ้งด้วยสารละลาย NaHCO_3 โดยวิธี RSM ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาคือ ความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) (X_1) อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา (X_2) และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา (X_3) พบว่าสถานะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นของ NaHCO_3 เท่ากับร้อยละ 0.3 อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา เท่ากับ 90°C และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา เท่ากับ 10 นาที ซึ่งสถานะดังกล่าว ได้ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์สูงสุด (7.647 ug.g^{-1}) ผลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปใช้ในการรักษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายก้ามกุ้ง ซึ่งความคงตัวของคลอโรฟิลล์ส่งผลต่อการใช้ประโยชน์ในการทำเป็นสารสี และส่งผลกระทบต่อคุณค่าทางโภชนาการของคลอโรฟิลล์ นั่นคือการรักษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์ทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากคลอโรฟิลล์ได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ผลประโยชน์ทับซ้อน

ผู้เขียนขอประกาศว่าบทความนี้ไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กองทุนส่งเสริม ววน.) สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกว.) สำหรับทุนอุดหนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

การมีส่วนร่วมในการเขียนบทความของผู้เขียน

ความคิดริเริ่ม และ สมมุติฐาน: นพรัตน์ มะเห. การปฏิบัติการวิจัย การมีส่วนร่วมในการออกแบบ การทดลอง การทดสอบ เครื่องมือวัด วิธีการเก็บข้อมูล และ criteria: นพรัตน์ มะเห, ดาริกา อวะภาค. การจัดเก็บข้อมูลการวิเคราะห์ข้อมูล การแปลผล: นพรัตน์ มะเห, ดาริกา อวะภาค. การวิพากษ์วิจารณ์ผล การแสดงการเปรียบเทียบกับข้อสรุปหรือองค์ความรู้ หรือทฤษฎีเดิม: นพรัตน์ มะเห, ดาริกา อวะภาค. การมีส่วนร่วมในการเขียนต้นฉบับบทความ: นพรัตน์ มะเห, ดาริกา อวะภาค. การให้การสนับสนุนเครื่องมือ ห้องปฏิบัติการ และ ครูภัณฑ์: ดลฤดี พิชัยรัตน์.

เอกสารอ้างอิง

- Albanese, D., Russo, L., Cinquanta, L., Brasiello, A., & Di Matteo, M. (2007). Physical and chemical changes in minimally processed green asparagus during cold storage. **Food Chemistry**, 101(1), 274-280.
- Amin, K. A., Abdel H. H., & Abd Elsttar, A. H. (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. **Food and Chemical Toxicology**, 48(10), 2994-2999.
- Aparicio-Ruiz, R., & Gandul-Rojas, B. (2014). Decoloration kinetics of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by autooxidation. **Food Research International**, 65(Part B), 199-206.
- Benlloch-Tinoco, M., Kaulmann, A., Corte-Real, J., Rodrigo, D., Martínez-Navarrete, N., & Bohn, T. (2015). Chlorophylls and carotenoids of kiwifruit puree are affected similarly or less by microwave than by conventional heat processing and storage. **Food Chemistry**, 187(1), 254-262.
- Comunian, T.A., Monterrey-Quintero, E. S., Thomazini, M., Balieiro, J. C. C., Piccone, P., Pittia, P., & Favaro-Trindade, C. S. (2011). Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried chlorophyllide, a natural food colourant, using gum Arabic, maltodextrin and soy protein isolate-based carrier systems. **International Journal of Food Science and Technology**, 46(6), 1259-1265.
- Cuny, P., Romano, J. C., Beker, B., & Rontani, J. F. (1999). Comparison of the photodegradation rates of chlorophyll chlorin ring and phytol side chain in phytodetritus: is the phytyldiol versus phytol ratio (CPPI) a new biogeochemical index?. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 237(2), 271-290.
- Elbe, V. J. H., Huang, A. S., Attoe, E. L., & Nank, K. W. (1986). Pigment composition and color of conventional and very green canned beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 34(1), 54-55.
- Erge, H. S., Karadeniz, F., Koca, N., & Soyer, Y. (2008). Effect of heat treatment on chlorophyll degradation and color loss in green peas. **GIDA**, 33(5), 225-233.
- Gaur, S., Shivhare, U. S., Sarkar, B. C., & Ahmed, J. (2007). Thermal chlorophyll degradation kinetics of mint leaves puree. **International Journal of Food Properties**, 10(4), 853-865.
- Ghidouche, S., Rey, B., Michel, M., & Galaffu, N. (2013). A Rapid tool for the stability assessment of natural food colours. **Food Chemistry**, 139(1-4), 978-985.
- Gold, H. J., & Weckel, K. G. (1959). Degradation of chlorophyll to pheophytin during sterilization of canned green peas by heat. **Food Technology**, 13(5), 281-285.
- Gunawan, M. I., & Barringer, S. A. (2000). Green color degradation of blanched broccoli (*Brassica Oleracea*) due to acid and microbial growth. **Journal of Food Processing and Preservation**, 24(3), 253-263.
- Hu, R. (1999). **Food Product Design**. Technomic Publishing Company, Inc.
- Hung, S. M., Hsu, B. D., & Lee, S. (2014). Modelling of isothermal chlorophyll extraction from herbaceous plants. **Journal of Food Engineering**, 128(1), 17-23.
- Inanc, A. L. (2016). Differential method to determine thermal degradation kinetics of chlorophyll in virgin olive oil. **Italian Journal of Food Science**, 28(1), 90-95.
- Jokopriyambodo, W., Sudarsono, & Rohman, A. (2014). The antiradical activity of insoluble water Suji (*Pleomele angustifolia* N. E. Brown) leaf extract and its application as natural colorant in bread product. **Journal of Food and Pharmaceutical Sciences**, 2(1), 52-56.
- Jone, I. D., Wite, R. C., Gidds, E., Stutler, L., & Nelson, L. A. (1977). Experimental formation of zinc and copper complexes of chlorophyll derivatives in vegetable tissue by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 25(1), 149-153.
- Kaur, N., Aggarwal, P., & Rajput, H. (2018). Effect of different blanching treatments on physicochemical, phytochemical constituents of cabinet dried broccoli. **Chemical Science Review and Letters**, 7(25), 262-271.
- Kaushal, M., sharma, K. D., & Attri, S. (2013). Effect of blanching on nutritional quality of dehydrated colocasia, *Colocasia esculenta* (L.) Schott leaves. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, 4(2), 161-164.
- Kidmose, U., Edelenbos, M., NØrbæk, R. & Christensen, L. P. (2002). Color stability in vegetables. In: MacDougall, D. B. (Ed.), **Color in Food: Improving Quality**, pp 179-232. CRC Press/Woodhead Publishing Limited.
- Koca, N., Karadeniz, F., & Burdurlu, H. S. (2007). Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. **Food Chemistry**, 100(2), 609-615.
- LaBorde, L. F., & Elbe, V. J. H. (1994). Chlorophyll derivatives in heated green vegetable. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42(5), 1100-1130.
- Lau, M. H., Tang, J., & Swanson, B. G. (2000). Kinetics of textural and color changes in green asparagus during thermal treatments. **Journal of Food Engineering**, 45(4), 231-236.

- McCann, D., Barret, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., Warner, J. O., & Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. **The Lancet**, 370(9598), 1560–1567.
- McQuistan, T. J., Simonich, M. T., Pratt, M. M., Pereira, C. B., Hendricks, J. D., Dashwood, R. H., Williams, D. E., & Bailey, G. S. (2012). Cancer chemoprevention by dietary chlorophylls: A 12,000-animal dose–dose matrix biomarker and tumor study. **Food and Chemical Toxicology**, 50(2), 341-352.
- Ngamwonglumert, L., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2017). Natural colorants: Pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of appropriate pretreatment and extraction methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57(15), 3243-3259.
- Ngo, T., & Zhao, Y. (2007). Formation of zinc chlorophyll derivative complexes in thermally processed green pears (*Pyrus communis* L.). **Journal of Food Science**, 72(7), 397-404.
- O'zkan, G., & Ersus Bilek, S. (2015). Enzyme-assisted extraction of stabilized chlorophyll from spinach. **Food Chemistry**, 176(1), 152–157.
- Pinsirodom, P. (2003). Effect of temperature, pH and $ZnCl_2$ on the green color stability of pandan (*Pandanus tectorius*) leaf extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 33(1), 277-282.
- Rahayuningsih, E., Pamungkas, M. S., Olvianas, M., & Putera, A. D. P. (2018). Chlorophyll extraction from suji leaf (*Pleomele angustifolia* Roxb.) with $ZnCl_2$ stabilizer. **Journal of Food Science and Technology**, 55(3), 1028-1036
- Salama, M. F., & Moharram, H. A. (2007). Relationship between colour improvement and metallo-chlorophyll complexes during blanching of peas and broccoli. **Alexandria Journal of Food Science and Technology**, 4(2), 11-18.
- Shahid, M., Shahid-Ul-Islam., & Mohammad, F. (2013). Recent advancements in natural dye applications: A review. **Journal of Cleaner Production**, 53(1), 310-331.
- Sigurdson, G. T., Tang, P., & Giusti, M. M. (2017). Natural colorants: Food colorants from natural sources. **The Annual Review of Food Science and Technology**, 8(1), 261-280.
- Sinha, K., Saha, P. D., & Datta, S., (2012). Extraction of natural dye from petals of Flame of forest (*Butea monosperma*) flower: process optimization using Response Surface Methodology (RSM). **Dyes and Pigments**, 94(1), 212–216.
- Solymosi, K. & Mysliwa-Kurdiel, B. (2017). Chlorophylls and their derivatives used in food industry and medicine. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, 17(13), 1194-1222.
- Subramoniam, A., Asha, V. V., Nair, S. A., Sasidharan, S. P., Sureshkumar, P. K., Rajendran, K. N., Karunakaran, D., & Ramalingam, K. (2012). Chlorophyll revisited: Anti-inflammatory activities of chlorophyll a and inhibition of expression of TNF- α gene by the same. **Inflammation**, 35(3), 959-966.
- Tijksens, L. M. M., Schijvens, E. P. H., & Biekman, E. S. A. (2001). Modelling the change in colour of broccoli and green bean during blanching. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2(4), 303-313.
- Tonucci, L. H., & Elbe, V. J. H. (1992). Kinetic of the formation of zinc complex of chlorophyll derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40(12), 2341-2344.
- Tumolo, T., & Lanfer-Marquez, U. M. (2012). Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties?. **Food Research International**, 46(2), 451-459.
- Wang, Y., Zhou, X., Wang, W., Wu, Y., Qian, Z., & Peng, Q. (2021). Sodium bicarbonate, an inorganic salt and a potential active agent. **Chinese Chemical Letters**, 32(12), 3687-3695.
- Willows, R. D. (2004). Chlorophylls. In Davies, K. M. (Ed.), **Plant pigments and their manipulation**, pp. 23-46. CRC Press.
- Yilmaz, C., & Gokmen, V. (2016). Chlorophyll. In Caballero, B., Finglas, P. M., & Toldra F. (Ed.), **Encyclopedia of Food and Health**, pp. 37-41. Academic Press.
- Zhang, J. H., Han, C., & Liu, Z. H. (2009). Absorption spectrum estimating rice chlorophyll concentration: preliminary investigations. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, 1(5), 223-229.