โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการเป็นพรีไบโอติกของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล
ชื่อนิสิต	นางสาวนิชกานต์ เอื้อเฟื้อ นางสาวสโรชา จิรวัฒนเมธา
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
ปีการศึกษา	2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการเป็นพรีไบโอติกของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล

โดย

นางสาวนิชกานต์ เอื้อเฟื้อ

นางสาวสโรชา จิรวัฒนเมธา

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปีการศึกษา 2561

Antioxidant activities and prebiotic properties of polysaccharide from seaweeds

Nichakarn Uaphua

Sarocha Jirawattanametha

Project Advisor

Assoc. Prof.Sumate Tantratian, Ph.D.

A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Bachelor of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

หัวข้องานวิจัย การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการเป็นพรีไบโอติกของพอลิแซ็กคาไรด์จาก สาหร่ายทะเล

โดย นางสาว นิชกานต์ เอื้อเฟื้อ

นางสาว สไรชา จิรวัฒนเมธา

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร

ปีการศึกษา 2561

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อนุมัติให้รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

ประจำปีการศึกษา 2561

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา ธนานุวงศ์)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

หัวข้องานวิจัย การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการเป็นพรีไบโอติกของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล

โดย นางสาว นิชกานต์ เอื้อเฟื้อ
นางสาว สโรชา จิรวัฒนเมธา
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร
ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อนำสาหร่ายทะเลมาใช้ให้เกิดประโยชน์ด้วยการนำสาหร่าย 3 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายไส้ไก่ สาหร่าย Chaetomorpha และ สาหร่ายผมนาง มาสกัดหยาบด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ Hot water extraction, Enzymes-assisted extraction(EAE) และ Ultrasound-assisted extraction(UAE) เพื่อศึกษาอิทธิพลของวิธีการสกัดที่มีต่อผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายแต่ละชนิด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และสมบัติความเป็นพรีไบโอติก จากการศึกษา พบว่า วิธีการสกัดโดยใช้เอนไซม์ Cellulase ช่วยในการสกัด เป็นวิธีที่ได้ผลผลิตร้อยละเฉลี่ยสูงที่สุด และการสกัดด้วย UAE จะเป็นวิธีการที่ได้ผลผลิตร้อยละเฉลี่ยต่ำที่สุด ในการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP โดยมี ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน พบว่าวิธีการสกัดมีอิทธิพลต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย Chaetomorpha และ สาหร่ายผมนาง แต่ไม่มีอิทธิผลต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)ในการสกัดสาหร่ายไส้ไก่ พบว่าการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี UAEจากสาหร่ายผมนาง จะมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อวัดด้วยวิธี DPPH คือ %inhibition เท่ากับ 33.01±1.80% สำหรับการวัดด้วยวิธี FRAP การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี EAE จากสาหร่ายผมนาง มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ 72.31±0.12 μmol ascorbic acid equivalent/g จากการศึกษาสมบัติการเป็นพรีไบโอติกด้วยการหาค่า prebiotic activity score ของสารสกัดจากสาหร่ายไส้ไก่ที่สกัดด้วย UAE เมื่อนำไปเลี้ยง *L.casei* มีค่าเท่ากับ 0.26 แต่พบว่าไม่เหมาะสมกับ เชื้อ *L. reuteri* จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่สกัดได้จากสาหร่ายทั้ง3ชนิดด้วยFTIR พบว่าสารสกัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์

Project Title Antioxidant activities and prebiotic properties of polysaccharide from seaweeds

Student Nichakarn Uaphua

Sarocha Jirawattanametha

Study Program Bachelor of Science in Food Technology

Advisor Assoc. Prof.Sumate Tantratian, Ph.D.

Academic Year 2018

ABSTRACT

This research intends to find the anti-oxidation and prebiotic activities of 3 seaweeds. 3 extraction methods were utilized include hot water extraction, Enzymes-assisted extraction (EAE) and Ultrasound-assisted extraction (UAE). *Ulva intestinalis*, *Chaetomorpha spiralis* and *Gracilaria tenuistipitata* were used as samples in the study. The study found that the enzymatic-assisted extraction using cellulase enzymes provide the highest average yield while ultrasound-assisted extraction provides the lowest average yield. The antioxidant properties determined with DPPH and FRAP methods using ascorbic acid as a standard. It was found that the extraction method had an influence on the antioxidant properties of crude extracts especially from *Chaetomorpha spiralis* and *Gracilaria tenuistipitata*, but had no significant effect on crude extracts from *Ulva intestinalis* ($p < 0.05$). Crude extract from *Gracilaria tenuistipitata* extracted by UAE provide the highest antioxidant properties measured by DPPH method. With % inhibition equal to 33.01 ± 1.80%. For determination using FRAP method. Crude extracts from *Gracilaria tenuistipitata* extracted by EAE provided highest antioxidant properties at 72.31 ± 0.12 μmol ascorbic acid equivalent/g. Prebiotic activity score of crude extracts from *Ulva intestinalis* extracted with UAE for culturing *L.casei* was 0.26. All crude extracts were not suitable for culturing *L. reuteri*. The analyses of samples extracted from 3 types of seaweeds with FTIR found the composition of crude extracts were mainly polysaccharide.

สารบัญ

	หน้า
บทที่1 บทนำ	1
1.1ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขต/กรอบแนวคิดของการวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	1
บทที่2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
2.1 สาหร่ายทะเล	2
2.2 วิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล	2
2.3 Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy	5
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ	6
2.5 พรีไบโอติก (prebiotic)	7
บทที่3 วิธีดำเนินงานวิจัย	8
บทที่4 ผลการดำเนินงานวิจัย	17
บทที่5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก ก	35
ภาคผนวก ข	43
ภาคผนวก ค	48
รายละเอียดโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์	50
ประวัติผู้วิจัย	55

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 สภาวะของการสกัดด้วยวิธีต่างๆ และ%yieldของสารสกัดหยาบที่สกัดได้ 4

4.1 น้ำหนักของสาหร่ายก่อน และ หลังทำการอบแห้ง คำนวณเป็นร้อยละน้ำหนักแห้ง 17

4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบหลักในตัวอย่างสาหร่ายที่นำมาใช้ในการวิจัย 18

4.3 ผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย3ชนิด ที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน 20

4.4 สมบัติต้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย3ชนิด ที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน ด้วยวิธีDPPH เทียบเป็น μmol ascorbic acid equivalent/g 21

4.5 สมบัติต้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย3ชนิด ที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน ด้วยวิธีDPPH เทียบเป็น % inhibition 22

4.6 สมบัติต้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย3ชนิด ที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน ด้วยวิธีFRAP เทียบเป็น μmol ascorbic acid equivalent/g 22

4.7 total phenolic content ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย3ชนิด ที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimatric assay เทียบเป็น mg gallic acid equivalent (GAE)/g 23

ข.1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย3ชนิด ที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน3วิธี 43

ข.2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีDPPHคำนวณเป็น μmol Ascorbic acid equivalent/g 43

ข.3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีDPPHคำนวณเป็น %inhibition 44

ข.4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีFRAP คำนวณเป็น μmol Ascorbic acid equivalent/g 44

ข.5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของtotal phenolic content คำนวณเป็น mg gallic acid/g 45

ข.6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการเพิ่มขึ้นของ *Lactobacillus casei* TISTR 1500 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ในเวลา 24ชั่วโมง 45

ข.7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการเพิ่มขึ้นของ Lactobacillus reuteri TRBC291 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ในเวลา 24ชั่วโมง 46

ข.8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการเพิ่มขึ้นของ *Escherichia coli* O74 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ในเวลา 24ชั่วโมง 46

ข.9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ prebiotic activities score ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1500 ที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต 47

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ข.10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ prebiotic activities score ของเชื้อ Lactobacillus reuteri TRBC291 ที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต 47
ค.1 แสดงการเพิ่มขึ้นของ Lactobacillus casei TISTR 1500 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่าย, อินูลิน หรือ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ในเวลา 24ชั่วโมง แสดงในรูป log CFU/ml 48
ค.2 แสดงการเพิ่มขึ้นของ Lactobacillus reuteri TRBC291ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่าย, อินูลิน หรือ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ในเวลา 24ชั่วโมง แสดงในรูป log CFU/ml 48
ค.3 แสดงการเพิ่มขึ้นของ Escherichia coli O74ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่าย, อินูลิน หรือ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ในเวลา 24ชั่วโมง แสดงในรูป log CFU/ml 49

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

4.1 แสดงค่า prebiotic activity score ของเชื้อ Lactobacillus casei TISTR 1500 และ Lactobacillus reuteri TRBC291 ที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต เปรียบเทียบกับ อินูลิน 24
4.2 ผล FTIR ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายผมนาง สกัดด้วย hot water extraction 26
4.3 ผล FTIR ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายผมนางสกัดด้วย ultrasound-assisted extraction 26
4.4 ผล FTIR ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายผมนางสกัดด้วย enzymatic-assisted extraction 27
4.5 ผล FTIR ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายไส้ไก่สกัดด้วย hot water extraction 27
4.6 ผล FTIR ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายchaetomorphaสกัดด้วย hot water extraction 28
ก.1 กราฟมาตรฐาน ascorbic acid สำหรับการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH 35
ก.2 กราฟมาตรฐาน ascorbic acid สำหรับการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP 37
ก.3 กราฟมาตรฐาน gallic acid สำหรับการวิเคราะห์ total phenolic content 42

บทที่1

บทนำ

1.1ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตคล้ายพืชที่เติบโตได้ในพื้นที่ที่มีน้ำไหลผ่าน มีแหล่งที่อยู่ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำกร่อย ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่าย ชาวเอเชียนิยมนำสาหร่ายบางชนิดมาประกอบอาหารตั้งแต่อดีตทั้งในรูปแบบสดและตากแห้ง ปัจจุบันนอกจากจะเป็นส่วนประกอบอาหารแล้วสาหร่ายบางชนิดยังถูกนำมาแปรรูปในอยู่รูปของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยมุ่งเน้นคุณค่าทางโภชนาการด้านโปรตีนและแร่ธาตุ แต่ยังมีสาหร่ายอีกหลายชนิดที่ไม่ถูกนำมาใช้ประโยชน์เนื่องจากยังขาดการศึกษาเกี่ยวการนำสารสำคัญอื่นๆมาใช้ให้เกิดประโยชน์ จึงมักกลายเป็นอาหารสำหรับสัตว์น้ำ หรือใช้เป็นปุ๋ยพืชเสมอ จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาประโยชน์ในด้านการต้านอนุมูลอิสระ และการเป็นพรีไบโอติกในพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดมาจากสาหร่ายทะเลในประเทศไทยจำนวน3ชนิด โดยการศึกษานี้จะศึกษา สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และการเป็นพรีไบโอติกจากของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากสาหร่าย3ชนิด โดยใช้วิธีในการสกัดต่างกัน3วิธี โดยมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของสาหร่ายและวิธีสกัดที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระ หรือใช้เป็นพรีไบโอติกเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ต่อยอดในอนาคต

1.2วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาผลของชนิดสาหร่ายและวิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ต่อ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการเป็นพรีไบโอติกของสารสกัดหยาบที่สกัดได้

1.3 ขอบเขต/กรอบแนวคิดของการวิจัย

ศึกษาผลผลิตร้อยละ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และ สมบัติการเป็นพรีไบโอติกในสารสกัดหยาบที่สกัดจากสาหร่าย3ชนิดด้วยวิธีสกัดแตกต่างกัน3วิธี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.4.1 เรียนรู้วิธีการวิเคราะห์ผลผลิตร้อยละ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และ สมบัติการเป็นพรีไบโอติกในสารสกัดหยาบ

1.4.2 ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดสาหร่ายแต่ละชนิด เพื่อที่จะนำไปใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ หรือ ใช้เป็นพรีไบโอติก

1.4.3 เพิ่มคุณค่าให้กับสาหร่ายทะเล และ สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับบริโภคได้

บทที่2

แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่าย

สาหร่าย คือ สิ่งมีชีวิตคล้ายพืชที่เติบโตได้ในพื้นที่ที่มีน้ำไหลผ่าน มีแหล่งที่อยู่ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำกร่อย ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่าย (สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา, 2555) ซึ่งประเทศในแถบเอเชียได้มีการนำสาหร่ายมาบริโภคเป็นเวลานานแล้ว โดยเฉพาะในประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี และอินโดนีเซีย สาหร่ายนั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายอย่างทั้งยารักษาโรค ปุ๋ย อาหารสัตว์ สกัดสารในสาหร่ายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม และการค้า เป็นต้น (Yuan et al. 2005)

สาหร่ายที่พบในประเทศไทยมีอยู่หลายชนิด เช่น สาหร่ายไส้ไก่ สาหร่ายผมนาง สาหร่ายมงกุฎหนาม สาหร่ายขนนก สาหร่ายโพรง สาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายใบ สาหร่ายทุ่น สาหร่ายเม็ดพริก และสาหร่ายพวงองุ่น (สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา, 2555) ในประเทศไทยได้มีการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ทั้งสาหร่ายน้ำจืด และสาหร่ายทะเล เช่น นำมาเป็นอาหาร ใช้ผลิตแก๊สเชื้อเพลิง ใช้ในการผลิตวุ้น ใช้ทำปุ๋ย ใช้เป็นอาหารสัตว์ และยังใช้บำบัดน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหรือโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆได้อีกด้วย (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2558)

2.2 วิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล

พอลิแซ็กคาไรด์ในสาหร่ายจะอยู่ที่บริเวณผนังเซลล์ (Rioux and Turgeon ,2013) การแยกเอาพอลิแซ็กคาไรด์ออกจากองค์ประกอบอื่นของสาหร่ายวิธีการแบบดั้งเดิมจะใช้วิธี Hot water extraction โดยการนำสาหร่ายสด หรือสาหร่ายตากแห้งมากำจัดไขมันด้วย methanol จากนั้นนำไปต้มด้วยน้ำร้อน85องศาเซลเซียสเป็นเวลา2ชม. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง15นาที นำส่วนของสารละลายออกมาตกตะกอนด้วย ethanol ก่อนจะล้างตะกอนที่ได้ด้วยacetone (Liu et al, 2016)

จากการศึกษาของ Barros et al., 2013 ได้ศึกษาสมบัติของ sulfated polysaccharide จากสาหร่าย *Gracilaria caudata*ใช้สภาวะในการสกัดที่อุณหภูมิสกัด 100 °C เวลาสกัด2ชั่วโมง อัตราส่วนสาหร่ายแห้งต่อน้ำกลั่น1.5:100 (w/v)

จากการศึกษาของ Peasura et al. (2015) ได้ศึกษาสมบัติของ sulfated polysaccharide จากสาหร่าย *Ulva intestinalis* โดยใช้ตัวทำละลายต่างกัน พบว่าการใช้ 0.1N HCl เป็นตัวทำละลายอัตราส่วนสาหร่ายแห้งต่อตัวทำละลาย1:20 อุณหภูมิสกัด 80 °C เวลาสกัด 6ชั่วโมง เป็นสภาวะการสกัดที่มีประสิทธิภาพที่สุด

ต่อมามีการพัฒนามีวิธีการใหม่ๆที่สามารถสกัดพอลิแซคคาไรด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น enzyme-assisted extraction , microwave-assisted extraction , pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction , และ ultrasound-assisted extraction (Shao, 2017)

2.2.1.Enzymes-assisted extraction (EAE)

เป็นการใช้เอนไซม์ที่สกัดมาจากสัตว์ พืช เห็ด หรือจุลินทรีย์ เพื่อช่วยให้สามารถสกัดพอลิแซคคาไรด์ออกมาให้ได้ผลผลิตมากขึ้น ร่วมกับการสกัดด้วยน้ำ โดยนิยมใช้เอนไซม์กลุ่ม hydrolase มากที่สุด โดยในpHและอุณหภูมิที่เหมาะสมเอนไซม์กลุ่มนี้จะทำลายผนังเซลล์และสกัดให้ได้สารที่ต้องการออกมา

การสกัดโดยใช้เอนไซม์มีข้อดีหลายประการคือ

-ไม่มีการสูญเสียพอลิแซคคาไรด์ระหว่างเกิดปฏิกิริยา

-ได้%yieldมาก และสามารถใช้ในอุตสาหกรรมได้

-มีความจำเพาะ และความไวต่อชนิดพอลิแซคคาไรด์สูง

-สภาวะในการทำงานของเอนไซม์ไม่รุนแรง ไม่เป็นพิษ หรือ ทำลายสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามการสกัดด้วยเอนไซม์ยังมีข้อจำกัดในด้านเสถียรภาพของเอนไซม์และค่าใช้จ่ายในการสกัด

ตัวอย่างเอนไซม์สำหรับสกัดพอลิแซคคาไรด์ในสาหร่ายได้แก่ agarase , alcalase , carragenanase , celluclast , Kojizyme , Neutrase, Termamyl , Ultraflo , Umamizyme , Viscozyme และ xylanase (Shao, 2017)

จากการศึกษาของ Hammed et al, 2017 ได้ใช้cellulase, amyloglucosidase และ vicozymeสกัด sulfated polysaccharidesจากสาหร่าย *Turbinaria turbinata*โดยใช้ชนิดเอนไซม์ต่างกัน ได้สกัดsulfated polysaccharidesโดยเติมน้ำกลั่นลงในสาหร่ายอบแห้งแล้วบดเป็นผงในอัตราส่วน1:40 (g/mL) และเติมสารละลายเอนไซม์25 μlหลังการhydrolysis ทำการต้มเพื่อยับยั้งเอนไซม์เป็นเวลา10นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยง 10นาที นำสารละลายมาตกตะกอนด้วยethanol แล้วนำมาล้างตะกอนด้วยethanolและacetoneตามลำดับ ก่อนนำไปอบแห้งเป็นเวลา48ชม. พบว่าการใช้เอนไซม์ cellulaseที่ความเข้มข้น1.5 μl/ml และ เวลา19.5ชม.ในการสกัด เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดมนการสกัด sulfated polysaccharideโดยไม่ได้ลดคุณภาพของ sulfated polysaccharideที่สกัดออกมาลงไป

นอกจากนี้ยังพบว่าการสกัดด้วยเอนไซม์ได้%yieldของพอลิแซคคาไรด์มากกว่าการสกัดด้วยการสกัดด้วยHot water extractionแบบดั้งเดิม และการสกัดด้วยUltrasound-assisted extraction จากการศึกษาของ (Rodriguez-Jasso et al, 2011)

2.2.2.Microwave-assisted extraction (MAE)

คลื่นไมโครเวฟ หมายถึง คลื่นที่มีช่วงความถี่อยู่ในช่วง 300 MHz ถึง 300 GHz การให้คลื่นไมโครเวฟช่วยสกัดขณะสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำ คลื่นไมโครเวฟที่ผ่านไปยังสาหร่ายจะถูกเปลี่ยนเป็นความร้อนจากผลของประจุและขั้วของสารภายในสาหร่าย ซึ่งจะทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายจากความดันที่

สูงขึ้นภายในเซลล์เนื่องจากความร้อน ทำให้ตัวทำละลายที่แพร่เข้ามาสกัดสารทางชีวภาพในเซลล์ออกไปได้ดี และยังลดความแข็งแรงทางกลของผนังเซลล์และทำให้ผนังเซลล์สูญเสียน้ำซึ่งทำให้ตัวทำละลายแพร่เข้ามาในเซลล์ได้ดี

ข้อดีของMAEได้แก่

–ใช้เวลาสกัดน้อย

-ลดการสูญเสียสารที่ระเหยได้ขณะสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ

-ใช้ตัวทำละลายน้อยเนื่องจากไม่มีการระเหยเกิดขึ้น

-ไม่มีไอกรดเกิดขึ้นขณะให้คลื่นไมโครเวฟกับกรดเนื่องจากเป็นระบบปิด

ข้อเสียของMAEได้แก่

–ใช้ความดันสูงจึงต้องระวัดระวังขณะสกัด

-ข้อจำกัดของเครื่องทำให้ไม่สามารถใช้สารละลายอุณหภูมิสูงมากได้ และไม่สามรถเติมตัวทำละลายอื่นขณะกำลังสกัดได้

-ต้องหล่อเย็นท่อก่อนที่จะเปิดฝาเครื่องเพื่อป้องกันการสูญเสียสารระเหย (Shao, 2017)

จากการศึกษาของ (He et al, 2016) พบว่าการใช้MAEสกัดพอลิแซคคาไรด์จะใช้เวลาสกัดน้อยกว่าและได้%yieldมากกว่าเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยวิธีHot water extractionและ Ultrasound-assisted extraction ตารางที่2.1 สภาวะของการสกัดด้วยวิธีต่างๆ และ%yieldของพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้

Extraction Method	Hot-Water Extract	Ultrasound-Assisted Extract	Microwave-Assisted Extract
Ratio of water to raw material (*w*/*w*)	1:20	1:20	1:20
Extraction time (min)	60	60	20
Extraction temperature (°C)	70	-	70
Extraction power (W)	-	500	500
Polysaccharides yield (%)	9.143 ± 0.723	8.523 ± 0.574	9.618 ± 0.731

ที่มา: He et al, 2016

2.2.3. Ultrasound-assisted extraction (UAE)

อัลตร้าซาวน์คือ คลื่นเสียงความถี่สูงเกิดกว่าที่มนุษย์จะได้ยินอยู่ที่ประมาณ20kHzขึ้นไป การใช้อัลตร้าซาวน์ช่วยขณะสกัดจะทำให้เกิดฟองอากาศขึ้นในตัวทำละลายที่ล้อมรอบสาหร่ายทำให้เกิดแรงดันและอุณหภูมิสูงขึ้น ทำให้ผนังเซลล์ที่ลดการถ่ายโอนมวลสารที่ทำการสกัดถูกทำลาย และทำให้ตัวทำละลายแพร่เข้าไปในเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น

UAE มีข้อดี คือ ใช้งานง่าย ใช้ตัวทำละลายน้อย และใช้ตัวทำละลายน้อย อย่างไรก็ตามเครื่องมือสำหรับ UAE ยังมีราคาสูงอยู่ (Shao, 2017)

จากการศึกษาของ Rahimi, Tabarsa and Rezaei (2016) ได้ศึกษาการสกัด sulfated polysaccharide จากสาหร่าย *Ulva intestinalis* ด้วยการใช้ultrasoundในการช่วยสกัด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด คือ อุณหภูมิสกัด 66 °C เวลาสกัด 40 นาที อัตราส่วนสาหร่ายแห้งต่อน้ำกลั่น1:50 (g/mL) และ pH 7.0

จากการศึกษาของ Wan et al. (2015) ได้ศึกษาการสกัด sulfated polysaccharide จากสาหร่าย *Laminaria japonica* ด้วยการใช้ไมโครเวฟในการช่วยสกัด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด คือ อุณหภูมิสกัด 80 °C เวลาสกัด 54 นาที ultrasonic power 1050 W และ อัตราส่วนสาหร่ายแห้งต่อน้ำกลั่น 1:50 (g/mL)

จากการศึกษาของ Fidelis et al.,2014 ได้ศึกษาการสกัด sulfated polysaccharide จากสาหร่าย *Gracilaria birdiae* ด้วยการใช้ultrasoundในการช่วยสกัด ใช้สภาวะในการสกัดที่อุณหภูมิสกัด 60 °C เวลาสกัด 30 นาที ultrasonic power 60 W

2.3 Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy

Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์โครงสร้างสาร โดยการวัดการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดซึ่งมีความถี่อยู่ในช่วง 10^{11}-10^{14} Hz ของตัวอย่างที่ความถี่ต่าง ๆ ในแต่ละตัวอย่างจะมีสมบัติการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ความถี่ต่าง ๆ แตกต่างกันทำให้สามารถจำแนกองค์ประกอบที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535) โดยการกระตุ้นด้วยพลังงานแสง เมื่อแสงอินฟราเรดที่ความยาวคลื่นต่างๆผ่านเข้าสู่ตัวอย่าง พันธะเคมีในโมเลกุลของสารจะดูดกลืนพลังงานที่ความยาวคลื่นหนึ่ง และถูกประมวลผลโดยใช้สมการเชิงอนุพันธ์ที่เรียกว่า Fourier Transform ซึ่งจะคำนวณพลังงานของแต่ละความยาวคลื่นแปรผลออกมาเป็นสเปกตรัม สารแต่ละชนิดให้สเปกตรัมที่มีลักษณะเฉพาะจึงสามารถนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อบ่งชี้ชนิดของสารได้ (วรางคณา อนุชิตโอฬาร, 2546)

ข้อดีของ FTIR คือ มีความไวสูง สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ทั้งของแข็ง ของเหลวและก๊าซ และใช้เวลาตรวจวิเคราะห์น้อยกว่าเทคนิคอื่น ๆ (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535) ให้ข้อมูลทางเคมีที่สมบูรณ์ และ ยังสมารถใช้ร่วมกับเทคนิคทาง image อื่นๆได้ เช่น SEM, AMF เพื่อเพิ่มความถูกต้อง

Rahimi, Tabarsa and Rezaei (2016)ได้วิเคราะห์องค์ประกอบของ สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายไส้ไก่ที่สกัดด้วย UAE พบว่ามี peak สำคัญได้แก่ ที่ 850 cm^{-1} และ 1256 cm^{-1} ของพันธะ C-O-S และ S-O ของซัลเฟต 3445 cm^{-1}ของพันธะ O-H 2942 cm^{-1}ของพันธะ C-H ที่1660 cm^{-1}ของหมู่ COO- จาก uronic acid และ 1446 cm^{-1} แสดงถึงความไม่สมมาตรพันธะ COO- และ พันธะ C-O ในหมู่ COOH

Tabarsa et al. (2018) วิเคราะห์องค์ประกอบของ พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายไส้ไก่ที่ละลายน้ำได้ พบช่วงการดูดกลืนมากที่ 800-1200 cm^{-1} และ 3400 cm^{-1} ช่วงคลื่นที่บ่งบอกถึงลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์

ได้แก่ 1000-1200 cm^{-1} ของพันธะ C-O แสดงถึง sugar ring และ glycosidic bond การดูดกลืนที่ 1164 cm^{-1} 1085 cm^{-1}และ 1034 cm^{-1} บ่งชี้ถึงโครงสร้างน้ำตาลแบบ pyranose ช่วงดูดกลืนกว้างที่ 3433 cm^{-1} และช่วงดูดกลืนเล็กๆที่ 2939 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ OH และ CH ตามลำดับ

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารที่สามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาต้านอนุมูลอิสระนั้นเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) กลไกการยับยั้งของสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป เช่น ช่วยป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ ช่วยทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น และช่วยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่การเกิดอนุมูลอิสระ (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)

อนุมูลอิสระ คือ สารที่เกิดจากการเผาผลาญอาหารในร่างกาย รวมทั้งจากสภาพแวดล้อม และมลพิษ ซึ่งอนุมูลอิสระจะเข้ามาทำลายโครงสร้างและหน้าที่ของผนังเซลล์ทำให้เกิดความผิดปกติจนเกิดเป็นโรคภัยไข้เจ็บต่าง ๆ และอาจนำไปสู่การเป็นมะเร็งได้อีกด้วย (เมดิกไทย, 2561)

2.4.1 วิธีการตรวจสอบความสามารถในการเป็น antioxidant

2.4.1.1 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) (จันทนา ไพรบูรณ์ และ อนงค์ จีรภัทร์, 2555)

DPPH assay เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการเป็น antioxidant รีเอเจนต์ที่ใช้ คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียรในตัวทำละลายเมทานอล สีของสารละลายเป็นสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm โดย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ถ้าตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีความสามารถในการเป็น antioxidant สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง (จันทนา ไพรบูรณ์ และ อนงค์ จีรภัทร์, 2555)

ข้อดีของวิธี DPPH assay คือ เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายในการนำมาวิเคราะห์ มีความถูกต้องสูง (จันทนา ไพรบูรณ์ และ อนงค์ จีรภัทร์, 2555)

ข้อเสียของวิธี DPPH assay คือ วิธีนี้ไม่สามารถใช้วิเคราะห์การทำงานของ antioxidant ของเลือดได้เพราะเป็นวิธีที่มีตัวทำละลายเป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอนได้ (จันทนา ไพรบูรณ์ และ อนงค์ จีรภัทร์, 2555)

2.4.1.2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay) (Benzie and Szeto., 1999; Pulido et al., 2000)

FRAP assay เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการเป็น antioxidant โดย antioxidant ให้อิเล็กตรอนกับสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้

สารประกอบเชิงซ้อนเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีม่วงน้ำเงินและสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 595 nm (Benzie and Szeto., 1999; Pulido et al., 2000)

ข้อดีของวิธี FRAP assay คือ เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง (จันทนา ไพรบูรณ์ และอนงค์ จีรภัทร์, 2555)

2.5 พรีไบโอติก (prebiotic) (Gibson and Roberfroid, 1995)

พรีไบโอติก (prebiotic) คือ อาหารที่ร่างกายไม่สามารถย่อยและดูดซึมได้ แต่จะถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ พรีไบโอติกนี้จะไปช่วยกระตุ้นการทำงานและส่งเสริมให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีการเจริญที่ดีขึ้น (Gibson and Roberfroid, 1995)

2.5.1 ประโยชน์ของพรีไบโอติก (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2561)

1) กรดแลคติกที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและสร้างสารพิษ ช่วยป้องกันและลดอาการของโรคติดเชื้อ (infection) ในทางเดินอาหาร (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2561)

2) ช่วยลดคอเลสเตอรอล (cholesterol) ในเลือด โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอลและยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลผ่านผนังลำไส้ (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2561)

3) ช่วยให้การดูดซึมอาหารในลำไส้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ลดอาการท้องผูกได้ โดยกรดอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นจะกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้และช่วยเพิ่มความชื้นของอุจจาระ ทำให้ขับถ่ายได้ดีขึ้น (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2561)

4) สามารถผลิตวิตามินบี1 บี2 บี6 บี12 กรดนิโคตินิก (nicotinic acid) และกรดโฟลิค (folic acid) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาภาวะภูมิแพ้ เสริมสร้างการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันได้ (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2561)

บทที่3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 วัตถุดิบ

3.1.1.1 สาหร่ายไส้ไก่ (*Ulva intestinalis*)

สาหร่ายไส้ไก่ปริมาณ2กิโลกรัม ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งระยอง นำมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก1ครั้ง จากนั้นนำไปอบแห้งด้วยHot air oven(Memmert, รุ่น UF110)ที่อุณหภูมิ60องศาเซลเซียส 12ชั่วโมง บดเป็นผงด้วยเครื่องปั่นผสม เก็บในถุงซิปล็อค

3.1.1.2 สาหร่าย chaetomorpha *(Chaetomorpha spiralis*)

สาหร่าย *chaetomorpha spiralis*ปริมาณ1กิโลกรัม ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเขต2 (สมุทรสาคร) นำมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก1ครั้ง จากนั้นนำไปอบแห้งด้วยHot air oven (Memmert, รุ่น UF110)ที่อุณหภูมิ60องศาเซลเซียส 12ชั่วโมง บดเป็นผงด้วยเครื่องปั่นผสม เก็บในถุงซิปล็อค

3.1.1.3 สาหร่ายผมนาง *(Gracilaria tenuistipitata)*

สาหร่ายผมนางปริมาณ2กิโลกรัม ได้รับความอนุเคราะห์จากสุรกิจฟาร์ม ตั้งอยู่ที่ หมู่13 ต.แหลมฟ้าผ่า อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ นำมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก1ครั้ง จากนั้นนำไปอบแห้งด้วยHot air oven(Memmert, รุ่น UF110)ที่อุณหภูมิ60องศาเซลเซียส 12ชั่วโมง บดเป็นผงด้วยเครื่องปั่นผสม เก็บในถุงซิปล็อค

3.1.2 สารเคมี

-สารที่ใช้ในการสกัดพอลิแซคคาไรด์

เอทานอล 95%

Hydrochloric acid

เอนไซม์ cellulase

-การวิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity

Ascorbic acid A.R. grade

2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	A.R. grade
Methanol	A.R. grade

-การวิเคราะห์ ferric reducing antioxidant power(FRAP)

ascorbic acid	A.R. grade
Sodium acetate	A.R. grade
2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine(TPTZ)	A.R. grade
ferric chloride	A.R. grade
glacial acetic acid	A.R. grade
hydrochloric acid	A.R. grade
methanol	A.R. grade

-การวิเคราะห์ Prebiotic activity score

MRS broth

Minimal media broth

MRS agar

Tryptone soya agar

Tryptone soya broth

Normal saline 0.9%

glucose

inulin

ammonium sulphate

dipotassium phosphate

monopotassium phosphate

sodium citrate

magnesium sulphate

peptone

beef extract

yeast extract

polysorbate80

ammonium citrate

sodium acetate

manganese sulphate

- การวิเคราะห์ total phenolic content

Sodium carbonate

Folin-Ciocalteu reagent

3.1.3 วัสดุ และ อุปกรณ์

-วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วย

เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม4ตำแหน่ง

Erlenmayer flask ขนาด250 ml

Water bath

Ultrasonic bath

Hot plate

บีกเกอร์

แท่งแก้วคนสาร

เครื่องCentrifuge

Centrifuge tube

หลอดหยด

ตู้เย็น

Suction flask

กระดาษกรอง macherey nagel MN 616

Buchner funnel

หลอดหยด

ชามกระเบื้อง

ขวดน้ำกลั่น

ผ้าขาวบาง

วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดสมบัติต้านอนุมูลอิสระ(DPPH และ FRAP)

Cuvette

หลอดทดลอง

เครื่องชั่งน้ำหนัก 4ตำแหน่ง

ช้อนตักสาร

Spectrophotometer (Thermo Spectronic, รุ่น GENESYS 10 UV)

ขวดกำหนดปริมาตร25 และ 50mL

ขวดน้ำกลั่น

ปิเปต

บีกเกอร์

ลูกยาง

Water bath (Memmert, รุ่น WNB22)

-วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ Prebiotic activity score

เครื่อง centrifuge

Spectrophotometer (Thermo Spectronic, รุ่น GENESYS 10 UV)

เครื่องเขย่าสาร

biosafety cabinet

autoclave

เครื่องชั่งสาร4ตำแหน่ง

ตู้บ่มเชื้อ

ขวดduran

แท่งแก้วคนสาร

หลอดทดลอง และฝา

rack

หลอดcentrifuge

cuvette

จานเพาะเชื้อพลาสติก

ตะเกียงแอลกอฮอล์

ไมโครปิเปต

tip

ไฟแช็ค

กระบอกตวง

ขวดน้ำกลั่น

ปิเปต

กระดาษฟอยด์

ช้อนตักสาร

dropper

เข็มเขี่ยเชื้อ

ถุงร้อน

หนังยาง

-วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ total phenolic content

Spectrophotometer (Thermo Spectronic, รุ่น GENESYS 10 UV)

Cuvette

หลอดทดลอง

Micropipette

Tip

ขวดปรับปริมาตร

3.1.4 วิธีวิเคราะห์ และตรวจวัดสมบัติด้านต่างๆ

-การวิเคราะห์สมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีDPPH radical scavenging activity

ดัดแปลงจาก Brand-Willams et al.(1995) และ Dore et al. (2013)

-การวิเคราะห์สมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power(FRAP)

ดัดแปลงจาก Benzie and Strain(1996)

-การวิเคราะห์ค่า Prebiotic activity score

ดัดแปลงจากวิธีของ Thuaytong and Anprung (2010) และ Huebner, Wehling and Hutkins (2007)

-การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคFT-IR

ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

-การวิเคราะห์ total phenolic content

ตามวิธีของ Imjongjaira et al.(2016)

3.2 ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

3.2.1 สกัดสารสกัดหยาบ และ วัดผลผลิตร้อยละ ตามขั้นตอนดังนี้

ชั่งสาหร่ายผง5 กรัม(บันทึกน้ำหนัก)ลงใน Erlenmayer flask ขนาด250 ml

↓

สาหร่ายแต่ละชนิดจะถูกสกัดพอลิแซคคาไรด์ด้วยวิธีต่างกัน3วิธี ได้แก่ hot water extraction, ultrasound-assisted extraction และ enzymatic-assisted extraction โดย

Hot water extraction สาหร่ายไส้ไก่ และ Chaetomorpha ใช้สภาวะตามวิธีของ Peasura et al. (2015)

สาหร่ายผมนางใช้สภาวะตามวิธีของ Barros et al. (2013)

Ultrasound-assisted extraction สาหร่ายไส้ไก่ และ Chaetomorpha ใช้สภาวะตามวิธีของ Rahimi, Tabarsa and Rezaei (2016) สาหร่ายผมนางใช้สภาวะตามวิธีของ Fidelis et al. (2014)

enzymatic-assisted extraction สาหร่ายทั้ง3ชนิดใช้สภาวะตามวิธีของ Hammed et al. (2017)

↓

กรองหยาบด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวมากรองด้วยกระดาษกรองผ่าน Buchner funnel ลงไปในsuction flask แล้วนำส่วนของเหลวที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 2500rpm 10องศาเซลเซียส 20นาที

↓

นำส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยงมาระเหยด้วย hot plate จนมีปริมาตร 1/10 ของปริมาตรเดิม

↓

เติม ethanol 95% 6เท่าของปริมาตรส่วนใสที่เหลืออยู่ ทิ้งไว้ข้ามคืนเก็บที่4องศาเซลเซียส

↓

นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 3500rpm 4 องศาเซลเซียส 15นาที

↓

นำส่วนตะกอนมาระเหยแห้งที่อุณหภูมิ70องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักตะกอน คำนวณ % yield

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ทดลอง3ซ้ำวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลผลิตร้อยละภายในชนิดสาหร่ายเดียวกันด้วย Duncan's New Multiple Range Test และพิจารณาผลที่ได้เพื่อเลือกวิธีที่เหมาะสมในการสกัดพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายแต่ละชนิด

3.2.2นำมาวัดสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และ total phenolic content

<u>การวิเคราะห์สมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity</u>

ชั่งสารสกัดหยาบ 0.05 g ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด25 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายความเข้มข้น 2 mg/ml แล้วปิเปตสารละลายดังกล่าวปริมาณ 0.2 ml ลงในหลอดทดลองผสมกับสารละลาย DPPH (ภาคผนวก ก.1) 4 ml ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยมี methanol เป็น blank นำค่าที่วัดได้จากสารละลาย DPPH ($A_{initial}$) และค่าที่วัดได้จากสารสกัด (A_{final}) มาหาผลต่างของค่าการดูดกลืนแสง (A_{diff})

$$A_{diff} = A_{initial} - A_{final}$$

นำ A_{diff} ของตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน ascorbic acid (ภาพที่ ก.1) จะได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid (µM) ที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารสกัด คำนวณเป็น µmol Ascorbic equivalent/g จากสมการ

$$\text{µmol Ascorbic equivalent/g} = \frac{\text{ความเข้มข้น } ascorbic\ acid \text{ จากกราฟ}}{40\ x \text{ น้ำหนักสารสกัดหยาบ}}$$

และคำนวณ %inhibitorของตัวอย่าง จากสมการ

$$\%\text{inhibition} = (1-\frac{A_{final}}{A_{initial}}) \times 100$$

<u>การวิเคราะห์สมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP)</u>

ชั่งสารสกัดหยาบ 0.05 g ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด25 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายความเข้มข้น 2 mg/ml แล้วปิเปตสารละลายดังกล่าวปริมาณ 0.2 ml ลงในหลอดทดลองผสมกับสารละลาย FRAP ที่แช่ใน water bath อุณหภูมิ 37 °C จนมีสีน้ำตาลอมส้มแล้ว 4 ml (ภาคผนวก ก.2) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 539 nm โดยมี น้ำกลั่น เป็น blank นำค่าที่วัดได้จากสารละลาย FRAP ($A_{initial}$) และค่าที่วัดได้จากสารสกัด (A_{final}) มาหาผลต่างของค่าการดูดกลืนแสง (A_{diff}) จากสมการ $A_{diff} = A_{initial} - A_{final}$

นำ A_{diff} ของตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน ascorbic acid (ภาพที่ ก.2) จะได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid (µM) ที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารสกัด คำนวณเป็น µmol Ascorbic equivalent/g จากสมการ

$$\text{µmol Ascorbic equivalent/g} = \frac{\text{ความเข้มข้น } ascorbic\ acid \text{ จากกราฟ}}{40\ x \text{ น้ำหนักสารสกัดหยาบ(g)}}$$

การวิเคราะห์ total phenolic content

ปิเปตสารละลายของสารสกัดหยาบความเข้มข้น 5mg/ml ลงในหลอดทดลอง 0.2 ml ผสมกับน้ำกลั่น 0.8 ml Folin–Ciocalteu reagent 0.2 ml ตั้งทิ้งไว้6นาที แล้วผสม 7% Na_2CO_3 2ml ลงในหลอดทดลอง ทิ้งไว้ในที่มืด90นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่760 nm โดยมีน้ำกลั่น1 ml 7% Na_2CO_3 2ml และ Folin–Ciocalteu reagent 0.2 mlเป็น blank

นำไปคำนวณหา total phenolic content ของสารสกัดโดยเทียบกับ A_{760} ของกราฟมาตรฐาน gallic acid (ภาพที่ ก.3) คำนวณเป็น µg gallic acid equivalent ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากสมการ

µg gallic acid equivalent/g = (µg gallic acid/ml) / (g crude extract/ml)

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทดลอง2ซ้ำวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range Test และพิจารณาผลที่ได้เพื่อเลือกชนิดสาหร่าย และวิธีสกัดที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดหยาบเพื่อนำไปเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

3.2.3 นำมาวิเคราะห์ค่า Prebiotic activity score

ชั่ง 0.10 g ของสารสกัดหยาบ กลูโคส หรือ อินูลิน ลงในหลอดทดลองที่มี MRS broth สำหรับการทดลอง (สำหรับเชื้อ *Lactobacillus*) หรือ minimal media broth สำหรับการทดลอง (สำหรับเชื้อ *E.coli*) (ภาคผนวก ก.6) 10mL นำไปฆ่าเชื้อด้วยautoclave แล้วเขย่าให้ละลาย

นำเชื้อที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ก.6) ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3500rpm 4°C 15นาที ตามวิธีของ Ngov, Sukboonyasatit and Paseephol (2014) เทส่วนใสออก แล้ว เติม normal saline 10 mlลงไป เขย่าให้ผสมกันเป็นสารแขวนลอย ทำซ้ำอีก2ครั้ง เพื่อเป็นการล้างเซลล์ให้ปราศจากอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม นำสารแขวนลอยที่ได้ไปวัด OD600 คำนวนCFU/ml ตามกราฟของ Dimov et al. (2007) สำหรับเชื้อ *Lactobacillus* และ Fred Ausubel et al. (2003) สำหรับเชื้อ *E.coli* เพื่อหาจำนวน dilution ที่ต้องใช้เพื่อหา CFU/ml

ปิเปตสารแขวนลอยของเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีbroth สำหรับการทดลอง 0.1ml นำไปบ่มที่ 37°C นำมานับจำนวนโคโลนี และคำนวณเป็น CFU/ml โดยใช้ MRS agar สำหรับเชื้อ*Lactobacillus* และ TSA สำหรับ *E.coli* ด้วยเทคนิค pour plate จำนวน2 dilution dilution ละ 3 plate ที่ชั่วโมงการบ่มที่0 และ 24

คำนวณ log CFU/ml ชั่วโมงที่0 และ 24 ในการบ่ม broth สำหรับการทดลองที่มีสารสกัดหยาบ อินูลิน หรือกลูโคส แล้วนำมาคำนวณเป็น prebiotic activity score ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus*โดยใช้ *E.coli* แทน enteric เปรียบเทียบกับอินูลินที่เป็น commercial prebiotic โดยใช้สมการ

prebiotic activity score = {(probiotic log cfu/ml on the prebiotic at 24 h - probiotic log cfu/ml on the prebiotic at 0 h)/(probiotic log cfu/ml on the glucose at 24 h - probiotic log cfu/ml on the glucose at 0 h)}- {(enteric log cfu/ml on the prebiotic at 24 h - enteric log cfu/ml on the prebiotic at 0 h)/(enteric log cfu/ml on the glucose at 24 h - enteric log cfu/ml on the glucose at 0 h)}

วางแผนการทดลองแบบ RBD ทดลอง2ซ้ำวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range Test และพิจารณาผลที่ได้เพื่อเลือกชนิดสาหร่าย และวิธีสกัดที่เหมาะสมในการนำสารสกัดหยาบไปเป็นพรีไบโอติก

3.2.4 ตรวจองค์ประกอบของสารสกัดหยาบที่สกัดได้ด้วยวิธี Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy โดยเลือกตัวอย่างสาหร่ายแต่ละชนิดส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (model Perkin Elmer, Spectrum One) โดยการเตรียมตัวอย่างขนาด 2 mg บดผสมกับผง KBr อัดเป็นเม็ดและวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย Attenuated total reflectance spectroscopy (ATR) mode

3.2.5 วิเคราะห์องค์ประกอบของสาหร่ายที่นำมาใช้ในการทดลองแต่ละชนิดโดยปริมาณความชื้นวัดด้วยเครื่อง Moisture Analyzer รุ่นMJ33 ปริมาณโปรตีนและเถ้า วิเคราะห์ตามวิธีของ AOAC (2000) จำนวน3ซ้ำวิเคราะห์ ส่วนปริมาณไขมันวิเคราะห์ตามวิธีของ AOAC (2000) จำนวน2ซ้ำวิเคราะห์ (ภาคผนวก ก.3-ก.5)

บทที่4

ผลการดำเนินงานวิจัย

4.1 การศึกษาองค์ประกอบของสาหร่ายที่จะนำมาใช้ในการวิจัย

4.1.1 เปอร์เซ็นของน้ำหนักแห้งที่ได้การอบแห้งสาหร่ายสด

เพื่อรักษาสาหร่ายตัวอย่างไม่ให้เกิดการเน่าเสีย หรือ เสื่อมสภาพก่อนนำไปสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ จึงนำสาหร่ายสดทั้งหมดมาอบแห้งด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อย เพื่อให้สาหร่ายที่ได้แห้งสนิท และเก็บรักษาได้นาน โดยน้ำหนักก่อนอบแห้งที่บันทึกไว้นั้นเป็นน้ำหนักที่บันทึกหลังจากล้างทำความสะอาดสิ่งสกปรกที่ติดมาแล้วชะด้วยน้ำกลั่นแล้ว และน้ำหนักหลังอบแห้งเป็นน้ำหนักที่บันทึกหลังที่อบแห้งเสร็จแล้วแต่ยังไม่ได้บดด้วยเครื่องปั่น ทำให้น้ำหนักเริ่มต้นไม่มีน้ำหนักของสิ่งเจือปนที่ไม่ใช่สาหร่ายและเป็นของแข็งติดมาด้วย และน้ำหนักหลังอบไม่มีส่วนที่สุญเสียไปกับการบดละเอียด อย่างไรก็ตาม%น้ำหนักแห้งที่ได้น้อยกว่าที่ควรจะเป็น คือ น้ำหนักแห้งที่ได้จากการอบสาหร่ายโดยทั่วไปจะอยู่ที่ประมาณ 10-12.5 % (De San, 2012)ของน้ำหนักเดิม แต่ในงานวิจัยนี้คำนวณได้เพียง 4.4-8.4% เท่านั้น(ตาราง 4.1) ซึ่งเป็นผลมาจาก 1. หลังการชะสาหร่ายสดด้วยน้ำกลั่นแล้ว นอกจากจะมีน้ำที่อยู่ในเซลล์สาหร่ายยังมีน้ำที่เปียกอยู่บนผิวนอกของสาหร่ายด้วยซึ่งแม้จะทำการบีบออก และ ซับออกแล้วก็ตาม สาหร่ายก็ยังอุ้มน้ำอยู่จำนวนหนึ่งซึ่งไม่สามารถกำจัดออกได้หมดก่อนนำไปอบอยู่ดี 2. เครื่องชั่งที่ใช้ชั่งเป็นเครื่องชั่งขนาดใหญ่ เนื่องจากขนาดของสาหร่ายก่อนอบมีปริมาตรมากเกินกว่าจะวางบนเครื่องชั่ง2ตำแหน่งได้ และน้ำหนักรวมภาชนะมากกว่าน้ำหนักสูงสุดจะใช้เครื่องชั่ง2ตำแหน่งได้ ทำให้น้ำหนักที่ชั่งได้อาจคลาดเคลื่อน 3. น้ำหนักหลังอบแห้งมีการสุญเสียไปบางส่วนจากการติดอยู่กับถาดที่ใช้อบแห้งและไม่สามารถขูดออกมาได้

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักของสาหร่ายก่อน และ หลังทำการอบแห้ง คำนวณเป็น %yield

ชนิดสาหร่าย	น้ำหนักก่อนอบแห้ง (g)	น้ำหนักก่อนหลังแห้ง (g)	%yield
สาหร่ายไส้ไก่	2000	88.2	4.4
สาหร่าย Chaetomorpha	1000	84.4	8.4
สาหร่ายผมนาง	2000	182.5	5.3

เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพของสาหร่าย3ชนิดพบว่าสาหร่าย Chaetomorpha มีผิวนอกที่แข็งและลำต้นมีขนาดใหญ่ไม่เกาะติดกันทำให้เชื่อว่ามีน้ำที่ติดอยู่ภายนอกก่อนอบน้อยที่สุด ในทางตรงข้ามสาหร่ายไส้ไก่ลำต้นเล็กอ่อนนุ่มเกาะติดกันเป็นก้อนจึงอุ้มน้ำได้ดี

4.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักในตัวอย่างสาหร่าย

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสาหร่ายไส้ไก่ดังตารางที่ 4.2 สอดคล้องกับการศึกษาของ Metin and Bayga (2018) ที่มีการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ และ องค์ประกอบของสาหร่าย *Enteromorpha intestinalis* ในฤดูกาลต่างๆ ณ ประเทศตุรกี ผลการศึกษา % องค์ประกอบต่างๆสอดคล้องกับค่าของงานวิจัยในช่วงฤดูใบไม้ร่วง(เดือนตุลาคม-พฤศจิกายน) ถึง ฤดูหนาว(ธันวาคม-มีนาคม) เมื่อคำนวณเป็น % ต่อน้ำหนักแห้งแล้ว ซึ่งสาหร่ายไส้ไก่ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้เก็บมาในช่วงเดือนพฤศจิกายน ความแตกต่างที่เกิดขึ้นเล็กน้อยอาจเป็นผลจากสภาพอากาศ และ ภูมิประเทศที่แตกต่างกัน

งานวิจัยนี้ที่วัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายไส้ไก่ได้ถึง 70.36% (ตารางที่4.2)มากกว่าในการทดลองของ Peasura et al. (2015) ที่นำสาหร่ายไส้ไก่ที่เก็บมาในเดือนกรกฎาคมมาสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีคาร์โบไฮเดรต55.43% ต่ำกว่าที่เก็บได้ในเดือนพฤศจิกายนจากการศึกษาของ Metin and Bayga (2018) ที่มีคาร์โบไฮเดรต 61.26%

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสาหร่ายผมนางจากตารางที่4.2 สอดคล้องกับการศึกษาของ Setthamongkol et al. (2015) ที่ได้เพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิด 9 ชนิด เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและองค์ประกอบ

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบหลักในตัวอย่างสาหร่ายที่นำมาใช้ในการวิจัย

องค์ประกอบหลัก	ชนิดสาหร่าย		
	สาหร่ายไส้ไก่	สาหร่ายChaetomorpha	สาหร่ายผมนาง
%ความชื้น	0.476^{a}±0.003	0.391^{b}±0.001	0.586^{c}±0.001
%เถ้า	13.18^{a}±0.09	18.75^{b}± 0.04	22.93^{c}±1.93
%โปรตีน	15.93^{a}±0.44	17.94^{b}±0.54	23.52^{c}±0.76
%ไขมัน	0.054^{a}±0.001	0.598^{b}±0.196	0.040^{a}±0.024
%คาร์โบไฮเดรตโดยการคำนวณ	70.36±0.53	62.32±0.78	52.92±2.72

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD)

โดยอักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันแสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบของสาหร่ายทั้ง3ชนิดจะพบว่า สาหร่ายผมนางมีปริมาณเถ้าสูงกว่าสาหร่ายอีก2ชนิด เนื่องจากปริมาณเถ้าบ่งบอกถึงปริมาณของแร่ธาตุในตัวอย่างซึ่งรวมถึงธาตุกำมะถันที่เป็น

ธาตุองค์ประกอบของหมู่ sulphate ที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระของ sulphated polysachharides ทำให้คาดว่าพอลิแซกคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผมนางจะมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

นอกจากนั้นยังพบว่าสาหร่ายไส้ไก่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากที่สุด รองลงมาคือ สาหร่าย chaetomorpha และ สาหร่ายผมนาง ตามลำดับ ทำให้คาดว่าปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้จะมีผลผลิตร้อยละจากสาหร่ายไส้ไก่มากที่สุด และ จากสาหร่ายผมนางน้อยที่สุด

4.2 ผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล

จากการสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย3ชนิดได้แก่สาหร่ายไส้ไก่ สาหร่าย Chaetomorpha และ สาหร่ายผมนาง ด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน3วิธีได้แก่ Hot water extraction ,Ultrasound-assisted extraction และ enzymatic-assisted extraction พบว่าการสกัดด้วย Ultrasound-assisted extraction ได้ผลผลิตร้อยละน้อยที่สุด(ตาราง4.3) สอดคล้องกับการทดลองของ He et al. (2016) ที่ได้ศึกษาอิทธิพลของการสกัดด้วยวิธีต่างกัน3วิธีได้แก่ Hot water extraction ,Ultrasound-assisted extraction และ Microwave-assisted extraction ในสาหร่าย4ชนิดพบว่าวิธี Ultrasound-assisted extraction ได้ผลผลิตร้อยละน้อยที่สุดเช่นกัน

สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยวิธี enzymatic-assisted extraction ได้ผลผลิตร้อยละเฉลี่ยสูงที่สุด ซึ่งเป็นผลจากการที่ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว(สาหร่ายไส้ไก่ และ สาหร่าย chaetomorpha) มีcelluloseเป็นส่วนประกอบอยู่ 19-41% และสาหร่ายสีแดง(สาหร่ายผมนาง) มีcelluloseเป็นส่วนประกอบอยู่ 7-24% (Rioux and Turgeon ,2013) ทำให้เอนไซม์ที่ใช้ในการวิจัยนี้คือ cellulase ตัดพันธะ 1,4-beta-D-glycosidic linkages ของ celluloseให้สั้นลง ทำให้ผนังเซลล์เกิดช่องว่างให้ตัวทำละลายเข้าไปสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ในเซลล์ออกมาได้ดีขึ้น รวมถึงทำให้สกัด sulphated poltsaccharides ที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ออกมาได้ดี แต่เนื่องจากสาหร่ายสีแดงมี cellulose น้อยกว่าสาหร่ายสีเขียวทำให้ผลผลิตร้อยละของสาหร่ายผมนางสกัดด้วย hot water extraction มากกว่า enzymatic-assisted extraction (ตาราง 4.3)

สำหรับ hot water extraction นั้นค่าที่ได้จากการสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายไส้ไก่ คือ 26.04% (ตาราง4.3) มากกว่าค่าจากการศึกษาของ Peasura et al. (2015) ที่ได้ค่าประมาณ12% เป็นผลมาจากปริมาณคาร์โบไฮเดรตในสาหร่าย (อ้างอิงจากหัวข้อ4.1.2) และอาจมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมของพื้นที่ที่สาหร่ายเจริญเติบโตมาเกี่ยวข้อง สำหรับสาหร่ายผมนาง *(Gracilaria tenuistipitata)* สกัดพอลิแซกคาไรด์ได้เพียง 13.78% ซึ่งน้อยกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาของ Barros et al. (2013) ที่สกัดได้มากถึง 32.8% เนื่องจากในงานวิจัยดังกล่าวได้ใช้สาหร่ายคนละสปีชีส์กันคือ สาหร่าย *Gracilaria caudate* นอกจากนี้ในงานวิจัยดังกล่าวได้อ้างอิงถึงงานวิจัยอื่นที่สกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสกุล *Gracilaria* อีกหลายชนิดซึ่งให้ค่าแตกต่างกันตั้งแต่ 6.5-46.6% ซึ่งในงานวิจัยนี้ก็อยู่ในช่วงดังกล่าวเช่นกัน

สำหรับผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย Ultrasound-assisted extraction พบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่ายไส้ไก่ได้ผลผลิต 12.29% ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Rahimi, Tabarsa and Rezaei (2016) ที่ได้ 8.3% ส่วนสาหร่ายผมนางได้ 7.80%ซึ่งน้อยกว่าการศึกษาของ Fidelis et al. (2014) เนื่องจากงานวิจัยดังกล่าวใช้สาหร่ายคนละสปีชีส์คือ *Gracilaria birdiae*

ตารางที่ 4.3 ผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย3ชนิด ที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน

ชนิดสาหร่าย	ผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบสกัดด้วยวิธี		
	Hot water extraction	Ultrasound-assisted extraction	enzymatic-assisted extraction
สาหร่ายไส้ไก่	26.04^{d}±2.89	12.29^{ab}±0.62	34.27^{e}±4.10
สาหร่ายChaetomorpha	19.27^{c}±1.09	12.64^{ab}±4.15	19.70^{c}±1.38
สาหร่ายผมนาง	13.78^{b}±3.34	7.80^{a}±2.06	10.80^{ab}±2.41

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการวิเคราะห์3ซ้ำ
โดยอักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันแสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

4.3 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบที่สกัดจากสาหร่าย3ชนิดด้วยวิธีแตกต่างกัน3วิธี

จากการสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสาหร่ายผมนางที่สกัดด้วย Ultrasound-assisted extraction มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับวิธีการอื่นๆ คือ 179.13 µmol ascorbic acid equivalent/g (เทียบเป็น31.52 mg ascorbic acid equivalent/g) (ตาราง4.4) สำหรับวิธี DPPH ซึ่งน้อยกว่าค่าในการศึกษาของ Fidelis et al. (2014) ที่ได้ประมาณ 80 mg ascorbic acid equivalent/g ซึ่งอาจเป็นผลจากการใช้สาหร่ายต่างสปีชีส์กัน

นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายผมนางที่สกัดด้วย enzymatic-assisted extraction ให้สมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงใกล้เคียงกับการใช้ Ultrasound-assisted extraction เมื่อวัดด้วยวิธีDPPH และมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อวัดด้วยวิธี FRAP ที่ 72.31 µmol ascorbic acid equivalent/g

แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ total phenolic content เพิ่มเติมพบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดจากสาหร่ายผมนางทั้ง3วิธีมี total phenolic content สูงกว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่ายอีก2ชนิดมาก โดยสารสกัดหยาบจากสาหร่ายผมนางมีมากที่สุดเท่ากับ 31.20 mg gallic acid equivalent (GAE)/g จึงอาจพิจารณาได้ว่าสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายผมนางเป็นผลมาจาก phenolic compound มากกว่า sulphated polysaccharides จึงควรมีการศึกษา sulfate content ในสารสกัดหยาบที่สกัดได้เพิ่มเติม

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย chaetomorpha กับ total phenolic content พบว่า phenolic content ของวิธี Ultrasound-assisted extraction มากกว่า enzymatic-assisted extraction อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อนำไปวัดสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วิธี enzymatic-assisted extraction กลับได้ค่ามากกว่าอีก2วิธีการสกัดอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อวัดด้วยวิธี FRAP ทั้ง3วิธีการสกัดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จึงอาจพิจารณาได้ว่าสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย chaetomorpha มาจาก sulphated polysaccharides มากกว่า phenolic compound

เมื่อพิจารณาสารสกัดหยาบจากสาหร่ายไส้ไก่พบว่าวิธีการสกัดไม่มีผลต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH และ total phenolic content นอกจากนี้ยังพบว่าสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายไส้ไก่มีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดหยาบจากสาหร่ายchaetomorpha ที่ประมาณ 11-12% (ตารางที่4.5) แต่กลับมี total phenolic content น้อยกว่าหลายเท่าตัว จึงอาจพิจารณาได้ว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่ายไส้ไก่มี sulphated polysaccharides อยู่มาก อย่างไรก็ตามค่าที่ได้จากการศึกษานี้น้อยกว่าค่าที่ได้รายงานไว้จากการศึกษาของ Peasura et al. (2015) ที่รายงานไว้ประมาณ50% และ Rahimi, Tabarsa and Rezaei (2016) ที่ประมาณ50%เช่นกัน ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการที่ปริมาณเถ้าซึ่งบอกถึงปริมาณแร่ธาตุในสาหร่ายไส้ไก่ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (13.18%) น้อยกว่างานวิจัยของ Peasura et al. (2015) (19.95%) และสำหรับวิธี Ultrasound-assisted extraction งานวิจัยนี้ใช้ความถี่ 4 kHz ซึ่งต่ำกว่างานวิจัยของ Rahimi, Tabarsa and Rezaei (2016) ที่53 kHz จึงอาจมีผลกับสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้

ตารางที่ 4.4 สมบัติต้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย3ชนิด ที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกันด้วยวิธีDPPH เทียบเป็น µmol ascorbic acid equivalent/g

ชนิดสาหร่าย	สมบัติต้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ (µmol ascorbic acid equivalent/g)สกัดด้วยวิธี		
	Hot water extraction	Ultrasound-assisted extraction	enzymatic-assisted extraction
สาหร่ายไส้ไก่	88.50[a]0±.28	89.31[a]±0.57	86.32[a]±1.08
สาหร่ายChaetomorpha	91.98[a]±0.28	89.97[a]±1.43	104.69[c]±0.28
สาหร่ายผมนาง	97.67[b]±0.00	179.13[e]±7.22	110.68[d]±0.84

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการวิเคราะห์2ซ้ำ โดยอักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันแสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

อย่างไรก็ตามเนื่องจากสิ่งที่สกัดจากสาหร่ายในงานวิจัยนี้เป็นสารสกัดหยาบจึงอาจมีสารอื่นที่อาจเจือปนมาที่ไม่ใช่phenolic content แต่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ascorbic acid , uric acid, bilirubin , thiols ,b-carotene, carotenoid, g-terpinen, di-alkyl ,nitroxides และ $FeCl_3$

ตารางที่ 4.5 สมบัติต้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย3ชนิด ที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกันด้วยวิธีDPPH เทียบเป็น % inhibition

ชนิดสาหร่าย	สมบัติต้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ(% inhibition)สกัดด้วยวิธี		
	Hot water extraction	Ultrasound-assisted extraction	enzymatic-assisted extraction
สาหร่ายไส้ไก่	11.24^{ab}±0.07	11.09^{a}±0.14	11.29^{ab}±0.29
สาหร่ายChaetomorpha	11.98^{ab}±0.07	10.94^{a}±0.36	15.21^{c}±0.07
สาหร่ายผมนาง	12.71^{b}±0.00	33.01^{e}±1.80	16.63^{d}±0.22

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการวิเคราะห์2ซ้ำ
โดยอักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันแสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.6 สมบัติต้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย3ชนิด ที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกันด้วยวิธีFRAP เทียบเป็น µmol ascorbic acid equivalent/g

ชนิดสาหร่าย	สมบัติต้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ (µmol ascorbic acid equivalent/g)สกัดด้วยวิธี		
	Hot water extraction	Ultrasound-assisted extraction	enzymatic-assisted extraction
สาหร่ายไส้ไก่	15.19^{a}±0.12	13.93^{a}±0.35	17.58^{b}±0.22
สาหร่ายChaetomorpha	18.78^{b}±0.58	19.79^{b}±0.48	18.54^{b}±0.94
สาหร่ายผมนาง	27.73^{c}±1.20	70.00^{d}±2.28	72.31^{e}±0.12

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการวิเคราะห์2ซ้ำ
โดยอักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันแสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.7 total phenolic content ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย3ชนิด ที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimatric assay เทียบเป็น mg gallic acid equivalent (GAE)/g

ชนิดสาหร่าย	สมบัติต้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสกัดด้วยวิธี (μmol ascorbic acid equivalent/g)		
	Hot water extraction	Ultrasound-assisted extraction	enzymatic-assisted extraction
สาหร่ายไส้ไก่	0.38^{a}±0.06	0.31^{a}±0.03	0.87^{ab}±0.06
สาหร่ายChaetomorpha	3.18^{cd}±0.03	3.42^{d}±0.08	2.02^{bc}±0.12
สาหร่ายผมนาง	18.55^{e}±0.34	31.20^{g}±1.61	26.12^{f}±0.18

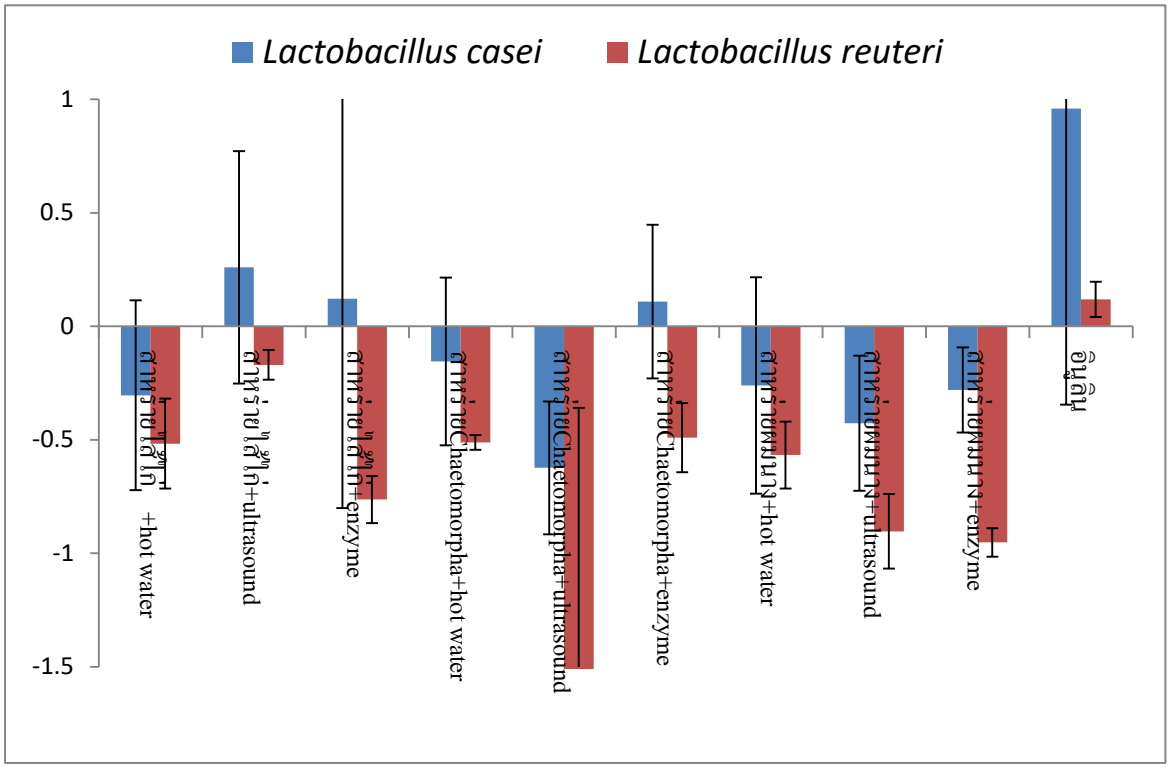
ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการวิเคราะห์2ซ้ำ โดยอักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันแสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

4.4 สมบัติการเป็นพรีไบโอติกของสารสกัดหยาบที่สกัดจากสาหร่าย3ชนิดด้วยวิธีแตกต่างกัน3วิธี

จากตารางที่ ค.1-ค.3 จะพบว่าการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ที่ใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตสารสกัดหยาบแต่ละชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และ การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ที่ใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตจากสารสกัดหยาบที่สกัดจากสาหร่ายชนิดเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และจุลินทรีย์ *Lactobacillus* ทั้ง2สายพันธุ์เจริญเติบโตใน อินูลินซึ่งเป็น commercial prebiotic ที่นำมาเป็นตัวเปรียบเทียบได้ดีที่สุด นอกจากนี้ *Escherichia coli* O74 ที่ใช้เป็นตัวแทน enteric strains ยังเจริญเติบโตบน inulinได้น้อยกว่าแหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่น ทำให้คำนวณแล้วมี prebiotic activities score สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ แต่หากพิจารณาเฉพาะสารสกัดหยาบจากสาหร่ายเท่านั้น สารสกัดหยาบจากสาหร่ายไส้ไก่ที่สกัดด้วยวิธี Ultrasound-assisted extraction จะมีค่า prebiotic activities score สูงทีสุด คือ 0.26ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1500 และ -0.26 ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus reuteri* TRBC291 (ภาพที่4.1) ซึ่งสาเหตุที่สารสกัดหยาบแต่ละตัวอย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และ เจริญเติบโตได้น้อยกว่าอินูลิน อาจเป็นผลจากการที่อินูลินเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีสายสั้นกว่าสารสกัดหยาบที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์จุลินทรีย์จึงนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตได้ดีกว่าจาก Watson et al. (2012) จะเห็นว่าprobiotic ทุกชนิดจะเจริญเติบโตในน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ดีกว่า oligosaccharides สำหรับเชื้อ *E.coli* จากการศึกษาของ Kornberg (1976)ได้ระบุว่า E.coli ใช้น้ำตาล frucose ที่เป็นโมเลกุลเดี่ยวของอินูลินได้น้อยกว่ากลูโคส และ จากการศึกษาของ Tabarsa et al. (2018) ระบุว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายไส้ไก่มีน้ำตาลกลูโคสอยู่ถึง 40.88% และมีกาแลกโทสอีก 15.79% ซึ่งงานวิจัยของ Bertib et al. (2012) แสดงให้เห็นว่า *E.coli* ใช้น้ำตาลทั้ง2ชนิดได้ดี สำหรับสาหร่าย

ผมนาง Fidelis et al. (2014) ก็ได้รายงานถึงการมีอยู่ของน้ำตาลทั้ง2ชนิดในพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้เช่นกัน

ภาพที่ 4.1 แสดงค่า prebiotic activity score ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1500 และ *Lactobacillus reuteri* TRBC291 ที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต เปรียบเทียบกับอินูลิน



ค่าในภาพแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการวิเคราะห์2ซ้ำ โดยอักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันแสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

4.5 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy

ในการวิจัยนี้ได้ตรวจวิเคราะห์ FTIR จำนวน 5 ตัวอย่างได้แก่ สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทั้ง3ชนิด ที่สกัดด้วย hot water extraction พบว่าองค์ประกอบสารสกัดหยาบที่ได้ว่ามีพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบหลัก

อ้างอิงผลการวิเคราะห์โครงสร้างจาก Barros et al. (2013) , Rahimi, Tabarsa and Rezaei (2016), Tabarsa et al. (2018) และ He et al. (2016) จะพบ peak ที่สำคัญจากสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้ง3ชนิด (ภาพที่ 4.2 4.5 และ 4.6) ได้แก่ ช่วง 3200-3400 cm^{-1} แสดงถึงพันธะ O-H ช่วง 2923-2925 cm^{-1} แสดงถึงพันธะ C-H ช่วง1620-1645 cm^{-1} แสดงถึงความไม่สมมาตรของ carboxylate ช่วงประมาณ1400 cm^{-1} แสดงถึงพันธะ C-O ช่วง 1215-1235 cm^{-1} แสดงถึงพันธะ S-O ของหมู่ซัลเฟต ช่วง1020-1080 cm^{-1} แสดงถึง

pyranose ring , glycosidic bond และ พันธะ C–O ช่วง 845-870 cm^{-1} แสดงถึงพันธะ C-O-S ของหมู่ซัลเฟตที่แทนที่ในวงน้ำตาล ทั้งหมดเป็น peakที่ แสดงถึง typical absorption peaks ของพอลิแซ็กคาไรด์ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดสาหร่ายทั้ง3ชนิดนั้นมีพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบหลักจากการที่เห็น peak สำคัญของพอลิแซ็กคาไรด์ได้อย่างชัดเจน

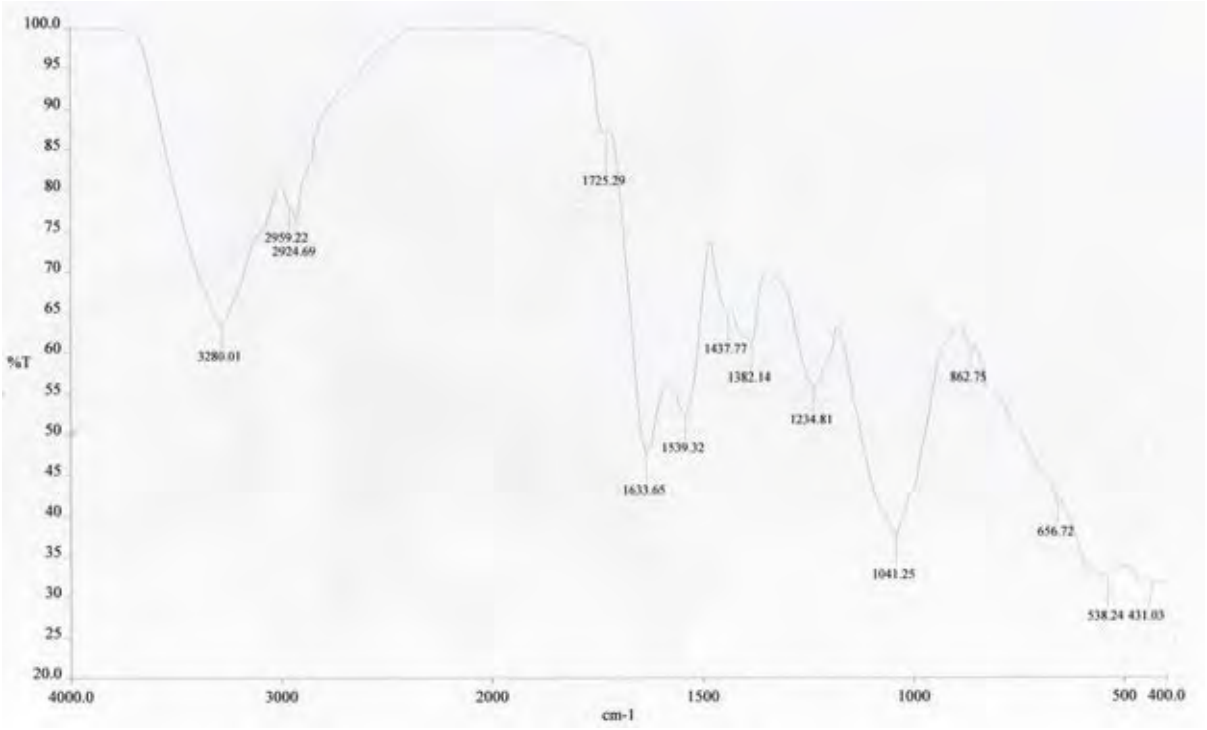
เมื่อพิจารณากราฟFTIRจากสาหร่ายผมนางที่สกัดต่างกันทั้ง3วิธีจะพบว่า peak สำคัญของพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบจากสารสกัดหยาบด้วยวิธี hot water extraction (ภาพที่4.2) จะมี %Tต่ำกว่าอีก2วิธีอย่างเห็นได้ชัด จึงคาดได้ว่าสารสกัดหยาบด้วยวิธีนี้ cm^{-1} จะมีสัดส่วนของพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ในสารสกัดหยาบมาก มีการพบ peak ที่ 2020-2050 cm^{-1} แสดงถึงพันธะC=O ซึ่งไม่พบในกราฟFTIRอีก2วิธี (ภาพที่4.3-4.4) peak ของความไม่สมมาตรของ carboxylate(RCOOR ') ช่วง 1630 cm^{-1} มี%T ต่ำกว่ากราฟอีก2วิธีการสกัดอย่างเห็นได้ชัดเจน

สำหรับกราฟ FTIR ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายผมนางสกัดด้วย ultrasound-assisted extraction (ภาพที่4.3) จะพบว่ากราฟของสารสกัดหยาบนี้มี peakเ ล็กๆตั้งแต่ช่วง 500-1230 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงพันธะ C-H ช่วง500-800 cm^{-1} พันธะ C=C ช่วง 800-1000 cm^{-1} และ พันธะ C=O ช่วง1000-1200 cm^{-1} ในตำแหน่งที่ไม่สอดคล้องกับพอลิแซ็กคาไรด์โดยทั่วไป ดังนั้นpeak เล็กๆในช่วงดังกล่าวจึงมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารอื่นที่ไม่ใช่พอลิแซ็กคาไรด์เจือปนมาหลายชนิด ซึ่งอาจมีสารที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเจือปนมากับสารสกัดหยาบทำให้สารสกัดหยาบนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH

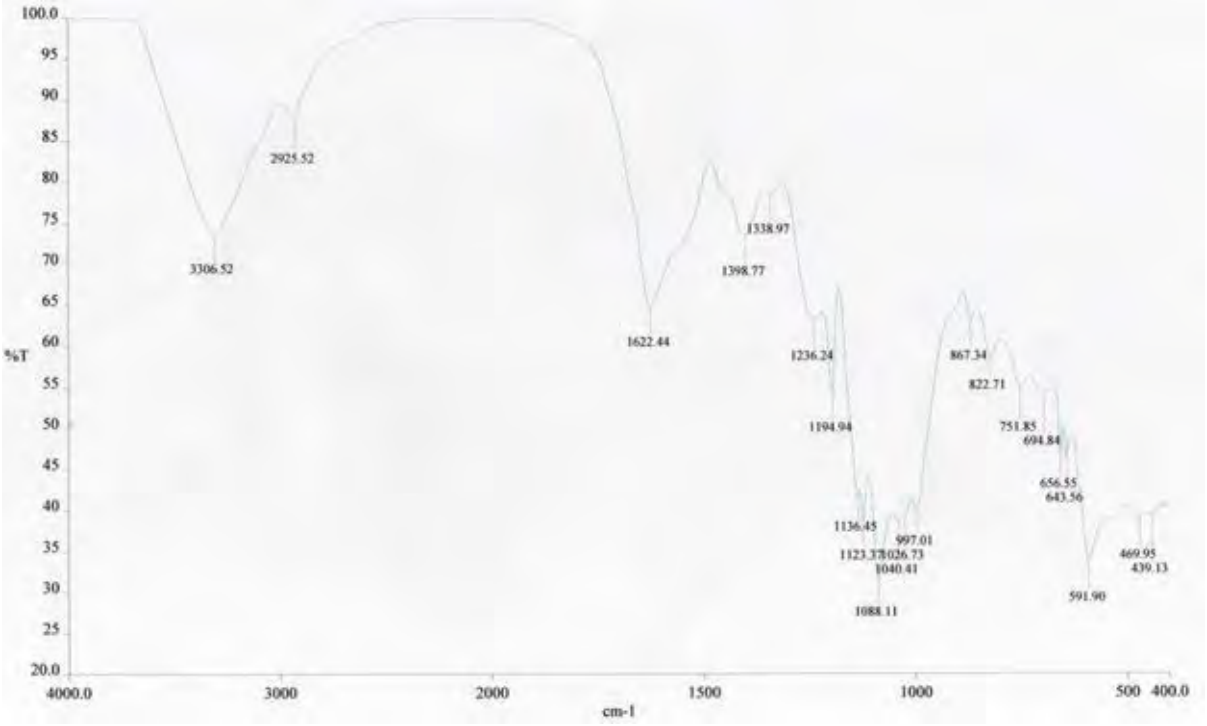
จากกราฟ FTIR จากสาหร่ายผมนางที่สกัดด้วยวิธีต่างกันทั้ง3วิธี (ภาพที่4.2-4.4) จะเห็นว่ากราฟจากวิธี ultrasound-assisted extraction มี peak ของพันธะ C=C อยู่จำนวนมาก ในขณะที่กราฟจากวิธี enzymatic-assisted extraction ไม่มี peakดังกล่าวอยู่ แต่ทั้ง2วิธีมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และ phenolic content อยู่ใกล้เคียงกัน

กราฟของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย hot water extraction และ enzymatic-assisted extraction มีลักษณะของกราฟ และ %T ที่typical absorption peaks ของพอลิแซ็กคาไรด์ใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับผล prebiotic activities score ที่ทั้ง2สารสกัด มี score ใกล้เคียงกัน สำหรับวิธี ultrasound-assisted extraction %T ที่ typical absorption peaks ของพอลิแซ็กคาไรด์ ช่วง 3300 cm^{-1} , 2900 cm^{-1}, 1200 cm^{-1} และ1000 cm^{-1} จะน้อยกว่าอีก2วิธีอย่างชัดเจน สอดคล้องกับ prebiotic activities scoreที่น้อยกว่าอีก2วิธีเช่นกัน

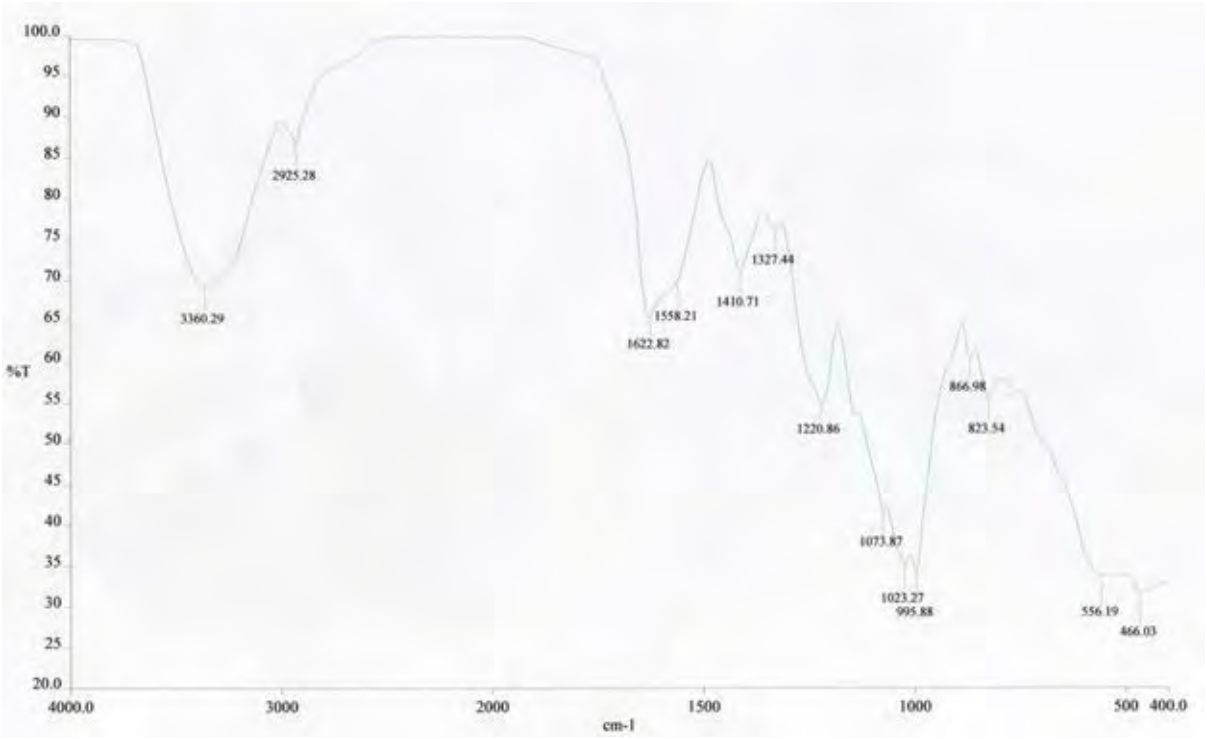
ภาพที่ 4.2 ผล FTIR ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายผมนางสกัดด้วย hot water extraction



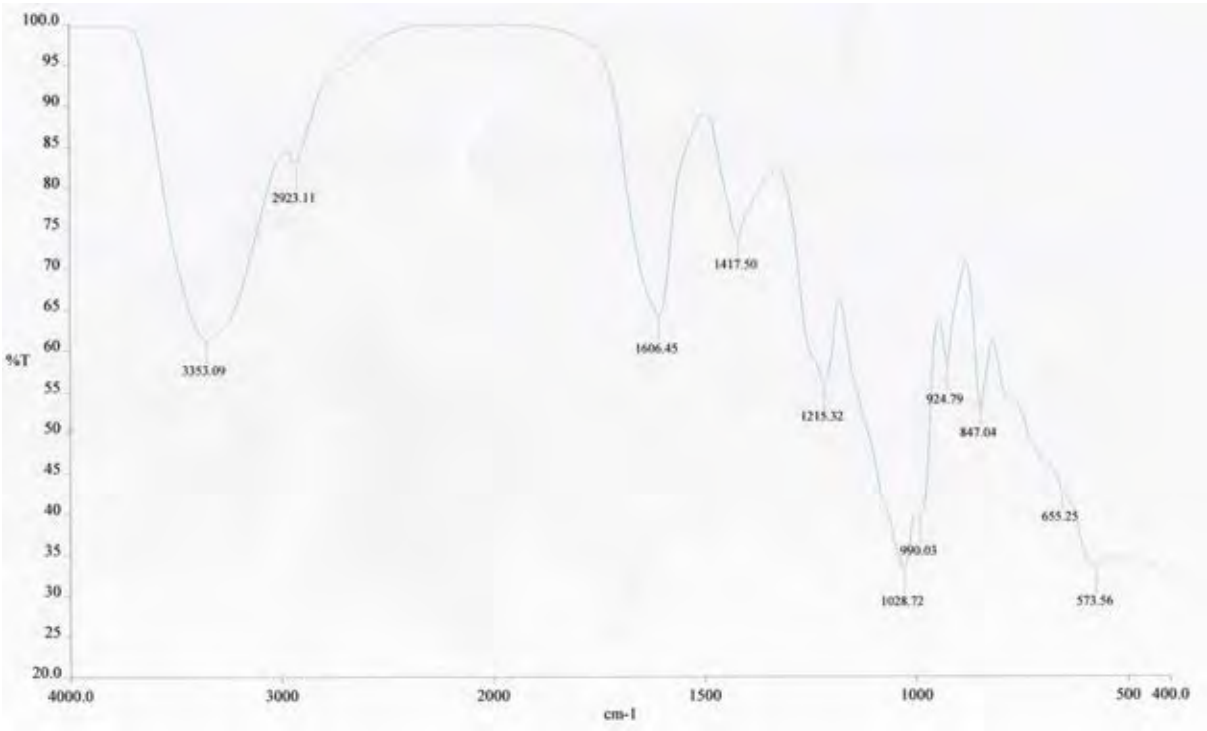
ภาพที่ 4.3 ผล FTIR ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายผมนางสกัดด้วย ultrasound-assisted extraction



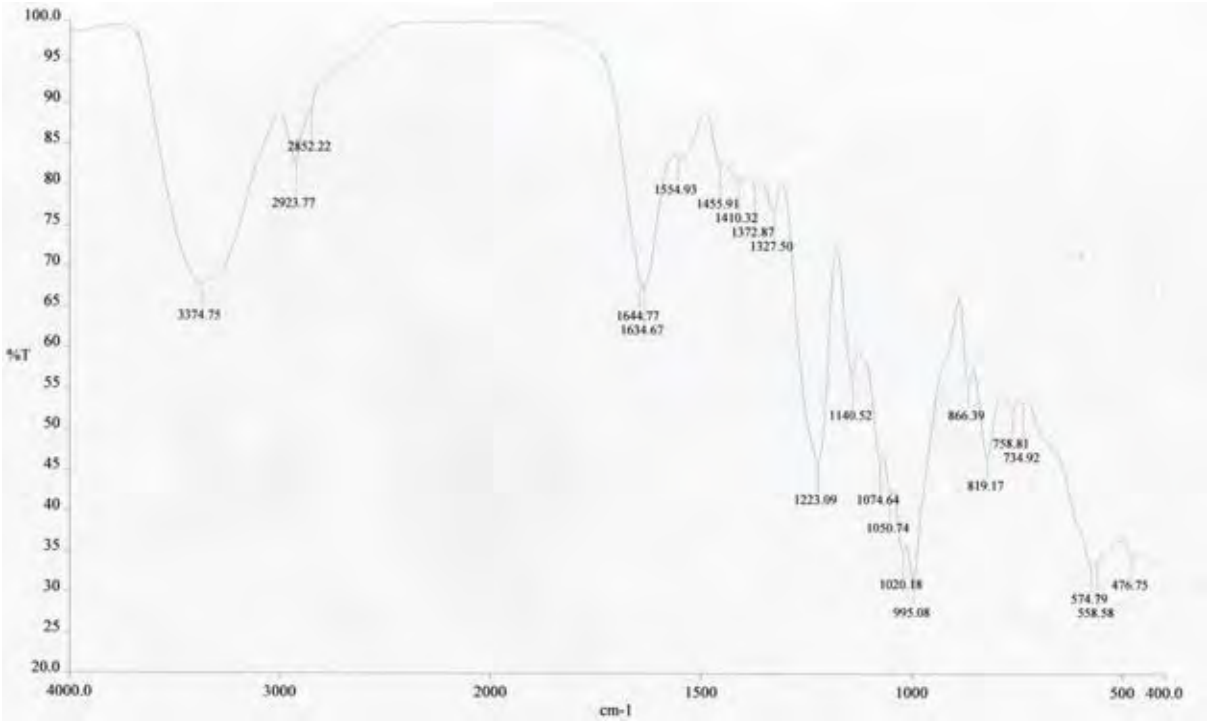
ภาพที่ 4.4 ผล FTIR ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายผมนางสกัดด้วย enzymatic-assisted extraction



ภาพที่ 4.5 ผล FTIR ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายไส้ไก่สกัดด้วย hot water extraction



ภาพที่ 4.6 ผล FTIR ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย chaetomorphaสกัดด้วย hot water extraction



บทที่5

สรุปผล และ ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการต้านอนุมูลอิสระ และ ใช้เป็นพรีไบโอติก ซึ่งจากการศึกษาสาหร่าย3ชนิดได้แก่ สาหร่ายไส้ไก่ สาหร่ายchaetomorpha และ สาหร่ายผมนาง นำมาสกัดด้วยวิธีการดั้งเดิมคือ hot water extraction และ วิธีการสมัยใหม่อีก2วิธีการโดยเลือก ultrasound-assisted extraction ที่เป็นวิธีการเชิงกล และ enzymatic-assisted extraction ที่เป็นวิธีการทางชีวภาพมาใช้ จากการศึกษาร้อยละผลผลิตในการสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์พบว่าวิธี enzymatic-assisted extraction สามารถสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีกว่า หรือ เทียบเท่ากับ hot water extractionซึ่งเป็นวิธีการดั้งเดิม การใช้เอนไซม์ช่วยสกัดนั้นใช้พลังงานและ ทรัพยากรต่ำกว่า จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่จะใช้แทนวิธีเดิม ในการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระพบว่าสาหร่ายผมนางมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด แต่จากการศึกษาเพิ่มเติมด้าน total phenolic content ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นผลจาก phenolic compound มากกว่า sulphated polysaccharides จึงควรศึกษา sulfate contentในสารสกัดหยาบเพิ่มเติมเพื่อให้ผลการศึกษาสมบูรณ์ยิ่งขึ้น การวิเคราะห์ total antioxidant capacity หรือ reducing power เพิ่มเติมอาจช่วยให้เข้าใจคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น ในการศึกษาสมบัติในการเป็นพรีไบโอติกในโพรไบโอติก2ชนิดพบว่าชนิดสาหร่าย และ วิธีการสกัดไม่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญ จึงควรที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมในการทำซ้ำเพื่อเพิ่มความแม่นยำ และการศึกษาในจุลินทรีย์ชนิดอื่น จากการวิเคราะห์FTIRสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากสาหร่ายทั้ง3ชนิดมีพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นส่วนประกอบและมีโครงสร้างที่แตกต่างกันจึงควรที่จะแยกพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบแล้วหาชนิดและสัดส่วนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธีการ HPLC เพื่อให้เข้าใจถึงโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ดีขึ้น รวมถึงการหามวลโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าว อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์FTIRแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของวิธีการสกัดต่อโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ซึ่งอาจส่งผลต่อสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์อื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

จันทนา ไพรบูรณ์ และ อนงค์ จีรภัทร์. (2555). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลบางชนิดในประเทศไทย. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนวิจัย มก., มหาวิทยาลัยเกษตร.

ณัฏฐิกา งามกิจภิญโญ. (2560). เคมีกับงานพิสูจน์หลักฐาน. สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 46(209): 13.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. (2561). พรีไบโอติก. ค้นเมื่อ 29 ตุลาคม 2561, จาก www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0781/prebiotic

เมดิกไทย. (2561). อนุมูลอิสระ คืออะไร? . ค้นเมื่อ 31 ตุลาคม 2561, จาก www.medicthai.com/อนุมูลอิสระ/

แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. (2535). หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. พิมพ์ครั้งที่ 1.

วรางคณา อนุชิตโอฬาร. (2546). FT-IR Imaging. เทคโนโลยีวัสดุ. 17(33): 67-70.

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2558). สาหร่าย (Algae). ค้นเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2561, จาก http://siweb.dss.go.th/repack/fulltext/IR%2035.pdf

สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา. (2555). งานวิจัยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเลในประเทศไทย. ค้นเมื่อ 3 กันยายน 2561, จาก www.coastalaqua.com/files/Seaweed_nica276.pdf.

ห้องปฏิบัติการนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. (2559). หลักการของ NMR. ค้นเมื่อ 1 พฤศจิกายน 2561, จาก http://science.buu.ac.th/part/nmr /index.php/home/principles.html

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพมหานคร: นิวไทยมิตรการพิมพ์.

A.O.A.C. (2000). Official Method of Analysis of AOAC International. (17th ed.). Gaithersburg, Maryland.

Barros, F.C.N., Silva, D.C., Sombra, V.G., Maciel, J.S., Feitosa, J.P.A., Freitas, A.L.P., and Paula, R.C.M. (2013). Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed Gracilaria caudata (J Agardh). Carbohydrate Polymers. 92: 598-603.

Benzie, I.F.F., and Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘‘Antioxidant Power’’: The FRAP Assay. Analytical Biochemistry. 239: 70-76.

Benzie, I.F.F., and Szeto, Y.T. (1999). Total Antioxidant Capacity of Teas by the Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. J. Agric. Food Chem. 47: 633-636. Chem.,48: 3396-3402.

Bertin, Y., Chaucheyras-Durand, F., Robbe-Masselot, C., Durand, A., De la Foye, A., Harel, J., Cohen, P.S., Conway, T., Forano, E., and Martin, C. (2013). Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. Environ Microbiol. 15(2): 610–622.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft and Technologie 28, 25–30.

De San, M. (2012). The Farming of seaweeds. Implementation of a Regional Fisheries Strategy For The Eastern-Southern Africa and India Ocean Region, pp 4-23. March 28, 2012

Dore, C.M.P.G., Alves, M.G.C.F., Will, L.S.E.P., Costa, T.G., Sabry, D.A., Rêgo, L.A.R.S., Accardo, C.M., Rocha, H.A.O., Filgueira, L.G.A., and Leite, E.L. (2013). A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae Sargassum vulgare with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. Carbohydrate Polymers. 91: 467-475.

Fidelis, G.P., Camara, R.B.G., Queiroz, M.F., Costa, M.S.S.P., Santos, P.C., Rocha, H.A.O., and Costa, L.S. (2014). Proteolysis, NaOH and Ultrasound-Enhanced Extraction of Anticoagulant and Antioxidant Sulfated Polysaccharides from the Edible Seaweed, Gracilaria birdiae. Molecules. 19: 18511-18526.

Fotia, M.C., and Amoratib, R. (2009). Non-phenolic radical-trapping antioxidants. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 61: 1435–1448.

Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition. 125: 1401–1412.

Hammed, A.M., Jaswir, I., Simsek, S., Alam, Z., and Amid, A. (2017). Enzyme aided extraction of sulfated polysaccharides from Turbinaria turbinata brown seaweed. International Food Research Journal. 24(4): 1660-1666.

He, J., Xu, Y., Chen, H. and Sun, P. (2016). Extraction, Structural Characterization, and Potential Antioxidant Activity of the Polysaccharides from Four Seaweeds. *Int. J. Mol. Sci. 17,*1988.

Huebner, J., Wehling, R.L., Hutkins, R.W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. International Dairy Journal. 17: 770-775.

Imjongjairak, S., Ratanakhanokchai, K., Laohakunjit, N., Tachaapaikoon, C., Pason, P., and Waeonukul, R.(2016). Biochemical characteristics and antioxidant activity of crude and purified sulfated polysaccharides from Gracilaria fisheri. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 80(3): 524-532.

Kornberg, H.L. (1976). Carbohydrate uptake by *escherichia coli*. Journal of Cellular Physiology. 89: 545-550.

Liu, X., Liu, B., Wie, X.L., Sun, Z.L. and Wang, C.Y. (2016): Extraction, fractionation, and chemical characterization of fucoidans from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. Czech J. Food Sci., 34: 406–413.

Metin, C., and Baygar, T. (2018). Determination of nutritional composition of *Enteromorpha intestinalis* and investigation of its usage as food. Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 35(1): 7-14.

Milo, R., (2019). Cell concentration for culture with OD600 of 0.1. ค้นเมื่อ 1 พฤษภาคม 2562, จาก https://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx

Ngov, S., Sukboonyasatit, D., and Paseephol T., (2014). Enhancement of Probiotic Survival in Low pH and Bile salt Condition using Alginate-Hi-maize Starch Encapsulation. KKU Research Journal. 19: 141-147.

Northwestern University Atomic and Nanoscale Characterization Experimental Center. (2019). How to prepare IR samples?. Retrieved July 8, 2019 from http://www.nuance.northwestern.edu/docs /keckii-pdf/how-to-prepare-ir-samples.pdf.

Peasura, N., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., and Wanlapa, S. (2015). Characteristics and antioxidant of Ulva intestinalis sulphated polysaccharides extracted with different solvents. International Journal of Biological Macromolecules. 81: 912-919.

Pulido, R., Bravo, L., and Calixto, F.s. (2000). Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols as Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. J. Agric. Food

Rahimi, F., Tabarsa, M., and Rezaei, M. (2016). Ulvan from green algae *Ulva intestinalis*: optimization of

ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity. Journal of Applied Phycology. 28: 2979-2990.

Rioux, L.E., and Turgeon, S.L.(2015). Seaweed carbohydrates. In Brijesh, K.T., and Troy, D.J.(Ed.), Seaweed Sustainability Food and Non-Food Applications(pp.145-147). San Diego: Academic Press.

Rodriguez-Jasso,R.M., Mussatto, S.I., Pastrana. L., Aguilar.C.N. and Teixeira, J.A. (2011). Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. Carbohydrate Polymers 86 : 1137– 1144.

Setthamongkol, P., Tunkijjanukij, S., Satapornvanit, K., and Salaenoi, J. (2015). Growth and Nutrients Analysis in Marine Macroalgae. Kasetsart Journal (Natural Science). 49: 211 – 218.

Shao, C.W. (2017). Antioxidant Activity of Sulfated Seaweeds Polysaccharides by Novel Assisted Extraction. In Solubility of Polysaccharides, pp.89-108. N.p. : INTECH.

Srikonga, W., Bovornreungrojb, N., Mittraparparthorna, P., and Bovornreungroja, P. (2017). Antibacterial and antioxidant activities of differential solvent extractions from the green seaweed *Ulva intestinalis.* ScienceAsia. 43: 88–95.

Tabarsa, M., SangGuan, Y., Dabaghian, E.H., and Surayot, U. (2018). Water-soluble polysaccharides from *Ulva intestinalis*: Molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities. Journal of food and drug analysis. 26: 599-608.

Thuaytong, W., and Anprung P., (2011). Bioactive Compounds and Prebiotic Activity in Thailand-Grown Red and White Guava Fruit (*Psidium guajava* L.). Food Science and Technology International. 17(3): 0205-0208.

Wan,P., Yang, X., Cai, B.,Chen, H., Sun, H., Chen, D. and Pan, J.(2014). Ultrasonic Extraction of Polysaccharides from *Laminaria japonica* and Their Antioxidative and Glycosidase Inhibitory Activities. J. Ocean Univ. China (Oceanic and Coastal Sea Research) 2015 14: 651-662.

Watson, D., O'Connell Motherway, M., Schoterman, M.H.C., Joost van Neerven, R.J., Nauta, A., and van Sinderen, D. (2012). Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. Journal of Applied Microbiology. 114: 1132-1146.

Williams, W.B., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. LWT - Food Science and Technology. 28: 25-30.

Yuan, Y.V., Carrington, M.F., and Walsh, N.A. (2005). Extracts from dulse (Palmaria palmata) are effective antioxidants and inhibitor of cell proliferation in vitro. Food. Chem. Toxic.43: 1073-1081.

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

ก.1 การวิเคราะห์สมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrythydrazyl (DPPH) assayดัดแปลงจากวิธีของ Brand-Willams, Cuvelier and Berset (1995) และ Dore et al. (2013)

<u>วิธีเตรียมสารละลาย DPPH</u>

เตรียม stock solution ละลาย DPPH 24 mg ด้วย methanol ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 ml เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศา ไม่เกิน 5 วัน เมื่อจะใช้งาน DPPH ให้ปิเปต stock solution 10 ml มาเจือจางด้วย methanol 50 ml และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 517 nm โดยมี methanol เป็นblank

<u>วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid และการสร้างกราฟมาตรฐาน</u>

1.ละลาย Ascorbic acid 44 mg ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 ml ได้สารละลายความเข้มข้น 10000 µM

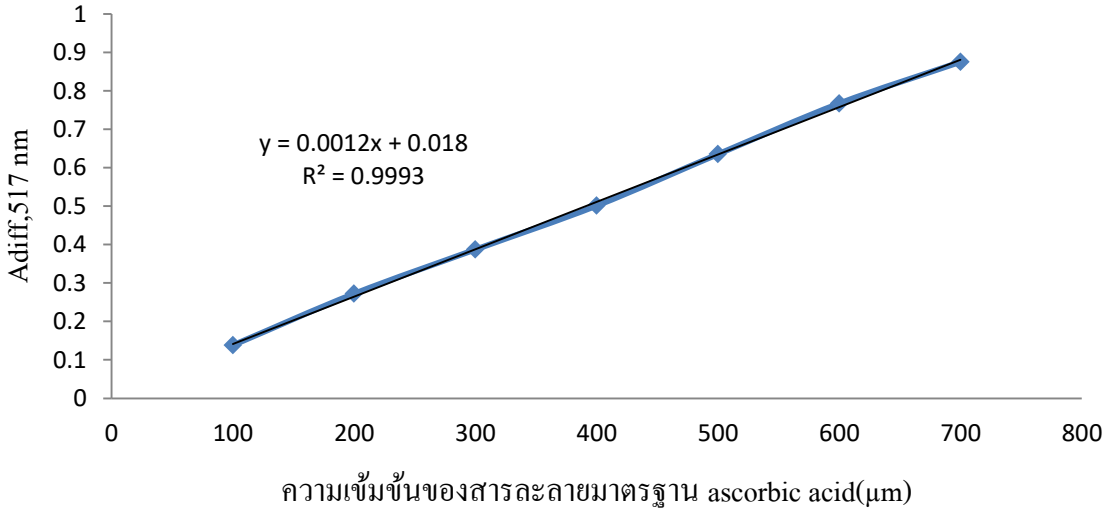
2.เจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 100-800 µM ด้วยน้ำกลั่น

3.ปิเปตสารละลาย 0.2 ml ใส่หลอดทดลอง ผสมกับสารละลาย DPPH 4 ml ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

4.นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยมีmethanolเป็น blank

5.นำค่าที่วัดได้จากสารละลาย DPPH ($A_{initial}$) และค่าที่วัดได้จาก ascorbic acid (A_{final}) มาหาผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงจากสมการ (A_{diff}) $A_{diff} = A_{initial} - A_{final}$

6.สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid กับ A_{diff}



ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานascorbic acid สำหรับการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ก.2 การวิเคราะห์สมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) ดัดแปลงจากวิธีของ Benzie และ Strain (1996)

<u>วิธีเตรียมสารละลาย FRAP</u>

1.เตรียม acetate buffer โดยผสม sodium acetate trihydrate 0.75 g และ glacial acetic acid 4 ml ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 ml ด้วยน้ำกลั่น

2.เตรียมสารละลาย ferric chloride โดยละลาย ferric chloride 135 mg ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 ml

3.เตรียมสารละลาย TPTZ โดยละลาย TPTZ 78 mg ด้วย HCl 0.04 M ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 ml

4.เตรียมสารละลาย FRAP โดยผสม acetate buffer 250 ml, สารละลาย ferric chloride 25 ml และสารละลาย TPTZ 25 ml ตามลำดับ

<u>วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid และการสร้างกราฟมาตรฐาน</u>

1.ละลาย Ascorbic acid 44 mg ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 ml ได้สารละลายความเข้มข้น 10000 μM

2.เจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 100-600 μM ด้วยน้ำกลั่น

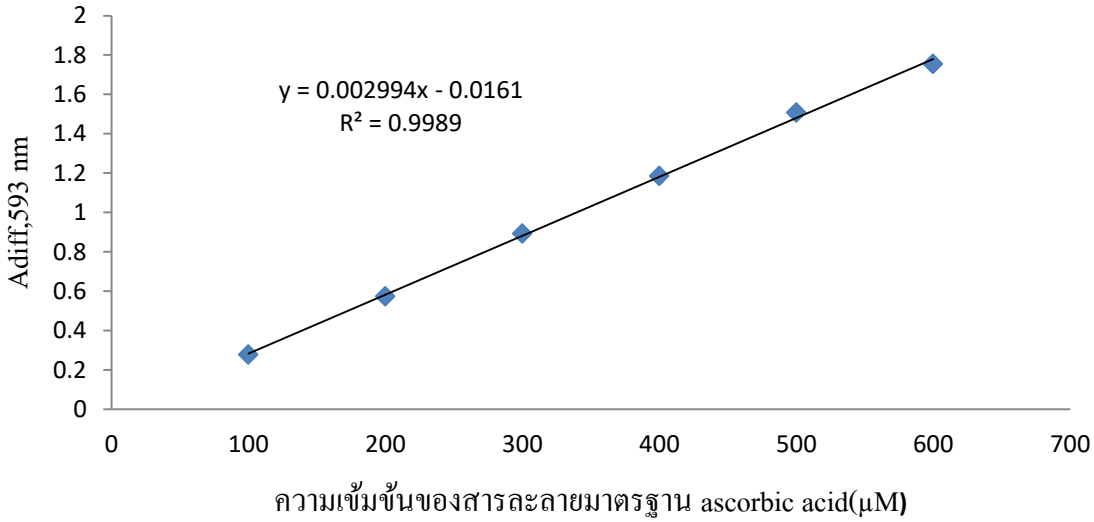
3.ปิเปตสารละลาย 0.2 ml ใส่หลอดทดลอง ผสมกับสารละลาย FRAP 4 ml ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

4.นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm โดยมีน้ำกลั่นเป็น blank

5.นำค่าที่วัดได้จากสารละลาย FRAP($A_{initial}$) และค่าที่วัดได้จาก ascorbic acid (A_{final}) มาหาผลต่างของค่าการดูดกลืนแสง (A_{diff})

$$A_{diff} = A_{initial} - A_{final}$$

6.สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid กับ A_{diff}



ภาพที่ ก.2 กราฟมาตรฐานascorbic acid สำหรับการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

ก.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Kjeldahl method ดัดแปลงจากวิธีของ A.O.A.C., 2000

<u>อุปกรณ์และเครื่องมือ</u>

อุปกรณ์ย่อยโปรตีน (BUCHI Digestion Unit, รุ่น K-424)

อุปกรณ์กลั่นโปรตีน (BUCHI Distillation Unit, รุ่น K-355)

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, รุ่น MS024S/01)

Water bath (Memmert, รุ่น WNB22)

Suction module

ขวดปรับปริมาตร 100 ml

ขวดปรับปริมาตร 500 ml

ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

บิวเรตขนาด 50 ml

กระบอกตวง 100 ml

ปิเปต 1 ml

บีกเกอร์ 250 ml

บีกเกอร์ 1000 ml

กระดาษกรอง

ช้อนตักสาร

สารเคมี

Copper sulphate

Potassium sulpate

Sulphuric acid 98%

Hydrochloric acid 0.1 N

Sodium hydroxide 35%

Boric acid 4%

อินดิเคเตอร์ (Bromocresolresin: Methyl red: Methylene blue อัตราส่วน 0.1: 0.125: 0.028 ใน Ethyl alcohol 100 ml)

วิธีวิเคราะห์

1.ชั่งตัวอย่าง 0.05 g ใส่ลงใน Suction module

2.เติม Copper sulphate 0.1 g และ Potassium sulphate 2 g

3.เติม Sulphuric acid 20 ml

4.นำตัวอย่างไปย่อยจนได้สารละลายใสสีน้ำตาล พักไว้จนเย็น

5.เติมน้ำกลั่น 25 ml เพื่อเจือจางความเป็นกรด

6.นำสารละลายที่ได้ใน Suction module เข้าเครื่องกลั่นและเติม Sodium hydroxide 35% จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีดำ กลั่นลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุ Boric acid 4% ปริมาณ 25 ml ที่หยดอินดิเคเตอร์ 2-3 หยดแล้ว กลั่นประมาณ 6 นาที

7.ไตเตรทสารละลายที่กลั่นด้วย Hydrochloric acid 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพูบันทึกปริมาตรของ hydrochloric acid ที่ใช้ไป

8.ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

9.คำนวณปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(\mathrm{A}-\mathrm{B})\times \mathrm{N}\times 14.007\times \mathrm{F}}{W_t}$$

เมื่อ A = ปริมาณของ Hydrochloric acid ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง (ml)

B = ปริมาณของ Hydrochloric acid ที่ใช้ในการไตเตรท blank (ml)

N = ความเข้มข้นของ Hydrochloric acid (N)

F = ค่า factor มีค่าเท่ากับ 6.25

Wt = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

ก.4 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ด้วยวิธี Soxhlet method ดัดแปลงจากวิธีของ A.O.A.C., 2000

<u>อุปกรณ์และเครื่องมือ</u>

Flat bottom flask

Soxhlet extractor

เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (EYELA, รุ่น N-N)

ตู้อบลมร้อน (Memmert, รุ่น UF 110)

เดสิคเคเตอร์

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, รุ่น MS024S/01)

กระบอกตวง 100 ml

Thimble

<u>สารเคมี</u>

Petroleum ether

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1.ชั่งน้ำหนัก flat bottom flask ที่แห้งและเก็บไว้ในเดสิคเคเตอร์ บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

2.ชั่งตัวอย่าง 3 กรัมใส่ลงใน thimble บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

3.นำ thimble ที่บรรจุตัวอย่างใส่ลงในเครื่อง Soxhlet extractor

4.นำ flat bottom flask ต่อเข้ากับ condenser และ Soxhlet syphon

5.เท Petroleum ether 200-250 ml ลงทางด้านบนของ Soxhlet syphon

6.เปิดheaterให้อัตราการกลั่น 5-6 หยดต่อวินาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7.ระเหย Petroleum ether ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

8.นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

9.ทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

10.คำนวณปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)} = \frac{100\times[(weight\ of\ flask+fat)-(weight\ of\ flask)]}{\text{weight of sample}}$$

ภาคผนวก ก.5 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า ด้วยวิธี Dry ashing ดัดแปลงจากวิธีของ A.O.A.C., 2000

อุปกรณ์และเครื่องมือ

กรูซิเบิลพร้อมฝา

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, รุ่น MS024S/01)

เตาเผา burner

เตาเผา furnace

เดสิคเคเตอร์

วิธีวิเคราะห์

1.ชั่งกรูซิเบิลพร้อมฝาที่เผาและทิ้งให้เย็นแล้ว บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

2.ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ในกรูซิเบิล บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

3.นำกรูซิเบิลที่บรรจุตัวอย่างแล้วไปเผาบนเตา burner จนได้เถ้าสีดำและหมดควัน

4.นำไปเผาต่อในเตา furnace ที่อุณหภูมิ 550 °C จนได้เถ้าสีขาวเทา

5.นำกรูซิเบิลออกจากเตาเผา ทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก

6.คำนวณปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)} = \frac{weight\ of\ ash \times 100}{\text{weight of sample}}$$

ก.6 การวิเคราะห์ค่า prebiotic activity ดัดแปลงจากวิธีของ Thuaytong and Anprung (2010) และ Huebner, Wehling and Hutkins (2007)

ส่วนประกอบของอาหารเหลวที่ใช้ในการวิจัย

1. minimal media broth สำหรับเตรียมเชื้อ (สัดส่วนต่อน้ำกลั่น1 ลิตร)

-dextrose	1.000 g
-ammonium sulphate	1.000 g
-dipotassium phosphate	7.000 g
-monopotassium phosphate	2.000 g
-sodium citrate	0.500 g
-magnesium sulphate	0.100 g

2. minimal media broth สำหรับการทดลอง (สัดส่วนต่อน้ำกลั่น1 ลิตร)

-ammonium sulphate	1.000 g
-dipotassium phosphate	7.000 g
-monopotassium phosphate	2.000 g
-sodium citrate	0.500 g
-magnesium sulphate	0.100 g

3. MRS broth สำหรับการทดลอง (สัดส่วนต่อน้ำกลั่น1 ลิตร)

-peptone	10.000 g
-beef extract	10.000 g
-yeast extract	5.000 g
-polysorbate80	1.000 g
-ammonium citrate	2.000 g
-sodium acetate	5.000 g
-magnesium sulphate	0.100 g
-manganese sulphate	0.050 g
-dipotassium phosphate	2.000 g

<u>เชื้อจุลินทรีย์</u>

Lactobacillus casei TISTR 1500

Escherichia coli O74

Lactobacillus reuteri TRBC291

<u>วิธีการเตรียมเชื้อ</u>

<u>สำหรับเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1500 และ *Lactobacillus reuteri* TRBC291</u>

1. ขีดเชื้อลงบนMRS agar ลงในจานเพาะเชื้อ บ่มไร้ออกซิเจนใน anaerobic jar 37°C 24ชม.
2. ถ่ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวในจานเพาะเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีMRS broth 10mL 1-2โคโลนี เขย่าให้ผสมกัน บ่ม37°C 24ชม.

<u>สำหรับเชื้อ *Escherichia coli* O74 (*E.coli*)</u>

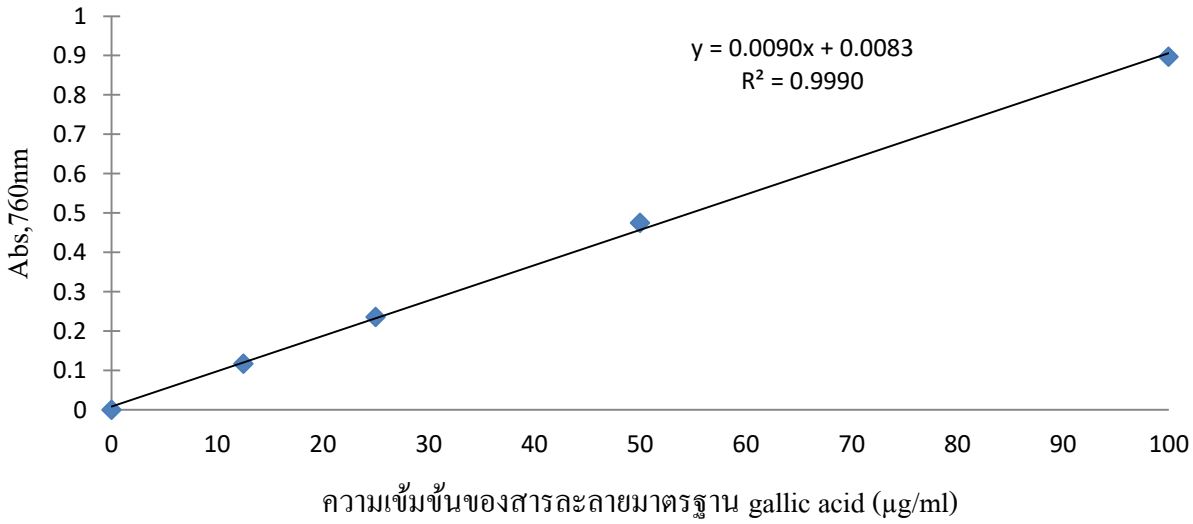
1. ขีดเชื้อลงบนTSA ลงในจานเพาะเชื้อ บ่มไร้ออกซิเจนใน anaerobic jar 37°C 24ชม.

2. ถ่ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวในจานเพาะเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีTSB 10mL 1-2โคโลนี เขย่าให้ผสมกัน บ่ม37°C 24ชม.
3. ปิเปตTSBที่มีเชื้อ*E.coli* 0.1mLลงในหลอดทดลองที่มี minimal media broth 10mL เขย่าให้ผสมกัน บ่ม37°C 24ชม.

ก.7 การวิเคราะห์total phenol;ic content ตามวิธีของ Imjongjaira et al.(2016)

<u>วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid และการสร้างกราฟมาตรฐาน</u>

1. ชั่ง gallic acid 1 mg.ลงในขวดปรับปริมาตร 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลาย gallic acid 100 µl/ml
2. ปิเปตสารละลาย gallic acid จากข้อ 1. ลงในขวดปรับปริมาตร 10ml และ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 12.5-50 µl/ml
3. ปิเปต gallic acid ลงในหลอดทดลอง 0.2 ml ผสมกับน้ำกลั่น 0.8 ml
4. ปิเปต Folin–Ciocalteu reagent ผสมลงในหลอดทดลอง 0.2 ml ตั้งทิ้งไว้6นาที
5. ผสม 7% Na_2CO_3 2ml ลงในหลอดทดลอง ทิ้งไว้ในที่มืด90นาที
6. นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่760 nm โดยมีน้ำกลั่น1 ml 7% Na_2CO_3 2ml และ Folin–Ciocalteu reagent 0.2 mlเป็น blank
7. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid กับ A_{760}



ภาพที่ ก.3 กราฟมาตรฐานgallic acid สำหรับการวิเคราะห์ total phenolic content

ภาคผนวก ข

ผลวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ข.1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย3ชนิด ที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน3วิธี

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1686.329[a]	8	210.791	28.274	.000
Intercept	8194.136	1	8194.136	1099.112	.000
method	577.370	2	288.685	38.723	.000
type	801.595	2	400.798	53.761	.000
method * type	307.363	4	76.841	10.307	.000
Error	134.194	18	7.455		
Total	10014.659	27			
Corrected Total	1820.523	26			

a. R Squared = .926 (Adjusted R Squared = .894)

ตารางที่ ข.2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีDPPHคำนวณเป็น μmol Ascorbic acid equivalent/g

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	13675.895[a]	8	1709.487	271.807	.000
Intercept	195631.753	1	195631.753	31105.245	.000
type	5752.170	2	2876.085	457.295	.000
method	2269.595	2	1134.797	180.432	.000
type * method	5654.130	4	1413.532	224.750	.000
Error	56.604	9	6.289		
Total	209364.251	18			
Corrected Total	13732.499	17			

a. R Squared = .996 (Adjusted R Squared = .992)

ตารางที่ ข.3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีDPPHคำนวณเป็น%inhibition

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	802.425[a]	8	100.303	255.805	.000
Intercept	3994.949	1	3994.949	10188.411	.000
type	318.802	2	159.401	406.523	.000
method	124.357	2	62.178	158.575	.000
type * method	359.267	4	89.817	229.062	.000
Error	3.529	9	.392		
Total	4800.903	18			
Corrected Total	805.954	17			

a. R Squared = .996 (Adjusted R Squared = .992)

ตารางที่ ข.4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีFRAP คำนวณเป็น µmol Ascorbic acid equivalent/g

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8773.412[a]	8	1096.677	1187.066	.000
Intercept	16666.594	1	16666.594	18040.278	.000
type	6239.138	2	3119.569	3376.688	.000
method	882.080	2	441.040	477.391	.000
type * method	1652.195	4	413.049	447.093	.000
Error	8.315	9	.924		
Total	25448.321	18			
Corrected Total	8781.727	17			

a. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .998)

ตารางที่ ข.5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของtotal phenolic content คำนวณเป็น mg gallic acid/g

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2406.675[a]	8	300.834	970.208	.000
Intercept	1645.786	1	1645.786	5307.756	.000
type	2242.049	2	1121.025	3615.370	.000
method	54.889	2	27.444	88.510	.000
type * method	109.737	4	27.434	88.477	.000
Error	2.791	9	.310		
Total	4055.251	18			
Corrected Total	2409.465	17			

a. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .998)

ตารางที่ ข.6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการเพิ่มขึ้นของ *Lactobacillus casei* TISTR 1500 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ในเวลา 24ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.049[a]	8	.131	.749	.653
Intercept	45.347	1	45.347	258.887	.000
type	.019	2	.010	.055	.947
method	.848	2	.424	2.421	.144
type * method	.182	4	.045	.259	.897
Error	1.576	9	.175		
Total	47.973	18			
Corrected Total	2.626	17			

a. R Squared = .400 (Adjusted R Squared = -.134)

ตารางที่ ข.7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการเพิ่มขึ้นของ *Lactobacillus* TRBC 291 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ในเวลา 24ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.480[a]	8	.185	1.843	.190
Intercept	42.351	1	42.351	421.936	.000
type	.797	2	.399	3.971	.058
method	.148	2	.074	.739	.504
type * method	.534	4	.134	1.331	.330
Error	.903	9	.100		
Total	44.734	18			
Corrected Total	2.383	17			

a. R Squared = .621 (Adjusted R Squared = .284)

ตารางที่ ข.8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการเพิ่มขึ้นของ *Escherichia coli O74* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ในเวลา 24ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.174[a]	8	.147	.068	1.000
Intercept	44.872	1	44.872	20.938	.001
type	.253	2	.127	.059	.943
method	.029	2	.014	.007	.993
type * method	.892	4	.223	.104	.978
Error	19.288	9	2.143		
Total	65.334	18			
Corrected Total	20.462	17			

a. R Squared = .057 (Adjusted R Squared = -.781)

ตารางที่ ข.9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ prebiotic activities score ของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1500 ที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.314[a]	8	.164	.749	.653
Intercept	.540	1	.540	2.463	.151
type	.386	2	.193	.880	.448
method	.222	2	.111	.506	.619
type * method	.706	4	.176	.805	.552
Error	1.974	9	.219		
Total	3.829	18			
Corrected Total	3.288	17			

a. R Squared = .400 (Adjusted R Squared = -.134)

ตารางที่ ข.10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ prebiotic activities score ของเชื้อ *Lactobacillus reuteri* TRBC291 ที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2.415[a]	8	.302	1.811	.197
Intercept	9.114	1	9.114	54.674	.000
type	.473	2	.236	1.418	.292
method	.343	2	.171	1.028	.396
type * method	1.600	4	.400	2.399	.127
Error	1.500	9	.167		
Total	13.029	18			
Corrected Total	3.915	17			

a. R Squared = .617 (Adjusted R Squared = .276)

ภาคผนวก ค

ผลการดำเนินการวิจัยพิ่มเติม

ตารางที่ ค.1 แสดงการเพิ่มขึ้นของ *Lactobacillus casei* TISTR 1500 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่าย, อินูลิน หรือ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ในเวลา 24ชั่วโมง แสดงในรูป log CFU/ml

แหล่งคาร์โบไฮเดรตจากพอลิแซคคาไรด์

ชนิดสาหร่าย	การเพิ่มขึ้นของ *Lactobacillus casei* TISTR 1500 (log CFU/ml)ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบสกัดด้วยวิธี		
	Hot water extraction	Ultrasound-assisted extraction	enzymatic-assisted extraction
สาหร่ายไส้ไก่	1.26^{a}±0.52	1.60^{a}±0.32	2.04^{a}±0.06
สาหร่ายChaetomorpha	1.40^{a}±0.51	1.67^{a}±0.14	1.64^{a}±0.43
สาหร่ายผมนาง	1.28^{a}±0.15	1.56^{a}±0.55	1.84^{a}±0.64

แหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ

แหล่งคาร์โบไฮเดรต	log CFU/ml
กลูโคส	1.63^{a}±1.17
อินูลิน	2.18^{a}±0.12

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการวิเคราะห์2ซ้ำ โดยอักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันแสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ค.2 แสดงการเพิ่มขึ้นของ *Lactobacillus reuteri* TRBC291ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่าย, อินูลิน หรือ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ในเวลา 24ชั่วโมง แสดงในรูป log CFU/ml

แหล่งคาร์โบไฮเดรตจากพอลิแซคคาไรด์

ชนิดสาหร่าย	การเพิ่มขึ้นของ *Lactobacillus reuteri* TRBC291(log CFU/ml)ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบสกัดด้วยวิธี		
	Hot water extraction	Ultrasound-assisted extraction	enzymatic-assisted extraction
สาหร่ายไส้ไก่	1.64^{ab}±0.08	1.89^{b}±0.01	1.78^{b}±0.09
สาหร่ายChaetomorpha	1.54^{ab}±0.21	0.82^{a}±0.44	1.42^{ab}±0.01

สาหร่ายผมนาง	1.68[b]±0.56	1.51[ab]±0.25	1.52[ab]±0.51

<u>แหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ</u>

แหล่งคาร์โบไฮเดรต	log CFU/ml
กลูโคส	2.74[c]±0.15
อินูลิน	2.04[bc]±0.63

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการวิเคราะห์2ซ้ำ โดยอักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันแสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ค.3 แสดงการเพิ่มขึ้นของ *Escherichia coli* O74ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่าย, อินูลิน หรือ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ในเวลา 24ชั่วโมง แสดงในรูป log CFU/ml

<u>แหล่งคาร์โบไฮเดรตจากพอลิแซคคาไรด์</u>

ชนิดสาหร่าย	การเพิ่มขึ้นของ Escherichia coli O74(log CFU/ml)ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดหยาบสกัดด้วยวิธี		
	Hot water extraction	Ultrasound-assisted extraction	enzymatic-assisted extraction
สาหร่ายไส้ไก่	1.59[a]±1.68	1.12[a]±1.08	1.79[a]±1.67
สาหร่ายChaetomorpha	1.46[a]±1.47	1.78[a]±1.04	1.24[a]±1.12
สาหร่ายผมนาง	1.52[a]±1.46	1.88[a]±1.80	1.83[a]±1.62

<u>แหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ</u>

แหล่งคาร์โบไฮเดรต	log CFU/ml
กลูโคส	1.31[a]±1.27
อินูลิน	1.06[a]±1.26

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการวิเคราะห์2ซ้ำ โดยอักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันแสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

รายละเอียดโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ปีงบประมาณ 2561

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารคณะวิทยาศาสตร์

ชื่อโครงการ การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการเป็นพรีไบโอติกของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล

นิสิตผู้เข้าร่วมโครงการ นางสาวนิชกานต์ เอื้อเฟื้อ

นางสาวสโรชา จิรวัฒนเมธา

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รศ.ดร. สุเมธ ตันตระเธียร

มูลเหตุจูงใจในการนำเสนอโครงการ

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตคล้ายพืชที่เติบโตได้ในพื้นที่ที่มีน้ำไหลผ่าน มีแหล่งที่อยู่ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำกร่อย ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่าย ชาวเอเชียนิยมนำสาหร่ายบางชนิดมาประกอบอาหารตั้งแต่อดีตทั้งในรูปแบบสดและตากแห้ง ปัจจุบันนอกจากจะเป็นส่วนประกอบอาหารแล้วสาหร่ายบางชนิดยังถูกนำมาแปรรูปในอยู่รูปของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยมุ่งเน้นคุณค่าทางโภชนาการด้านโปรตีนและแร่ธาตุ แต่ยังมีสาหร่ายอีกหลายชนิดที่ไม่ถูกนำมาใช้ประโยชน์เนื่องจากยังขาดการศึกษาเกี่ยวการนำสารสำคัญอื่นๆมาใช้ให้เกิดประโยชน์ จึงมักกลายเป็นอาหารสำหรับสัตว์น้ำ หรือใช้เป็นปุ๋ยพืชเสมอ จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาประโยชน์ในด้านการต้านอนุมูลอิสระและการเป็นพรีไบโอติกในโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดมาจากสาหร่ายทะเลในประเทศไทยจำนวน3ชนิด โดยการศึกษานี้จะศึกษาโครงสร้าง สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และการเป็นพรีไบโอติกจากของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่าย3ชนิด โดยใช้วิธีในการสกัดต่างกัน3วิธี โดยมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของสาหร่ายและวิธีสกัดที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการต้านอนุมูลอิสระ หรือ ใช้เป็นพรีไบโอติกเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ต่อยอดในอนาคต

แนวคิด เหตุผล และทฤษฎีสำคัญ

สาหร่าย คือ สิ่งมีชีวิตคล้ายพืชที่เติบโตได้ในพื้นที่ที่มีน้ำไหลผ่าน มีแหล่งที่อยู่ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำกร่อย ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่าย (สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา, 2555) ซึ่งประเทศในแถบเอเชียได้มีการนำสาหร่ายมาบริโภคเป็นเวลานานแล้ว โดยเฉพาะในประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี และอินโดนีเซีย สาหร่ายนั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายอย่างทั้งยารักษาโรค ปุ๋ย อาหารสัตว์ สกัดสารในสาหร่ายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม และการค้า เป็นต้น (Yuan et al. 2005)

สาหร่ายที่พบในประเทศไทยมีอยู่หลายชนิด เช่น สาหร่ายผมนาง, สาหร่ายมงกุฎหนาม, สาหร่ายขนนก, สาหร่ายโพรง, สาหร่ายผักกาดทะเล, สาหร่ายใบ, สาหร่ายทุ่น, สาหร่ายเม็ดพริกและสาหร่ายพวงองุ่น (สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา, 2555) ในประเทศไทยได้มีการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ทั้งสาหร่ายน้ำจืด และสาหร่ายทะเล เช่น นำมาเป็นอาหาร ใช้ผลิตแก๊สเชื้อเพลิง ใช้ในการผลิตวุ้น ใช้ทำปุ๋ย ใช้เป็นอาหารสัตว์ และยังใช้บำบัดน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหรือโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆได้อีกด้วย (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2558)

การแยกเอาสารพอลิแซ็กคาไรด์ออกจากองค์ประกอบอื่นของสาหร่ายวิธีการแบบดั้งเดิมจะใช้วิธี Hot water extraction โดยการนำสาหร่ายสดหรือ สาหร่ายตากแห้งมากำจัดไขมันด้วย methanol จากนั้นนำไปต้มด้วยน้ำร้อน85องศาเซลเซียสเป็นเวลา2ชม. จากนั้นน้ำไปปั่นเหวี่ยงแยก15นาที นำส่วนของสารละลายออกมาตกตะกอนด้วยEthanol ก่อนจะล้างตะกอนที่ได้ด้วยacetone (Liu et al, 2016)

ต่อมามีการพัฒนามีวิธีการใหม่ๆที่สามารถสกัดพอลิแซคคาไรด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นเช่น

Enzymes-assisted extraction(EAE) เป็นการใช้เอนไซม์ที่สกัดมาจากสัตว์ พืช เห็ด หรือจุลินทรีย์เพื่อช่วยให้สามารถสกัดพอลิแซคคาไรด์ออกมาให้ได้ผลผลิตมากขึ้น ร่วมกับการสกัดด้วยน้ำ โดยนิยมใช้เอนไซม์กลุ่มHydrolasesมากที่สุด โดยในpHและอุณหภูมิที่เหมาะสมเอนไซม์กลุ่มนี้จะทำลายผนังเซลล์และสกัดให้ได้สารที่ต้องการออกมา (Shao, 2017)

Microwave-assisted extraction(MAE) การให้คลื่นไมโครเวฟช่วยสกัดขณะสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำ คลื่นไมโครเวฟที่ผ่านไปยังสาหร่ายจะถูกเปลี่ยนเป็นความร้อนจากผลของประจุและขั้วของสารภายในสาหร่าย ซึ่งจะทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายจากความดันที่สูงขึ้นภายในเซลล์เนื่องจากความร้อน ทำให้ตัวทำละลายที่แพร่เข้ามาสกัดสารทางชีวภาพในเซลล์ออกไปได้ดี และยังลดความแข็งแรงทางกลของผนังเซลล์และทำให้ผนังเซลล์สูญเสียน้ำซึ่งทำให้ตัวทำละลายแพร่เข้ามาในเซลล์ได้ดี (Shao, 2017)

Ultrasound-assisted extraction(UAE) การใช้ อัลตร้าซาวน์ช่วยขณะสกัดจะทำให้เกิดฟองอากาศขึ้นในตัวทำละลายที่ล้อมรอบสาหร่ายทำให้เกิดแรงดัน และอุณหภูมิสูงขึ้น ทำให้ผนังเซลล์ที่ลดการถ่ายโอนมวลสารที่

ทำการสกัดถูกทำลาย และทำให้ตัวทำละลายแพร่เข้าไปในเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น (Shao, 2017)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารที่สามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาต้านอนุมูลอิสระนั้นเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) สารต้านอนุมูลอิสระโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ เช่น phenolic compounds และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene BHT,

tertiary butyl hydro quinone (TBHQ) และ Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (นิธิยา รัตนาปนนท์ และพิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, 2018) กลไกการยับยั้งของสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป เช่น ช่วยป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ ช่วยทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น และช่วยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่การเกิดอนุมูลอิสระ (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)

พรีไบโอติก (prebiotic) คือ อาหารที่ร่างกายไม่สามารถย่อยและดูดซึมได้ แต่จะถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ พรีไบโอติกนี้จะไปช่วยกระตุ้นการทำงานและส่งเสริมให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีการเจริญที่ดีขึ้น (Gibson and Roberfroid, 1995)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาผลของชนิดสาหร่ายและวิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ต่อ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการเป็นพรีไบโอติกของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้

ขอบเขต/กรอบแนวคิดของการวิจัย

ศึกษาผลผลิตร้อยละ โครงสร้าง สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และ สมบัติการเป็นพรีไบโอติกในพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่าย3ชนิดด้วยวิธีสกัดแตกต่างกัน3วิธี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.4.1 เรียนรู้วิธีการวิเคราะห์ผลผลิตร้อยละ โครงสร้าง สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และ สมบัติการเป็นพรีไบโอติกในพอลิแซ็กคาไรด์

1.4.2 ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดชนิดสาหร่ายแต่ละชนิด เพื่อที่จะนำไปใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ หรือ ใช้เป็นพรีไบโอติก

1.4.3 เพิ่มคุณค่าให้กับสาหร่ายทะเล และ สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับบริโภคได้

รายละเอียดของการดำเนินโครงการ

1. เตรียมอุปกรณ์ สารเคมี
2. หาสาหร่าย3ชนิด อบแห้ง บดละเอียด
3.สกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีสกัด3วิธี
4.ศึกษาสมบัติต้านอนุมูลอิสระ
5.ศึกษาสมบัติการเป็นพรีไบโอติก
6.ศึกษาองค์ประกอบของสาหร่ายที่ใช้
7.วิเคราะห์ข้อมูล และทดลองแก้ไข

8.สรุปผลจัดทำรายงาน

ระยะเวลาในการดำเนินโครงการ

กิจกรรม	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.
1.เตรียมอุปกรณ์ สารเคมี	◄	·····	·····	····►								
2.หาสาหร่าย3ชนิด อบแห้ง บดละเอียด			◄	·····	····►							
3.สกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีสกัด3วิธี				◄	····►							
4.ศึกษาสมบัติต้านอนุมูลอิสระ						◄··►						
5.ศึกษาสมบัติการเป็นพรีไบโอติก							◄····►					
6.ศึกษาองค์ประกอบของสาหร่ายที่ใช้						◄	·····	·····	····►			
7.วิเคราะห์ข้อมูล และทดลองแก้ไข							◄··►					
8.สรุปผลจัดทำรายงาน								◄	———	►		

งบประมาณ

ค่าใช้จ่ายทั่วไป

ค่าสำเนาเอกสารและสิ่งพิมพ์			500	บาท
ค่าเดินทางในการจัดหาวัตถุดิบและข้อมูล			500	บาท

วัตถุดิบ

สาหร่าย ไส้ไก่	10	กิโลกรัม	50	บาท
สาหร่าย chaetomorpha	10	กิโลกรัม	50	บาท
สาหร่าย ผมนาง	10	กิโลกรัม	50	บาท

เชื้อจุลินทรีย์

Lactobacillus casei	900	บาท	
Lactobacillus reuteri	900	บาท	
Escherichia coli	900	บาท	

สารเคมี

Cellulase	50	กรัม	590	บาท
Tryptone Soya Agar	500	กรัม	1656	บาท
MRS agar	500	กรัม	1932	บาท
Ethanol 95%	3	ลิตร	428	บาท
Inulin	100	กรัม	105	บาท

อุปกรณ์เครื่องมือ

จานเพาะเชื้อพลาสติกแบบบาง	1	กล่อง	1440	บาท
จานเพาะเชื้อพลาสติกแบบหนา	10	แพ็ค	480	บาท
		รวม	10,481	บาท

เอกสารอ้างอิง

นิธิยา รัตนาปนนท์ และพิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. (2018). Antioxidant. ค้นเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2561, จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0188/antioxidant-สารต้านออกซิเดชัน

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2558). สาหร่าย (Algae). ค้นเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2561, จาก http://siweb.dss.go.th/repack/fulltext/IR%2035.pdf

สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา. (2555). งานวิจัยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเลในประเทศไทย. ค้นเมื่อ 3 กันยายน 2561, จาก www.coastalaqua.com/files/Seaweed_nica276.pdf.

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพมหานคร: นิวไทยมิตรการพิมพ์.

Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition. 125: 1401–1412.

Liu, X., Liu, B., Wie, X.L., Sun, Z.L. and Wang, C.Y. (2016): Extraction, fractionation, and chemical characterization of fucoidans from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. Czech J. Food Sci., 34: 406–413.

Shao, C.W. (2017). Antioxidant Activity of Sulfated Seaweeds Polysaccharides by Novel Assisted Extraction. In Solubility of Polysaccharides, pp.89-108. N.p. : INTECH.

Yuan, Y.V., Carrington, M.F., and Walsh, N.A. (2005). Extracts from dulse (Palmaria palmata) are effective antioxidants and inhibitor of cell proliferation in vitro. Food. Chem. Toxic. 43: 1073-1081.