

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

โดยทั่วไปการเสีของอาหารส่วนใหญ่มักมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์นอกจากนี้ยังมีการเสีของอาหารเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต และอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพลง คุณค่าทางอาหารลดลงและบางครั้งอาจมีสารที่เป็นอันตรายต่อร่างกายเกิดขึ้น (ศิวาพร, 2546) ดังนั้นเพื่อลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่จึงได้มีการเติมสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ เช่น Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT), Propyl gallate (PG) และ Tertiary butylhydroxy quinone เป็นต้น อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้สารต้านออกซิเดชันเหล่านั้นก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น ทำลายตับ และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง (Lee และคณะ, 2009; Sabeena Farvin และ Jacobsen, 2013)

ในปัจจุบันมีนักวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจในการหาสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถใช้ทดแทนสารสังเคราะห์ที่ใช้ในทางการค้า เช่น สารสกัดจากออริกาน (Camo และคณะ, 2011) สารสกัดจากโรสแมรี่ (Camo และคณะ, 2008) สารสกัดจาก horseradish (Jung และคณะ, 2009) สารสกัดจากชาเขียว (Siripatrawan และ Noipha, 2012) รวมทั้งสารสกัดจากสาหร่ายชนิดต่างๆ และพบว่าสาหร่ายเป็นทางเลือกใหม่ที่ปลอดภัย (Lee และคณะ, 2009) และจัดเป็นทรัพยากรทางชีวภาพที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้ มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสาหร่ายขนาดเล็กหลายงานวิจัยพบว่า สาหร่ายมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เช่น *Pediastrum duplex* และ *Dactylococcopsis fascicularis* (Lee และคณะ, 2009) *Porphyridium cruentum* (Chen และคณะ, 2008) *Scenedesmus vacuolatus* และ *Chlorella kessleri* (Sabatini และคณะ, 2009) *Synechococcus* sp. FACHB 283, *Chlamydomonas nivalis* และ *Nostoc ellipsosporum* CCAP 1453/17 (Li และคณะ, 2007) เป็นต้น

วุ้นมะพร้าวหรือเซลลูโลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย (Bacterial cellulose) เป็นผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้จากการหมักในอาหารน้ำมะพร้าวด้วยเชื้อ *Gluconacetobacter xylinus* (ชื่อเดิม *Acetobacter xylinum*) ซึ่งจะสร้างแผ่นฟิล์มสีขาว หรือครีมที่บริเวณส่วนบนของผิวหน้าอาหารน้ำมะพร้าว แผ่นเซลลูโลสมีเส้นใยประสานกันคล้ายร่างแห มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิกสูง (hydrophilic) สามารถอุ้มน้ำได้ดีจึงทำให้สามารถดูดซับสารต่างๆ ไว้ในเส้นใยได้ (วรารุณ, 2551) และมีการนำแผ่นฟิล์มเซลลูโลสไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การใช้แผ่นฟิล์มร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่ในการทำเป็น Active packaging ของผลิตภัณฑ์เนื้อแกะ (Camo และคณะ, 2008) การใช้แผ่นฟิล์มเซลลูโลสร่วมกับสารสกัดจากออริกานในการทำเป็น Active packaging ของผลิตภัณฑ์เนื้อวัว (Camo และ

คณะ, 2011) การทำ Active packaging ของไส้กรอกหมูจากไคโตซาน (chitosan) ร่วมกับสารสกัดจากชาเขียว (Siripatrawan และ Noipha, 2012) เป็นต้น

กุนเชียงเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ประเภทไส้กรอกแบบกึ่งแห้ง (semi-dry) ที่มีเนื้อสัมผัส กลิ่นรส และรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ มีส่วนผสมที่สำคัญคือเนื้อหมู และ ไขมันหมู เนื่องจากกุนเชียงมีไขมันในปริมาณสูงประมาณร้อยละ 20 ถึง 30 (Chen และคณะ, 2007; Tan และคณะ, 2007) อาจเป็นการเร่งให้เกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งจะนำไปสู่การเสื่อมสภาพของคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อในระหว่างการเก็บรักษา (เช่น สี กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และคุณค่าทางโภชนาการ) รวมทั้งก่อให้เกิดสารพิษ (cytotoxic) และสารที่เป็นพิษต่อยีน (genotoxic compounds) (Qi และ Zhou, 2013)

เนื่องจากงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อย ดังนั้นโครงการวิจัยนี้มีแนวคิดที่จะทำการสกัดสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวน 10 สายพันธุ์และทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้ จากนั้นคัดเลือกสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงมาเพียง 1 สายพันธุ์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ ร่วมกับเซลล์โลสที่ได้จากแบคทีเรียเพื่อผลิตเป็น Active packaging ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูป ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง และมักเกิดการเหม็นหืนได้ง่าย ทำให้ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้นรวมทั้งลดการเติมสารกันหืนสังเคราะห์

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. สกัดสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ankistrodesmus* sp. W53, *Chlamydomonas* sp. W53, *Chlorella* sp. E53, *Chlorella* sp. ED53, *Chlorella* sp. W53, *Chlorella* sp. W54, *Chlorella* sp. W55, *Chlorococcum* sp. C53, *Monoraphidium* sp. W53 และ *Scenedesmus* sp. W53 โดยทดลองใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำร้อนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

2. วิเคราะห์ ปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัด ด้วยน้ำและเอทานอล ที่ได้จากสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์

3. ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical) ความสามารถในการแย่งจับกับเฟอร์รัสไอออน (Ferrous ion chelating ability assay) และความสามารถในการยับยั้ง ปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน ของไขมันด้วย วิธี Thiobarbituric acid reactive substance

4. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลล์โลส

5. ประยุกต์ใช้สารสกัด จากสาหร่าย สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลล์โลสในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูป ในระหว่างการเก็บรักษา

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่คัดแยกจากแหล่ง น้ำธรรมชาติภายในสถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ankistrodesmus* sp. W53, *Chlamydomonas* sp. W53, *Chlorella* sp. E53, *Chlorella* sp. ED53, *Chlorella* sp. W53, *Chlorella* sp. W54, *Chlorella* sp. W55, *Chlorococcum* sp. C53, *Monoraphidium* sp. W53 และ *Scenedesmus* sp. W53 โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือน้ำร้อนและเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทำการวิเคราะห์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และ ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยใช้วิธีทดสอบ 3 วิธี ได้แก่ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical) ความสามารถในการแย่งจับกับเฟอร์รัสไอออน (Ferrous ion chelating ability assay) และศึกษาความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมา ประยุกต์ใช้ ร่วมกับแผ่นฟิล์ม เซลลูโลส ในการยับยั้งปฏิกิริยา เปอร์ออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูปในระหว่างการเก็บรักษา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่างๆของสารสกัดจากสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์ สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการวิจัยประยุกต์ด้านอื่นๆต่อไป นอกจากนั้นอาจนำเอาสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมาเป็นสารสกัด จากธรรมชาติ ทดแทนสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เพื่อใช้ยับยั้งปฏิกิริยา ออกซิเดชันของไขมัน ในผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบทำให้ยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์เนื้อให้นานขึ้น และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

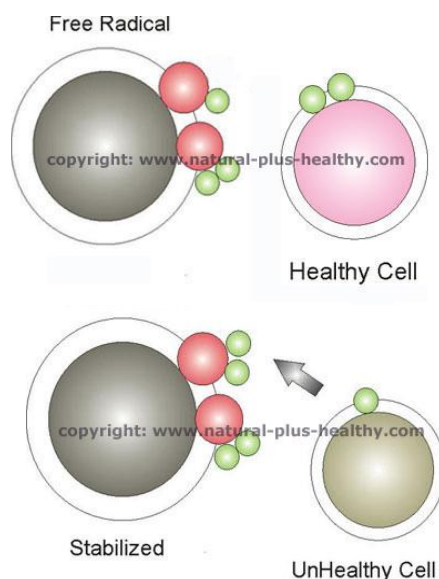
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารอนุมูลอิสระ (โอภา และคณะ, 2549)

2.1.1 ความหมายของสารอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดของอะตอม หมายรวมถึงอะตอมของไฮโดรเจนและไอออนของโลหะทรานซิชันส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังรวมถึงโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งนับว่าเป็นอนุมูลเพราะอิเล็กตรอนจำนวน 2 อิเล็กตรอนซึ่งแยกกันอยู่เป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวในแต่ละวงโคจรหรือออร์บิทัล อนุมูลที่มีน้ำ หนักโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติจำเพาะ คือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารข้างเคียง หากร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ ปฏิกิริยาจะเกิดต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ ส่งผลให้มีอนุมูลอิสระหลายล้านโมเลกุลเกิดขึ้นในชั่วพริบตา แสดงให้เห็นการเปิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 อนุมูลอิสระ และการเกิดปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่น

ที่มา : <http://www.natural-plus-healthy.com/antioxodant-facts.html>

อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้าและสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งด้านบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $A^\cdot$ อนุมูล $A^{\cdot-}$ และอนุมูล $A^{\cdot+}$ ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่มีประจุบวก (cation radical) เช่น อนุมูลอิสระของ pyridinyl cation radical ($NAD^{\cdot+}$) อนุมูลอิสระที่มีประจุลบ (anion radical) เช่น อนุมูลอิสระของ superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) และ

อนุมูลอิสระที่เป็นกลาง (neutral radical) เช่น อนุมูลอิสระของ peroxy radical ($\text{ROO}^\bullet$) เป็นต้น สามารถแบ่งชนิดอนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญทางชีววิทยาเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1. Reactive oxygen species (ROS) หมายถึง สารก่อปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยอะตอมออกซิเจนซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระ เช่น superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical ($\text{HO}^\bullet$) และที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระแต่มีคุณสมบัติในการออกซิไดซ์หรือถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระได้ง่าย เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl) และ ozone (O_3) เป็นต้น
2. Reactive nitrogen species (RNS) หมายถึง สารก่อปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยอะตอมไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ เช่น nitric oxide radical ($\text{NO}^\bullet$) และ nitrogen dioxide radical ($\text{NO}_2^\bullet$) เป็นต้น
3. Reactive chlorine species (RCS) หมายถึง สารก่อปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยอะตอมคลอรีน เช่น hypochlorous acid (HOCl) และ nitryl chloride (NO_2Cl) เป็นต้น
4. Reactive bromine species (RBS) หมายถึง สารก่อปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยอะตอมโบรมีน เช่น hypobromous (HOBr) และ bromine gas (Br_2)

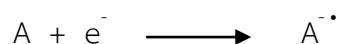
2.1.2 การเกิดสารอนุมูลอิสระ

สารอนุมูลอิสระเป็นสารที่เกิดขึ้นเนื่องจาก ปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่สร้างประโยชน์ในบางกลไกของร่างกาย ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังตัวออกซิไดซ์ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระ เมื่อเกิดออกซิเดชันในร่างกายบ่อยๆและมากขึ้นก่อให้เกิดการเสื่อมถอยของร่างกาย ทั้งการเกิดริ้วรอยแห่งความชราก่อนวัยอันควรและโรคร้ายไข้เจ็บต่างๆมากมาย เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ เป็นต้น การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้

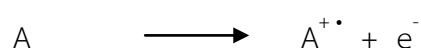
1. การแตกของพันธะโคเวเลนต์แบบโฮโมไลซิส



2. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



3. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวจากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



สาเหตุการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายของมนุษย์แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

1. อนุมูลอิสระที่เกิดภายในร่างกาย เป็นผลเนื่องจากร่างกายของเรามีกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) เกิดขึ้นตลอดเวลา ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาเคมีและกิจกรรมของเซลล์ในร่างกาย ที่ต้องดำเนินการตามปกติ ตัวอย่างเช่นในกระบวนการหายใจจะเกิดออกซิเจนที่มีประจุลบ ซึ่งก็คืออนุมูลอิสระ สารตัวนี้สามารถรวมตัวกับไขมัน LDL (Low Density Lipoproteins) ได้ดี และ

ยังสามารถรวมตัวกับสารบางชนิดในร่างกายก่อให้เกิดสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อ หรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมในดีเอ็นเอ ทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์มะเร็ง เป็นต้น

2. อนุมูลอิสระที่มาจากนอกร่างกาย เกิดได้หลายปัจจัยด้วยกันคือ จากการได้รับเชื้อโรค เช่นการติดเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (Autoimmune Diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่นควันบุหรี่ แก๊สจากท่อไอเสียรถยนต์ จากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูงๆ กลับมาใช้อีก จากยาบางชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (Doxorubicin) เพนนิซิลามีน (Penicillamine) พาราเซตามอล (Paracetamol) เป็นต้น

อนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิตเกิดจากการเผาผลาญของเซลล์โดยการใช้ออกซิเจน อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และอนุมูลไฮดรอกซี เป็นอนุมูลที่พบในเซลล์ มากกว่าอนุมูลอื่นๆ และมีบทบาทในปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดขึ้นในเซลล์เป็นอย่างมาก และมีความเป็นพิษสูง จึงมีชื่อเรียกเป็นภาษาอังกฤษว่า reactive oxygen species (ROS) อนุมูลอิสระที่สำคัญ ได้แก่

- 1.) ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion); $O_2^{\cdot -}$
- 2.) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide); H_2O_2
- 3.) ไฮดรอกซิลแรดิคัล (hydroxyl radical); $OH^{\cdot}$

2.1.3 การเกิดออกซิเดชันในอาหาร

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันและไขมัน มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารมาก เนื่องจากเป็นสาเหตุให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนและเป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้เอง หรือ ออโตออกซิเดชัน (Auto-oxidation) โดยออกซิเจนเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ไขมันและน้ำมันเกิดปฏิกิริยาที่พันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ยิ่งถ้ามีพันธะคู่มากปฏิกิริยาออกซิเดชันจะยิ่งเกิดขึ้นได้เร็วมากอีกด้วย ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เป็นแบบลูกโซ่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกับออกซิเจนและอนุมูลอิสระ เกิดเป็นสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydroperoxide) สารเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นนี้จะสลายเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กๆ ที่ทำให้มีกลิ่นเหม็นหืนและเกิดเป็นสารอนุมูลอิสระที่เริ่มต้นของปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไปอีกด้วย (สุภารัตน์, 2552)

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในอาหาร

กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันและ ไขมันในอาหารเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) สามารถแบ่งออกเป็นขั้นต่างๆได้ 3 ขั้นตอนเหมือนการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตและมีรายละเอียดดังนี้ (ศิวาพร, 2546)

1. ปฏิกิริยาขั้นต้น (Initiation step)

กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในช่วงต้น โมเลกุลของออกซิเจนจะทำปฏิกิริยาบริเวณพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในอาหาร เกิดการสูญเสียไฮโดรเจนอะตอมตรงตำแหน่งพันธะคู่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ คือ อนุมูลไฮโดรคาร์บอนและไฮโดรเจนอะตอมซึ่งมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วถ้ามีตัวกระตุ้น(Catalyst) ที่เหมาะสม เช่น แสง ความร้อน และโลหะ ในขณะที่ตัวกระตุ้นดังกล่าวอาจจะทำให้เกิดการสลายตัวของกรดไขมัน ไม่อิ่มตัวในอาหารได้ โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอาหารและได้อนุมูลอิสระที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยามากเช่นกัน

2. กรดไขมันอิสระ – กรดไขมันที่อยู่ในรูปอิสระ (Free fatty acid) จะถูกออกซิไดส์ได้ง่ายกว่าที่อยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์

3. ปริมาณออกซิเจนและพื้นที่ผิวที่สัมผัสกับออกซิเจน ออกซิเจนเข้าร่วมในปฏิกิริยาออกซิเดชัน หากอาหารอยู่ในบรรยากาศมีปริมาณออกซิเจนมาก หรือมีพื้นที่ผิวที่สัมผัสกับออกซิเจนได้มาก ก็เกิดปฏิกิริยาได้รวดเร็ว ดังนั้นการกำจัดออกซิเจนออกจากบรรจุภัณฑ์ด้วยการบรรจุสุญญากาศ (Vacuum packaging) การบรรจุแบบปรับสภาพ บรรยากาศ (Modified atmosphere packaging) หรือใช้สารกำจัดออกซิเจน (Oxygen scavenger) ในบรรจุภัณฑ์จะช่วยชะลอการเสื่อมเสียได้

4. อุณหภูมิ อุณหภูมิสูงจะเร่งให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่าอุณหภูมิต่ำ การเก็บอาหารแช่เย็น แช่แข็ง (Freezing) จะลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้

5. วอเตอร์แอกทิวิตี (Water activity) ของอาหาร

6. แร่ธาตุหรือโลหะ เช่น โคบอลต์ ทองแดง เหล็ก แมงกานีส ซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหารโดยธรรมชาติ เช่น เหล็กในไมโอโกลบิน หรือ โลหะและแร่ธาตุที่ปนเปื้อนจากดิน หรือจากอุปกรณ์ในการแปรรูป โดยโลหะแม้เพียงส่วนเล็กน้อย 0.1 - 5 ส่วนในล้านส่วน ก็สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ดังนั้นในกระบวนการทำน้ำมันและไขมันให้บริสุทธิ์จึงต้องมีขั้นตอนของการฟอกสี และกำจัดโลหะหนัก เช่น เหล็ก และทองแดง นอกจากนี้การใช้สารพวงคิเลตติ้ง (Chelating agent) เช่น EDTA ซึ่งสารพวกนี้จะไปรวมตัวกับโลหะเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เป็นการลดการเร่งปฏิกิริยาให้น้อยลงปฏิกิริยาออกซิเดชันจะถูกหน่วงให้ช้าลง

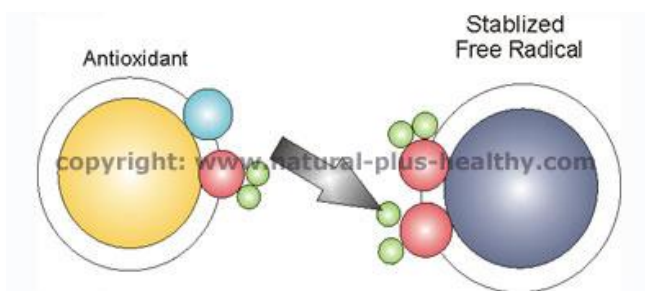
7. แสงและรังสีต่างๆ เช่น แสงที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (Visible light) แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet) และ การฉายรังสีอาหาร (Food irradiation)

8. สารต้านออกซิเดชันใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (Food additive) เพื่อป้องกันปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันมีทั้งสารธรรมชาติ เช่น วิตามินซี วิตามินอี กรดซิตริก หรือสารสังเคราะห์ เช่น บิวไทเลตไฮดรอกซีโทลูอีน บิวไทเลตไฮดรอกซีโทลูอีน บิวทิลไฮโดรควิโนน (tert - Butylhydroquinone, TBHQ)

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

2.2.1 ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไปหรือ ไปหยุดยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ มีทั้งที่เป็นสารธรรมชาติ (natural antioxidant) และสารสังเคราะห์ (synthetic antioxidant) สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้ายับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยถูกออกซิไดซ์ (รูปที่ 2.2) ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงถือเป็นตัวรีดิวซ์ สารต้านอนุมูลมีโครงสร้างเคมีและฤทธิ์ต้านการออกซิเดชันที่แตกต่างกัน ยกตัวอย่าง สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น กรดยูริก บิลิรูบิน จะเป็นตัวกำจัดอนุมูล ส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูตาไธโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควิโนน จะไปหยุดยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่



รูปที่ 2.2 กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชัน

ที่มา : <http://www.natural-plus-healthy.com/antioxodant-facts.html>

2.2.2 บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระ

ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นสิ่งสำคัญ ญต่อสิ่งมีชีวิต แต่ในภาวะที่เกิดออกซิเดชันมากเกินไป (oxidative stress) อาจนำมาซึ่งการทำลายหรือสร้างความเสียหายแก่เซลล์ได้ ดังนั้นพืชและสัตว์จึงรักษาสมดุลโดยใช้ระบบยับยั้งของปฏิกิริยาโดยสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น กลูตาไธโอน วิตามินซี และวิตามินอี เช่นเดียวกับเอนไซม์พวกซูเปอร์ออกไซด์ รวมถึงเปอร์ออกซิเดสต่างๆ การใช้สารต้านอนุมูลอิสระในทางเภสัชวิทยาได้รับการศึกษาอย่างละเอียดในการรักษาภาวะโรคหลอดเลือดในสมอง และโรค neurodegenerative disease อย่างไรก็ดี ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าออกซิเดชันที่มากเกินไปนั้นเป็นสาเหตุการเกิดโรคหรือไม่

มีงานวิจัยมากมายบ่งชี้ว่า สารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสี่ยงต่อโรคโดยเฉพาะโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์กับอาหาร เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคสมอง (เช่น อัลไซเมอร์) เป็นต้น รวมทั้งช่วยชะลอกระบวนการบางขั้นตอนที่ทำให้เกิดความแก่ โดยปกติร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระก่อนที่มันจะทำอันตราย แต่ถ้ามีการสร้างอนุมูลอิสระเร็ว หรือมากเกินไปกว่าร่างกายจะกำจัดทัน อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น จะสร้างความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพ (th.wikipedia.org/wiki/สารต้านอนุมูลอิสระ)

2.2.3 สารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ (วาริน, 2543)

สารต้านอนุมูลอิสระที่มีในธรรมชาติได้มาจากการบริโภคผัก ผลไม้ ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารประเภทวิตามินซี เบต้า-แคโรทีน แคโรทีนอยด์ สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์ ฟีนิลโพรพานอยด์ เป็นต้น ปัจจุบันพบว่าสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติได้แก่

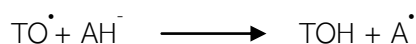
1. วิตามินเอ

ในธรรมชาติ จะพบวิตามินเอ เฉพาะในสัตว์เท่านั้น แต่ในพืชจะมีสารประกอบ แคโรทีนอยด์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ จัดเป็น Precursor ของวิตามินเอ เรียกว่า โปรวิตามินเอ มักพบในพืชผักใบเขียว ผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง หรือสีส้มแดง

2. วิตามินซี

วิตามินซีมีชื่อทางเคมีว่า กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ จะสลายตัวเมื่อถูกความร้อนหรือทิ้งไว้ในอากาศที่มีความชื้น วิตามินซีมีสมบัติเป็นสารต้าน

ออกซิเดชัน โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล hydroxyl และอนุมูล peroxy นอกจากนี้ วิตามินซีสามารถยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชันของวิตามินอีด้วย โดยทำให้อนุมูล α -tocopherol $\cdot$ (TO $\cdot$) เปลี่ยนกลับไปเป็น α -tocopherol (TOH) ดังเดิม ดังสมการ

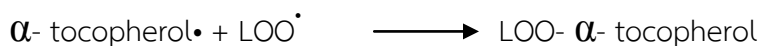


3. วิตามินอี

วิตามินอีเป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน เป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญ โดยวิตามินอีทำงานร่วมกับสารต้านออกซิเดชันตัวอื่นๆ เช่น วิตามินซีและซีลีเนียม เป็นต้น วิตามินอีช่วยปรับให้ร่างกายสามารถนำวิตามินเอมาใช้ ช่วยในการป้องกันสารที่เป็นพิษที่มีผลมาจากโลหะ เช่น ตะกั่ว ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ โทโคฟีรอล และ โทโคไธโอนอล แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อยๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟา (α -) เบต้า (β -) แกมมา (γ -) และเดลต้า (δ -) วิตามินอี ทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก้อนุมูล peroxy ดังสมการ



อนุมูล α -tocopherol $\cdot$ ที่เกิดขึ้น สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxy ตัวอื่นทำให้ได้สารที่มีความเสถียร (LOO- α -tocopherol) ดังสมการ เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง (Basu และคณะ, 1999)



4. ซีลีเนียม ทองแดง และสังกะสี

เป็นสารต้านออกซิเดชันทางอ้อม เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน มีการศึกษาวิจัยที่แสดงว่าการใช้ซีลีเนียม และวิตามินอีร่วมกันช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการป้องกันการเกิดโรคเมเร็งบางชนิด ซึ่งพบได้ในอาหารตามธรรมชาติ เนื่องจากสารต้านออกซิเดชันมีหน้าที่หลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) เป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระจับกับไอออนโลหะที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยหน้าที่ต่างๆ เหล่านี้ จึงทำให้มีผลต่อการชะลอ หรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ และทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร หรือเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกต่อไป หรือเป็นสารที่ไม่ใช้อนุมูลอิสระ (non-radical product)

5. แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบทั่วไปในธรรมชาติ จะถูกสังเคราะห์ขึ้นใน คลอโรพลาสต์ของพืช และพบมากในผักและผลไม้สุก โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนห้าหรือหกเหลี่ยม ก็ได้ ที่

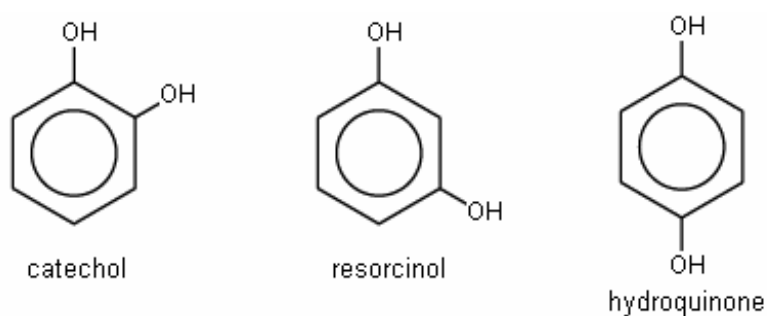
บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของโมเลกุล แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามองค์ประกอบของโครงสร้างในโมเลกุล ดังนี้

1. แคโรทีน (Carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุล ประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น เบต้าแคโรทีน (β -carotene) อัลฟาแคโรทีน (α -carotene) แกมมาแคโรทีน (γ -carotene) ไลโคปีน (lycopene) เป็นต้น และซึ่ง เบต้าแคโรทีน เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ การเปลี่ยนรูปจากเบต้าแคโรทีนไปเป็นวิตามินเอโดยการแตกพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุล โดยเอนไซม์ carotene deoxygenase เมื่อเบต้าแคโรทีน สามารถดักจับอนุมูลอิสระเข้าไว้ในโมเลกุลแล้ว โมเลกุลของเบต้าแคโรทีนจะอยู่ในลักษณะที่มีความเสถียร

2. ออกซิแคโรทีนอยด์ หรือ แซนโทฟิล เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุล บริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่นนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้าคริปโทแซน-ทิน (β -cryptoxanthin) และลูทีน (lutein)

6. สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบจำพวกฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืช ซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วย aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxy group โดยมากเป็นสารที่มีขั้วละลายในตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์ได้ดี โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลจะเกิดจากการรวมตัวของโมเลกุลน้ำตาลตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไปรวมกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล คือ กลูโคส (Glucose) นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยกันเองหรือสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) กรดอินทรีย์ (Organic acid) อะมีน (Amine) และ ไขมัน ตัวอย่างสูตรโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกแบบง่ายบางชนิด แสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกแบบง่ายบางชนิด

ที่มา : http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/pep_12_2546_phenolic.pdf

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่มีสูตรโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างกันในสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มได้ดังนี้

1. สารประกอบฟีนอลแบบง่าย (simple phenolic compound) เป็นสารที่พบทั่วไปในธรรมชาติโดยมีวงแหวนเบนซีนเพียง 1 วงเท่านั้น พบเฉพาะพืชกลุ่มแองจิโอสเปิร์ม ได้แก่ กลุ่ม ฟีนอล (phenols) เช่น catechol, resorcinol, orcinol และ hydroquinone เป็นต้น กลุ่มกรดฟีนอลิก (phenolic acids) เช่น salicylic acid, syringic acid, vanillic acid และ p-hydroxybenzoic acid เป็นต้น

2. ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid) เป็นสารที่มีองค์ประกอบของวงแหวนเบนซีน ต่อกับสายของคาร์บอนอีก 3 อะตอม ช่วยควบคุมการเจริญเติบโตและการต้านทานโรค พบมากในผักกาด ข้าว ธัญพืช องุ่น และแอปเปิ้ล เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ p-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid, umbelliferone, sesamin, eugenol และ isoeugenol

3. โพลีฟีนอล (polyphenol) เป็นสารที่มีโครงสร้างของฟีนอลหรือฟีนิลโพรพานอยด์หลายๆ วงมาต่อกัน สูตรโครงสร้างคือ $(-C_6-C_3-C_6-)_n$ และ $(-C_6-C_3-)_n$ ตามลำดับ สามารถยับยั้งโลหะซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระโดยเป็นตัวให้โปรตอนหรืออิเล็กตรอนแก่โลหะ มีความสำคัญในการเป็นตัวยารักษาโรคต่างๆ พบมากใน ชาเขียว ชาดำ กาแฟ โกโก้ กีวี เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ได้แก่ ลิกนินและแทนนิน

4. ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่ มีสูตรโครงสร้างคือ $-C_6-C_3-C_6-$ หรือ $-C_6-C_1-C_6-$ หรือ $-C_6-C_2-C_6-$ (C6 คือ หมู่ฟีนอล) พบมากในชา มะนาว ไวน์ เปลือกของผลไม้ต่างๆ ผักใบเขียว สารในกลุ่มนี้ได้แก่ flavanes, flavanones, flavanols, flavones, flavonols, anthocyanidins, isoflavanes, isoflavanones, isoflavanols, isoflavones, isoflavonols, chalcones, aurones, coumarins และ dihydrochalcones

ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล

คุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลที่ได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน คือ การเป็นสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ และการใช้สารประกอบฟีนอลในการป้องกันโรคต่างๆ โดยสารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของ โลหะที่สามารถเร่งการเกิด ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วยจึงทำให้สารประกอบฟีนอลสามารถลดจำนวนอนุมูลอิสระได้ถึงสองเท่าดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



พบว่าสารประกอบฟีนอล หลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และ แทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวจับไออนอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ อนุมูล peroxy (Packer และคณะ, 1999) โดยมีกลไก 2 แบบคือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีนอลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดขึ้นตอนพลอพาเกินได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุล เช่น เควอร์ซีทิน (quercetin)

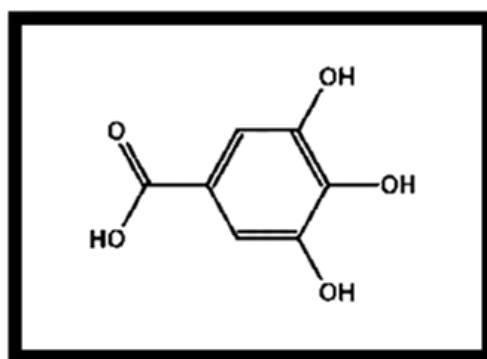
สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้อิโตรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชัน ที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป

2.2.4 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชันที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก และใช้โครงสร้างของสารต้านออกซิเดชันที่มีในธรรมชาตินำมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมีและมีฤทธิ์ที่ดีขึ้น เช่น สารต้านออกซิเดชันที่พัฒนามาจากโครงสร้างของวิตามินอี และโครงสร้างสารโพลีฟีนอล ตัวอย่างของสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ เช่น

1. Gallic acid

Gallic acid หรือ 3, 4, 5-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_7H_6O_5$ Gallic acid เป็นส่วนประกอบของแทนนิน โครงสร้างของ Gallic acid แสดงให้เห็นในรูปที่ 2.4 โดยจะพบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ๊ค และพืชอื่นๆ โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยา คุณสมบัติของ Gallic acid คือ สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดี

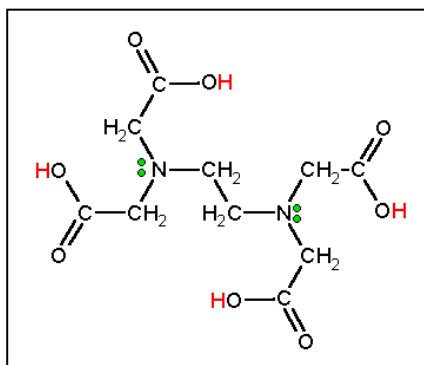


รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของ Gallic acid

ที่มา : <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/gallic-acid.php>

2. EDTA

EDTA หรือชื่อเต็มว่า Ethylenediaminetetraacetic acid มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_{10}H_{16}N_2O_8$ (แสดงในรูปที่ 2.5) มีคุณสมบัติเป็นสารคีเลต โดยการจับกับธาตุโลหะที่มีประจุ เช่น ตะกั่ว เหล็ก สังกะสี แคลเซียม แมงกานีส และทองแดง ซึ่งประโยชน์ทางการแพทย์สามารถนำมาใช้กำจัดไอออนของโลหะต่างๆได้



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ EDTA

ที่มา : <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/edta/edtah.htm>

3. BHA

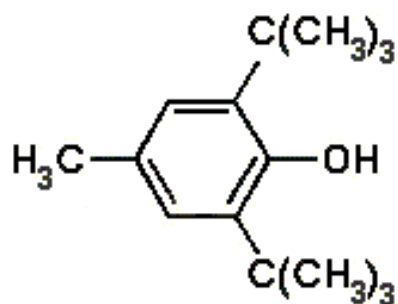
BHA (บีเอชเอ) ย่อมาจากคำว่า beta hydroxy acid เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นมา มีคุณสมบัติทนต่อความร้อน ไม่เสื่อมง่าย สารในตระกูลบีเอชเอตัวหนึ่งที่รู้จักกันดี ก็คือ กรดซาลิซิลิก (salicylic acid) ประวัติความเป็นมา ในปี คศ .1827 Leroux ค้นพบสารสำคัญคือ Salicin สกัดได้จาก Willow bark เป็นสารในกลุ่ม bitter glycoside จากนั้นมาในปี คศ .1838 Piria ก็สามารถเตรียม Salicylic acid ได้จาก Salicin และต่อมาในปี คศ.1844 Cahoues สามารถเตรียม Salicylic acid ได้จาก Oil of gaulthuria (oil of wintergreen) ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน หรือมีสีชมพูปนอยู่ด้วย และมีกลิ่นหอมของมินท์ ถึงแม้ว่าจะสามารถสกัด Salicylic acid ได้จากพืชก็ตาม แต่ Salicylic acid ที่ใช้ปัจจุบันส่วนใหญ่ ได้มาจากการสังเคราะห์ โดยในปี คศ .1860 Kolbe และ Lauterman ประสบความสำเร็จ ในการสังเคราะห์ Salicylic acid จาก Phenol จนกลายเป็นการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจะมีลักษณะเป็นผลึกสีขาวหรือใสไม่มีสีหรือเป็นผงสีขาวและหากได้จากการสังเคราะห์จะไม่มีกลิ่น (<http://www.fda.moph.go.th/prac/watch/product/bha.shtml>)

จากประวัติความเป็นมา จะเห็นว่า Salicylic acid ซึ่งใช้ชื่อในการโฆษณาว่า BHA ไม่ใช่สารใหม่ แต่เป็นสารที่มีการใช้มานานแล้ว โดยเฉพาะการใช้ในทางการแพทย์และเครื่องสำอาง

4. Butylated hydroxytoluene (BHT)

บิวไทเลตไฮดรอกซีโทลูอิน มีคุณสมบัติเป็นสารอินทรีย์ที่ละลายได้ในไขมัน (Lipophilic) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารพวกฟีนอล (รูปที่ 2.6) ตามข้อบังคับทางยุโรปและประเทศอังกฤษอนุญาตให้ใช้สารดังกล่าวในปริมาณน้อยเพื่อใช้ในการเติมแต่งอาหารเนื่องจากเป็นอันตรายต่อมนุษย์ (Williams และคณะ, 1996) นอกจากนี้บิวไทเลตไฮดรอกซีโทลูอินก็ยังใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมและต้านไวรัสเริ่มอีกด้วย

บิวไทเลตไฮดรอกซีโทลูอินจะมีกลไกการทำงานคล้ายกับสารสังเคราะห์วิตามินอีซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอนุมูลอิสระ โดยกระบวนการนี้จะเกิดจากสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่อิ่มตัวจะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศซึ่งบิวไทเลตไฮดรอกซีโทลูอินจะเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยานี้โดยการเปลี่ยนอนุมูลเปอร์ออกซิลเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Burton และ Ingold, 1981)



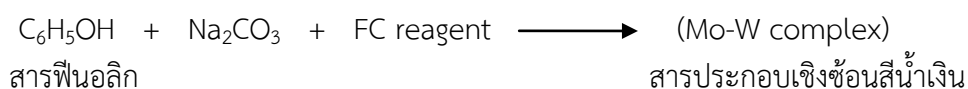
Butylated Hydroxytoluene

รูปที่ 2.6 โครงสร้างของบิวไทเลตไฮดรอกซีโทลูอิน

ที่มา : Mann และ Fowkes (1983)

2.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds) มีความสัมพันธ์กับความสามารถของการในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant capacity) ซึ่งสามารถหาโดยวิธี Folin-Ciocalteu เป็นการศึกษาการเกิดสีโดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยสารประกอบฟีนอลิกในสารละลายในสภาวะเป็นด่างหรือในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (pH 10) และสาร Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วยกรดพอสฟอโมลิบดิก ($H_3PMo_{12}O_{40}$) และกรดพอสฟอทังสเตนดิก ($H_3PW_{12}O_{40}$) ถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups ในสารละลาย Na_2CO_3 (ต่าง) เกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Mo-W สีน้ำเงิน และนำไปวิเคราะห์วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ค่าที่ได้ก็นิยมนำมาเทียบกับค่ามาตรฐานที่ได้จากกราฟมาตรฐานโดยกราฟมาตรฐานส่วนมากที่ใช้จะเป็นกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกและรายงานในหน่วยมิลลิกรัมของ GAE (Gallic Acid Equivalents)

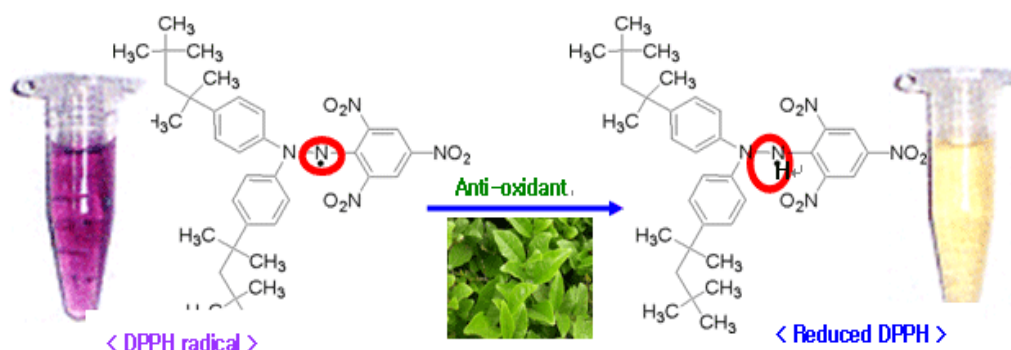


2.2.6 การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (วรศราและคณะ, 2553)

1. การวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical)

DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง และสามารถรับอิเล็กตรอนได้อีกเพื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูล การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม อิสระ และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่น จะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยการวัดการลดลงของ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่มีความเสถียร สามารถใช้ในการวัดความสามารถของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยอาศัยการจับกับอิเล็กตรอนให้แก่อนุมูลอิสระ DPPH จะเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ DPPH ที่มีความคงตัว ทำให้ DPPH ซึ่งมีสีม่วงแดงเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 517 นาโนเมตร มีค่าลดลง (ดังรูปที่ 2.7) หากสารตัวอย่างใดมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ หรือสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีจะทำให้สีม่วงแดงของ DPPH จางลงได้มากกว่าสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้น้อยและมักใช้เปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สังเคราะห์ เช่น บิวทิเลเตดไฮดรอกซีโทลูอิน บิวทิเลเตดไฮดรอกซีอะนิโซล หรือแอลฟา โทโคฟีรอล เป็นต้น โดยแสดงผลเป็น ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{517 \text{ control}} - A_{517 \text{ test sample}}) / A_{517 \text{ control}}] \times 100$$



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลอิสระ DPPH

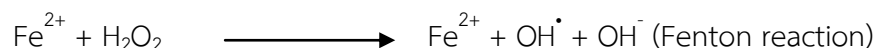
ที่มา : <http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html>

ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้ง่าย นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ ข้อเสียของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH มีความคงตัวไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้

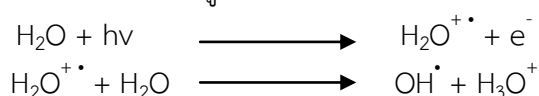
2. วิธี Hydroxyl (OH) radical scavenging activity

Hydroxyl radical (OH[•]) เป็นอนุมูลอิสระที่ว่องไว สามารถจับอนุมูลที่สำคัญในร่างกายโดยการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่อย่างต่อเนื่อง สิ่งมีชีวิตสามารถสร้าง OH[•] radical โดย 2 กลไกได้แก่

1) ปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) แม้ว่าเกลือของโลหะทรานซิชันทั่วไปทำปฏิกิริยากับ H₂O₂ ได้ OH[•] แต่ในร่างกายนั้น เป็นไปได้ว่าเกิดจากเหล็ก Fe²⁺ ทำปฏิกิริยากับ H₂O₂ ได้ OH[•] โดยเรียกปฏิกิริยานี้ว่า Fenton reaction ดังสมการ



2) การแตกตัวของน้ำ เนื่องจากการถูกแสงหรือรังสี ดังสมการ



ในการศึกษาความสามารถในการยับยั้ง OH[•] radical ของสารตัวอย่าง ต้องทำการสังเคราะห์ Hydroxyl radical (OH[•]) จากน้ำตาล deoxyribose โดยปฏิกิริยา Fenton reaction model system เมื่อเติมสาร Thiobarbituric acid (TBA) และ Trichloroacetic acid จะเกิดเป็นสีชมพู เมื่อเติมสารที่ต้องการทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้ง OH[•] radical ลงไป จะทำให้สีชมพูของสารละลายจางลง โดยสามารถตรวจสอบได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm (Mathew และ Abraham, 2006) จากนั้นนำไปคำนวณเป็น % inhibition ได้ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{532 \text{ control}} - A_{532 \text{ test sample}}) / A_{532 \text{ control}}] \times 100$$

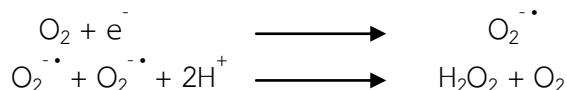
3. วิธี Metal chelating activity

การวัดความสามารถในการแย่งจับกับโลหะเป็นวิธีหนึ่งที่ยิยมใช้ในการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารที่ต้องการทดสอบ เพราะโลหะไอออนเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระต่างๆมากมายหลายชนิด โดยเฉพาะธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์รัส หรือ Fe²⁺ จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็นสารอนุมูล Superoxide anion radical (O₂^{•-}) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆต่อไป ดังนั้นวิธีการวัดความสามารถในการแย่งจับโลหะ Fe²⁺ ของสารที่ต้องการทดสอบนั้น อาศัยจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 562 nm ที่มีค่าลดลง โดยเมื่อเติมสาร Ferrozine ลงไป สารนี้จะไปจับกับ Fe²⁺ แล้วอยู่ในรูป Ferrozine - Fe²⁺ complex ซึ่งจะให้สีแดง และถ้าสารที่ต้องการทดสอบมีความสามารถในการแย่งจับกับ Fe²⁺ จะอยู่ในรูป Antioxidant - Fe²⁺ complex แล้วจะทำให้สีแดงของ Ferrozine - Fe²⁺ complex จางลงได้ เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการ

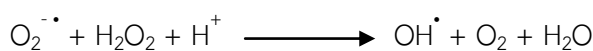
$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{562 \text{ control}} - A_{562 \text{ test sample}}) / A_{562 \text{ control}}] \times 100$$

4. วิธี Superoxide radical scavenging

Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) เป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และเป็นตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆอีกมากมายจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ นอกจากจะทำให้อนุมูลอิสระมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแล้วฤทธิ์และความแรงของอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นอันตรายสูงขึ้นด้วย แต่ตัวของ $O_2^{\cdot-}$ จะมีความว่องไวน้อยกว่า $OH^{\cdot}$ ซึ่งการเกิด $O_2^{\cdot-}$ เป็นดังสมการ



เมื่อ $O_2^{\cdot-}$ ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 จะทำให้เกิด $OH^{\cdot}$ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Haber-Weiss reaction ดังสมการ



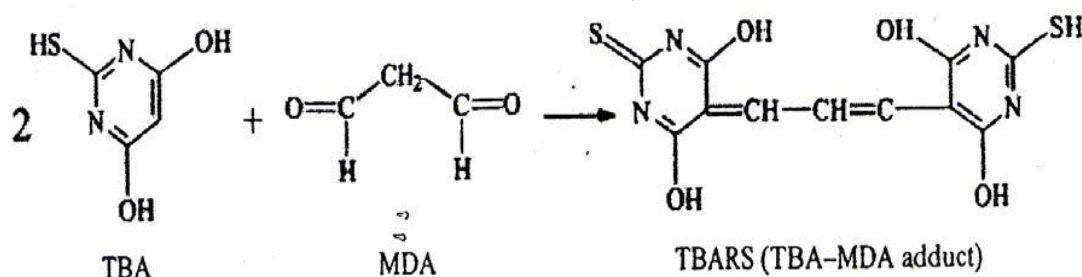
การศึกษาสมบัติการเป็นสารจับ $O_2^{\cdot-}$ ของสารตัวอย่าง ซึ่ง $O_2^{\cdot-}$ จะผลิตมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารในระบบ Phenazine methosulphate (PMS) – Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) อนุมูล $O_2^{\cdot-}$ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับสาร Nitroblue tetrazolium (NBT) ซึ่งมีสีเหลือง ปฏิกิริยาระหว่าง $O_2^{\cdot-}$ กับสาร NBT ให้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร diformazan (DF) ที่มีสีน้ำเงิน และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 560 nm จากนั้นนำไปคำนวณเป็น % inhibition ได้ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{560 \text{ control}} - A_{560 \text{ test sample}}) / A_{560 \text{ control}}] \times 100$$

5. วิธีการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในตับ (Lipid peroxidation in liver homogenates) (Halliwell และคณะ, 1987)

เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ่ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูล สามารถทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกไซด์ เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยาเนื่องจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันสามารถเกิดได้ง่ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยลิพิด 2 ขั้นตอนการเกิดลิพิดออกซิเดชันกับลิพิดในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อเอนไซม์และตัวรับ (Receptor) ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เอนไซม์และตัวรับมีการทำงานที่เสียไปเป็นสาเหตุในเกิดโรคต่างๆ ได้อีกด้วย ผลผลิตที่เกิดขึ้นมาจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ได้แก่ สารไฮโดรคาร์บอน เช่น อีเทน อีทีน และเพนเทน รวมไปถึง สารคีโตน และสารอัลดีไฮด์ เป็นต้น ซึ่งสารอัลดีไฮด์ที่มีความสำคัญ คือ มาลอนไดอัลดีไฮด์

วิธีนี้เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดทดสอบ โดยใช้ตับหนูมาทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน แล้วทำให้เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้เป็นสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ จากนั้นเติมกรดไทโอบาร์บิทริกในสภาวะกรดสารมาลอนไดอัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทริก ได้เป็นสารมีสีเรียกว่า ทิปีอาร์เอส (Thiobarbituric acid reactive substances) (ดังรูปที่ 2.8) เมื่อเติมสารสกัดทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันลงไป จะทำให้สารสีจางลง จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร



รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาการเกิดทีบีเออาร์เอส (TBARS)

ที่มา : โอภา และคณะ (2549)

2.3 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

2.3.1 ดิวิชันคลอโรไฟตา (ยูวดี, 2538; ศิริเพ็ญ, 2537)

สาหร่ายสีเขียวจัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Division Chlorophyta) สาหร่ายดิวิชันนี้ ส่วนใหญ่มีสีเขียวเหมือนหญ้า (Grass green algae) ทั้งนี้เพราะภายในคลอโรพลาสต์มีรงควัตถุพวก คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีจำนวนมาก ซึ่งจะบดบังรงควัตถุอื่น ๆ ไว้ นอกจากนั้นก็มีรงควัตถุ พวกแคโรทีนอยด์และแซนโทฟิลล์อีกหลายชนิด รงควัตถุทั้งหมดอยู่ในคลอโรพลาสต์ ซึ่งมีรูปร่างได้ หลายแบบ คุณสมบัติเหล่านี้สามารถนำมาจัดจำแนกสาหร่ายสีเขียวได้อย่างชัดเจน สาหร่ายสีเขียว ส่วนใหญ่จะมีไพเรโนยด์ (Pyrenoid) ในคลอโรพลาสต์ ซึ่งเป็นศูนย์กลางของการสร้าง แป้งในเซลล์ สาหร่าย

สาหร่ายสีเขียวนี้จะพบได้ทั่วไปแทบทุกหนทุกแห่ง ประมาณกันว่า ร้อยละ 10 ของสาหร่าย ทั้งหมดเป็นสาหร่ายทะเล ซึ่งจะเจริญแตกต่างกันตามสภาพอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มของแสงและ ความสมบูรณ์ของสารอาหาร ส่วนอีก ร้อยละ 90 ของสาหร่ายทั้งหมดจะเป็นสาหร่ายน้ำจืดหรือ สาหร่ายที่ขึ้นอยู่บนภายใต้สภาพแวดล้อมที่เป็นอากาศก็ได้ สาหร่ายที่อยู่ในน้ำจืดอาจจะเจริญอยู่ในน้ำตื้นๆ หรือน้ำลึกที่แสงส่องถึง และหลายชนิดมีสภาพเป็นแพลงก์ตอนพืช บางชนิดก็ขึ้นอยู่บน ก้อนหิน ทราเย โคลน เปลือกหอย บนพืช หรือสัตว์อื่น หรืออาจเจริญอยู่ในพืช หรือสัตว์อื่นก็ได้ อาจขึ้นอยู่ในดิน หรือในเปลือกไม้แตก บางชนิดสปอร์ของมันอาจจะปนมากับฝุ่นละออง และบาง ชนิดอาจจะพบอยู่ในหิมะ หรือน้ำแข็งก็ได้สาหร่ายสีเขียวในดิวิชันคลอโรไฟตา พบได้ในแหล่งน้ำ จืด ในทะเล และบนพื้นดินพวกที่มีขนาดเล็ก มักพบในลักษณะเป็นแพลงก์ตอนพืชส่วนใหญ่พบใน แหล่งน้ำจืด สารที่พบมากจะเป็นพวกคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และ เบต้า - แคโรทีน

ก. โครงสร้างของเซลล์

1. ผนังเซลล์มี 2 ชั้น ผนังชั้นในเป็นพวกเซลลูโลส ผนังชั้นนอกเป็นเพกติน นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ปกติหรือเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวบางชนิดไม่มีผนังเซลล์

2. รงควัตถุ และคลอโรพลาสต์ รงควัตถุของสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วย

(1) คลอโรฟิลล์เอ และ คลอโรฟิลล์บี

(2) แคโรทีนอยด์ ได้แก่ แคโรทีนประกอบด้วย อัลฟา - แคโรทีน เบต้า - แคโรทีน และแกมมา - แคโรทีน ส่วนแซนโทฟิลล์ ได้แก่ ลูทีน ไวโอลาแซนทิน และนีโอแซนทิน คลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างลักษณะต่าง ๆ เช่น

- 1) เป็นเกลียว (Helical or spiral chloroplast)
- 2) เป็นรูปดาว (Stellate chloroplast)
- 3) เป็นแผ่นแบน 1 แผ่น (Lamellar หรือ Flat plate chloroplast) พบใน *Ankistrodesmus* และ *Scenedesmus*
- 4) เป็นร่างแห (Reticulate chloroplast)
- 5) เป็นทรงกระบอกตรงหัวและท้ายเปิด (Open cylinder chloroplast) พบใน *Monoraphidium*
- 6) เป็นรูปถ้วย (Cup shaped chloroplast) พบใน *Chlamydomonas*, *Chlorella* และ *Chlorococcum*

(3) อาหารสะสมของสาหร่ายสีเขียวจะอยู่ในรูปของแป้ง ประกอบด้วยอะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพกติน (Amylopectin) โดยจะเก็บสะสมแป้งไว้ในพริโนยด์ สำหรับสาหร่ายที่ไม่มี พริโนยด์จะสะสมอาหารไว้ในรูปของน้ำมัน

(4) การเคลื่อนไหว สาหร่ายสีเขียวพวกที่มีการเคลื่อนไหวได้ ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ปกติหรือเซลล์สืบพันธุ์ มักพบว่ามีออร์แกเนลล์ที่มีสีเขียวเรียกว่า สติกมา (Stigma) หรืออายสปอต (Eyespot) ทำหน้าที่รับแสง แล้วส่งความรู้สึกต่อไปยังแฟลกเจลลา

ข. รูปร่างลักษณะ

สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างลักษณะหลายแบบด้วยกัน มีทั้งเซลล์เดี่ยว กลุ่มเซลล์ เส้นสาย หลอดหรือท่อ

ค. การสืบพันธุ์

สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแบ่งเซลล์ เป็นการสืบพันธุ์แบบที่พบมากในสาหร่ายสีเขียว โดยสาหร่ายชนิดที่เป็นกลุ่มเซลล์จะเป็นการเพิ่มขนาดของกลุ่มเซลล์ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการรวมของแกมีตนั้นมีทั้งแบบไอโซแกมี (Isogamy) แอนไอโซแกมี (Anisogamy) และโอโอแกมี (Oogamy)

ชั้นคลอโรไฟซี (Class Chlorophyceae) (วันเพ็ญ, 2549)

สาหร่ายสีเขียวในชั้นคลอโรไฟซีแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวอื่นๆ คือ มีทีกา (Theca) ด้านนอกเซลล์ และมีการยุบตัวของเส้นใยสปินเดิลในระยะทีโลเฟสเพื่อแบ่งเซลล์ลูกออกเป็น 2 เซลล์ ต่อมาเกิดการแบ่งของเซลล์แบบสร้างไฟโคพลาสต์ ระบบรากของแฟลกเจลลาเป็นกากบาท

สาหร่ายสีเขียวที่มีแฟลกเจลลาบางชนิดไม่มีทีกา ในการวิวัฒนาการจึงมีการสูญเสียทีกา เพราะว่าเซลล์มีการพัฒนาลักษณะอื่นๆ ขึ้นมาในสาหร่ายสีเขียวชั้นคลอโรไฟซีให้มีความหลากหลายในการอาศัยอยู่ในน้ำจืดแหล่งต่างๆ ทั่วโลก เช่น *Chlamydomonas* sp. คลอโรไฟซีมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างไซโกตที่สามารถพักตัวได้ เมื่อมีการงอกใหม่ของไซโกตจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส มีการสร้างเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้ที่มีสมมาตรรัศมี แฟลกเจลลายึดติดด้านหน้าสุดของเซลล์ อาจมีการสร้างไรโซพลาสต์ ไม่มีโครงสร้าง ที่ประกอบด้วยเซลล์หลายชั้น มีจุดรับแสงแบบธรรมดา มีการสลายไกลโคเลทโดยใช้เอนไซม์ไกลโคเลท ดีไฮโดรจีเนส และมีการสลายยูเรียโดยใช้เอนไซม์ยูเรีย แอมิโนไลเอส

การจัดจำแนกชั้นคลอโรไฟซีออกเป็นอันดับ (Order) อันดับที่สำคัญ ได้แก่

1. อันดับคลอโรคอกคาเลส (Order Chlorococcales)

ในอันดับคลอโรคอกคาเลส เป็นสาหร่ายสีเขียวที่เคลื่อนที่ไม่ได้ ทัลลัสประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว หรือซีโนเปียมที่มีจำนวนเซลล์แน่นอน และมีการจัดเรียงตัวอย่างจำเพาะในแต่ละชนิด การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างซูโอ อสปอร์หรืออะพลาโนสปอร์หรือพบทั่วไปคือสร้างออโตสปอร์ (Autospores) ซึ่งออโตสปอร์น่าจะเกิดขึ้นได้มากกว่าเซลล์ลูกที่สร้างจากทัลลัสพ่อแม่ โดยที่ออโตสปอร์จะเป็นอะพลาโนสปอร์ที่มีขนาดเท่ากับเซลล์พ่อแม่ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศสามารถเป็นได้ทั้งแบบไอโซแกมี แอนไอโซแกมี หรือโอโอแกมี สาหร่ายในอันดับนี้พบมากในน้ำจืด ต้นกำเนิดของอันดับนี้มาจากอนุพันธุ์ของสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. ที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียการสร้างแฟลกเจลลาในเซลล์ระยะยังชีพ แต่มีหลักฐานการสืบเนื่องทางวิวัฒนาการอยู่ได้แก่ *Scenedesmus* sp. มีเซนทริโอลอยู่ แต่พบได้ยากในเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้

การประกอบกันของเซลล์หลายเซลล์ในอันดับคลอโรคอกคาเลสแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุของเซลล์และสภาวะการเจริญ เมื่อถึงระยะที่การเติบโตคงที่ เซลล์หยุดการแบ่งตัว และในหลายๆกรณีที่มีผนังหนาขึ้น มีการสะสมไขมันและแคโรทีนอยด์ในโพทโทพลาสซึมเมื่อไนโตรเจนลดน้อยลง ผลของการเพิ่มอัตราส่วนของแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์ทำให้สีเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีส้ม

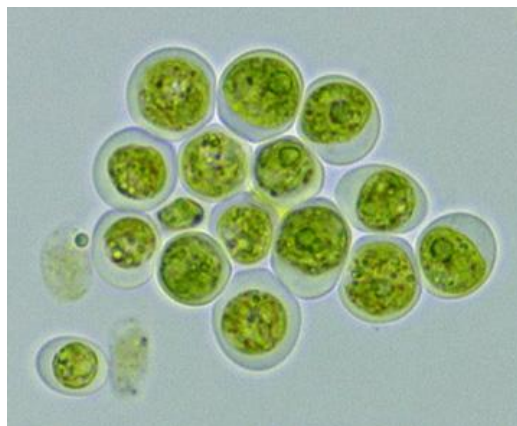
อันดับนี้แบ่งออกได้เป็น 5 วงศ์ คือ วงศ์คลอโรคอกคาซีอี วงศ์แคราเซียซีอี วงศ์โพโทไซไฟนาซีอี วงศ์ไฮโดรดิโกไทอาซีอี และวงศ์โอโอซิสทาซีอี แต่ในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงวงศ์คลอโรคอกคาซีอี และวงศ์โอโอซิสทาซีอี

1.1 วงศ์คลอโรคอกคาซีอี (Family Chlorococcaceae)

สาหร่ายสีเขียววงศ์นี้เป็นชนิดคลอโรคอกคาเลียน (Chlorococcalean) ที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างซูโอสปอร์ ถึงแม้ว่าบางชนิดอาจจะสร้างอะพลาโนสปอร์ด้วย เป็นสาหร่ายเซลล์เดียว มีนิวเคลียส 1 อัน ต่อมาก่อนการสืบพันธุ์อาจจะเป็นแฮพลอยด์และมีคลอโรพลาสต์รูปร่างหลายแบบ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบบไอโซแกมี แอนไอโซแกมี หรือโอโอแกมี ตัวอย่างของสกุลสาหร่ายในวงศ์นี้ คือ

ก. *Chlorococcum* sp. (Siver, 2009)

Chlorococcum sp. ลักษณะเซลล์จะอยู่เดี่ยวๆ เป็นทรงกลมหรือรูปไข่ ขนาดของเซลล์มีความแตกต่างกัน เซลล์อาจอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นกระจุก บางครั้งรวมตัวกันเป็นแผ่นฟิล์มบนที่ขึ้นหรือบนผิวหน้าของน้ำ มีเมือกที่บาง แต่ละเซลล์มีคลอโรพลาสต์ เป็นลักษณะรูปถ้วยอยู่แถบด้านข้าง มีไพรีนอยด์เพียงอันเดียว (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.9 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorococcum* sp.

ที่มา : Siver (2009)

Chlorococcum sp. อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมในน้ำและบนบก รวมถึงดินที่เปียก แหล่งน้ำ และที่อยู่อาศัยที่มีความชื้น (Subaerial habitats) โดยปกติจะพบมากในตอนเหนือและตอนกลางของอเมริกา และทะเลแคริบเบียน ซึ่งมีทั้งหมด 34 สายพันธุ์ทั่วโลก (Guiry และ Guiry, 2011)

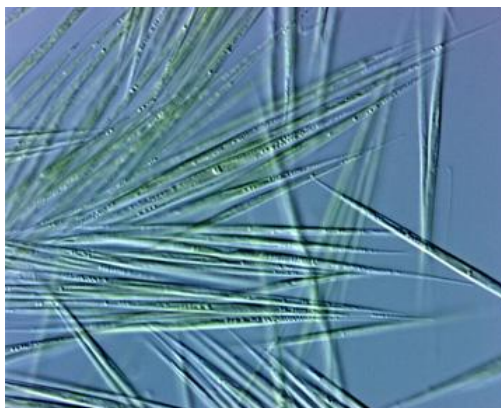
ในระหว่างที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เซลล์พ่อแม่จะมีการแบ่งเซลล์ไซโทพลาสซึมและนิวเคลียส สร้างซุโอสปอร์จากผนังเซลล์ของเซลล์พ่อแม่ มีแฟลกเจลลา 2 เส้น ผนังเซลล์ของซุโอสปอร์ในระยะแรกมีอายุสเปตและคอนแทร็กไทล์แควคิวโอล ก่อนจะมีการพัฒนาไปเป็นตัวเซลล์ ถ้าในสภาพแวดล้อมที่ขาดน้ำตัวเซลล์ที่เกิดจากอะพลาโนสปอร์ (Aplanospore) จะมีมากกว่าซุโอสปอร์ ผนังเซลล์ของไซโกตจะหนาหรือฮิพโนสปอร์ (Hypnosore) ที่พัฒนาไปเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับเจริญเติบโต (Vegetative cells) ในระหว่างที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

1.2 วงศ์โอโอซิสทาซีอี (Family Oocystaceae)

เป็นสาหร่ายสีเขียวที่สร้างเซลล์ลูกได้เหมือนกัน และเท่ากันกับเซลล์พ่อแม่หรือออโตสปอร์ ส่วนใหญ่อยู่ในน้ำจืดที่มีไนเตรตและฟอสเฟตปริมาณสูง จัดเป็นแพลงก์ตอนพืชหลักในทะเลสาบน้ำจืด ตัวอย่างของสาหร่ายในวงศ์นี้ คือ

ก. *Ankistrodesmus* sp. (Siver, 2009)

ลักษณะเซลล์ของ *Ankistrodesmus* sp. ประกอบด้วยโคโลนี 4 – 32 เซลล์ มีรูปร่างคล้ายเข็มยาว รูปร่างลักษณะเป็นกระสวย บางครั้งมีลักษณะเป็นรูปเสี้ยวพระจันทร์ เป็นเซลล์ที่ไม่มีเมือกและอาจพบอยู่เดี่ยวๆ เป็นกลุ่ม บิดอยู่รอบๆ เซลล์อื่น หรืออยู่เป็นกระจุกในสาหร่ายชนิดอื่น ไม่มีไฟรีนอยด์ (รูปที่ 2.10)



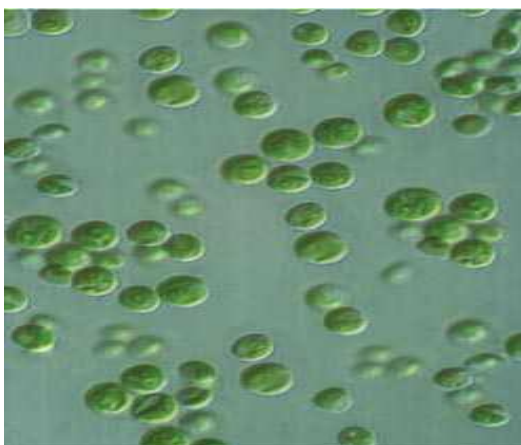
รูปที่ 2.10 ลักษณะเซลล์ของ *Ankistrodesmus* sp.

ที่มา : Siver (2009)

Ankistrodesmus sp. พบอยู่ทั่วไปมากในทวีปอเมริกาเหนือ ปกติจะพบเป็นพวกแพลงก์ตอนพืชในแหล่งน้ำจืดและทะเลสาบ บางครั้งอาศัยอยู่ในบ่อเพาะเลี้ยง แอ่งน้ำ และน้ำตก ซึ่ง *Ankistrodesmus* sp. พบทั้งหมด 19 สายพันธุ์ (Guiry และ Guiry, 2011) แต่พบในประเทศไทยเพียง 3 สายพันธุ์ (ยุวดี, 2548)

ข. *Chlorella* sp. (Siver, 2009)

Chlorella sp. ลักษณะเซลล์จะอยู่เดี่ยวๆ เป็นสาหร่ายสีเขียวที่ไม่มีการเคลื่อนที่ มีรูปร่างกลมและรูปวงรี ปกติเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 - 12 ไมโครเมตร แต่ขนาดอาจแตกต่างกันแม้จะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เซลล์จะอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นกระจุกไม่สม่ำเสมอ มีคลอโรพลาสต์อยู่แถบข้างเซลล์มีลักษณะเป็นรูปกล้วย หรือคล้ายจาน บางครั้งก็มีพริ้นอยด์ (รูปที่ 2.11)



รูปที่ 2.11 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp.

ที่มา : <http://www.osnanet.de/tegelhuetter/chlorella.jpg>

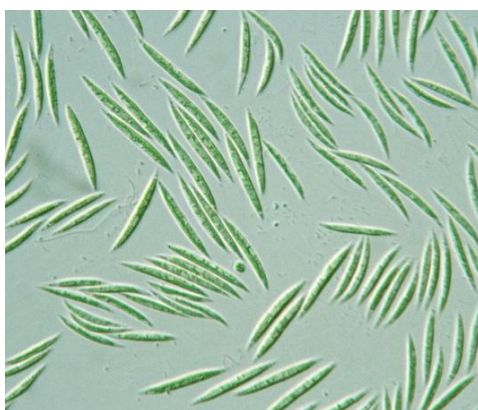
Chlorella sp. มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง ทำให้เป็นที่น่าสนใจมากสำหรับนักวิจัยในด้านต่างๆ *Chlorella* sp. มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูง และอุดมไปด้วยโปรตีน วิตามิน (โดยเฉพาะวิตามินบี) และแร่ธาตุ เป็นแหล่งอาหารที่มีศักยภาพ *Chlorella* sp. สามารถใช้เป็นอาหารเสริมทางโภชนาการได้

Chlorella sp. ปกติจะพบอยู่ทั่วไปในทวีปอเมริกาเหนือ และจะพบเป็นแพลงก์ตอนพืชของแหล่งน้ำจืด และสภาพแวดล้อมทางทะเล มักจะอยู่ในทะเลสาบ บ่อน้ำ หรือบ่อน้ำขนาดเล็ก ในดิน ขณะนี้พบสายพันธุ์ของ *Chlorella* sp. 30 สายพันธุ์ (Guiry และ Guiry, 2011) ซึ่งบริเวณประเทศไทยพบน้อยพบเพียง 3 สายพันธุ์ (ยุวดี, 2548) มีการดำรงชีวิตอยู่ในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังในแหล่งน้ำจืด เช่น โปรโตซัว ฟองน้ำ สัตว์พวกซีเลนเทอรата หนอนตัวแบน และหอย ซึ่งความสัมพันธ์เหล่านี้เป็นประโยชน์ต่อ *Chlorella* sp. ในกระบวนการเผาผลาญ เช่น การสังเคราะห์แสง และการตรึงไนโตรเจน

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ลูก 4 เซลล์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้สร้างมาจากโปรโตพลาสต์ของเซลล์พ่อแม่ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด *Chlorella* sp. มีความคล้ายคลึงกับ *Chlorococcum* sp. ขึ้นอยู่กับลักษณะรูปร่าง แต่การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของ *Chlorococcum* sp. มีการสร้างซุโอสปอร์ (Zoospore) ซึ่งมีแฟลกเจลเลต 2 เส้น มีคลอโรพลาสต์ที่คลุมผนังเซลล์ พบในดิน บนไม้ หรือหิน

ค. *Monoraphidium* sp. (Komárková-Legnerová, 1969)

Monoraphidium sp. มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีที่มีจำนวนไม่คงที่ ตัวเซลล์มีรูปร่างแหลม แขนยาวตรง หรือโค้งแหลม ไม่มีเมือกหุ้ม (Mucilage envelope) มีคลอโรพลาสต์ 1 อันหรือมากกว่าที่มีรูปร่างแหลมและมีผนังหุ้ม เซลล์มีขนาด $2 - 182 \times 1 - 8$ ไมโครเมตร ผนังเซลล์เรียบ ไม่มีไพรีนอยด์หรือเมื่อมีไพรีนอยด์ ก็จะไม่มีเยื่อหุ้มแบ่งเอาไว้ (รูปที่ 2.12)



รูปที่ 2.12 ลักษณะเซลล์ของ *Monoraphidium* sp.

ที่มา : <http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/Images/Chlorophyta/Monoraphid>

Monoraphidium sp. เป็นแพลงก์ตอนที่พบในน้ำจืดหรือในดินในประเทศฝั่งยุโรป เอเชีย และอเมริกาเหนือ ซึ่งชนิดที่พบไม่มีความแตกต่างกันนัก บที่พบในชั่วโลกโดยปัจจุบันพบทั้งหมด 28 สายพันธุ์ (Guiry และ Guiry, 2011) และในประเทศไทยพบน้อย ส่วนมากจะอยู่บริเวณภาคเหนือ โดยมี 12 สายพันธุ์ (ยุวดี, 2548)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยใช้ออโตสปอร์หรือออโตซีโนเปียม (Autocoenobium) 2 - 16 สปอร์ต่อสปอร์แรงเกียม 1 เซลล์ซึ่งปล่อยออกมาในลักษณะตามยาวหรือตามขวางจากผนังเซลล์พ่อแม่ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและระยะที่มีการใช้แฟลกเจลล่ายังไม่ทราบแน่ชัด

1.3 วงศ์ซีนีเดสมาซีอี (Family Scenedesmaceae) (ยุวดี, 2549)

เป็นโคโลนีที่ประกอบด้วยเซลล์จำนวน 2, 4, 8 หรือ 16 เซลล์ มาเรียงต่อกันด้านข้างตามความยาวของเซลล์ แต่ละเซลล์มีลักษณะเป็นรูปไข่ หรือทรงกระบอก หรือพระจันทร์ครึ่งซีก เซลล์ที่อยู่ด้านริมสุดทั้งสองด้านอาจมีหนาม (Spine) ยื่นออกมา บางชนิดก็ไม่มีคลอโรพลาสต์เป็นแผ่นเต็มเซลล์มีไพรีนอยด์และมีนิวเคลียสเซลล์ละ 1 อันซึ่งเท่ากับจำนวนเซลล์ปกติของ *Scenedesmus* ชนิดนั้น เมื่อแก่ก็จะหลุดออกมาจากผนังเซลล์ของแม่จับกันเป็นโคโลนีใหม่ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างแกมิตที่มีแฟลกเจลลัม 2 เส้น แล้วมีการรวมแบบไอโซแกมี เป็นสหาหร่ายที่มีชีวิตแบบแพลงก์ตอนพืช หรืออาจพบในดินบ้าง ถ้านำมาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสหาหร่ายมักไม่จับกันเป็นโคโลนี แต่มักจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ตัวอย่างของสหาหร่ายในวงศ์นี้ คือ

ก. *Scenedesmus* sp. (Siver, 2009)

Scenedesmus sp. เป็นสหาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก ที่ไม่มีการเคลื่อนที่ ซึ่งประกอบกันเป็นเซลล์เรียงชิดติดกันในลักษณะจานแบน ส่วนใหญ่โคโลนีจะประกอบด้วยเซลล์จำนวน 2, 4, 8, 16, 32 บางครั้งก็เป็นเซลล์เดี่ยว แต่ละเซลล์มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก รูปไข่ กระสวยหรือพระจันทร์ครึ่งซีก โดยปกติแล้วปลายสุดทั้งสองด้านของแต่ละเซลล์จะมีหนามยาวถึง 200 ไมโครเมตร ยื่นออกมานอกเซลล์ แต่ละเซลล์มีคลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะคล้ายจานเป็นแถบข้างเซลล์มีไพรีนอยด์ 1 อัน เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนผนังเซลล์อาจหุ้มด้วยเซลล์กันกระแทกหรือเซลล์ที่มีลักษณะเป็นร่างแห (Reticulations) มีมากกว่า 100 สายพันธุ์จะแตกต่างกันตามจำนวน การจัดเรียงของเซลล์ และรูปแบบที่อยู่บนผนังเซลล์ (รูปที่ 2.13)

Scenedesmus sp. พบได้ทั่วไปในพวกแพลงก์ตอนพืชในแหล่งน้ำจืด แม่น้ำ สระน้ำ บ่อน้ำหรือบางครั้งอาศัยอยู่ในน้ำกร่อย พบได้ทั่วทุกทวีปอเมริกาเหนือที่มีสภาพอากาศเขตร้อนไปจนถึงชั่วโลกเหนือ *Scenedesmus* sp. ที่พบทั้งหมดมี 76 สายพันธุ์ (Guiry และ Guiry, 2011) และบริเวณประเทศไทยพบ 17 สายพันธุ์ (ยุวดี, 2548) เจริญในแหล่งน้ำที่อุดมด้วยสารอาหาร *Scenedesmus* sp. จัดเป็นผู้ผลิตหลักที่สำคัญและเป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง



รูปที่ 2.13 ลักษณะเซลล์ของ *Scenedesmus* sp.

ที่มา : Alster และ Zohary (1902)

Scenedesmus sp. ปกติจะเป็นตัวบ่งชี้สภาวะแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมี เป็นที่นิยมที่ใช้ในการตรวจสอบสารอาหารและสารพิษที่เกิดจากมนุษย์ในการใช้แหล่งน้ำ

Scenedesmus sp. มีทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและเป็นโคโลนี (Coenobium) แต่ละเซลล์ของเซลล์พ่อแม่จะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยไม่มีแฟลกเจลลาที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ลูก เหมือนกับเซลล์ฟอแมโคโลนีใหม่ที่ได้ยังคงเกาะกันแน่นภายในผนังเซลล์จนกว่าจะปล่อยออกมาทำลายผนังเซลล์

2. อันดับวอลโวคาเลส (Order Volvocales) (วันเพ็ญ, 2549)

ในอันดับวอลโวคาเลส เซลล์ ยังชีพมีแฟลกเจลลาและเคลื่อนที่ได้ มีทั้งเซลล์เดี่ยวหรือหลายเซลล์ ถ้าเป็นพวกหลายเซลล์ จำนวนเซลล์ในกลุ่มเซลล์ยังชีพจะเป็นทวีคูณของสอง สำหรับในอันดับนี้เกือบทั้งหมดอยู่ในน้ำจืด จะเพิ่มจำนวนได้มากในแหล่งน้ำที่มีไนโตรเจนสูง แบ่งได้เป็น 2 วงศ์ คือ วงศ์แคลมิโดโมนาดาซีอี และ วงศ์วอลโวเคซีอี แต่ในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงวงศ์แคลมิโดโมนาซี

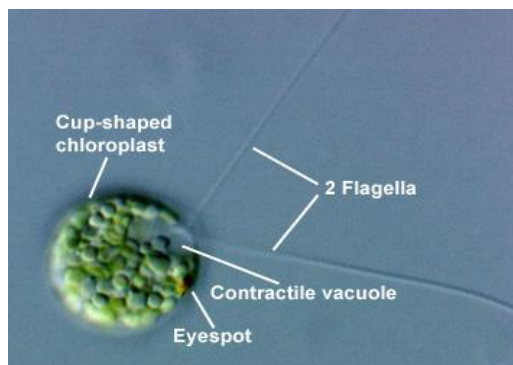
2.1 วงศ์แคลมิโดโมนาดาซี (Family Chlamydomonaceae)

สำหรับในวงศ์นี้เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวทั้งหมด ทุกสกุลมีนิวเคลียส 1 อัน และโดยปกติคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วย ตัวอย่างของสกุลสาหร่ายในวงศ์นี้ คือ

ก. *Chlamydomonas* sp. (Siver, 2009)

Chlamydomonas sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก ลักษณะเป็นเซลล์อยู่เดี่ยวๆ มีลักษณะกลม เซลล์รูปไข่หรือรูปวงรี มีแฟลกเจลลา 2 เส้น และคอนแทกไทล์แควคิควอล 2 อัน บริเวณด้านหน้า คลอโรพลาสต์มีลักษณะรูปถ้วย เป็นแถบข้างเซลล์ ซึ่งอาจมีไพรีนอยด์เพียง 1 อัน หรือมากกว่า บริเวณเซลล์มักมีอายสปอตเพียงอันเดียว ผนังเซลล์แข็ง ชั้นของผนังเป็นพวก

ไกลโคโปรตีนมากกว่าเซลลูโลส แพลกเจลลาทั้งสองยื่นออกมาจากรูของผนังเซลล์ อาจมีการป้องกันตัวเองจากสาหร่ายชนิดอื่นๆ มีการเคลื่อนที่แบบหมุนไปข้างหน้า (รูปที่ 2.14)



รูปที่ 2.14 ลักษณะเซลล์ของ *Chlamydomonas* sp.
ที่มา : Siver (2009)

Chlamydomonas sp. ชอบเข้าหาแสง โดยจะมีการดึงดูดแสงในปริมาณที่ปานกลาง ไม่รับแสงในปริมาณที่มากเนื่องจากบริเวณที่รับแสงอยู่ใกล้กับอวัยวะสปีด แต่แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันมาก ตรงบริเวณตำแหน่งของคลอโรพลาสต์ และจำนวนของไฟรีนอยด์ *Chlamydomonas* sp. มี 414 สายพันธุ์ (Guiry และ Guiry, 2011) มี 20 สายพันธุ์ที่พบอยู่ทั่วไปในทวีปอเมริกาเหนือ 1 สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย ที่อยู่อาศัยต่างๆ รวมไปถึงแหล่งน้ำจืด ดิน และพี นมิวที่เป็นหิมะ น้ำแข็งขั้วโลกเหนือหรือแอ่งน้ำในแอนตาร์กติ นิยมนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการทางพันธุกรรม เพื่อศึกษาโครงสร้างและการทำงานของเซลล์ เนื่องจากมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายและมีวงจรชีวิตที่มีโครโมโซม 1 ชุด (Haploid) ซึ่งชักนำให้มีการสืบพันธุ์ได้อย่างง่ายดาย สามารถสังเคราะห์แสงเองได้ แต่ในบางสายพันธุ์มีการใช้อะซิเตท เช่น คาร์บอน ช่วยให้เกิดการเจริญเติบโตได้ในที่มืด

Chlamydomonas sp. โดยปกติจะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเป็น 4 (หรือแบ่งเซลล์เป็น 2, 8, 16) ในผนังเซลล์ของพ่อแม่ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะมีการสร้างแกมมาต ซึ่งทั้งแบบไอโซแกมี แอนไอโซแกมี หรือโอโอแกมี

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย

Kuda และคณะ (2005) ได้ทำการสกัดสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากสาหร่าย สีน้าตาลจำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ ได้แก่ *Scytosiphon lomentaria*, *Papenfussiella kurono* และ *Nemacystus decipiens* และสาหร่ายสีแดง 1 สายพันธุ์คือ *Porphyra* sp. จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ สารประกอบฟีนอลิกและศึกษาฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่าย 5 วิธี ได้แก่ suppression of hemoglobin- induced linoleic acid peroxidation การหาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (reducing power) ความสามารถในการรวมตัวกับเฟอร์รัสไอออน (ferrous ion chelating) ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

และ วิธี scavenging of superoxide anion radical-generated non-enzymatic systematic จากการศึกษาพบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล โดยมีค่าอยู่ในช่วง 2.2-9.4 มิลลิกรัมสมมูลย์คาเทชินต่อกรัมตัวอย่างน้ำ นักแห่งรวมทั้งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากวิธีทดสอบที่ใช้ทั้ง 5 วิธีที่กล่าวมา

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Ecklonia cava* โดยทำการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ความสามารถในการยับยั้งการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ความสามารถในการรวมตัวกับเฟอร์รัสไอออน ศึกษาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ และการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลร้อยละ 70 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ทุกวิธี และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูง และ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกพบมากในสารละลายที่มีขั้วสูงกว่าสารละลายที่มีขั้วต่ำ (Senevirathne และคณะ, 2006)

Li และคณะ (2007) ทำการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจาก fraction ที่แตกต่างกันของสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้ 23 ชนิด เพื่อหาแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระใหม่ที่ปลอดภัย และราคาไม่แพง โดยใช้วิธี Trolox equivalent antioxidant capacity assay และวิธี Folin–Ciocalteu ในการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดตามลำดับ โดยทำการสกัดสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และน้ำ ตามลำดับ พบว่า สาหร่าย *Synechococcus* sp. FACHB 283 , *Chlamydomonas nivalis* และ *Nostoc ellipsosporum* CCAP 1453-1417 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด จึงเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ นอกจากนี้เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระกับสารฟีนอลของ fraction พบว่ามีน้อยมากในเฮกเซน ($R^2 = 0.0075$) เอทิลอะซิเตต ($R^2 = 0.5851$) และน้ำ ($R^2 = 0.3599$) ดังนั้น สารประกอบฟีนอลจึงไม่ใช่สารตัวหลักที่ทำให้สาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 14 ชนิดจากมาเลเซียมาคัดแยกให้บริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงในน้ำที่สะอาด น้ำกร่อยและน้ำทะเล ซึ่งทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทางเคมี 3 วิธีคือ วิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเฟอร์ริกไทโอไซยาเนต (Ferric thiocyanate) วิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากค่ากรดไทโอบาพิริก วิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ โดยพบว่าสารสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็ก 6 ชนิด ได้แก่ *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* และ *Tetraselmis tetrahele* มีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก ซึ่ง *I. galbana* และ *C. calcitrans* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดจากการวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเฟอร์ริกไทโอไซยาเนต และวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากค่ากรดไทโอบาพิริกมากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งเห็นว่าสาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้มีสารที่ออกฤทธิ์ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมัน (Natrath และคณะ, 2007)

จากการศึกษาสารสกัดแห้งจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum boveanum* ที่สกัดด้วยน้ำ และ เอทานอล โดยตรวจสอบหาสารประกอบฟีนอลิก โดยใช้วิธี Folin-ciocalteu พบว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดด้วยน้ำมีค่าเท่ากับ 17 ± 0.492 มิลลิกรัมสมมูลย์ของคาเตชินต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง การสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน ร้อยละ 90 ตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ถึงร้อยละ 94 (Rastian และคณะ, 2007)

Shanab (2007) ศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเอทานอลและไดคลอโรมีเทน จากสาหร่าย 3 ชนิด ได้แก่ *Sargassum dentifolium*, *Laurencia papillosa* และ *Jania corniculata* ในประเทศอียิปต์ โดยทำการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการยับยั้ง ปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมัน พบว่า สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนของสาหร่ายแต่ละชนิดมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล โดย *Sargassum dentifolium* มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด รองลงมาคือ *Laurencia papillosa* และ *Jania corniculata* สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนของ *Laurencia papillosa* มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันไขมันได้สูงที่สุด รองลงมาคือ *Sargassum dentifolium* และ *Jania corniculata*

Zubia และคณะ (2007) ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ 48 ชนิด (ดิวิชันคลอโรไฟต์ 17 ชนิด ดิวิชันไฟโอไฟต์ 8 ชนิดและดิวิชันโรโดไฟต์ 23 ชนิด) จากชายฝั่งของคาบสมุทรยูคาทานและกินตานาโร ประเทศเม็กซิโก จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี วัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระDPPH และปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดแต่ละชนิด พบว่าสาหร่าย *Avrainvillea longicaulis*, *Chondria baileyana* และ *Lobophora variegata* แสดงความสามารถในการสารต้านออกซิเดชันที่ดี โดยมีค่า EC_{50} ต่ำ (1.44 ± 0.01 , 2.84 ± 0.07 และ 0.32 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ EC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระทางการค้าบางชนิด เช่น อัลฟา - โทโคฟีรอล กรดแอสคอร์บิก บีเอชเอ และบีเอชที นอกจากนี้สารสกัดส่วนใหญ่ ยังแสดงฤทธิ์ในการรีดิวซ์กำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ไอออน และยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน

จากการศึกษาการสกัดสารสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลและสารละลายเมทานอลร้อยละ 50 จากสาหร่ายทะเล ได้แก่ *Padina antillarum*, *Caulerpa racemosa* และ *Kappaphycus alvarezzi* จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยทำการวิเคราะห์หา ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี วิธี Folin-Ciocalteu และการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง อนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการ รวมตัวกับเฟอร์รัสไอออน (Ferrous ion chelating) และการต้านออกซิเดชันโดยการฟอกจางสีเบต้าแคโรทีน พบว่า *P. antillarum* มีสารประกอบฟีนอลิกสูง ที่สุด 2430 ± 208 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อตัวอย่างแห้ง 100 กรัม และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอบิกสมมูลย์ มีค่าเท่ากับ 1140 ± 85 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแอสคอบิกต่อตัวอย่างแห้ง 100 กรัม *C. racemosa* และ *K. alvarezzi* มีสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอบิกสมมูลย์ต่ำกว่า พบว่า *C. racemosa* มีสารประกอบฟีนอลิก 144 ± 22 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อตัวอย่างแห้ง 100 กรัมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอบิกสมมูลย์ 14.3 ± 2.0 มิลลิกรัมสมมูลย์ของ

กรดแกลลิกต่อตัวอย่างแห้ง 100 กรัม นอกจากนี้ *P. antillarum* มีความสามารถในการลดทอนฤทธิ์อนุมูลอิสระ 15.7 ± 2.6 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง และความสามารถในจับกันของอนุมูลอิสระสูงที่สุด *C. racemosa* และ *K. alvarezzi* มีความสามารถในการลดทอนฤทธิ์อนุมูลอิสระได้ 0.737 ± 0.423 และ 0.561 ± 0.269 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีความสามารถในการจับกันของอนุมูลอิสระต่ำกว่า และการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการฟองจางสีเบต้าแคโรทีนของสาหร่ายทะเลทั้ง 3 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงเท่าเทียมกัน (Chew และคณะ, 2008)

Ganesan และคณะ (2008) ได้ประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายสีแดง 3 สายพันธุ์จากประเทศอินเดีย ได้แก่ *Euchema kappaphycus*, *Gracilaria edulis* และ *Acanthophora spicifera* โดยทำการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารสกัดหยาบเมทานอล และได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันรวมของสารสกัดเมทานอล และส่วนสกัด (fraction) ด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ ปีโตรเลียมอีเทอร์ (PE) เอทิลอะซิเตต (EA) ไดคลอโรมีเทน (DCM) บิวทานอล (BuOH) และน้ำ จากการศึกษพบว่าส่วนสกัดจาก EA ของสาหร่าย *A. spicifera* แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น (32.01 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) ส่วนสกัดจาก PE ของ *G. edulis* มีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุด (16.26 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารสกัดหยาบจากเมทานอลเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น โดยความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของ *E. kappaphycus* มีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน (α -tocopherol) และสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในสาหร่ายทุกชนิดพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Kumar และคณะ (2008) ได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย *Kappaphycus alvarezii* ที่ใช้ตัวทำละลายต่างๆ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรวมตัวกับเพอร์สไอออน การลดทอนฤทธิ์อนุมูลอิสระ และการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันด้วยวิธีเฟอร์ริกไทโอไซยาเนต จากการศึกษพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด มีค่าตั้งแต่ร้อยละ 0.683 ± 0.040 ถึง 2.05 ± 0.038 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีความสามารถในการยับยั้งเพอร์สไอออนได้ดีโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความสามารถในการยับยั้งเพอร์สไอออน คิดเป็นร้อยละ 67 ± 0.924 จากการวิเคราะห์ความสามารถในการลดทอนฤทธิ์อนุมูลอิสระ มีฤทธิ์มากตามลำดับดังนี้ สารสกัดจากเมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตต น้ำ และเฮกเซน แต่การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ BHT

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิก ของสารสกัดด้วยเมทานอล และไดเอทิลอีเทอร์จากสาหร่ายทะเล 8 ชนิดทางเหนือของเกาะบอร์เนียว ประเทศมาเลเซีย ได้แก่ สาหร่ายทะเลสีแดง 3 ชนิด (*Eucheuma cottonii*, *E. spinosum* และ *Halymenia durvillaei*) สาหร่ายทะเลสีเขียว 2 ชนิด (*Caulerpa lentillifera* และ *C. racemosa*)

และสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล จำนวน 3 ชนิด (*Dictyota dichotoma*, *Sargassum polycystum* และ *Padina* sp.) ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ 2 วิธี ได้แก่ การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐานโทรลิกซ์ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์ไอออนของโลหะ (Ferric reducing antioxidant power, FRAP) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin–Ciocalteu จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียว (*C. lentillifera* และ *C. racemosa*) และสาหร่ายสีน้ำตาล (*S. polycystum*) มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระและ ความสามารถในการรีดิวซ์ สูง รวมทั้ง มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสาหร่ายชนิดอื่นๆ (Matanjun และคณะ, 2008)

Selamassakul และคณะ (2009) ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารและศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย *Gracilaria fisheri* ซึ่งเป็นสาหร่ายที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและเป็นที่ยอมรับของประชากรทางภาคใต้ของประเทศไทย จากการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารพบว่ามีปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า คาร์โบไฮเดรต และใยอาหาร ร้อยละ 6.66, 0.11, 23.97, 64.41 และ 4.84 ตามลำดับ เมื่อศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการสกัดสาหร่ายด้วยน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียสและ ร้อยละ 80 เอทานอลที่เวลาการสกัดต่างๆ แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วย วิธี Folin–Ciocalteu พบว่าการสกัดด้วยน้ำเป็นเวลา 60 นาที มีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดเท่ากับ 46.49 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ($P > 0.001$) แต่ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าน้อยกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลโดยสารสกัดด้วยเอทานอลเป็นเวลา 36 ชั่วโมงมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 58.70 ($P > 0.001$) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกและประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายด้วยน้ำและสกัดด้วยเอทานอลพบว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระแปรตามปริมาณฟีนอลิกมีค่า $R^2 = 1.000$ และ $R^2 = 0.647$ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า *G. fisheri* เป็นแหล่งของสารอาหารและสารต้านอนุมูลอิสระทางธรรมชาติที่ดี

จากรายงานฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายทะเล 4 ชนิดทางใต้ของประเทศไทย ได้แก่ *Caulerpa racemosa* var. *macrophyssa*, *Gracilaria tenuistipitata* var. *tenuistipitata*, *Sargassum* sp. และ *Ulva lactuca* ที่เก็บได้จากพื้นที่ชายฝั่งทะเลทางใต้ของประเทศไทย เตรียมโดยนำผงสาหร่ายแห้งต้มในน้ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมงและฆ่าเชื้อตัวอย่างแต่ละชนิดที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงจากนั้นนำไปทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze-dried) และตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีการกำจัดอนุมูล DPPH อนุมูลไฮดรอกซิล และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ พบว่าการใช้วิธีการต้มสาหร่ายเพื่อให้ได้สารสกัดมีปริมาณฟีนอลิก สูงกว่าวิธีใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ยกเว้นสาหร่าย *C. racemosa* นอกจากนี้สารสกัดจากสาหร่าย *C. racemosa*, *G. tenuistipitata*, และ *U. lactuca* ที่ใช้วิธีการต้ม มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลไฮดรอกซิลพบว่าสารสกัดด้วยวิธีการต้มมีฤทธิ์น้อยกว่าการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยเฉพาะ *Sargassum* แสดงฤทธิ์มากที่สุดจากการที่มีปริมาณฟีนอลิกสูง (Yangthong และคณะ, 2009)

Wang และคณะ (2009) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยน้ำและและอะซิโตน ความเข้มข้นร้อยละ 70 จากสาหร่ายทะเล 10 สายพันธุ์ที่พบบนเกาะไอล์แลนด์ โดยวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ตรวจวัดปริมาณการดูดจับอนุมูลออกซิเจน (ORAC) และ

ความสามารถในการแย่งจับเพอร์ร็อกไซด์ไอออน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดด้วยอะซีโตนจากสาหร่ายสายพันธุ์ Furoid 3 สายพันธุ์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูง สุดและแสดง ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงสุดเช่นเดียวกัน และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ของสารสกัดจากสาหร่ายมีความสัมพันธ์ สูงกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลเพอร์ร็อกไซด์ สารสกัดด้วยน้ำมี ความสามารถในการ รวมตัวกับเพอร์ร็อกไซด์ไอออนได้ดีกว่าสารสกัดด้วยอะซีโตน แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับสารประกอบฟีนอลิกที่วิเคราะห์ได้ ทั้งนี้เป็นเพราะสารประกอบอื่นๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ โปรตีน หรือ เปปไทด์ ที่มีอยู่ในสารสกัด ที่มีผลต่อความสามารถใน การแย่งจับ เพอร์ร็อกไซด์ไอออน

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดด้วยเมทานอลหรือคลอโรฟอร์มจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Sargassum fusiforme*, *Sargassum kjellmanianum*, *Sargassum pallidum*, *Sargassum thunbergii* และ *Sargassum horneri* จากประเทศจีน โดยทำการ ทดสอบ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และการลดทอนอนุมูลอิสระ วิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วย วิธี Folin-Ciocalteu พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจาก *S. kjellmanianum* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสาหร่ายสายพันธุ์อื่น ซึ่งสารสกัดของสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลทั้งหมดมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่ำกว่ากรดแกลลิกและกรดแอสคอบิก จากนั้นนำสารสกัดสาหร่ายทะเลที่สกัดด้วยเมทานอลแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครโมโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ บิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ พบว่า ส่วนสกัดจากเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาก กว่ากรดแอสคอบิก ยกเว้น สาหร่าย *S. thunbergii* ซึ่งมีฤทธิ์ในการลดทอนอนุมูลอิสระต่ำกว่ากรดแกลลิก สารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้น 15 - 45 กรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสกัดจากเอทิลอะซิเตทมีสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดและมีขั้ว ปานกลาง (Luo และคณะ, 2010)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดของสาหร่ายสีน้ำตาลด้วยเมทานอล โดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารต้านอนุมูลอิสระ การต้านออกซิเดชันโดยการฟอกจางสีเบตาแคโรทีน และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสาหร่าย *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata* และ *Fucus serratus* ที่มีปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด สาหร่าย *Fucus vesiculosus* และ *F. serratus* ที่มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และสาหร่าย *F. vesiculosus* และ *A. nodosum* ที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดซึ่งสามารถป้องกันไม่ให้เกิดการฟอกจางสีเบตาแคโรทีน (O'Sullivan และคณะ, 2010)

Zhang และคณะ (2010) ได้ศึกษาการสกัดสาร sulfated polysaccharides จากสาหร่าย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สาหร่ายสีน้ำตาล คือ *Laminaria japonica* สาหร่ายสีแดง คือ *Porphyra haitanensis* และสาหร่ายสีเขียว 3 ชนิด ได้แก่ *Ulva pertusa*, *Enteromorpha linza* และ *Bryopsis plumose* จากนั้นทำการศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งหมด โดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide hydroxyl และ reducing power จากการวิเคราะห์ทางเคมี และ FT-IR spectrum พบว่าสารสกัดเหล่านี้เป็นโพลีแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่าโพลีแซคคาไรด์แสดงฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี

จากงานวิจัยเปรียบเทียบความสามารถในกา รต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายทะเลสีเขียว *Enteromorpha* 3 สายพันธุ์คือ *E. compressa*, *E. linza* และ *E. tubulosa* ที่สกัดด้วยตัว ทำละลายต่างๆ จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกพบว่า *E. compressa*, *E. linza* และ *E. tubulosa* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซีโ ตน เมทานอล และ อะซีโตน มีปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 11.63 ± 0.39 3.45 ± 0.18 และ 6.30 ± 0.06 ตามลำดับ สารสกัด ด้วยเมทานอลจากสาหร่าย *E. compressa* แสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด (IC_{50} 1.89 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) สารสกัดด้วยอะซีโตนจาก *E. tubulosa* แสดงการลดทอน ฤทธิ์ของอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเมื่อ เปรียบเทียบกับสารสกัดจาก *E. compressa* และ *E. linza* *tubulosa* ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดด้วยเมทานอลและโพรพานอลจาก *E. compressa* แสดงความสามารถในการรวมตัวกับเพอร์สไอออนได้ดี นอกจากนี้สารสกัดของสาหร่าย ทะเล 3 สายพันธุ์ ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเกิด จากปฏิกิริยาเป อร์ออกซิเดชันของไขมัน (Ganesan และคณะ, 2011)

Shanab และคณะ (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสาร สกัดจากสาหร่าย 9 สายพันธุ์ โดยทำการหาร้อยละของสารทุติยภูมิที่สำคัญ (ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เทอร์ฟีนอยด์ และอัลคาลอยด์) รวมถึงรงควัตถุกลุ่มไฟโคโบลีโปรตีน (ไฟโคไซยานิน แอลโลไฟ โคไซยานิน และไฟโคอีริทริน) ในสารสกัดจากสาหร่าย รวมทั้งศึกษา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสาร สกัดจากสาหร่ายโดยวิธี 2,2diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2-azino-bis (ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)) radical cation assay พบว่าฤทธิ์การต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายที่ได้จากการทดสอบ DPPH และ ABTS มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 30.1 - 72.4 และร้อยละ 32.0 - 75.9 ตามลำดับ ร้อยละ 87.25 และร้อยละ 89.4 ตามลำดับ จาก การศึกษาการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Nostoc muscorum* และ *Oscillatoria* sp. โดยศึกษาการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรตในอาหาร BG 11 ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นเป็น 3 6 และ 9 กรัม ต่อลิตร มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของสารสีไฟโคบิลิน และมีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระใน ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์

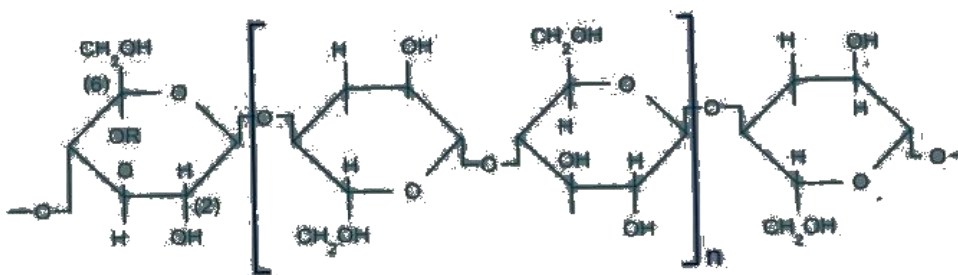
Vijayabaskar และVaseela (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด sulfate polysaccharide จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *Sargassum tenerrimum* โดยการนำสารสกัด sulfate polysaccharide ทำการวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีกายภาพ ความสามารถในการต้านอนุมูล อิสระทั้งหมด คุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH, ABTS และ อนุมูล H_2O_2) พบว่าสารสกัดที่ได้มีคาร์โบไฮเดรตสูงถึงร้อยละ 55 ± 3.61 รองลงมาได้แก่ ซัลเฟตร้อย ละ 6.6 ± 1.42 และโปรตีน ร้อยละ 0.86 ± 0.42 และพบว่าสารสกัดมีความสามารถในการต้าน อนุมูลอิสระโดยใช้วิธีการ ABTS มีค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ 70.33 ± 2.33 รองลงมาได้แก่ ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 64.66 ± 2.08 และ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ H_2O_2 มีค่าเท่ากับร้อยละ 61.56 ± 2.05 จากการทดสอบ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดมีค่าเท่ากับร้อยละ 62.55 ± 1.40

2.5 เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (วรารุณี, 2551)

2.5.1 ความหมายของเซลลูโลส

เซลลูโลส (cellulose) เป็นอินทรีย์สารที่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ทั้งจากพืช และจุลินทรีย์ ในส่วนของจุลินทรีย์จะเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดอะซิติก และยังสามารถสังเคราะห์เซลลูโลส โดยการปล่อยเส้นใยเซลลูโลส (cellulose microfibrils) ออกมานอกเซลล์ โดยเส้นใยจะรวมตัวกัน เกิดเป็นแผ่นที่ลอยอยู่บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกแผ่นที่สร้างแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกนี้ว่า “เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (bacterial cellulose)”

เซลลูโลสจากแบคทีเรียจัดเป็นสารอินทรีย์ที่บริโภคได้ ไม่มีรสชาติ ไม่มีกลิ่น และยังสามารถใช้ได้ ในอุตสาหกรรมหลายประเภท รวมถึงอุตสาหกรรมอาหาร และเซลลูโลสจากแบคทีเรียจะมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น “Nata” นิยมเรียกในประเทศฟิลิปปินส์ “วุ้นสวรรค์ หรือวุ้นน้ำมะพร้าว” นิยมเรียกในประเทศไทย เป็นต้น โครงสร้างของเซลลูโลสเป็นเส้นสายของโพลิเมอร์ที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยแต่ละหน่วยต่อกันด้วยพันธะ β - 1,4 ในระหว่างเส้นสายต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (รูปที่ 2.15) เซลลูโลสอยู่ในรูปของโครงสร้างที่ไม่ละลายน้ำ และเส้นใยเซลลูโลส (cellulose fibril) สามารถเห็นได้โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนซึ่งพบว่า เส้นใยนี้มีขนาดเล็กอยู่ในช่วงกว้างระหว่าง 1 - 25 นาโนเมตร



รูปที่ 2.15 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

ที่มา : วรารุณี (2551)

เซลลูโลสในพืชเกิดขึ้นจากการสังเคราะห์แสงในเซลล์ของพืช แต่แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถนำกลูโคสภายในเซลล์มาสานรวมกันเป็นเซลลูโลส ซึ่งเซลลูโลสที่สร้างจากแบคทีเรียนี้เรียกว่า “Bacterial cellulose” ทั้งนี้แบคทีเรียที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้อยู่ในสายพันธุ์ *Acetobacter* spp., *Achromobacter* spp., *Aerobacter* spp., *Agrobacterium* spp., *Alcaligenes* spp., *Azotobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp. และ *Sarcina* spp. แบคทีเรียเหล่านี้ไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์แสง แต่การสังเคราะห์เซลลูโลสของแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยกลูโคสหรือสารอินทรีย์บางชนิดที่อยู่ในสภาพแวดล้อมแทน อีกทั้งเซลลูโลสจากแบคทีเรียไม่ได้เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เช่นเดียวกับในกรณีของพืช

โดยธรรมชาติเซลลูโลสจากแบคทีเรียสามารถสานตัวกันจนเป็นแผ่นลอยอยู่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ทั้งนี้เนื่องจากโพลิเมอร์ที่เกิดขึ้นนั้นสามารถปล่อยออกมาจากนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่สร้างได้ สำหรับเหตุผลที่เซลลูโลสเกิดการลอยตัวมาที่ผิวนั้น สันนิษฐานว่าเกิดจากผลของฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ถูกจับอยู่ในโครงร่างแหเซลลูโลส (cellulose matrix) และก่อให้เกิดแรงขับเคลื่อน (driving force) ให้เซลลูโลสจาก

แบคทีเรียลอยขึ้นสู่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เซลลูโลสนี้มีคุณสมบัติที่ดีในด้านต่างๆ เช่น มีค่าแรงดึง (tensile strength) และความยืดหยุ่น (elasticity) ที่ดี ความสามารถในการอุ้มน้ำ (water binding capacity) สูง ไม่เป็นพิษและไม่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ อีกทั้งยังมีความสามารถในการต้านทานความร้อน (heat resistance) ที่อุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 3 ชั่วโมง และเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียนั้นบริสุทธิ์ปราศจากลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และสารอื่นๆ ซึ่งจะแตกต่างจากเซลลูโลสที่ได้จากพืชที่มีลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และสารอื่นๆ อยู่ด้วยเสมอ

2.5.2 *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*) : แบคทีเรียที่สร้างเซลลูโลสสายพันธุ์ของ *Acetobacter* spp. ที่เป็นที่รู้จักและใช้ในการผลิตเซลลูโลสกันอย่างกว้างขวาง คือ *A. aceti* ssp. *xylinum* มักเรียกว่า “*A. xylinum*” แบคทีเรีย *A. xylinum* นี้เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างท่อน เซลล์อาจอยู่เรียงต่อกัน หรือเป็นเซลล์เดี่ยว ในการสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* จะผลิตเส้นใยเซลลูโลส (cellulose microfibrils) ซึ่งมีขนาดเล็ก และขับออกมาภายนอกเซลล์ เส้นใยเซลลูโลสเล็กๆ เหล่านี้จะมาต่อกันเป็นสายยาว โดยความกว้างของเส้นใยประมาณ 3.2×133 นาโนเมตร (รูปที่ 2.16) ส่วนความยาวแปรผันตามระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก อัตราการเจริญของเส้นใยนี้ประมาณ 2 นาโนเมตรต่อนาที เส้นใยเซลลูโลสที่แบคทีเรีย *A. xylinum* ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ และเมื่อเส้นใยเซลลูโลสนี้มีจำนวนมากขึ้นเส้นสายเหล่านี้จะล้อมรอบและหุ้มตัวเซลล์ของแบคทีเรีย *A. xylinum* ไว้ภายใน



รูปที่ 2.16 เส้นใยเซลลูโลสที่ผลิตโดย *A. xylinum* เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (กำลังขยาย 10,000 เท่า): (ก) เส้นใยเซลลูโลสที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ (ศรีชี): (ข) เส้นใยเซลลูโลสล้อมรอบ และหุ้มตัวเซลล์
ที่มา : วราวุฒิ (2551)

2.5.3 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส

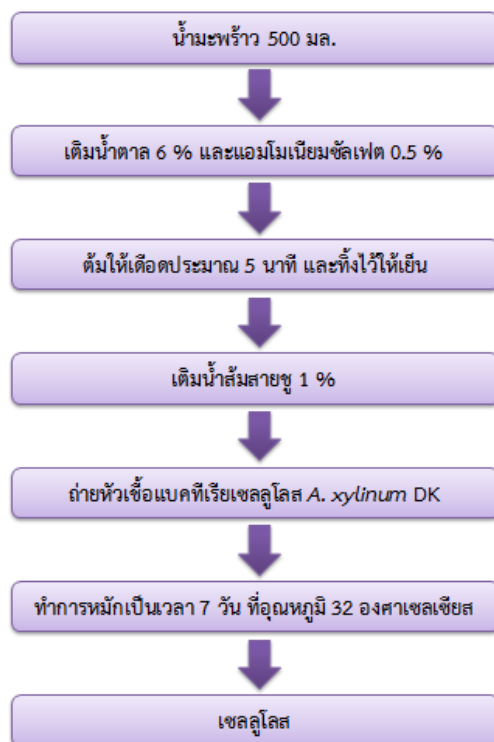
การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์นี้ ยมนำจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมาถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่จากนั้นนำไปถ่ายไว้ในอาหารเหลว เมื่อสังเกตเห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์นั้นมีการเจริญเติบโตเต็มที่ วิธีการนี้สามารถนำมาใช้ได้กับการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. xylinum* ได้เช่นกันแต่มักนิยมใช้ในการศึกษาในห้องปฏิบัติการเท่านั้น โดยอาจเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Hestrin และ Schramm (1954) ประกอบด้วย กลูโคส 20

กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.7 กรัมต่อลิตร กรดซิตริก 1.2 กรัมต่อลิตร และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 และมีอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำมะพร้าวแก่ (coconut water medium) ซึ่งนิยมใช้มาก แต่มีข้อแม้ว่าน้ำมะพร้าวนั้นควรผ่านการเก็บมาไม่เกิน 3 ชั่วโมง (นับตั้งแต่ผ่าลูกมะพร้าว) อาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำมะพร้าวนี้ไม่ต้องเติมสารอาหารใดๆ หรือถ้าต้องการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.0 ก็สามารถทำได้

2.5.4 กระบวนการผลิตเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย

โดยทั่วไปกระบวนการผลิตเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย หรือที่นิยมเรียกว่า "วุ้นน้ำมะพร้าว หรือวุ้นสรวง" นิยมใช้การหมักในสภาพนิ่ง การผลิตภายในประเทศมักเลือกใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ โดยที่ต้องควบคุมให้เวลาหลังการเก็บรวบรวมน้ำมะพร้าวจากแหล่งผลิตไม่ให้เกิน 3 ชั่วโมง เนื่องจากน้ำมะพร้าว อาจเกิดการเสื่อมเสียได้ อย่างไรก็ตามถ้าไม่สามารถนำมาใช้ในกระบวนการผลิตได้ทันที หรือวางแผนใช้น้ำมะพร้าวเกินช่วง 3 ชั่วโมงดังกล่าวทั้งนี้จำเป็นต้องมีการเติมน้ำส้มสายชู หรือกรดอะซิติกเพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของน้ำมะพร้าว เพราะน้ำส้มสายชูมีคุณสมบัติในการยับยั้ง หรือทำลายการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยทั่วไปอยู่แล้ว อีกทั้งในการผลิตเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียมีการเติมน้ำส้มสายชูประมาณร้อยละ 1 อยู่แล้ว ดังนั้นในกรณีนี้จึงเลือกใช้น้ำมะพร้าวด้วยน้ำส้มสายชูให้มีปริมาณความเป็นกรดประมาณร้อยละ 2

วัตถุดิบที่เหมาะสมและนิยมใช้นอกจากน้ำมะพร้าวแล้วยังมีวัตถุดิบชนิดอื่นที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียได้ เช่น น้ำผลไม้ (อาทิเช่น น้ำสับปะรด น้ำแตงโม) น้ำกะทิ น้ำหางกะทิ น้ำหางนมจากโรงงานผลิตเนย น้ำกาส่าจากโรงงานผลิตแอลกอฮอล์ ซึ่งมีการวิจัย Kurosumi และคณะ (2009) ได้ศึกษาการใช้น้ำผลไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำส้ม น้ำสับปะรด น้ำลูกแพร์ ญีปุ่น และน้ำองุ่น เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแบคทีเรียเซลล์ูโลส พบว่าน้ำส้ม และน้ำลูกแพร์ญีปุ่น เป็นอาหารที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียเซลล์ูโลส และพบว่าเซลล์ูโลสจะเพิ่มขึ้นเมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มลงไป ในน้ำผลไม้ นอกจากนี้แบคทีเรียเซลล์ูโลสสามารถผลิตได้จากส่วนต่างๆ ของส้ม เช่น เปลือก และส่วนที่เหลือจากการคั้น พบว่าสามารถผลิตแบคทีเรียเซลล์ูโลสได้ 0.65 กรัม (น้ำหนักแห้ง) จากส้ม 100 กรัม และของแข็งที่เหลือจากส้มประมาณ 17.2 กรัม ซึ่งขั้นตอนการผลิตเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* และลักษณะของเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียแสดงในรูปที่ 2.17 และ 2.18



รูปที่ 2.17 ขั้นตอนการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum*
ที่มา : วราวุฒิ (2551)



รูปที่ 2.18 ลักษณะของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย
ที่มา : วราวุฒิ (2551)

2.5.5 การใช้ประโยชน์เซลลูโลสจากแบคทีเรีย

การใช้ประโยชน์เซลลูโลสจากแบคทีเรีย หรือที่คนไทยรู้จัก คั้นเคยในชื่อ "วุ้นสวรรค์ หรือวุ้นน้ำมะพร้าว" นั้นมีหลากหลายรูปแบบ สามารถใช้เซลลูโลสในลักษณะสด ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่น วุ้น หรือเจล หรือลักษณะแห้งซึ่งขึ้นกับกระบวนการทำแห้ง เช่น กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze drying process) (ดังรูปที่ 2.19) นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาถึงสมบัติทางเคมี และความบริสุทธิ์ของเซลลูโลส สำหรับในประเทศไทยนั้นนิยมใช้ประโยชน์เซลลูโลสแบคทีเรียในด้านอาหาร โดยเฉพาะขนมหวาน และพรมีบ้างที่ใช้เป็นอาหารคาว ดังนั้นในการกล่าวถึงประโยชน์เซลลูโลสแบคทีเรียขอจำแนกเป็นด้านต่างๆ ได้แก่ ด้านอาหาร ด้านวัตถุปรุงแต่งอาหาร ด้านวัสดุ และด้านการแพทย์



รูปที่ 2.19 ลักษณะของแบคทีเรียเซลลูโลสที่นำมาใช้ประโยชน์ : (ก), (ข) ลักษณะสด; (ค), (ง) ลักษณะแห้งจากกระบวนการทำแห้งแบบ Freeze – dried
ที่มา : วรารุณี (2551)

1. การใช้ประโยชน์เซลลูโลสจากแบคทีเรียในด้านอาหาร

เซลลูโลสจากแบคทีเรียนิยมนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอาหาร เนื่องจากมีคุณสมบัติด้านโภชนาการ จึงได้นำมาประยุกต์เป็นแหล่งของใยอาหารในอาหารสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตขึ้นโดยใช้เซลลูโลสจากแบคทีเรีย เช่น วุ้นน้ำมะพร้าวในน้ำเชื่อมเข้มข้น หรือเรียกว่า "Nata de coco in Heavy Syrup" ผลิตภัณฑ์วุ้นน้ำมะพร้าวผสมน้ำผลไม้ เช่น น้ำลิ้นจี่ ผลิตภัณฑ์เยลลี่ โยเกิร์ต การผลิตซอสพริก และน้ำจิ้มไก่จากเศษน้ำหมัก

2. การใช้เซลลูโลสจากแบคทีเรียเพื่อผลิตสารเพิ่มความคงตัว (stabilizer)

ตามปกติแล้วคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (ซีเอ็มซี; CMC) เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภทรวมถึงอุตสาหกรรมอาหาร และมีแนวโน้มนำเข้าสูงขึ้นทุกปี การผลิต CMC จำเป็นต้องใช้วัตถุดิบที่มีปริมาณแอลฟาเซลลูโลสสูง วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตส่วนใหญ่มาจากพืชชนิดต่างๆ เช่น ฝ้าย ชานอ้อย ฟางข้าว กระดาษและไม้ ดังนั้นเซลลูโลสจากแบคทีเรียจึงเป็นวัตถุดิบทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรีย *A. xylinum* มีคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น ระดับการรวมตัว (degree of polymerization) และการเกิดผลึก (crystallinity) ใกล้เคียงกับเซลลูโลสที่

ได้จากฝ้าย แต่เซลลูโลสจากแบคทีเรียมีข้อได้เปรียบจากฝ้าย คือ เป็นเซลลูโลสที่มีองค์ประกอบเป็น แอลฟาเซลลูโลสสูงไม่มีลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสเจือปนอยู่จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็น วัตถุดิบในการผลิต CMC

ง. การใช้เซลลูโลสจากแบคทีเรียเป็นวัตถุดิบในการผลิตกระดาษ

กระดาษที่ผลิตขึ้นจะมีคุณสมบัติที่ดี แต่เดิมฟีนอลเรซิน หรือเส้นใยคาร์บอนซึ่งโดยปกติไม่สามารถทำให้เป็นแผ่นได้ แต่เมื่อนำเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* ที่ผ่านการอบแห้ง และบดเป็นผงแล้วมาผสมเพื่อใช้เป็นตัวเชื่อมจะทำให้เส้นใยเหล่านี้ขึ้นเป็นแผ่นได้ ในการผลิตกระดาษ คาร์บอน (activated carbon fiber sheets) เพื่อใช้ในการดูดซับสารพิษ การเติมเซลลูโลสจากแบคทีเรียลงไปจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษให้ดีขึ้น นอกจากนี้ แล้วยังได้มีการนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาพัฒนาใช้ในการผลิตกระดาษสา หรือเพิ่มคุณภาพของกระดาษสาอีกด้วย เซลลูโลสจากแบคทีเรียยังได้รับการพัฒนาขึ้นเป็นกระดาษกรอง เนื่องจากคุณสมบัติด้านการจับกับน้ำที่ดีจึงทำให้เหมาะสมกับการกรองสารแขวนลอยได้

จ. การใช้แบคทีเรียเซลลูโลสเป็นหนังเทียม (temporary skin substitute)

โดยอาศัยคุณภาพของเซลลูโลส และเบต้า- ดี-ไฮโมโพลีกลูแคนของแผ่นวุ้นเซลลูโลสของแบคทีเรีย *Acetobacter* spp. ทั้งนี้ได้ผลิตเป็น "ฟิล์มชีวภาพ (biofilm)" ใช้ในการรักษาแผลไหม้ และปัญหาด้านผิวหนัง อย่างไรก็ตามในการพัฒนาอย่างต่อเนืองมีแนวโน้มที่จะมีการนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียไปประยุกต์ร่วมกับเทคโนโลยีทางด้านนาโน เพื่อผลิตหนังเทียมที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับธรรมชาติยิ่งขึ้น

ฉ. การนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับโพลิเมอร์อื่นๆ เช่น โพลีไวนิลแอลกอฮอล์

เพื่อผลิตวัสดุที่มีความแข็งแรง และทนทานใช้เป็นสารให้ความหนืด และความคงตัวในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องสำอาง และใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพในด้านของเยื่อใย และกากอาหาร ทั้งยังเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักอีกด้วย เนื่องจากคุณสมบัติของเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่ดี และเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่ดีที่จะมีการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่างๆ ทั้งในด้านอาหาร และไม่ใช่อาหาร เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ต่อไป

2.6 บรรจุภัณฑ์แอคทีฟ (Active packaging) (Rhim และคณะ, 2007)

บรรจุภัณฑ์แอคทีฟ คือ นวัตกรรมที่ทำการควบคุมองค์ประกอบต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ทางด้านอาหาร เช่น ทางกายภาพ และทางเคมี เป็นต้น และยังมีการเติมสารทั้งที่เป็นสารเคมี และสารสกัดจากธรรมชาติลงไป เพื่อควบคุมให้ผลิตภัณฑ์มีการยืดอายุในการเก็บรักษาออกไปได้นานขึ้น ซึ่งการทำบรรจุภัณฑ์แอคทีฟนั้นจะมีการเติมสารต่างๆ ลงตามความเหมาะสมของผลิตภัณฑ์ เช่น สารดูดออกซิเจน สารต้านอนุมูลอิสระ สารยับยั้งการเกิดเชื้อรา สารยับยั้งจุลินทรีย์

หน้าที่ของบรรจุภัณฑ์แอคทีฟ

หน้าที่ของบรรจุภัณฑ์แอคทีฟ คือ ปกป้องอาหาร และควบคุมสภาพบรรยากาศภายในบรรจุภัณฑ์ โดยการยอม หรือสกัดกั้นไม่ให้มีการแพร่ผ่านของก๊าซต่างๆ เข้าสู่ผลิตภัณฑ์ตามความเหมาะสมของผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เพื่อยืดอายุในการเก็บรักษา และรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์

ในปัจจุบันการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่สามารถกินได้ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการลดขยะพลาสติกแล้วยังเพิ่มคุณภาพของอาหารอีกด้วย โดยบรรจุภัณฑ์ทำหน้าที่ปกป้อง

ผลิตภัณฑ์กับสภาพแวดล้อมโดยรอบ (Yu และคณะ, 2013) แนวคิดดั้งเดิมของบรรจุภัณฑ์ คือ การรักษาคุณภาพของ ผลิตภัณฑ์โดยที่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์กับบรรจุภัณฑ์ น้อยที่สุด อย่างไรก็ตามในปีที่ผ่านมาบรรจุภัณฑ์มีความหลากหลายมากขึ้น เทคโนโลยีบรรจุภัณฑ์ แอคทีฟค่อนข้างใหม่ แนวคิดที่มุ่งเน้นสำหรับยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์การรักษาคุณภาพทางโภชนาการ และทางประสาทสัมผัส รวมทั้งความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ ได้มีการศึกษา ความสามารถของ พิล์มบิโกลิไดร์ หรือความสามารถของบรรจุภัณฑ์ที่ เคลือบด้วยวัตถุเจือปนอาหารบางชนิด เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ ยาต้านจุลชีพ สารสี กลิ่นรส วิตามิน สารอาหาร และเครื่องเทศต่างๆ เป็นต้น (Sayanjali และคณะ, 2011)

2.7 กุนเชียง (รุจริน, 2555)

กุนเชียงเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แบบลดรูปชนิดบดหยาบ คือ ชิ้นเนื้อถูกบดด้วยเครื่องบดแบบธรรมดา เพื่อย่อยขนาดโครงสร้างของชิ้นเนื้อลง แต่ไม่ถึงระดับเส้นใยกล้ามเนื้อ

กุนเชียงเป็นผลิตภัณฑ์จาก เนื้อสัตว์ในกลุ่มไส้กรอกประเภทไส้กรอกกึ่งแห้ง (semi-dry) มีส่วนผสมที่สำคัญได้แก่ เนื้อหมู และมันหมู มีการปรุงรสด้วยไวน์ น้ำตาล ซอสถั่วเหลือง เป็นต้น ไม่มีการหมักด้วยจุลินทรีย์พวกที่สร้างกรดแลกติก (Chen และคณะ, 2007) ทำให้กุนเชียงมีเนื้อสัมผัสรสชาติ และกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์ นอกจากนี้ยังมีการเติมวัตถุเจือปนที่ใช้ในอาหารลงไปในกุนเชียง ได้แก่ ไนไตรต์ ผงเพรก เกลือฟอสเฟต โซเดียมอิริโธเบท เป็นต้น

2.7.1 วัตถุเจือปนที่ใช้ในการผลิตกุนเชียง

ก. ไนไตรต์

ไนไตรต์ช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีสีสวยขึ้น มีกลิ่นรสที่ดีขึ้น และช่วยลดการเกิดกลิ่นเหม็นหืน นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อ *Clostridium botulinum* ที่ตรวจพบเป็นปัญหาในหน่อไม้ปี๋เมื่อหลายปีก่อน แต่การใช้เกลือไนไตรต์นั้นจะต้องมีความระมัดระวัง เนื่องจากการใช้ในปริมาณมากเกินไปอาจมีปัญห ำเกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์ เมื่อรวมตัวกับสารประกอบเอมีนในอาหารสามารถเปลี่ยนเป็นสารก่อมะเร็งได้ ซึ่งสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้กำหนดให้ใช้ไนไตรต์ในปริมาณไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อเนื้อ 1 กิโลกรัม

ข. ผงเพรก

ผงเพรก คือส่วนผสมของเกลือบิโกลิไดร์ (โซเดียมคลอไรด์) และสารประกอบไนไตรต์ เนื่องจากความลำบากในการชั่งเกลือไนไตรต์ปริมาณน้อยๆ ให้มีความถูกต้อง จึงได้มีการผสมเกลือไนไตรต์เข้ากับเกลือบิโกลิไดร์เพื่อให้ชั่งตวงได้สะดวกขึ้น ซึ่งส่วนนี้มีชื่อเรียกทางการค้าแตกต่างกันไป โดยทั่วไปจะมีส่วนผสมของไนไตรต์ประมาณร้อยละ 0.5 ถึง 20 ขึ้นอยู่กับผู้ผลิต

ค. เกลือฟอสเฟต (มิกซ์ฟอสเฟต)

เกลือฟอสเฟต (มิกซ์ฟอสเฟต) ช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัส ช่วยลดการเกิดกลิ่นเหม็นหืน หากใช้ในปริมาณมากเกินไปจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเฝื่อน ซึ่งสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้กำหนดให้ใช้เกลือฟอสเฟตในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ไม่เกิน 3 กรัมต่อเนื้อ 1 กิโลกรัม

ง. โซเดียมอิริโทรเบท

โซเดียมอิริโทรเบทช่วยให้ไนโตรดสลายตัวได้เร็วขึ้น ลดปัญหาการตกค้าง และลดโอกาสการเกิดสารก่อมะเร็งเพิ่มความปลอดภัยให้กับผลิตภัณฑ์ ช่วยปรับปรุงสีของผลิตภัณฑ์ และยืดอายุการเก็บรักษา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอนุญาตให้ใช้ได้ปริมาณ 300 มิลลิกรัม ต่อเนื้อ 1 กิโลกรัม

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารสกัดจากธรรมชาติในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร

ในอุตสาหกรรมอาหารการใช้ สารเคลือบแผ่นฟิล์มที่สามารถรับประทานได้กำลังเป็น เรื่องที่น่าสนใจอย่างมาก เนื่องจากศักยภาพของแผ่นฟิล์มที่เคลือบสารสามารถเพิ่ม อายุการเก็บของ ผลิตภัณฑ์อาหาร รักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ และผู้บริโภคปลอดภัยจากจุลินทรีย์ จึงส่งผลให้นักวิจัยหลายคนได้มุ่งเน้นศึกษา บรรจุภัณฑ์ อาหารจากแผ่นฟิล์มที่ย่อยสลาย ได้จากโพลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน (Norajit และคณะ, 2010)

Abreu และคณะ (2011) ได้ศึกษาการใช้ active packaging film ที่ใช้สารต้านอนุมูลอิสระ จากธรรมชาติจากเปลือกข้าวบาร์เลย์ โดยศึกษาการเกิดออกซิเดชันของไขมันในฉลามสีน้ำเงินแซ่แข็ง (*Prionace glauca*) ในการตรวจสอบการชะลอการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว PUFA ของเนื้อฉลามสีน้ำเงิน ชิ้นปลาฉลามสีน้ำเงินจะถูกบรรจุในฟิล์มชนิด low density polyethylene (LDPE) ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ (ตัวอย่าง $C_1=7 \text{ mg/dm}^2 \text{ film}$ และตัวอย่าง $C_2=24 \text{ mg/dm}^2 \text{ film}$) หรือในฟิล์ม LDPE โดยไม่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (ตัวอย่างควบคุม) และนำไปแช่แข็ง เป็นเวลา 12 เดือน จากการศึกษาพบว่าค่าเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในตัวอย่างควบคุม ในช่วง 6 เดือนแรก มากกว่าในตัวอย่าง C_1 และ C_2 และกรดไขมันอิสระมีปริมาณสูงขึ้นอย่างมี นัยสำคัญในตัวอย่างควบคุมมากกว่าในตัวอย่าง C_1 และ C_2 ในระหว่างระยะเวลา 12 เดือนที่ ทำการศึกษาเมื่อพิจารณาระยะเวลา 6 เดือนที่ทำการเก็บรักษา พบว่าความเข้มข้นของกรด thiobarbituric ในตัวอย่าง C_1 และ C_2 มีค่าต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยา hydrolytic และการเกิดออกซิเดชันของไขมันมีความไวต่อสารต้านอนุมูล อิสระและระยะเวลาในการเก็บรักษา และผลที่ได้ยืนยันถึงประสิทธิภาพของ active packaging ที่มี สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่ได้มาจากเปลือกข้าวบาร์เลย์สามารถชะลอกระบวนการย่อยไขมันและ เพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์ออกซิเดชันในเนื้อฉลามสีน้ำเงิน

จากการศึกษา antioxidant active packaging สำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อไก่แปรรูป โดยใช้ สภาวะแรงดันสูง ซึ่งผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ทำจากอกไก่สด และสะโพกไก่จะถูกบรรจุในสภาวะสุญญากาศ (ชุดควบคุม) หรือในภาชนะจากนั้นนำไปให้แรงดันสูง (800 MPa เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส) และเก็บรักษาเป็นเวลา 25 วัน ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ทำการศึกษาการเกิด ออกซิเดชันของไขมันบนพื้นผิว และด้านในของก้อนเนื้ออบ (meat patties) พบว่าบริเวณพื้นผิวด้าน นอกของก้อนเนื้ออบจะเกิดออกซิเดชันของไขมันสูง และการใช้ active packaging สามารถที่จะ ชะลอการเกิดออกซิเดชันของไขมันได้ถึง 25 วัน ซึ่งการเกิดออกซิเดชันของไขมันบริเวณด้านในของ meat patties จะถูกจำกัด แต่จะถูกยับยั้งบริเวณพื้นผิวของ active packaging นอกจากนี้ยังพบว่า ผลของการเกิดออกซิเดชันของไขมันเมื่อใช้แรงดันสูงไม่สามารถอธิบายได้ว่าเกิดจากความเสียหายของ เยื่อหุ้มเซลล์เพียงอย่างเดียว แต่อาจเกิดจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเนื้อสัตว์ในระหว่างการให้แรงดัน สูง (Bolumar และคณะ, 2011)

Camo และคณะ (2011) ได้ศึกษาอายุการเก็บรักษาของ สเต็กเนื้อสด ที่ถูกพ่นด้วยสารสกัด ออริกาโนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 2 และ 4 โดยตัวอย่างควบคุมสเต็กเนื้อสด ที่ไม่ถูกพ่นด้วยสาร สกัดออริกาโนจะใช้เป็นตัวอย่างควบคุม จากนั้นบรรจุสเต็กเนื้อสดในภาชนะบรรจุ ซึ่งจะถูกเติมด้วย แก๊ส CO₂ ร้อยละ 80 O₂ ร้อยละ 20 และเก็บภายใต้แสงสว่าง (14 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 1 ± 1 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ทำการตรวจสอบการสร้าง Metmyoglobin การเกิดออกซิเดชันของ ไขมัน (TBARS) การเปลี่ยนแปลงสี (CIE a^*) และประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านสี กลิ่น รสชาติทั้งหมดของออริกาโน จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างเนื้อที่พ่นด้วยสารสกัดออริกาโนจะช่วยเพิ่มความคง ตัวของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดออริกาโน สำหรับอายุการ เก็บรักษาของตัวอย่างเนื้อพบว่าต้องใช้สารสกัดออริกาโนที่มีความเข้มข้นอย่างน้อยร้อยละ 1 ซึ่ง สามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญที่ 14 - 23 วัน และพบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัด ออริกาโนร้อยละ 4 จะก่อให้เกิดกลิ่นที่ไม่ยอมรับ ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดออริกาโนที่ เหมาะสมที่สุดในการทำ active packaging ควรจะอยู่ในช่วงร้อยละ 1 - 2

Contini และคณะ (2012) ได้ศึกษาการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่ประกอบด้วย สารต้านอนุมูล อิสระจากธรรมชาติ 2 ชนิด ได้แก่ ภาชนะพลาสติกที่ได้จาก PET และฉีดยาพ่นด้วยสารสกัดจากผล citrus และ α -tocopherol ทำการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของทั้งสองบรรจุภัณฑ์ โดยบรรจุเนื้อสัตว์ปิ้งสุก และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากผล การวิเคราะห์การ เกิดออกซิเดชันของไขมันในตัวอย่างที่บรรจุในภาชนะบรรจุที่เคลือบด้วยสารสกัดจากผล citrus ด้วย วิธี TBARS พบว่าการเกิดออกซิเดชันของไขมันต่ำกว่าแบบที่ไม่เคลือบอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p < 0.01$) ส่วนตัวอย่างเนื้อที่บรรจุในภาชนะที่เคลือบด้วย α -tocopherol ไม่ได้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใดๆ

Contini และคณะ (2012) ได้ศึกษาการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่ประกอบด้วยสารต้านอนุมูล อิสระจากธรรมชาติ 2 ชนิด ได้แก่ ภาชนะพลาสติกที่ได้จาก PET และฉีดยาพ่นด้วยสารสกัดจากผล citrus และ α -tocopherol ทำการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ ทั้งสองบรรจุภัณฑ์ โดยบรรจุเนื้อสัตว์ปิ้งสุก และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากผลการวิเคราะห์การ เกิดออกซิเดชันของไขมันในตัวอย่างที่บรรจุในภาชนะบรรจุที่เคลือบด้วยสารสกัดจากผล citrus ด้วย วิธี TBARS พบว่าการเกิดออกซิเดชันของไขมันต่ำกว่าแบบที่ไม่ เคลือบอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p < 0.01$) ส่วนตัวอย่างเนื้อที่บรรจุในภาชนะที่เคลือบด้วย α -tocopherol ไม่ได้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใดๆ

Hadder และคณะ (2012) ได้ศึกษาการทำงาน และคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระของ แผ่นฟิล์มเจลลาตินที่ทำจากหนังปลาทูน่า (*Thunnus thynnus*) ร่วมกับสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Cystoseira barbata*) ที่สกัดด้วยน้ำ หรือสกัดด้วยเมธานอล โดยทำการวิเคราะห์คุณสมบัติการต้าน อนุมูลอิสระ (ferric-reducing ability และ DPPH-radical-scavenging capacity) โดย เปรียบเทียบแผ่นฟิล์มเจลลาตินที่ทำจากหนังปลาทูน่าที่ผสมด้วย BHA จากการทดลองพบว่าคุณสมบัติ ต้านอนุมูลอิสระ ของฟิล์มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มสารสกัดจากสาหร่ายลงไปบนแผ่นฟิล์ม

Jung และคณะ (2009) ได้ศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเนื้อหมู และเนื้อปลาโดยใช้ แผ่นฟิล์มพลาสติก กที่เคลือบด้วยไมโครแคปซูลที่บรรจุสาร ระเหยของสารสกัด ด้วยเมทานอล horseradish จากผลการวิเคราะห์ HPLC ได้ยืนยันว่าในสารสกัดมีสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ อยู่ และจากการทดลองพบว่า การห่อหุ้มเนื้อหมู และเนื้อปลาด้วยแผ่นฟิล์มที่มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยา ออกซิเดชันมีผลทำให้การเปลี่ยนแปลงสีเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน รวมทั้งการเหม็นหืนที่ช้าลง

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการใช้สารสกัดจาก horseradish เคลือบแผ่นฟิล์มซึ่ง เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความคงตัวของเนื้อหมู และเนื้อปลาได้

Norajit และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแผ่นฟิล์มแอลจินต์ที่สามารถย่อยสลายได้ร่วมกับสารสกัดจากโสมขาว และโสมแดง พบว่าแผ่นฟิล์มแอลจินต์ที่มีสารสกัดจากโสมมีปริมาณความชื้นที่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ยกเว้นแผ่นฟิล์มที่ไม่มีสารสกัดจากโสมซึ่งมีความชื้นสูงสุด นอกจากนี้แผ่นฟิล์มที่ผสมสารสกัดจากโสมมีค่าความต้านการดึง และค่าความยืดหยุ่นโมดูลัสที่ลดลง แต่มีจุดที่ยึดตัวจนขาดมีร้อยละเพิ่มมากขึ้น และการเติมสารสกัดของโสมลงในแผ่นฟิล์มไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติการซึมผ่านไอน้ำของแผ่นฟิล์ม แผ่นฟิล์มแอลจินต์ที่เติมสารสกัดจากโสมขาวที่ผลิตที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) สูงที่สุด (61.12%) ในเมทานอล รองลงมาได้แก่แผ่นฟิล์มที่มีสารสกัดจากโสมแดงที่ใช้อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากโสมขาวมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า ที่จะใช้ร่วมกับแผ่นฟิล์มแอลจินต์ที่จะทำหน้าที่เป็นแผ่นฟิล์มที่สามารถต้านสารอนุมูลอิสระได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

3.1.1 สำหรับเชื้อขนาดเล็กที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังจำนวน 10 สายพันธุ์ได้แก่

1. *Ankistrodesmus* sp. W53
2. *Chlamydomonas* sp. W53
3. *Chlorella* sp. E53
4. *Chlorella* sp. ED53
5. *Chlorella* sp. W53
6. *Chlorella* sp. W54
7. *Chlorella* sp. W55
8. *Chlorococcum* sp. C53
9. *Monoraphidium* sp. W53
10. *Scenedesmus* sp. W53

3.1.2 แบคทีเรีย *Gluconacetobacter xylinus* TISTR 976 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.2 วัตถุดิบ

1. น้ำมะพร้าวแก่
2. หมูเนื้อแดงส่วนสะโพก
3. มันแข็ง
4. ผงเพรก (มีส่วนผสมของไนไตรท์ ร้อยละ 05)
5. เกลือฟอสเฟต
6. โซเดียมอิริโธเบต
7. ถุงพลาสติกชนิด polyethylene (PE) ขนาด 8X12 นิ้ว

3.3 สารเคมี

1. Absolute ethanol : Lab-Scan (Analytical reagent)
2. Folin-ciocalteu reagent : Merck #109001
3. Gallic acid monohydrate : Aldrich #27645
4. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) : Sigma #D9132
5. Butylated hydroxy toluene (BHT) : Sigma Aldrich #B1378
6. Ferrozine : Fluka # 82950
7. Iron (II) chloride tetrahydrate : Merck # 103861

8. EDTA disodium salt : Merck # 108418
9. Linoleic acid : Sigma Aldrich # 62240
10. Sodium dihydrogen phosphate dehydrate : Fluka # 71500
11. Thiobarbituric acid : BDH # 30408
12. Trichloroacetic acid : Fisher Scientific # 1088006
13. Malonaldehyde bis (MDA) : Acros Organics
13. สูตรอาหาร BB (ภาคผนวก ก- 1)
14. สูตรอาหาร N-8 (ภาคผนวก ก-2)
15. สูตรอาหาร BG-11 (ภาคผนวก ก-3)
16. สูตรอาหาร HS (Hestrin and Schramm) (ภาคผนวก ก-4)
17. อาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก-5)

3.4 อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ : Olympus รุ่น CH30
2. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) : Heidolph
3. เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer) : Thermolyne รุ่น Cimarec 2
4. เครื่องเขย่า (Shaker) : Gallenkamp รุ่น MUA/USEEP
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking water bath) : Lab companion รุ่น BS -21
6. เครื่องชั่งน้ำหนักสี่ตำแหน่ง : Ohaus รุ่น AR 2140
7. เครื่องเติมอากาศ (Pump) : LifeTech รุ่น Aquarium air pump 9830
8. เครื่องทำแห้งเยือกแข็งภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Lyophilized) : Welch รุ่น Lyolab 3000
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) : HAILEA รุ่น ACO - 318
10. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) : Becthai รุ่น Helios Alpha
11. ตู้แช่แข็ง (Freezer) : Sanyo รุ่น MDF - U4086S
12. ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (Laminar air flow) : Maxel Technology รุ่น LA-CLEANLINE BS-120
13. เครื่องวัดพีเอช (pH Meter) : Denver Instrument รุ่น UB10
14. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) : Contherm รุ่น Thermotech 2000 OVEN
15. หม้อหนึ่งอัดไอ (Autoclave) : Hirayama รุ่น HA - 300 M IV
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) : PolyScience รุ่น 20L – M
17. ตู้อบแห้งแบบถาด (Tray drier)
18. เครื่องแก้ว เช่น ฟลาสก์ ปีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต และอื่นๆ

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ 10 สายพันธุ์

นำตัวอย่างเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่คัดแยกได้มาทำให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็งโดยสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlamydomonas* sp. W53 เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร BG - 11 ส่วน *Ankistrodesmus* sp. W53, *Chlorella* sp. E53, *Chlorella* sp. W53, *Chlorella* sp. W54, *Chlorella* sp. W55, *Chlorococcum* sp. C53, *Monoraphidium* sp. W53, *Scenedesmus* sp. W53 เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N-8 และ *Chlorella* sp. ED53 เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร BB เพื่อทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (Large scale) โดยมีวิธีการดังนี้

3.5.1.1 การเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่าย

1. เตรียมอาหารแข็งสูตร BG-11, N-8 และ BB ในจานเพาะเลี้ยง
2. เลือกโคโลนีที่เหมาะสมมาทำการคัดแยกสาหร่าย ที่เก็บไว้ในหลอดอาหารผิวเอียง แยกสาหร่ายที่จะนำมาใช้ในการทดสอบด้วยเทคนิค Cross streak เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์
3. นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยมีการให้แสงสว่างตลอดเวลาด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์)
4. เลือกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยดูลักษณะของเซลล์และองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อยืนยันผลว่าเป็นสาหร่ายสายพันธุ์ที่ต้องการและเก็บโคโลนีของสาหร่ายบริสุทธิ์แต่ละสายพันธุ์ลงในหลอดอาหาร เพื่อเก็บเป็นหัวเชื้อสำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.1.2 การเตรียมหัวเชื้อของสาหร่าย

1. เตรียมอาหารเหลวสูตร BG - 11 สูตร N - 8 และสูตร BB ในพลาสติกบูชขนาด 250 มิลลิลิตรพลาสติก 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำอาหารที่เตรียมได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. ถ่ายตัวอย่างสาหร่ายจากอาหารผิวเอียงลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ขวดละ 1 - 2 ลูป (Loop) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique)
3. นำขวดอาหารที่ลงเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยง โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง อัตราการเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ให้อากาศและแสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์อย่างต่อเนื่อง และทำการสุ่มวัดค่าการดูดกลืนแสงจนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร จึงนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณที่มีขนาดใหญ่ต่อไป

3.5.1.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย เพื่อเพิ่มปริมาณที่มีขนาดใหญ่

1. นำถังน้ำพลาสติกขนาด 6 ลิตร ไปฆ่าเชื้อโดยแช่เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการลวกน้ำร้อนเพื่อกำจัดเอทานอล
2. เตรียมอาหารเหลวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ปริมาตร 4 ลิตร ลงในถังน้ำพลาสติกขนาด 6 ลิตร
3. เติมหหัวเชื้อสาหร่ายที่เตรียมไว้ (จากข้อ 3.5.1.2) ลงไปร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

4. ต่อสายยางจากเครื่องเติมอากาศลงในแต่ละถังที่ใช้เพาะเลี้ยงให้มีความแรงของอากาศพอเหมาะและให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงประมาณ 30 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์ของสาหร่ายอยู่ในระยะการเจริญเติบโตคงที่ (Stationary phase) จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์

3.5.1.4 การเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย

1. ปิดเครื่องเติมอากาศ เอาสายยางที่ให้อากาศออก จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เซลล์สาหร่ายตกตะกอนลงมาถึงก้นถังเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 1 – 2 วัน สังเกตสารละลายส่วนบนของอาหารหากมีความขุ่นหรือเขียวอยู่ ให้ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งสารละลายส่วนบนใส
2. เทสารละลายใสส่วนบนออก นำส่วนตะกอนของสาหร่ายบริเวณก้นถังไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
3. เทสารละลายใสส่วนบนทิ้งไป และนำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำตัวอย่างสาหร่ายแห้งที่ได้มาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดเป็นเวลาประมาณ 15 นาทีด้วยแรงที่คงที่ และเก็บตัวอย่างสาหร่าย ที่บดแล้วในภาชนะบรรจุที่สะอาดที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3.5.2 การสกัดสารสกัดหยาบจากสาหร่าย

นำสาหร่ายที่เตรียมไว้มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ น้ำร้อน และเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ซึ่งมีวิธีการสกัดโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Jaime และคณะ (2010) ดังนี้

3.5.2.1 การสกัดด้วยน้ำ

1. นำตัวอย่างสาหร่าย 5 กรัม มาสกัดด้วยน้ำร้อน 50 มิลลิลิตร นำส่วนผสมมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสและทำการเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
2. นำส่วนผสมที่ได้จากการสกัดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส
3. แยกสารละลายส่วนด้านบนออกและนำส่วนเซลล์ (Pellet) ไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยวิธีเดิม จากนั้นนำส่วนของสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งไปทำให้แห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการวิเคราะห์ ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

3.5.2.2 การสกัดด้วยเอทานอล

1. นำตัวอย่างสาหร่าย 5 กรัม มาสกัดด้วยเอทานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำส่วนผสมมาเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
2. นำส่วนผสมที่ได้จากการสกัดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส
3. แยกสารละลายส่วนบนออกและนำส่วนเซลล์ไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยวิธีเดิม นำส่วนของสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งไปทำให้แห้งโดยเหวี่ยงเอาเอทานอลออกด้วย

เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการวิเคราะห์ ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

นำตัวอย่างสารสกัดหยาบ บดด้วยน้ำร้อนและเอทานอล ของสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์มาทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method ที่ดัดแปลงมาจาก Kumar และคณะ (2008) มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. นำสารสกัดหยาบจากสาหร่าย ที่ละลาย ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตรในหลอดทดสอบ
2. เติม Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ส่วนผสมเข้ากัน
3. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน
4. ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วเขย่าส่วนผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที
5. นำส่วนผสมไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร
6. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในรูปมิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัม ของสารสกัด โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกและค่าดูดกลืนแสง ทำการทดลองตัวอย่างละ 6 ซ้ำ

3.5.4 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย

3.5.4.1 ความสามารถในการกำจัด อนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical) ดัดแปลงจากวิธีการของ Kumar และคณะ (2008) มีวิธีการดังนี้

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน DPPH ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ใน Absolute ethanol
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT (ใช้เป็นสารมาตรฐาน ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ความเข้มข้น 0.025 – 0.200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน Absolute ethanol
3. เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 0.4 - 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด
4. เติมสารละลายของสารสกัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมทันทีหลังจากเติม DPPH
5. เก็บส่วนผสมทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที
6. นำส่วนผสมไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์
7. บันทึกค่าดูดกลืนแสงและนำค่าดูดกลืนแสง ที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging capacity) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT ทำการทดลองตัวอย่างละ 6 ซ้ำ

$$\text{Scavenging capacity (SC) \%} = \left[\frac{A_0 - (A - A_b)}{A_0} \right] \times 100$$

กำหนดให้ $A_0 = A_{517}$ ของ DPPH ที่ไม่เติมตัวอย่างสารสกัด

$A = A_{517}$ ของตัวอย่างสารสกัดผสมกับ DPPH

$A_b = A_{517}$ ของตัวอย่างสารสกัดที่ไม่เติม DPPH

8. คำนวณหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่าง ที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (50 % Effective concentration : EC₅₀) จากกราฟระหว่างร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายหรือสารมาตรฐาน BHT

3.5.4.2 การตรวจสอบความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน (Ferrous ion - chelating ability assay) ดัดแปลงจากวิธีการของ Wang และคณะ (2009) มีวิธีการดังนี้

1. ปิเปตสารละลายสารสกัดจากสาหร่ายความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 2.7 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายเฟอร์รัสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน

3. เติมสารละลาย Ferrozine ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันเพื่อเริ่มปฏิกิริยา จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

4. นำส่วนผสมของสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำการทดลองตัวอย่างละ 6 ซ้ำ

5. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน EDTA- Na_2 ที่ความเข้มข้น 0.00005 0.0001 0.0005 0.001 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรดังนี้

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100$$

โดยที่ A_0 = ค่าดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาควบคุม

A_1 = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน EDTA- Na_2

A_2 = ค่าดูดกลืนแสงของ blank

หมายเหตุ 1. ปฏิกิริยาควบคุม (Control) ให้ใช้ตัวทำละลาย 2 มิลลิลิตรแทนสารสกัด

2. blank ให้ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรแทนสารละลาย ferrozine

3.5.4.3 การวิเคราะห์การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก ของสารสกัด ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substances ดัดแปลงจาก Panphadung (2004) และ Ismail และคณะ (2010)

1. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. เตรียมสารละลายกรดลิโนเลอิกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 น้ำหนักโดยปริมาตรในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

2. นำสารละลายกรดคลีนเลือกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมสารละลายด้วยเครื่องกวนสารละลาย

3. เติมสารละลายของสารสกัดหยาดสาหร่ายที่สกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลที่มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปในขวดไวแอล แล้วตามด้วยสารละลายผสมข้อ 2 จากนั้นทำการผสมให้เข้ากัน

4. นำสารละลายตัวอย่างข้อ 3 ไปปั่นในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

5. ชุดควบคุมมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นแต่ ไม่เติมสารสกัดจากสาหร่าย และใช้ BHT เป็นชุดควบคุมเชิงบวก

2. การวิเคราะห์ปฏิกิริยา

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง

2. เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายกรดไทโอบาร์บิทูริกความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ใส่แทนสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตรเพื่อใช้เป็นแบล็ก

3. นำสารละลายผสมต้มในน้ำต้มเดือดเป็นเวลา 20 นาที เพื่อเร่งการเกิดปฏิกิริยา

4. ทำให้สารละลายผสมให้เย็นลงและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

5. ปิเปตส่วนใส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 6 ซ้ำ

6. นำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งปฏิกิริยา ดังนี้

$$\text{ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

โดยที่ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรของตัวควบคุม

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรของตัวอย่าง

3.6 การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่าย ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลล์โลส ในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน

ในการศึกษาการประยุกต์ใช้สารสกัดหยาดสาหร่ายมาใช้ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลล์โลส จะทำการคัดเลือกสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวเพียง 1 สายพันธุ์ ที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีโดยเฉพาะความสามารถในการ ยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน เพื่อนำไปใช้ศึกษาการยับยั้ง ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์เนื้อ

3.6.1 การเตรียมแผ่นฟิล์มเซลล์ูโลส (ดวงใจ, 2549)

3.6.1.1 การเตรียมหัวเชื้อ

1. นำเชื้อ *Gluconacetobacter xylinus* TISTR 976 ที่เก็บในโคโอ ทิว (cryotube) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ลงเพาะเลี้ยงในอาหาร HS broth แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จะเกิดแผ่นเซลล์ูโลสบางๆบริเวณผิวหน้าของอาหาร

2. ใช้ลูป (loop) ตะในอาหาร HS broth มาลากลงบนอาหาร HS medium ด้วยเทคนิค Cross streak บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวของเชื้อ

3. นำเอาโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาลงในอาหาร HS broth ที่เตรียมไว้ในขวดไวแอล (Vial) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

4. นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ที่เตรียมไว้ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหารขวดละ 100 มิลลิลิตร โดยถ่ายเชื้อ *G. xylinus* TISTR 976 ในสัดส่วน 1 ขวดไวแอลต่อปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จะได้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ูโลส

3.6.1.2 การผลิตแผ่นเซลล์ูโลสโดยใช้อาหารสูตรน้ำมะพร้าว

1. นำหัวเชื้อ *G. xylinus* TISTR 976 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (จากข้อ 3.3.1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหารสูตรน้ำมะพร้าว 90 มิลลิลิตร

2. นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.6.1.3 การทำให้แผ่นเซลล์ูโลสบริสุทธิ์

1. ทำการเก็บเกี่ยวแผ่นเซลล์ูโลสออกจากอาหาร แล้วนำไปล้างด้วยน้ำเพื่อกำจัดองค์ประกอบของอาหารและเศษเซลล์ออก

2. นำแผ่นเซลล์ูโลสมาต้มด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียออกจากแผ่นเซลล์ูโลส

3. จากนั้นนำมาแช่น้ำทิ้งไว้โดยเปิดน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้ได้ค่า pH ที่เป็นกลางและแผ่นเซลล์ูโลสที่มีสีขาว

3.6.1.4 การผลิตแผ่นฟิล์มเซลล์ูโลส

1. นำแผ่นเซลล์ูโลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเข้าเครื่องอัดรีดน้ำ โดยใช้แรง 7 ตัน จะได้แผ่นเซลล์ูโลสที่มีลักษณะบาง โดยมีความหนา 0.5 มิลลิเมตร

2. นำแผ่นเซลล์ูโลสที่ได้มา มาแช่ด้วยหมอนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แผ่นฟิล์มเซลล์ูโลสที่ได้จะนำมาใช้ศึกษาร่วมกับสารสกัดจากสาหร่ายต่อไป

3.6.2 การใช้สารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลล์ูโลสในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน

3.6.2.1 การศึกษาความสามารถในการยับยั้ง ปฏิกริยาเปอร์ออกซิเดชัน ของไขมันของสารสกัดจากสาหร่าย ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Panphadung (2004) และ Ismail และคณะ (2010)

1. การเตรียมสารละลายกรดลิโนเลอิก

1. เตรียมสารละลายกรดลิโนเลอิกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 น้ำหนักโดยปริมาตร ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

2. นำสารละลายกรดลิโนเลอิกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer

2. การเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย

1. เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย โดยใช้ความเข้มข้นเป็น 1 1.5 2 2.5 3 3.5 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

1. ปิเปตสารละลายกรดลิโนเลอิก ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ลงไปในขวดสีชาขนาด 60 ซีซี จากนั้นเติมสารละลายของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากันโดยใช้ Vortex

2. นำสารละลายตัวอย่างของแต่ละความเข้มข้น ไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3. สำหรับชุดควบคุมมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น แต่ไม่ใส่ สารสกัดหยาบจากสาหร่าย

4. การวิเคราะห์ปฏิกริยา

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ

2. เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายกรด ไทโอบาร์บิทริกความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันด้วย Vortex สำหรับแบลงก์ใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 แทนสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3. นำสารละลายผสมมาต้มในน้ำเดือด (อุณหภูมิ 98-99 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 นาที เพื่อเป็นการเร่งปฏิกริยา

4. เมื่อครบเวลา นำสารละลายผสมมาทำให้เย็นลงและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

5. ดูดส่วนใสออกมาแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 6 ซ้ำ

6. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาทำการคำนวณหา ร้อยละการยับยั้งปฏิกริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันดังนี้

$$\text{ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกริยาเปอร์ออกซิเดชัน} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

โดยที่ A_{control} คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรของตัวควบคุม

A_{sample} คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรของตัวอย่าง

7. คำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) จากกราฟระหว่างร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย

3.6.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Panphadung (2004) และ Ismail และคณะ (2010)

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่ใช้ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลส

1. เตรียมสารสกัดหยาบจากสาหร่ายโดยแปรความเข้มข้นเป็น 2 3 และ 4 เท่าของความในการสามารถยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 (IC_{50})

2. นำแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่เตรียมเอาไว้มา แช่ในสารสกัดหยาบจากสาหร่ายแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้แผ่นฟิล์มเซลลูโลสดูดซับสารสกัด

3. จากนั้นนำแผ่นฟิล์มเซลลูโลสออก นำไปผึ่งให้แห้งแล้วนำไปจุ่มลงในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 15 เพื่อให้แผ่นฟิล์มเซลลูโลสมีความยืดหยุ่น

4. นำแผ่นฟิล์มเซลลูโลสไปเข้าเครื่องแช่เยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อให้แผ่นฟิล์มเซลลูโลสแห้ง

6. จากนั้นนำแผ่นฟิล์มไปทดสอบการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance

2. การเตรียมสารละลายของสารสกัด

1. นำแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ผ่านการแช่สารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มา ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำแผ่นฟิล์มที่ได้มา 0.1 กรัม เติมนิเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99.5 (absolute ethanol) ลงไปปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน

2. ตั้งส่วนผสมทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการผสมส่วนผสมอีกครั้งแล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมสารละลายกรดลิโนเลอิก

1. เตรียมสารละลายกรดลิโนเลอิกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 น้ำหนักโดยปริมาตรในนิเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

2. นำสารละลายกรดลิโนเลอิกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมสารละลายด้วยเครื่อง Magnetic stirrer

4. การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

1. ปิเปตสารละลายกรดลิโนลิก ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ลงไปในขวดสีชาขนาด 60 ซีซี เติมสารละลายของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากันโดยใช้ Vortex

2. นำสารละลายตัวอย่าง ไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3. สำหรับชุดควบคุมมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น แต่ไม่ใส่สารสกัดหยาบจากสาหร่าย

5. การวิเคราะห์ปฏิกิริยา

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ

2. เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายกรด ไทโอบาร์บิทูริกความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันด้วย Vortex สำหรับแบลงก์ใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 แทนสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3. นำสารละลายผสมมาต้มในน้ำเดือด (อุณหภูมิ 98-99 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 นาที เพื่อเป็นการเร่งปฏิกิริยา

4. นำสารละลายผสมมาทำให้เย็นลงแล้ว วนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

5. ดูดส่วนใสออกมาแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

6. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาทำการคำนวณหาร้อยละการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันดังนี้

$$\text{ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

โดยที่ A_{control} คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรของตัวควบคุม

A_{sample} คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรของตัวอย่าง

3.7 การใช้สารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูป

3.7.1 การเตรียมแผ่นเซลลูโลสที่ซุบสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่ความเข้มข้นต่างๆ

1. ทำการเตรียมแผ่นฟิล์มเซลลูโลส โดยเลี้ยงเชื้อ *G. xylinus* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวโดยทำการเพาะเลี้ยงในภาตสีเหลี่ยมผืนผ้า ขนาดกว้างxยาว เท่ากับ 9.2x7 นิ้ว ใส่อาหารสูตรน้ำมะพร้าวปริมาตร 900 มิลลิลิตรและเติมหัวเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงตัดแผ่นฟิล์มเซลลูโลสให้มีขนาด กว้าง xยาว เท่ากับ 2.4x1.6 นิ้ว

2. จากนั้นนำแผ่นฟิล์มเซลลูลอสที่ได้ไปทำการ ชุบสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่ มีความเข้มข้น เป็น 2 3 และ 4 เท่าของ IC_{50} โดยใช้ระยะเวลาในการแช่ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

3. นำแผ่นฟิล์ม ที่ได้ไป ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปจุ่มลงในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 15 เพื่อให้แผ่นฟิล์มเซลลูลอสมีความยืดหยุ่น

4. จากนั้นนำไปเข้าเครื่องแช่เยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อนำแผ่นฟิล์มที่ได้มาห่อหุ้มผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูปในขั้นตอนต่อไป

3.7.2 การผลิตกุนเชียงหมูขึ้นรูป (รุจริน, 2555)

ทำการผลิตกุนเชียงหมูขึ้นรูปโดยมีสูตรส่วนผสมและวิธีการทำกุนเชียงหมูขึ้นรูปมีดังต่อไปนี้ ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมในการทำกุนเชียงหมูขึ้นรูป

ส่วนผสม	น้ำหนัก (กรัม)
หมูเนื้อแดงส่วนสะโพก	100.0
มันแข็ง	25.0
น้ำตาลทราย	26.5
ผงเพรก (ไนไตรท์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5)	3.0
เกลือฟอสเฟต	0.3
โซเดียมอริโธเรเบท	0.03

วิธีการทำ

1. นำหมูเนื้อแดงส่วนสะโพก และมันแข็งล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นซับน้ำด้วยผ้าสะอาด
2. หั่นหมูเนื้อแดงส่วนสะโพก และมันแข็งให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปแช่แข็งข้ามคืน
3. บดหมูเนื้อแดงด้วยเครื่องบด
4. บดมันหมูแข็งด้วยเครื่องบด
5. เติมน้ำตาลลงในเนื้อแดง นวดคลุกให้เข้ากัน (ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส)
6. เติมเกลือฟอสเฟต และโซเดียมอริโธเรเบท นวดคลุกให้เข้ากัน (ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส)
7. เติมน้ำมันหมูแข็ง นวดให้เข้ากันโดยทั่วถึง (ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส)
8. เติมน้ำตาล นวดให้เข้ากันจะได้เป็นส่วนผสมกุนเชียง
9. จากนั้นนำส่วนผสมกุนเชียงที่ได้มาบดให้เข้ากันมากขึ้น เพื่อลดขนาดของมันแข็งไม่ให้เป็นก้อน (ควบคุมอุณหภูมิให้เย็น)

10. บรรจุส่วนผสม กุนเชียง 350 กรัมลงในถุงพลาสติกขนาด 8x12 นิ้ว เคลี่ยให้ทั่วถุง ให้ความยาวจาก กันถุงมาทางปากถุงได้ประมาณ 11 นิ้ว และรีดให้เป็นแผ่นควบคุมความหนาของส่วนผสมกุนเชียงให้สม่ำเสมอ (ประมาณ 4 มิลลิเมตร) เพื่อให้ได้กุนเชียงหมูขึ้นรูป ที่มีความหนาใกล้เคียงกัน และสุกสม่ำเสมอเมื่อเข้าอบ

11. จากนั้นนำเข้าตู้แช่แข็ง จนเนื้อแข็งเป็นแผ่นดินนำออก มาตัดถุงออกให้หมด แล้วตัดส่วนผสมกุนเชียงแช่แข็งให้เป็นชิ้นขนาด 1x1.5 นิ้ว (ขั้นตอนนี้ควรทำด้วยความรวดเร็ว และไม่วาง

ส่วนผสมกุนเชียงแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากส่วนผสมกุนเชียงมีไขมันมากจะละลายและอ่อนตัวเร็วทำให้ตัดเป็นชิ้นยาก)

12. วางชิ้น กุนเชียง ที่ตัดแล้วบนตะแกรง และนำเข้าอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นพลิก กุนเชียงหมูขึ้นรูป เพื่อไม่ให้ติดตะแกรง และปรับอุณหภูมิลงเป็น 70 องศาเซลเซียส อบต่ออีก 2 ชั่วโมงครึ่ง

13. เมื่อครบเวลา นำกุนเชียงหมูขึ้นรูปออกจากตู้อบ พักไว้ให้เย็นตัวดีก่อนนำไปบรรจุ

3.7.3 การนำแผ่นฟิล์มมาห่อหุ้มผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูป

1. นำแผ่นฟิล์มที่ได้จากข้อ 3.7.1 มาห่อหุ้มผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูป และเก็บรักษาไว้ในถุงพลาสติกชนิด PE ในสภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

2. ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ กุนเชียงหมูขึ้นรูป ทุกๆ 3 วัน นำมาวิเคราะห์หาความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยา ออกซิเดชันของ ไขมันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูป โดยการวิเคราะห์ค่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substance) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม 2 ชนิดคือ กุนเชียงหมูขึ้นรูปที่ไม่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลส และกุนเชียงหมูขึ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ไม่แช่สารสกัดจากสาหร่าย

3. การวิเคราะห์ค่า Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) ในตัวอย่างกุนเชียงหมูขึ้นรูป ทำการวิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Buege และคณะ (1978) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูป 1 กรัม
2. เติมสารละลาย ผสมของกรดไทโอบาร์บิทริก (TBA) (ภาคผนวก ข-1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปในตัวอย่างกุนเชียง
3. นำส่วนผสมไปตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่น (stomacher) ที่ความเร็วสูงสุด 1 นาที
4. จากนั้นกรองเอาเฉพาะส่วน ของสารละลายไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นลง
5. นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
6. ทำการดูดส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ TBARS (Thiobarbituric acid reactive substance) ในรูปของ malonaldehyde โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ รายงานค่า TBARS เป็นมิลลิกรัมของ malonaldehyde ต่อกรัมตัวอย่างจาก กราฟมาตรฐานใช้สารละลาย malonaldehydedimethyl acetal (MIDA) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

งานวิจัยนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete randomized design) และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ ความแปรปรวน (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 17.0

