

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากธรรมชาติจำนวน 10 สายพันธุ์

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ขนาดเล็กที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ankistrodesmus* sp. W53, *Chlorella* sp. E53, *Chlorella* sp. W53, *Chlorella* sp. W54, *Chlorella* sp. W55, *Chlorococcum* sp. C53, *Monoraphidium* sp. W53 และ *Scenedesmus* sp. W53 ด้วยอาหารสูตร N – 8 *Chlamydomonas* sp. W53 ด้วยอาหารสูตร BG – 11 *Chlorella* sp. ED53 ด้วยอาหาร BB ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง ให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และให้อากาศด้วยอัตราที่คงที่สม่ำเสมอเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตลอดการเพาะเลี้ยง ซึ่งเพาะเลี้ยงในขวดอาหารปริมาตร 4 ลิตร โดยใส่หัวเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 ปริมาตรร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารทั้งหมด ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการเพาะเลี้ยงจนถึงช่วงปลายของระยะการเจริญคงที่ ของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ (ประมาณ 30 – 40 วัน) จึงทำการเก็บเซลล์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.1.1 การเพาะเลี้ยง *Ankistrodesmus* sp. W53

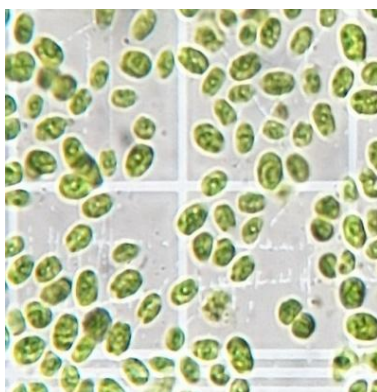
จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ขนาดเล็กสายพันธุ์ *Ankistrodesmus* sp. W53 ในอาหารสูตร N-8 พบว่าเซลล์มีลักษณะเรียวยาว ส่วนปลายโค้งมนเล็กน้อย คล้ายพระจันทร์เสี้ยว อาจอยู่รวมเป็นกลุ่มหรือโคโลนีเดี่ยวๆ ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระยะเริ่มต้นการเจริญเติบโตจนกระทั่งเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ และเมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะใกล้ตาย (Death phase) สีเขียวภายในเซลล์จะค่อยๆ จางลงเป็นสีเหลือง ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ลักษณะเซลล์ของ *Ankistrodesmus* sp. W53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า

4.1.2 การเพาะเลี้ยง *Chlamydomonas* sp. W53

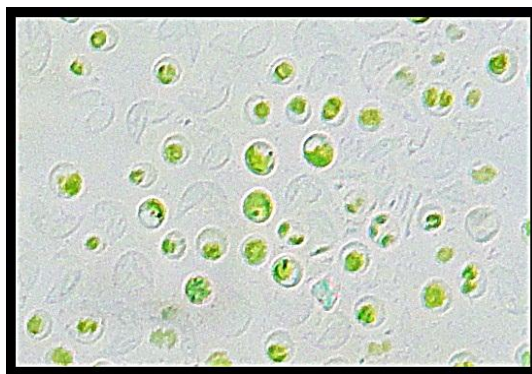
การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlamydomonas* sp. W53 ในอาหารสูตร BG - 11 พบว่ามีลักษณะเซลล์เป็นทรงกลม มีคลอโรพลาสต์ที่เป็นรูปกล้วย ในระยะเริ่มการเจริญเติบโตในระยะปรับตัว ลักษณะภายนอกของเซลล์มีขนาดเล็ก เมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ไปจนถึงระยะการเจริญเติบโตผนังเซลล์เริ่มหนาขึ้น จนกระทั่งเมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ สีเขียวภายในเซลล์จะค่อยๆ จางลงเป็นสีเหลือง มีผนังเซลล์หนา และเห็นอายสปอตชัดเจนขึ้น ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ลักษณะเซลล์ของ *Chlamydomonas* sp. W53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า

4.1.3 การเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. E53

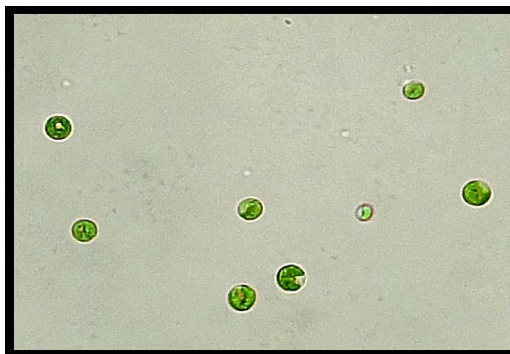
การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella* sp. E53 ในอาหารสูตร N-8 พบว่าลักษณะของเซลล์เป็นทรงกลม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ภายในเซลล์มีคลอโรพลาสต์ ที่เป็นรูปกล้วยอยู่ภายในเซลล์ 1 อัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปประมาณ 3 วัน พบว่าขนาดของเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นจากระยะแรก ในระหว่างการเพาะเลี้ยงจำนวนเซลล์มีอัตราการเจริญที่สูง ขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ สีเขียวภายในเซลล์จะค่อยๆ จางลงเป็นสีเหลือง และขนาดของเซลล์ค่อยๆ เล็กลง จนใกล้เคียงกับระยะปรับตัว ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp. E53 ที่กำลังขยายของภาพของภาพ 400 เท่า

4.1.4 การเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ED53

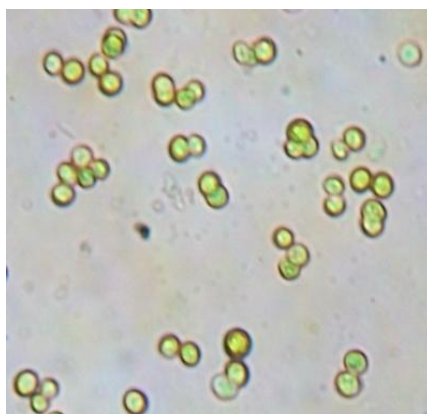
การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella* sp. ED53 ในอาหารสูตร BB พบว่าลักษณะเซลล์เป็นทรงกลม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ภายในมีคลอโรพลาสต์ที่เป็น รูปร่างอยู่ภายในเซลล์ 1 อัน ในระยะปรับตัว จนกระทั่งเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ ขนาดของเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง สีเขียวของเซลล์จางลงเล็กน้อย ค่าการดูดกลืนแสงที่สามารถวัดได้ก็ลดลงเช่นกัน ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp. ED53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า

4.1.5 การเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. W53

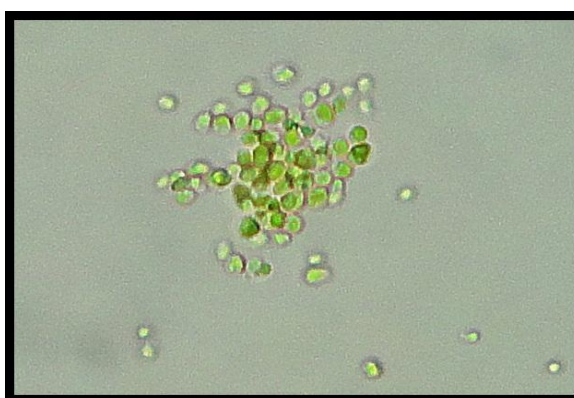
จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella* sp. W53 ด้วยอาหารสูตร N-8 พบว่าเซลล์มีลักษณะทรงกลม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ภายในมีคลอโรพลาสต์รูปร่าง สาหร่ายชนิดนี้ มักอยู่เป็นกระจุกไม่สม่ำเสมอ ในระยะปรับตัว เซลล์มีจำนวนน้อยแต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป ปริมาณเซลล์ของสาหร่ายชนิดนี้เพิ่มขึ้นในปริมาณ ไม่มากนักจน กระทั่งถึงระยะการเจริญเติบโตคงที่ สีของเซลล์จะมีสีเขียวจางลงเรื่อยๆ จนถึงระยะใกล้ตาย ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp. W53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า

4.1.6 การเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. W54

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella* sp. W54 ในอาหารสูตร N - 8 พบว่าลักษณะเซลล์เป็นทรงกลม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ภายในมีคลอโรพลาสต์ที่เป็น รูปถ้วยอยู่ ภายในเซลล์ ในระยะเริ่มต้นการเจริญเติบโตจนกระทั่งเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว สีเขียวของเซลล์เมื่อตรวจสอบโดยการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าจางลงเล็กน้อยเท่านั้น และเมื่อทำการตรวจสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ก็ลดลงเช่นกัน ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp. W54 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า

4.1.7 การเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. W55

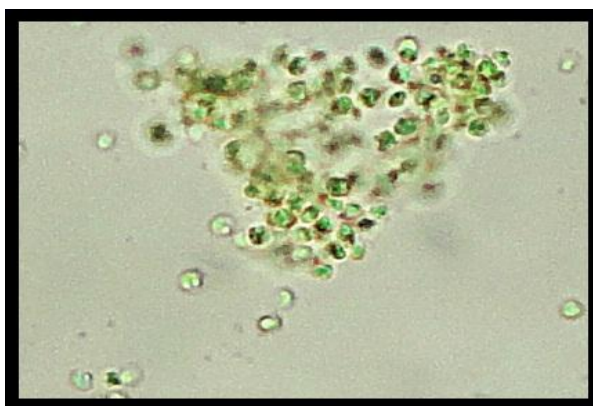
จากการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. W55 ด้วยอาหารสูตร N - 8 พบว่า เซลล์มีลักษณะค่อนข้างกลม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ภายในมีคลอโรพลาสต์รูปถ้วย โดยในระยะปรับตัวจนถึงระยะการเจริญเติบโตคงที่มีช่วงระยะเวลานาน นอกจากนี้ยังมีเซลล์ในปริมาณค่อนข้างสูงอีกด้วย เนื่องจากมีช่วงระยะการเจริญเติบโตคงที่ที่ยาวนานจึงทำให้มีเซลล์ค่อนข้างมาก ดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp. W55 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า

4.1.8 การเพาะเลี้ยง *Chlorococcum* sp. C53

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. C53 ด้วยอาหารสูตร N – 8 พบว่า เซลล์มีลักษณะเป็นรูปทรงกลม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ภายในมีคลอโรพลาสต์รูปถ้วย โดยในระยะเริ่มต้นของการเจริญ เซลล์ของสาหร่ายชนิดนี้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ค่อนข้างมากจนกระทั่งถึงระยะการเจริญเติบโตคงที่ โดยที่ลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลง ดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorococcum* sp. C53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า

4.1.9 การเพาะเลี้ยง *Monoraphidium* sp. W53

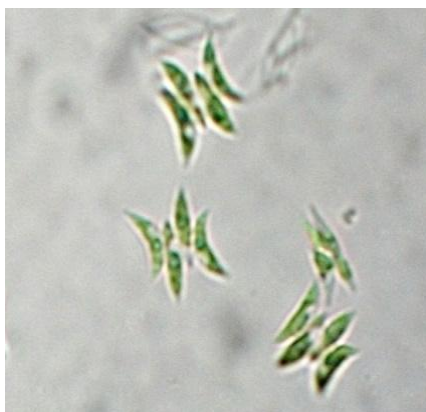
การเพาะเลี้ยง *Monoraphidium* sp. W53 ในอาหาร N-8 พบว่ามีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่กระจัดกระจายไม่คงที่ รูปร่างของตัวเซลล์โค้งแหลม ไม่มีเมือกหุ้ม มีคลอโรพลาสต์ 1 อัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปประมาณ 3-4 วันจำนวนเซลล์สาหร่ายมีปริมาณมากขึ้น ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ สีเขียวของตัวเซลล์มีลักษณะจางลงและขนาดของเซลล์ก็ลดลงเช่นกัน ดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ลักษณะเซลล์ของ *Monoraphidium* sp. W53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า

4.1.10 การเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. W53

การเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. W53 ในอาหารสูตร N-8 พบว่าเซลล์อยู่กันเป็นโคโลนี ลอยตามน้ำ ไม่มีแฟลกเจลลาที่สามารถเคลื่อนที่ได้ มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว คลอโรพลาสต์มีลักษณะคล้ายจานแบน ซึ่งช่วงระยะปรับตัวของสาหร่ายสายพันธุ์นี้จะมีปริมาณเซลล์ค่อนข้างน้อย แต่เมื่อเริ่มเข้าระยะการเจริญเซลล์จะค่อยๆ เพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นไปจนกระทั่งถึงระยะการเจริญเติบโตคงที่ สีเขียวของตัวเซลล์จะค่อยๆ จาง ลง ในช่วงที่สาหร่ายสายพันธุ์นี้มีการสืบพันธุ์ เซลล์ที่เกาะกลุ่มกันเป็นโคโลนีจะหลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยว ดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 ลักษณะเซลล์ของ *Scenedesmus* sp. W53 ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า

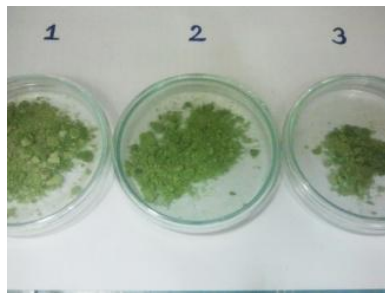
4.2 ผลได้ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์

ในการศึกษาผลได้ของสารสกัดหยาบของสาหร่าย ขนาดเล็กจำนวน 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 โดยนำเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการทำแห้งแล้วมาบดเป็นผงเพื่อให้เซลล์สาหร่ายแตก จากนั้นนำไปสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เซลเซียส และสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดจากสาหร่ายที่ใช้น้ำร้อนเป็นตัวทำละลายจะมีลักษณะเป็นผงแห้ง มีสีเขียวจนถึงสีเขียวอมเหลือง ในขณะที่สารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่ใช้เอทานอลร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย สารสกัดที่ได้มีลักษณะเหนียวข้นหนืดและมีสีเขียวเข้มจนถึงสีเขียวเข้มอมดำ (รูปที่ 4.11 และ 4.12)

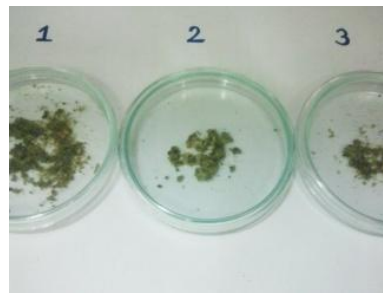
เมื่อพิจารณาปริมาณผลได้ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์ พบว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนมีร้อยละของผลได้ของสารสกัดหยาบมากกว่าการใช้เอทานอลร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย ในการสกัดด้วยน้ำร้อน สาหร่ายขนาดเล็ก ที่มีร้อยละของผลได้ของสารสกัดหยาบมากที่สุด คือ *Ankistrodesmus* sp. W53 มีค่าเท่ากับ 51.77 ± 0.60 รองลงมาได้แก่ *Chlamydomonas* sp. W53, *Scenedesmus* sp. W53, *Chlorococcum* sp. C53, *Chlorella* sp. W54, *Chlorella* sp. W55, *Chlorella* sp. E53, *Chlorella* sp. W53, *Chlorella* sp. ED53 และ *Monoraphidium* sp. W53 ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 30.82 ± 0.43 30.46 ± 1.20 $27.61 \pm$

2.10 23.95 ± 0.69 23.91 ± 1.07 23.61 ± 0.31 20.68 ± 1.54 18.96 ± 0.47 และ 14.89 ± 1.51 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ส่วนการสกัดโดยใช้เอทานอล พบว่า *Scenedesmus* sp. W53 มีร้อยละของผลได้ของสารสกัดหยาบมากที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 20.85 ± 1.93 รองลงมาคือ *Chlorococcum* sp. C53, *Chlorella* sp. W54, *Chlorella* sp. W55, *Chlamydomonas* sp. W53, *Chlorella* sp. ED53, *Chlorella* sp. W53, *Chlorella* sp. E53, *Ankistrodesmus* sp. W53 และ *Monoraphidium* sp. W53 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 19.79 ± 4.28 19.77 ± 1.75 13.61 ± 0.63 10.94 ± 0.89 10.76 ± 0.80 10.27 ± 0.52 9.35 ± 0.62 9.01 ± 0.31 และ 4.30 ± 0.55 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

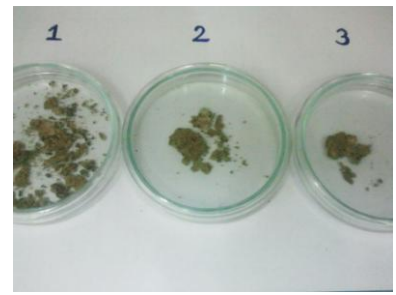
เป็นที่รู้กันดีว่าผลได้ของสารสกัดหยาบขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน พีเอช เวลาในการสกัด และอุณหภูมิ เป็นต้น เช่นเดียวกับองค์ ประกอบทางเคมีในตัวอย่าง โดยการสกัด ภายใต้สภาวะของเวลากับอุณหภูมิเดียวกัน ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและคุณสมบัติทางเคมีของ ตัวอย่างเป็น 2 ตัวแปรที่สำคัญที่สุด และการสกัดด้วยน้ำร้อนให้ร้อยละของสารสกัดแห้งสูงกว่า การ สกัดด้วยเอทานอล เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าเอทานอล ทำให้ในการสกัดนี้ โมเลกุล ของน้ำสามารถดึงเอาปริมาณสารประกอบต่างๆที่อยู่ในสาหร่ายออกมาได้ในปริมาณมากกว่าเอทานอล ซึ่งมีความเป็นขั้วต่ำกว่า (Waters และคณะ, 1996) นอกจากนี้ น้ำร้อนยังสามารถละลายสารอื่น เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ เป็นต้น (Macheix และคณะ, 1990) ทำให้ร้อยละของสารสกัดแห้ง ด้วย น้ำร้อนสูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ López และคณะ (2011) พบว่าผลได้ของสาหร่ายสีน้ำตาล *Stypocaulon scoparium* ที่สกัดด้วยน้ำมากกว่าที่สกัดด้วยเอ ทานอล ซึ่งมีร้อยละของผลได้เท่ากับ 16.6 และ 2.36



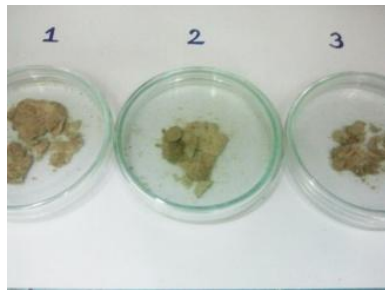
(ก)



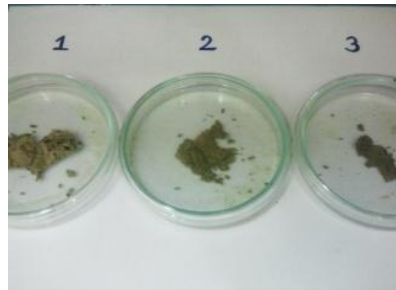
(ข)



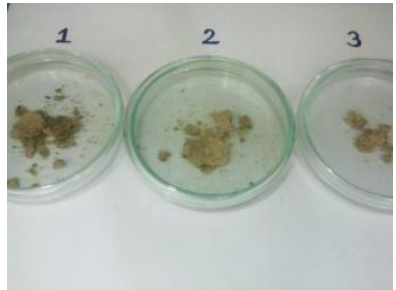
(ค)



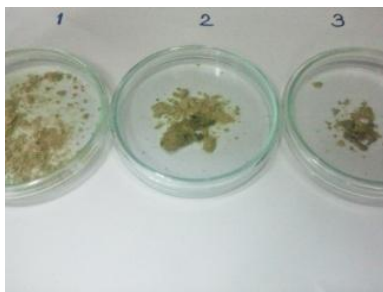
(ง)



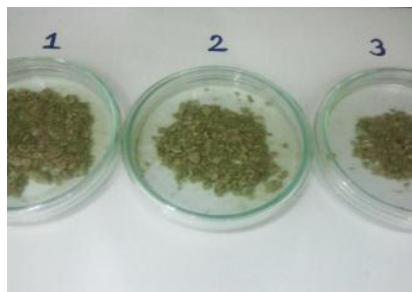
(จ)



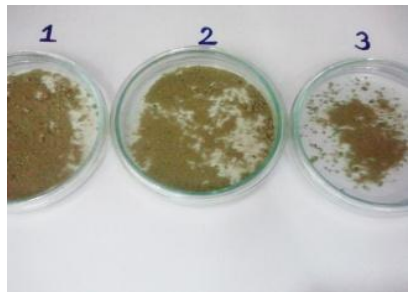
(ฉ)



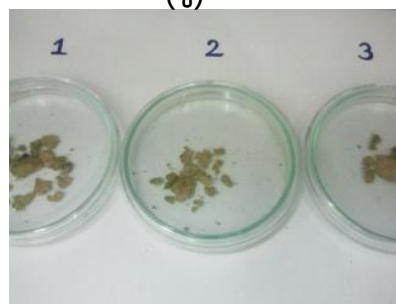
(ช)



(ซ)



(ณ)



(ญ)

รูปที่ 4.11 ปริมาณผลได้และลักษณะของสารสกัดด้วยน้ำร้อนจากสาหร่ายสีเขียวจำนวน 10 สายพันธุ์

- | | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| (ก) <i>Ankistrodesmus</i> sp. W53 | (ข) <i>Chlamydomonas</i> sp. W53 | (ค) <i>Chlorella</i> sp. E53 |
| (ง) <i>Chlorella</i> sp. ED53 | (จ) <i>Chlorella</i> sp. W53 | (ฉ) <i>Chlorella</i> sp. W54 |
| (ช) <i>Chlorella</i> sp. W55 | (ซ) <i>Chlorococcum</i> sp. C53 | (ณ) <i>Monoraphidium</i> sp. W53 |
| (ญ) <i>Scenedesmus</i> sp. W53 | | |

ตารางที่ 4.1 ร้อยละของผลได้และลักษณะของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำร้อนจากสาหร่ายสีเขียวจำนวน 10 สายพันธุ์

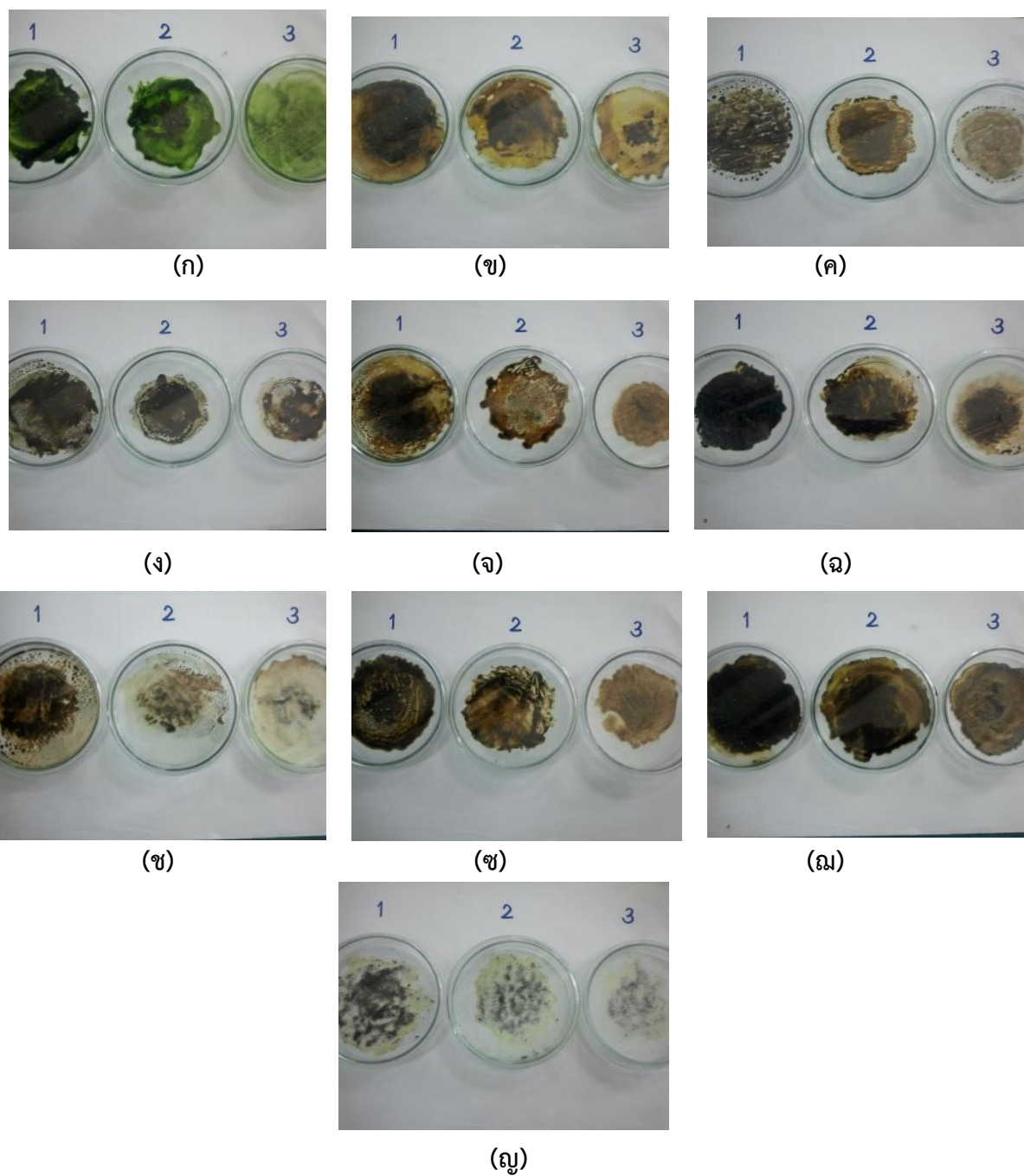
สาหร่าย	น้ำหนักของผลได้ ¹ (กรัมต่อ 5 กรัมสาหร่ายแห้ง)	ร้อยละของ ผลได้รวม ²	ลักษณะของสารสกัดหยาบ
<i>Ankistrodesmus</i> sp. W53	2.5887	51.77 ^{a3} ± 0.60	มีลักษณะเป็นผงแห้ง สีเขียว
<i>Chlamydomonas</i> sp. W53	1.5408	30.82 ^b ± 0.43	มีลักษณะเป็นผงแห้ง สีเขียวอมเหลือง
<i>Chlorella</i> sp. E53	1.1809	23.62 ^d ± 0.31	มีลักษณะเป็นผงแห้ง สีเขียวอมเหลือง
<i>Chlorella</i> sp. ED53	0.9478	18.96 ^{ef} ± 0.47	มีลักษณะเป็นผงแห้ง สีเขียวอมเหลือง
<i>Chlorella</i> sp. W53	1.0340	20.68 ^e ± 1.54	มีลักษณะเป็นผงแห้ง สีเขียวอมเหลือง
<i>Chlorella</i> sp. W54	1.1973	23.95 ^d ± 0.69	มีลักษณะเป็นผงแห้ง สีเหลือง
<i>Chlorella</i> sp. W55	1.1955	23.91 ^d ± 1.07	มีลักษณะเป็นผงแห้ง สีเขียวอมเหลือง
<i>Chlorococcum</i> sp. C53	1.3807	27.61 ^c ± 2.10	มีลักษณะเป็นผงแห้ง สีเขียวอมเหลือง
<i>Monoraphidium</i> sp. W53	0.7445	14.89 ^s ± 1.51	มีลักษณะเป็นผงแห้ง สีเขียวอมเหลือง
<i>Scenedesmus</i> sp. W53	1.5231	30.46 ^b ± 1.20	มีลักษณะเป็นผงแห้ง สีเขียวอมเหลือง

หมายเหตุ

¹ ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของผลได้รวมของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำร้อนซ้ำ 3 ครั้ง โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

² ค่าเฉลี่ยของร้อยละของผลได้ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำร้อน โดยแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=2)

³ a,b,c.... ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.12 ปริมาณผลได้ของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากสาหร่ายจำนวน 10 สายพันธุ์

- | | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| (ก) <i>Ankistrodesmus</i> sp. W53 | (ข) <i>Chlamydomonas</i> sp. W53 | (ค) <i>Chlorella</i> sp. E53 |
| (ง) <i>Chlorella</i> sp. ED53 | (จ) <i>Chlorella</i> sp. W53 | (ฉ) <i>Chlorella</i> sp. W54 |
| (ช) <i>Chlorella</i> sp. W55 | (ซ) <i>Chlorococcum</i> sp. C53 | (ฌ) <i>Monoraphidium</i> sp. W53 |
| (ญ) <i>Scenedesmus</i> sp. W53 | | |

ตารางที่ 4.2 ร้อยละของผลได้และลักษณะของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายสีเขียวจำนวน 10 สายพันธุ์

สาหร่าย	น้ำหนักของผลได้ ¹ (กรัมต่อ 5 กรัมสาหร่ายแห้ง)	ร้อยละของ ผลได้รวม ²	ลักษณะของสาร สกัดหยาบ
<i>Ankistrodesmus</i> sp. W53	0.4506	9.01 ^c ± 0.31	มีลักษณะข้นเหนียว สีเขียวเข้ม
<i>Chlamydomonas</i> sp. W53	0.5470	10.94 ^{bc} ± 0.89	มีลักษณะข้นเหนียว สีนํ้าตาลเข้ม
<i>Chlorella</i> sp. E53	0.4670	9.34 ^c ± 0.62	มีลักษณะข้นเหนียว สีเขียวอมนํ้าตาลเข้ม
<i>Chlorella</i> sp. ED53	0.5376	10.75 ^{bc} ± 0.80	มีลักษณะข้นเหนียว สีเขียวอมนํ้าตาล
<i>Chlorella</i> sp. W53	0.5132	10.26 ^{bc} ± 0.52	มีลักษณะข้นเหนียว สีเขียวเข้ม
<i>Chlorella</i> sp. W54	0.9881	19.76 ^a ± 1.75	มีลักษณะข้นเหนียว สีนํ้าตาลเข้ม
<i>Chlorella</i> sp. W55	0.6802	13.60 ^b ± 0.63	มีลักษณะข้นเหนียว สีเขียวเข้มอมดำ
<i>Chlorococcum</i> sp. C53	0.9893	19.78 ^a ± 4.28	มีลักษณะข้นเหนียว สีนํ้าตาลเข้ม
<i>Monoraphidium</i> sp. W53	0.2150	4.30 ^d ± 0.55	มีลักษณะข้นเหนียว สีเขียวอมนํ้าตาลเข้ม
<i>Scenedesmus</i> sp. W53	1.0424	20.84 ^a ± 1.93	มีลักษณะข้นเหนียว สีนํ้าตาลเข้ม

หมายเหตุ

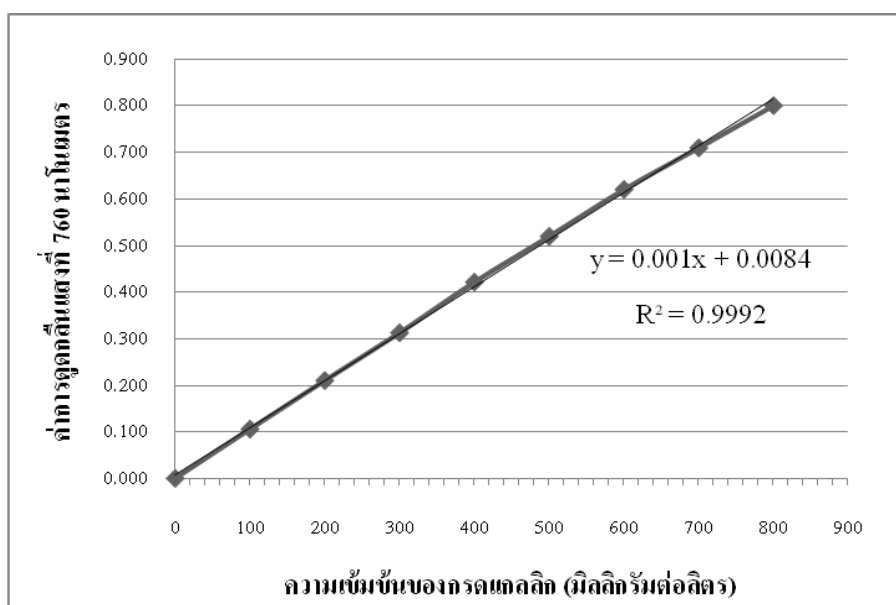
¹ ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของผลได้รวมของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอลซ้ำ 3 ครั้ง โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

² ค่าเฉลี่ยของร้อยละของผลได้ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 2)

³ a,b,c,d ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05)

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds) สามารถหาโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งเป็นการศึกษาการเกิดสีโดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยสารประกอบฟีนอลิกในสารละลายที่มีสถานะเป็นต่าง หรือในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (pH 10) และสาร Folin-Ciocalteu reagent ซึ่ง ประกอบด้วยกรดฟอสฟอโมลบดีก ($H_3PMo_{12}O_{40}$) และกรดฟอสทังสเตนดิก ($H_3PW_{12}O_{40}$) จะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups ในสารละลาย Na_2CO_3 (ต่าง) เกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Mo-W มีสีน้ำเงิน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดนี้จะนำไปเทียบกับสารมาตรฐาน กรดแกลลิก (รูปที่ 4.13) และรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg GAL/g dry weight) การวิเคราะห์โดยวิธีนี้ไม่เฉพาะเจาะจงต่อสารจำพวกโพลีฟีนอลเท่านั้นแต่สารละลาย Folin-ciocalteu phenol สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่สามารถออกซิไดซ์ (oxidize) ตัวมันได้ ดังนั้นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับจำนวนหมู่ฟีนอลที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารประกอบนั้นๆ (Moktan และคณะ, 2008)



รูปที่ 4.13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกและค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร

มีการศึกษาของผู้วิจัยหลายคณะพบว่า กลุ่มสารประกอบฟีนอลในสาหร่ายแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ (Chew และคณะ, 2008; Kumar และคณะ, 2008; Lopez และคณะ, 2011; Chakraborty และคณะ, 2013) ซึ่งกลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกคือ 1)

สามารถกำจัดอนุมูลอิสระต่างๆโดยตรง เช่น อนุมูลไฮดรอกซี ($\text{OH}^\cdot$) ไนโตรเจนไดออกไซด์ ($\text{NO}_2^\cdot$) และกรดเปอร์รอกซีไนตรัส (ONOOH) เป็นต้น 2) สามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) หรือ 3) สารประกอบฟีนอลิกสามารถจับหรือรวมตัวกับไอออนของโลหะ เช่น Fe^{2+} และ Cu^{2+} ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ (กล่าวขวัญ และคณะ, 2553) ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดของสาหร่าย

จากการนำสารสกัดจากสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็ก จำนวน 10 สายพันธุ์ที่สกัดด้วยเอทานอล และน้ำร้อนมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดย วิธี Folin-ciocalteu ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่า สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์

ตัวอย่างสาหร่าย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ¹ (มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด)
<i>Ankistrodesmus</i> sp. W53	5.17 ^b ± 1.49
<i>Chlamydomonas</i> sp. W53	13.90 ^{ab} ± 4.38
<i>Chlorella</i> sp. E53	11.30 ^b ± 0.14
<i>Chlorella</i> sp. ED53	10.60 ^b ± 0.00
<i>Chlorella</i> sp. W53	12.90 ^{ab} ± 0.42
<i>Chlorella</i> sp. W54	13.00 ^{ab} ± 9.43
<i>Chlorella</i> sp. W55	27.93 ^a ± 1.41
<i>Chlorococcum</i> sp. C53	7.00 ^b ± 0.85
<i>Monoraphidium</i> sp. W53	17.72 ^{ab} ± 17.52
<i>Scenedesmus</i> sp. W53	10.60 ^b ± 0.28

หมายเหตุ

¹ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมของ

สารสกัด โดยแต่ละค่าจะแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)

² a,b ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการวิเคราะห์สารสกัดด้วยน้ำร้อนพบว่า สารสกัดจาก *Chlorella* sp.W55 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 27.93 ± 1.41 รองมาได้แก่ *Monoraphidium* sp. W53, *Chlamydomonas* sp.W53, *Chlorella* sp. W 54, *Chlorella* sp. W 53, *Chlorella* sp. E 53, *Chlorella* sp. ED 53, *Scenedesmus* sp.W53 ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 17.72 ± 17.52 13.90 ± 4.38 13.00 ± 9.43 12.90 ± 0.42 11.30 ± 0.14 10.60 ± 0.00 และ 10.60 ± 0.28 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัม สารสกัด ตามลำดับ ส่วน *Chlorococcum* sp. C53 และ *Ankistrodesmus* sp. W53 พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกต่ำกว่าสาหร่ายชนิดอื่นๆโดยมีค่าเท่ากับ 7.00 ± 0.85 และ 5.17 ± 1.49 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัม สารสกัด ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) และเมื่อพิจารณาสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดจาก *Chlamydomonas* sp.W53 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ 54.70 ± 2.97 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่นรองลงมาเป็นสารสกัดหยาบจาก *Chlorella* sp.W53, *Chlorella* sp. E53, *Chlorella* sp. W55 *Chlorella* sp. ED53, *Scenedesmus* sp.W53, *Monoraphidium* sp. W53, *Chlorococcum* sp. C53, *Chlorella* sp. W 54 และ *Ankistrodesmus* sp. W53 ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 39.70 ± 10.32 35.50 ± 0.14 34.43 ± 0.71 29.10 ± 1.27 27.90 ± 2.69 25.06 ± 2.44 23.60 ± 0.57 21.83 ± 2.12 และ 19.73 ± 9.98 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย
10 สายพันธุ์

ตัวอย่างสาหร่าย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ¹ (มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด)
<i>Ankistrodesma</i> sp. W53	19.73 ^e ± 9.98
<i>Chlamydomonas</i> sp. W53	54.70 ^a ± 2.97
<i>Chlorella</i> sp. E53	35.50 ^{bc} ± 0.14
<i>Chlorella</i> sp. ED53	29.10 ^{bcde} ± 1.27
<i>Chlorella</i> sp. W53	39.70 ^b ± 10.32
<i>Chlorella</i> sp. W54	21.83 ^e ± 2.12
<i>Chlorella</i> sp. W55	34.43 ^{bcd} ± 0.71
<i>Chlorococcum</i> sp. C53	23.60 ^{de} ± 0.57
<i>Monoraphidium</i> sp. W53	25.06 ^{cde} ± 2.44
<i>Scenedesmus</i> sp. W53	27.90 ^{cde} ± 2.69

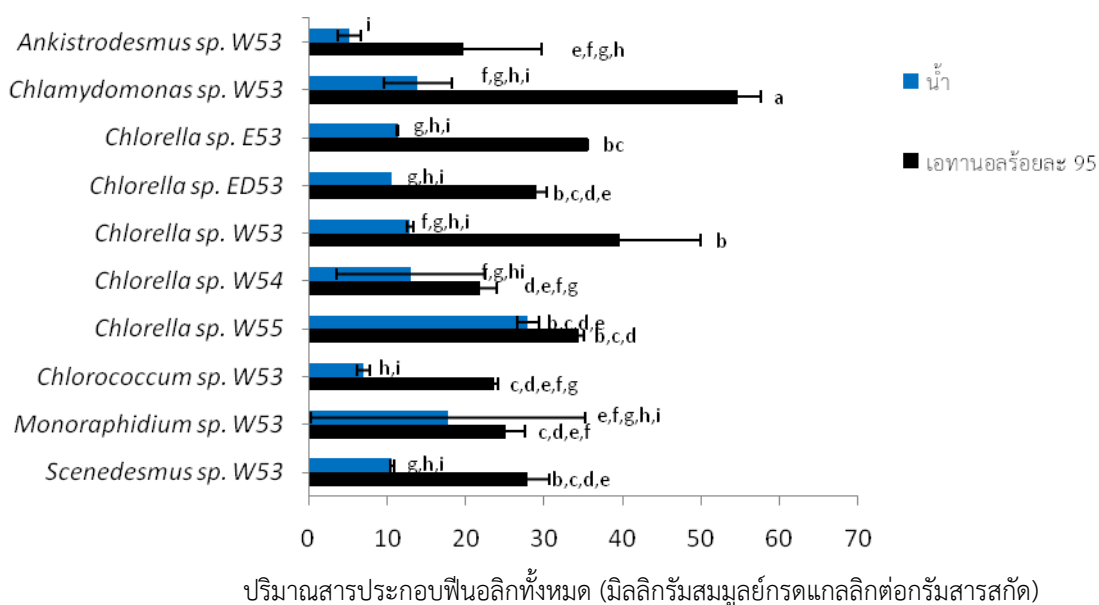
หมายเหตุ

¹ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมของ สารสกัด โดยแต่ละค่าจะแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)

² a,b,c.... ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลพบว่าเมื่อพิจารณาสาหร่ายชนิดเดียวกัน สารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05) (รูปที่ 4.14) การที่สารสกัดหยาบที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดหยาบที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายอาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบที่มีวงแหวนเบนซีนเป็นองค์ประกอบ โครงสร้างของสารประเภทฟีนอลมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ต่ออยู่กับหมู่แอริล (Ar) ทำให้มีสูตรทั่วไปคือ ArOH

และสารประกอบอินทรีย์กลุ่มนี้มีสูตรโมเลกุลเป็น C_6H_5OH ทำให้มีความเป็นขี้ผึ้งสูงจึงสามารถสกัดได้ด้วยตัวทำละลายที่มีขี้ผึ้ง โดยส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกจะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขี้ผึ้งสูงและละลายได้เล็กน้อยในน้ำแต่จะละลายได้ดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่ง สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าการสกัด สารสกัดโดยใช้ เอทานอล เป็นตัวทำละลายมีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อน ถึงแม้ว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนจะให้ปริมาณผลได้ของสารสกัดสูงกว่าการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย



รูปที่ 4.14 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด(มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) ของสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลจากสาหร่าย จำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งตัวอักษร a,b,c.... ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

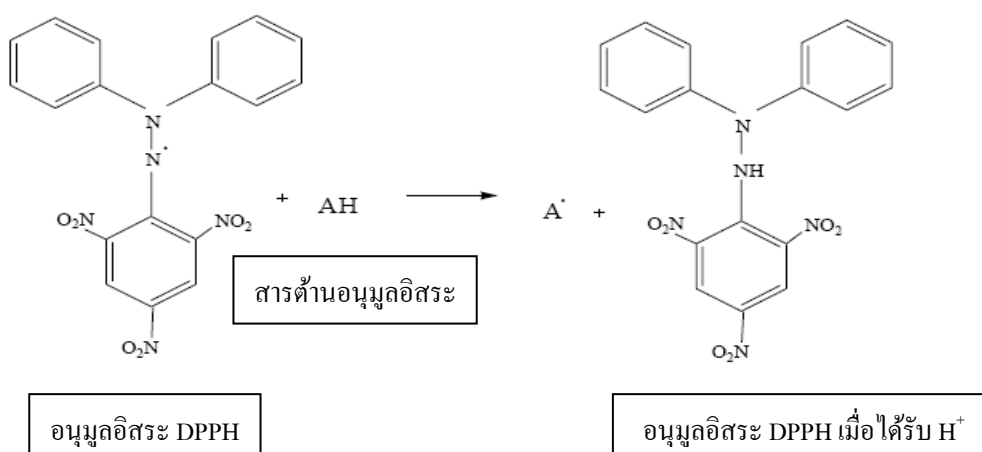
จากรายงานการวิจัยของ Wang และคณะ (2009) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดด้วยน้ำและสารละลายอะซิโตนเข้มข้นร้อยละ 70 ได้กล่าวไว้ว่าการใช้สารละลายอะซิโตนเข้มข้นร้อยละ 70 มีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างสาหร่ายส่วนใหญ่ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำทั้งนี้ เนื่องจากโดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิกสามารถละลายในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ที่มีขี้ผึ้งได้ดีกว่าในน้ำ นอกจากนี้ Sabeena Farvin และ Jacobsoen (2013) ได้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลของสาหร่าย 16 สายพันธุ์จากชายฝั่งเดนิชพบว่าการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกออกมาได้มากกว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

4.4 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์

4.4.1 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical)

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรที่มีธาตุไนโตรเจน (N) เป็นอะตอมกลาง ขอบละลายในไขมัน (Lipophilic) ซึ่งสารนี้ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการประเมินค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและเมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction) สีของสารละลาย DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง ซึ่งสามารถทราบถึงปฏิกิริยาได้ที่มีความยาวคลื่นที่เหมาะสมต่อการทดสอบนั้นคือ 517 นาโนเมตร (Moktan และคณะ, 2008)

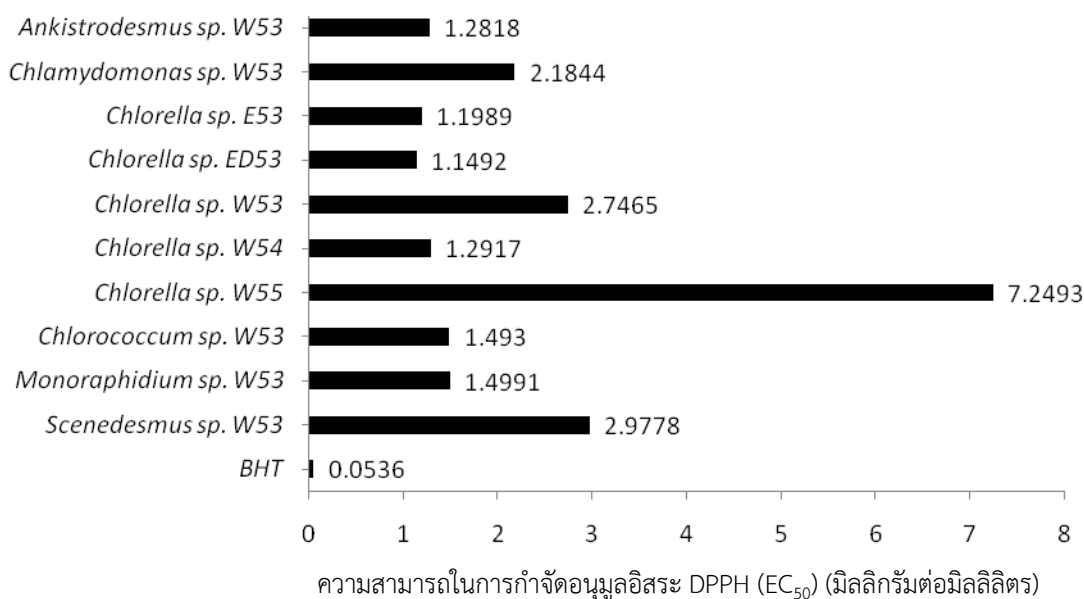
ในการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลของสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กทั้ง 10 สายพันธุ์ โดยผลการทดลองพบว่าสารละลายสีม่วงของอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดหยาบจากสาหร่าย สีของสารละลายผสมเปลี่ยนไปเป็นสีเขียวอมเหลืองมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด ที่เพิ่มขึ้น หรือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรที่ลดลง และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณเป็นร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลของสาหร่ายทุกสายพันธุ์มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น นั่นแสดงว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่ายมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ ซึ่งแสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังสมการ



และเมื่อนำค่าร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นต่างๆมาเขียนสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า EC_{50} ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณของสารสกัดจากสาหร่าย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ต้องใช้ในการทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ลดลงร้อยละ 50 ดังนั้นค่า EC_{50} จะมีค่าผกผันกับความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.15 4.16 และ 4.17

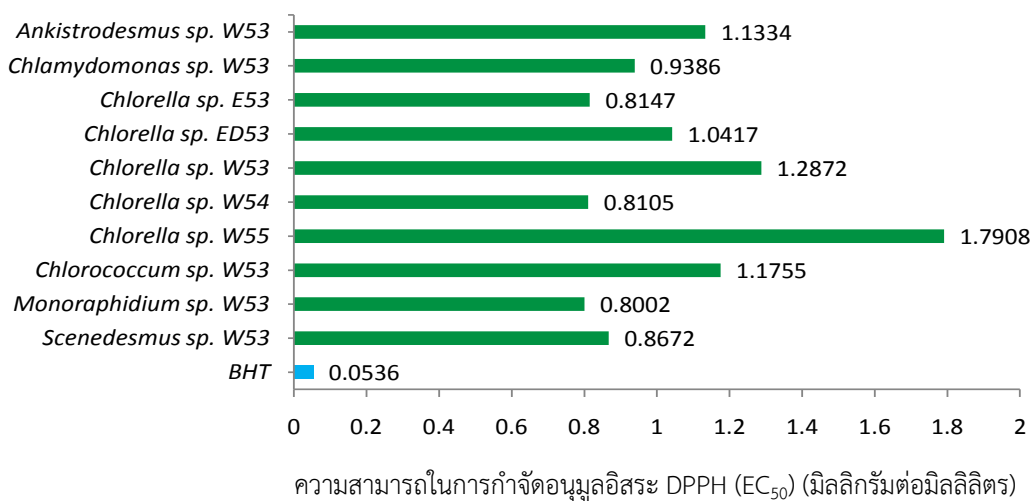
เมื่อเปรียบเทียบค่า *Chlorella* sp. ED53 ของสารสกัดด้วยน้ำร้อนจากสาหร่ายจำนวน 10 สายพันธุ์ พบว่า EC_{50} ของสารสกัดมีค่าอยู่ในช่วง 1.1412-7.2493 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าทั้งหมด

มีค่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับ EC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0536 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก *Chlorella* sp. ED53 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุดคือมีค่า EC_{50} เท่ากับ 1.1492 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจาก *Chlorella* sp. W55 มีค่า EC_{50} ต่ำสุดเท่ากับ 7.2493 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.15)



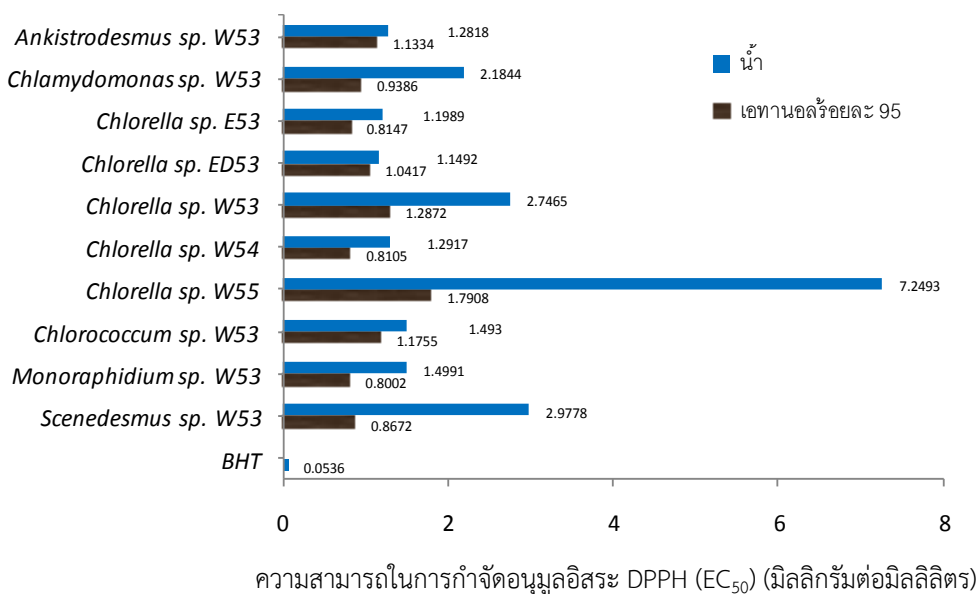
รูปที่ 4.15 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์

สำหรับค่า EC_{50} ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายจำนวน 10 สายพันธุ์พบว่าสารสกัดจาก *Monoraphidium* sp. W53 มีค่า EC_{50} ต่ำสุดเท่ากับ 0.8002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ สารสกัด จาก *Chlorella* sp. W54, *Chlorella* sp. E53, *Scenedesmus* sp. W53, *Chlamydomonas* sp. W53, *Chlorella* sp. ED53, *Ankistrodesmus* sp. W53, *Chlorococcum* sp. C53, *Chlorella* sp. W53 และ *Chlorella* sp. W55 ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.8105 0.8147 0.8672 0.9386 1.0417 1.1334 1.1755 1.2872 1.7908 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.16) ซึ่งมีค่า EC_{50} สูงกว่าสารมาตรฐาน BHT เช่นเดียวกับสารสกัดด้วยน้ำ



รูปที่ 4.16 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (EC₅₀) ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายจำนวน 10 สายพันธุ์

แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่า EC₅₀ ของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์แล้ว สารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายทุกสายพันธุ์มีค่า EC₅₀ ต่ำกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (รูปที่ 4.17) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ



รูปที่ 4.17 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (EC₅₀) ของสารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์

มีรายงานวิจัยที่ศึกษาความสามารถในการ กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดที่ใช้ น้ำ และอะซิโตนร้อยละ 70 เป็นตัวทำละลายของสาหร่ายที่พบในประเทศไต้หวัน พบว่าสารสกัดที่สกัด ด้วยอะซิโตนร้อยละ 70 ของ *Fucus vesiculosus* Linnaeus และ *Fucus serratus* Linnaeus มี ร้อยละในการ กำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือ 93.9 และ 90.8 มีค่า EC_{50} เท่ากับ 10.7×10^{-3} และ 11.0×10^{-3} มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำของ *Fucus vesiculosus* Linnaeus และ *Fucus serratus* Linnaeus มีร้อยละในการกำจัดอนุมูลอิสระประมาณ 60 และ 50 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำมีร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำกว่าสาร สกัดที่สกัดด้วยอะซิโตนร้อยละ 70 ซึ่งอาจเนื่องจากการเปลี่ยนความเป็นขี้ของตัวทำละลาย มีผลต่อ ประสิทธิภาพในการสกัดกลุ่มของสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันซึ่งมีผลต่อคุณสมบัติในการต้าน ออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้ (Wang และคณะ, 2009)

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ กันในเชิงบวก นั่นคือปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงแต่ให้ผลของค่า EC_{50} สูง (ความสามารถในการ กำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดต่ำ) เช่น สารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย *Chlorella* sp. W55 มีปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ 27.93 ± 1.14 มิลลิกรัมสม มูลย์กรดแกลลิกต่อกรัม สารสกัด เมื่อ นำมาวิเคราะห์ความสามารถ ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH พบว่ามีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.2493 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็นค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายสายพันธุ์อื่นๆ หรือสารสกัดด้วยเอทานอลของ *Chlamydomonas* sp. W53 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ 54.70 ± 2.97 มิลลิกรัมสม มูลย์กรดแกลลิกต่อกรัม สารสกัดมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.9386 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็น ค่าที่สูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Monoraphidium* sp. W53 ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 25.06 ± 2.44 มิลลิกรัมสม มูลย์กรดแกลลิกต่อกรัม สารสกัด แต่มีค่า EC_{50} ต่ำกว่าเท่ากับ 0.8002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สาเหตุอาจเนื่องมาจากสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดจากสาหร่าย นอกจากจะมีสารประกอบฟีนอลิกแล้วยังมี สารจำพวกโพลีแซคาไรด์ รงควัตถุต่างๆ โปรตีนหรือเปปไทด์ (Kumar และคณะ, 2008) นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยการตรวจหาปริมาณสารแคโรทีนอยด์ ของสาหร่าย *Dunaliella salina* และทำการวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันของสารสกัด แคโรทีนอยด์ของสาหร่ายชนิดนี้ซึ่งแยกโดยเทคนิค HPLC ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ร้อยละความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดแคโรทีนอยด์รวมของสาหร่าย , *trans-form* ทั้งหมดของ Zeaxanthin , Lutein , β -carotene , α -carotene และ α -tocopherol มีค่าเป็น 64.14 26.23 25.75 24.38 24.01 และ 82.41 ตามลำดับ และมีค่า EC_{50} เป็น 8.36 22.82 23.04 24.17 24.54 และ 2.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของสารสกัดแคโรทีนอยด์เป็น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีแนวโน้มในการ กำจัดอนุมูล

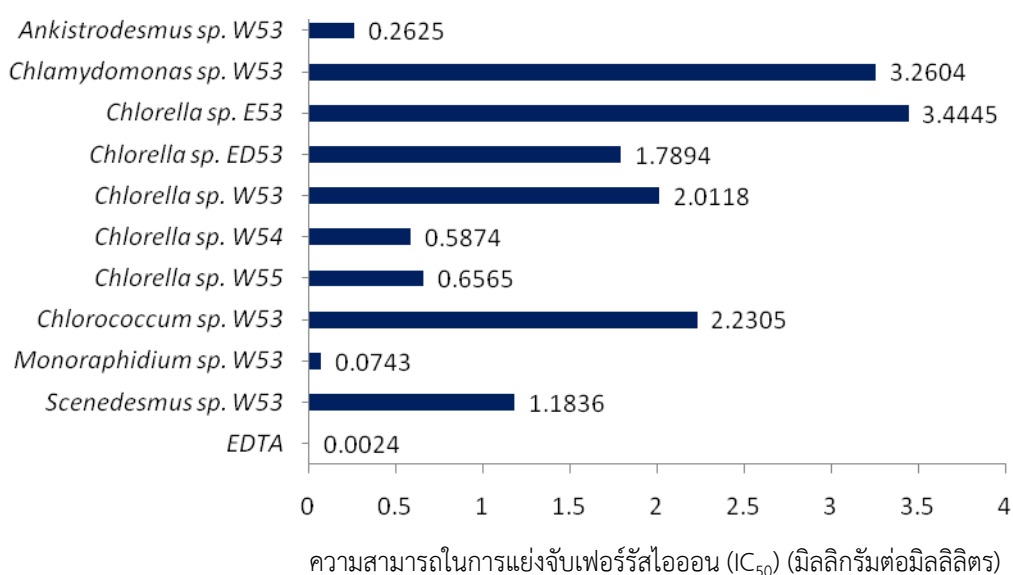
อิสระที่เพิ่มมากขึ้น (Hu และคณะ, 2008) นอกจากนี้ Cho และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลสีเขียว *Enteromorpha prolifera* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเอทิลอะซิเตท พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลสูงสุด เมื่อเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวก BHT และ α -tocopherol ที่ความเข้มข้น 0.25-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลสีเขียว *Enteromorpha prolifera* เกิดขึ้นเนื่องจากสารประกอบคลอโรฟิลล์ และฟิโอฟิไบด์ เอ

แต่เมื่อมองภาพโดยรวมแล้วจะพบว่าโดยทั่วไปสารสกัดจากน้ำร้อนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่ำ ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (ค่า EC_{50}) มีค่าสูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล

4.4.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับเฟอร์รัสไอออน (Ferrous ion chelating ability assay)

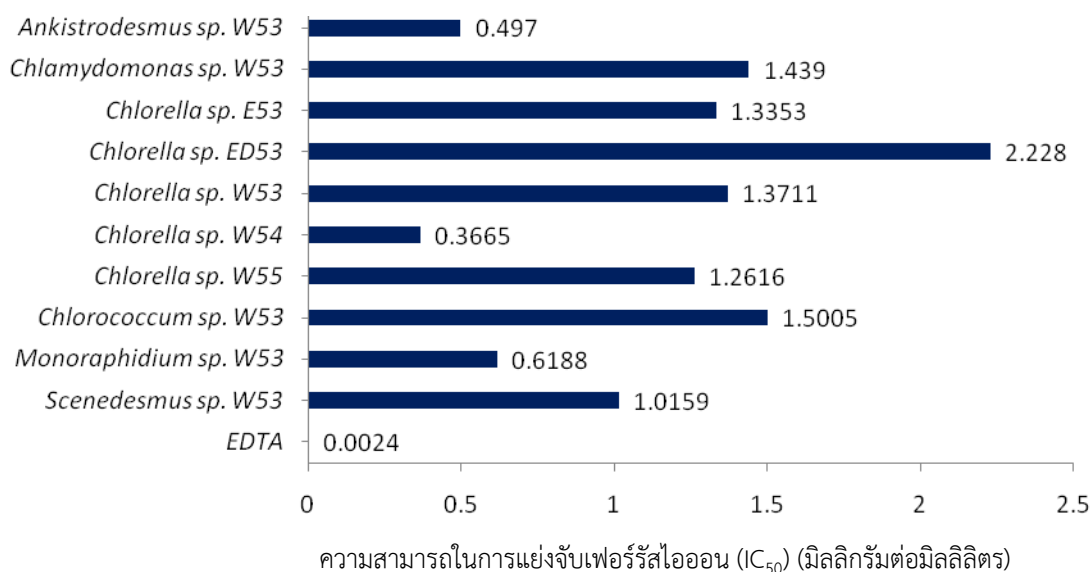
ความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออนเป็นการทดสอบหาสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม chelating agent ในสารสกัด ซึ่งจะไปแย่งจับกับไอออนของโลหะ ทำให้ลดการเกิดอนุมูลอิสระโดยปฏิกิริยา Fenton และ Haber-Weiss (Halliwell และ Gatteridge, 2007) การวัดความสามารถในการแย่งจับกับโลหะเป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้ในการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เพราะโลหะไอออนเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระหลายชนิด โดยเฉพาะธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์รัส หรือ Fe^{2+} จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็นสารอนุมูล Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวต่อไป ดังนั้นวิธีการวัดความสามารถในการแย่งจับโลหะ Fe^{2+} ของสารที่ต้องการทดสอบนั้น อาศัยจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรที่มีค่าลดลง โดยเมื่อเติมสาร Ferrozine ลงไป สารนี้จะไปจับกับ Fe^{2+} แล้วอยู่ในรูป Ferrozine - Fe^{2+} complex ซึ่งจะให้สีม่วงแดง และถ้าสารสกัดมีความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} จะอยู่ในรูป Antioxidant - Fe^{2+} complex แล้วจะทำให้สีม่วงแดงของ Ferrozine - Fe^{2+} complex จางลงได้ โดยแสดงได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรที่ลดลง จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเป็นร้อยละความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออน และเมื่อนำค่าร้อยละความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออน (% Inhibition) มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดหยาบ และหาสมการเส้นตรงเพื่อคำนวณหาความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออนได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.18 ซึ่งถ้าค่า IC_{50} ที่ได้มีค่าน้อย แสดงถึงประสิทธิภาพในการจับกับเฟอร์รัสไอออนก็ยิ่งมีมาก

จากการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์ มีค่า IC_{50} สูงกว่าค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน EDTA- Na_2 ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0024 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์ มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.0743 ถึง 3.4445 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดจาก *Monoraphidium* sp. W53 มีค่า IC_{50} ต่ำสุดเท่ากับ 0.0743 รองลงมาเป็นสารสกัดจาก *Ankistrodesmus* sp. W53, *Chlorella* sp.W54, *Chlorella* sp.W55, *Scenedesmus* sp.W53, *Chlorella* sp. ED53, *Chlorella* sp. W53, *Chlorococcum* sp. C53, *Chlamydomonas* sp.W53 และ *Chlorella* sp. E53 ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.2625 0.5874 0.6565 0.6560 1.1836 1.7894 2.0118 2.2305 3.2604 และ 3.4445 ตามลำดับ



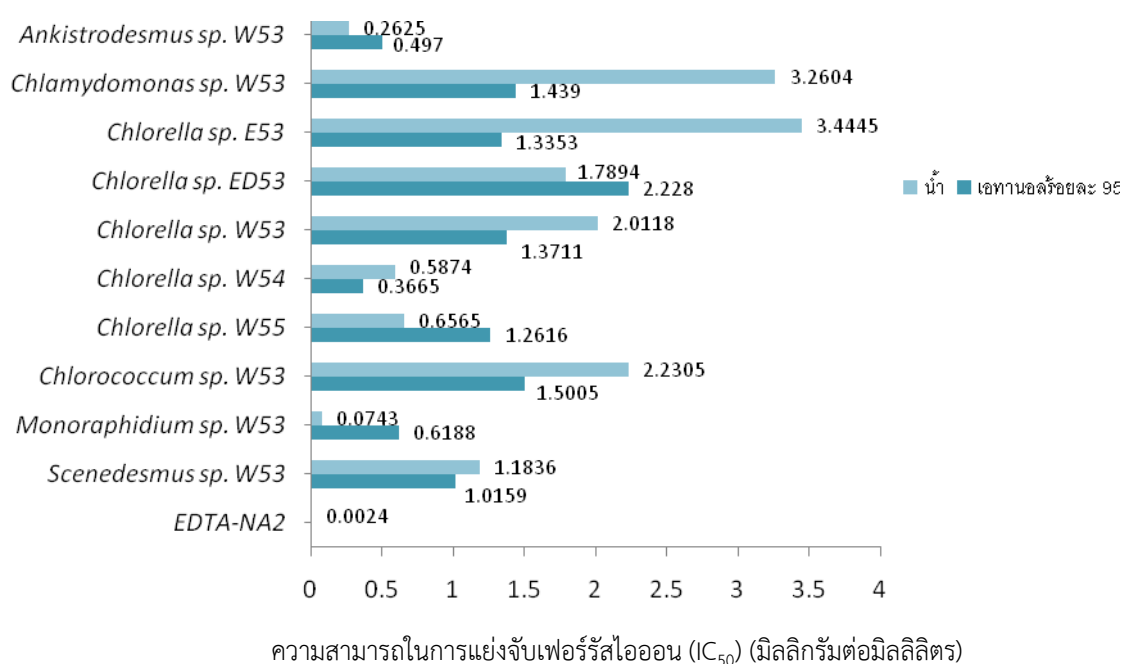
รูปที่ 4.18 ความสามารถในการยับยั้งเพอร์ร็อกซิไดซิ่ง (IC₅₀) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์

ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลของสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.3665 ถึง 1.5005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp.W54 มีค่า IC_{50} ต่ำสุดเท่ากับ 0.3665 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.19) และสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorococcum* sp. C53 มีค่า IC_{50} สูงสุดเท่ากับ 1.5005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นแสดงว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย *Chlorella* sp.W54 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกับเพอร์ร็อกซิไดซิ่งได้ดี



รูปที่ 4.19 ความสามารถในการยับยั้งเพอร์อกไซด์ออกซิเดชัน (IC₅₀) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์

แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ของสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลจากสาหร่ายชนิดเดียวกัน ทั้ง 10 สายพันธุ์จะเห็นว่าสารสกัดด้วยเอทานอลแสดงความสามารถในการยับยั้งเพอร์อกไซด์ออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ยกเว้นสารสกัดจาก *Monoraphidium* sp. W53 ซึ่งพบว่าสารสกัดด้วยน้ำจะมีค่า IC₅₀ ต่ำกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล (รูปที่ 4.20) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ตรงกันข้ามกับรายงานผลการทดลองของ Kuda และคณะ (2006) ที่รายงานว่าสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่ายสีน้ำตาล *Petalonia binghamiae* แสดงความสามารถในการยับยั้งเพอร์อกไซด์ออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล และจากผลการศึกษาของ Wang และคณะ (2009) ที่พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย 10 สายพันธุ์จากไต้หวันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเพอร์อกไซด์ออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดด้วยสารละลายอะซีโตนเข้มข้นร้อยละ 70 และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการยับยั้งเพอร์อกไซด์ออกซิเดชันของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกเช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH



รูปที่ 4. 20 ความสามารถในการยับยั้งเพอร์ออกซิเดชัน (IC₅₀) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์

4.4.3 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance

เป็นการศึกษาความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่ายโดยใช้กรดไขมันลิโนเลอิกทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้เป็นสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) จากนั้นเติมกรดไทโอบาร์บิทริกในสภาวะกรด สารมาลอนไดอัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทริกได้เป็นสารมีสีที่เรียกว่า ทีบีเออาร์เอส (Thiobarbituric acid reactive substance, TBARS) และเมื่อเติมสารสกัดจากสาหร่ายที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันลงไปจะมีผลทำให้สีจางลง สามารถตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็นร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 และ 4.6

ตารางที่ 4.5 ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์และสารมาตรฐาน BHT ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดจากสาหร่าย	ร้อยละของความสามารถในการยับยั้ง ¹ ปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน
<i>Ankistrodesmus</i> sp. W53	15.44 ^{e2} ± 2.45
<i>Chlamydomonas</i> sp. W53	15.76 ^e ± 5.04
<i>Chlorella</i> sp. E53	15.28 ^e ± 2.43
<i>Chlorella</i> sp. ED53	5.88 ^f ± 1.91
<i>Chlorella</i> sp. W53	22.26 ^d ± 1.38
<i>Chlorella</i> sp. W54	45.35 ^b ± 1.13
<i>Chlorella</i> sp. W55	15.46 ^e ± 0.13
<i>Chlorococcum</i> sp. C53	31.36 ^c ± 3.40
<i>Monoraphidium</i> sp. W53	32.61 ^c ± 2.92
<i>Scenedesmus</i> sp. W53	8.92 ^f ± 1.27
BHT	94.4 ^a ± 1.39

หมายเหตุ

¹ ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 6)

² a,b,c ... ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05)

เมื่อนำสารที่สกัดด้วยน้ำร้อนของสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันพบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน คิดเป็นร้อยละอยู่ในช่วง 5.88 ± 1.91 ถึง 45.35 ± 1.13 โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. W54 มีร้อยละความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน สูงสุดเท่ากับ 45.35 ± 1.13 และสารสกัดด้วยน้ำร้อนของ *Chlorella* sp. ED53 มีร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันต่ำสุดเท่ากับ 5.88 ± 1.91 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.5) จากผลการทดลอง ถึงแม้ *Chlorella* sp. W54 มีร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันสูงที่สุด แต่ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT ซึ่งมีร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันเท่ากับ 94.42 ± 1.39 พบว่ามีฤทธิ์ต่ำกว่าสารมาตรฐาน BHT ถึง 2 เท่า

การทดสอบความสามารถ ในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์และสารมาตรฐาน BHT พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีค่าร้อยละใน

การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันค่อนข้างสูง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 79.07 ± 3.93 ถึง 88.79 ± 3.54 ยกเว้นสารสกัดจาก *Ankistrodesmus* sp. W53 ซึ่งมีค่าการยับยั้งต่ำสุดเท่ากับร้อยละ 6.50 ± 0.08 เท่านั้น (ตารางที่ 4.6) จากผลการทดลองสารสกัดจาก *Scenedesmus* sp. W53 มีร้อยละความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันสูงที่สุดเท่ากับ 88.80 ± 3.54 รองลงมาเป็นสารสกัดหยาบจาก *Chlorella* sp. ED53 มีร้อยละความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันเท่ากับ 87.96 ± 0.59 แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าในการยับยั้งของสารมาตรฐาน BHT (ร้อยละ 94.42 ± 1.39) พบว่า ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่จะใช้สารสกัดจาก *Scenedesmus* sp. W53 และ *Chlorella* sp. ED53 ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติแทนสารสังเคราะห์ได้ เชื่อกันว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติจะไปทำลายสายโซ่ของอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยการให้อะตอมของไฮโดรเจนทำให้ตัวอนุมูลอิสระมีความเสถียรมากยิ่งขึ้น (Naveena และคณะ, 2008) มีรายงานของ Lupu (2006) พบว่ามีการใช้สาหร่ายทะเล *Porphyridium cruentum* เป็นสารเติมแต่งในอาหารและยัตอายุการเก็บรักษาอาหารสดและอาหารแห้ง เนื่องจากว่าสารเคมีที่ใช้ในการถนอมอาหารนั้นไม่เป็นผลดีต่อสุขภาพ

ตารางที่ 4.6 ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย 10 สายพันธุ์และสารมาตรฐาน BHT ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

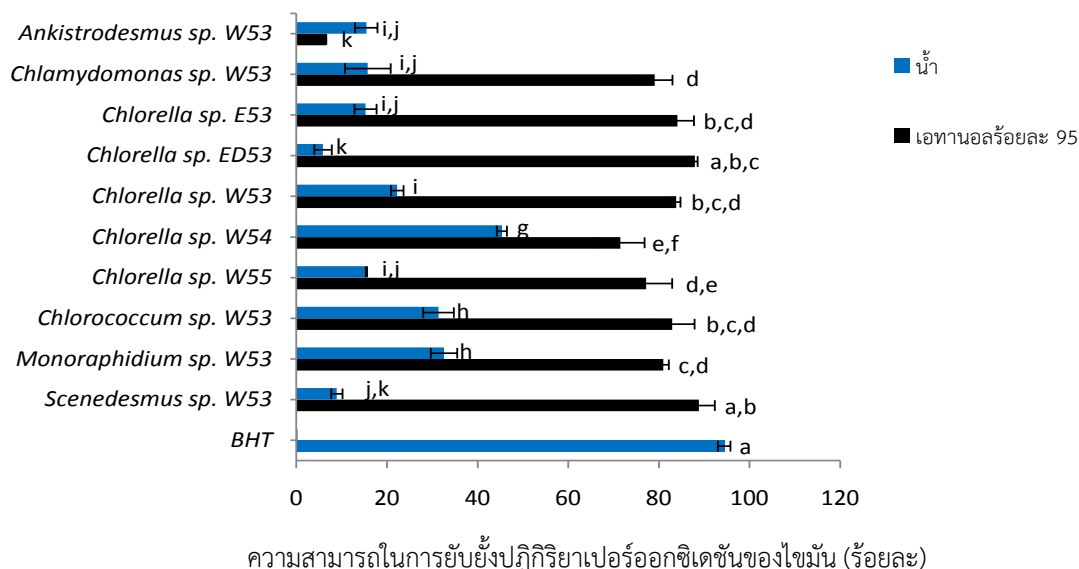
สาหร่าย	ร้อยละของความสามารถในการยับยั้ง ¹ ปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน
<i>Ankistrodesmus</i> sp. W53	$6.50^{e2} \pm 0.08$
<i>Chlamydomonas</i> sp. W53	$79.07^{cd} \pm 3.93$
<i>Chlorella</i> sp. E53	$84.12^{bc} \pm 3.61$
<i>Chlorella</i> sp. ED53	$87.96^{ab} \pm 0.59$
<i>Chlorella</i> sp. W53	$83.80^{bc} \pm 0.96$
<i>Chlorella</i> sp. W54	$71.53^d \pm 5.34$
<i>Chlorella</i> sp. W55	$77.17^{cd} \pm 5.78$
<i>Chlorococcum</i> sp. C53	$82.96^{bc} \pm 4.89$
<i>Monoraphidium</i> sp. W53	$80.95^{bc} \pm 1.22$
<i>Scenedesmus</i> sp. W53	$88.79^{ab} \pm 3.54$
BHT	$94.42^a \pm 1.39$

หมายเหตุ

- 1 ร้อยละความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน ของสารสกัดแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 6)
- 2 a, b, c, d, e ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

และเมื่อเปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน ของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอล จะพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของสาหร่ายทุ กชนิดยกเว้นสารสกัดจาก *Ankistrodesmus* sp. W53 มีร้อยละในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน สูงกว่าสารสกัดจากน้ำร้อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4.21 ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ ต่ำ เช่นเดียวกันกับ Nakayama และคณะ (1999) ซึ่งใช้สารสกัดจากสาหร่ายสีแดงซูซาบินอรี (*Porphyra yezoensis*) ที่สกัดด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต อะซิโตน อัตราส่วนของคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล (2:1) เมทานอล และน้ำร้อน (อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส) พบว่าสารสกัดจากน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน โดยวิธี TBARS เพียงเล็กน้อย ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับสารสกัดด้วยน้ำร้อนของสาหร่ายขนาดเล็กที่ใช้ในการทดลองนี้

เป็นที่ทราบกันดีว่าสารที่ละลายได้ในไขมันมีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันดีกว่าสารที่ละลายในน้ำ (Kosar และคณะ, 2011) การสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดและอุณหภูมิจัดว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญในการดึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระออกมา โดยดูได้จากความเป็นขั้วของตัวทำละลายที่ใช้สกัด (Dorta และคณะ, 2012) เช่น สารประกอบฟีนอลิก มีทั้งละลายในตัวทำละลายน้ำและเอทานอล เป็นต้น ซึ่งฤทธิ์ที่ได้จะแตกต่างกันไปด้วย ดังเช่น Ikhsan และ Fatin (2006) ได้ทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดแยกได้ 14 สายพันธุ์ พบว่าสาหร่าย 6 สายพันธุ์ที่สกัดด้วยเมทานอล ได้แก่ *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* และ *Tetraselmis tetrahele* มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน โดยที่ *I. galbana* และ *C. calcitrans* มีฤทธิ์สูงสุด คือ มีร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยานี้มากกว่า 90 เมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละของความสามารถในการยับยั้งของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 ที่มีความสามารถในการยับยั้ง ต่ำกว่างานวิจัยของ Ikhsan และ Fatin (2006) อาจเนื่องมาจากการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันในการสกัด



รูปที่ 4.21 ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลจากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ ซึ่งตัวอักษร a,b,c.... ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลอง สาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 ที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 27.90 ± 2.69 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันสูงที่สุด ในขณะเดียวกัน สาหร่าย *Chlorella* sp. ED53 และ *Chlorella* sp. E53 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเดียวกันมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 29.10 ± 1.27 และ 35.50 ± 0.14 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ แต่สาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีค่าความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันต่ำกว่า *Scenedesmus* sp. W53 แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกไม่ได้เป็นตัวการหลักในแสดงฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ About-Enein และคณะ (2003) พบว่า *Scenedesmus dimorphus* และ *Chlorella ellipsoidea* มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่คล้ายกัน เนื่องจากมีวิตามินบางตัวที่เหมือนกัน

Silva และคณะ (2011) ได้ทำการสกัดโพลีแซคคาไรด์เพื่อดำเนินปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในการทำลายเซลล์ลำไส้ของหนูจากสาหร่ายสีแดง *Gracilaria caudate* พบว่าโพลีแซคคาไรด์จะไปลดความเข้มข้นของสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ซึ่งเป็นตัวการในการทำลายเซลล์ลำไส้หนู

จากการทดลองของ Guedes และคณะ (2011) พบว่า *Scenedesmus almeriensis* มีสารจำพวกกลูทีน และเบต้า - แคโรทีนในปริมาณสูง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารเหล่านี้มี ผลในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้

นอกจากนี้ Sa'ñchez และคณะ (2008) พบว่า *Scenedesmus almeriensis* สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้หลายชนิดได้แก่ ลูทีน เบต้า - แคโรทีน แอสต้าแซนทิน ไวโอแซนทิน และแคนตาแซนทิน ซึ่งมีปริมาณแคโรทีนอยด์ร้อยละ 0.53 0.07 0.05 0.03 และ 0.01 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเป็นสามารถผลิตลูทีนสูงที่สุด อาจกล่าวได้ว่าลูทีนเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้นั่นเอง

อย่างไรก็ตามในสาหร่ายขนาดเล็กยังพบรงควัตถุอีกชนิดหนึ่งที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ นั่นก็คือ คลอโรฟิลล์เอและคลอโรไฟลิน (Dietaryfiberfood, 2012) นอกจากนี้ Shanab (2007) รายงานว่า คลอโรฟิลล์ เอ จะไปจับกับประจุลบของอนุมูลเปอร์ออกซิลทำหน้าที่ช่วยเสริมฤทธิ์ให้กับวิตามินอี ซึ่งอาจพบวิตามินอีในสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอลก็เป็นได้

จากการศึกษาของ Chakraborty และคณะ (2013) ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทจากสาหร่ายสีน้ำตาลสายพันธุ์ *Turbinaria conoides* และ *Turbinaria ornata* คัดแยกจากอ่าวมานนารีในชายฝั่งตะวันออกเฉียงใต้ของอินเดีย พบว่าสารสกัดจาก *T. conoides* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 105.97 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง มากกว่า *T. ornata* ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 69.63 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจาก *T. ornata* ที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันที่ร้อยละ 50 (IC₅₀) เท่ากับ 0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

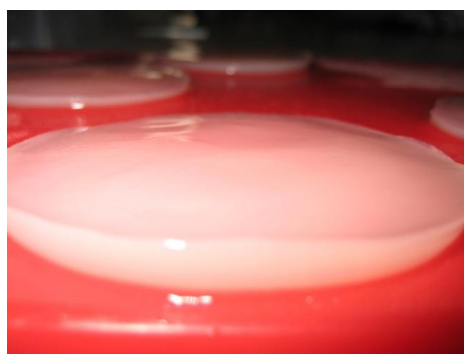
4.5 การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสจากแบคทีเรียในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน

จากการศึกษา ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด จากสาหร่าย 10 สายพันธุ์ได้แก่ *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 โดยทำการตรวจสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรวมตัวกับเฟอร์รัสไอออนและความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 88.80 นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดี (EC₅₀ เท่ากับ 0.8672 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รวมทั้งมีความสามารถในการรวมตัวกับเฟอร์รัสไอออนได้ระดับปานกลางเมื่อเทียบกับสาหร่ายสายพันธุ์อื่น (IC₅₀ เท่ากับ 1.0159 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันเหล่านี้มีความสำคัญต่อการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของไขมันสูง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์

ออกซิเดชันของไขมันร่วมกับเซลลูโลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย และทดลองใช้กับผลิตภัณฑ์เนื้อแปรรูปเพื่อชะลอการเหม็นหืนที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

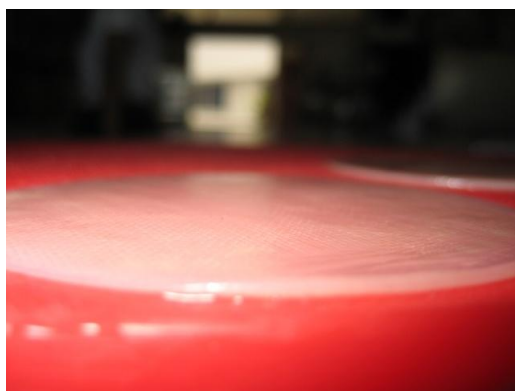
4.5.1 การเตรียม เซลลูโลสที่ได้จากการหมักของเชื้อ *Gluconacetobacter xylinus* TISTR 976

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Gluconacetobacter xylinus* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ภายใต้สภาวะนิ่งในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีลักษณะเป็นแผ่นลอยอยู่บนผิวหน้าของอาหาร สีขาวขุ่น (รูปที่ 4.22) มีความหนาประมาณ 0.34 เซนติเมตร



รูปที่ 4.22 ลักษณะของแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการหมักเชื้อ *Gluconacetobacter xylinus* TISTR 976

จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำมารีดน้ำออกโดยใช้แรงอัด 7 ตัน จะได้แผ่นฟิล์มเซลลูโลส ที่มีความหนาประมาณ 0.08 เซนติเมตร (รูปที่ 4.23) ซึ่งแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.23 ลักษณะของแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ได้จากการรีดน้ำออกจากแผ่นเซลลูโลสด้วยเครื่อง รีดน้ำ

4.5.2 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัด ด้วยเอทานอล จากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

โดยเตรียมสารสกัดจากสาหร่ายให้มีความเข้มข้น เป็น 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งผลการทดลองพบว่าร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายนั้นคือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้นความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันจะเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน อยู่ในช่วงร้อยละ 29.31 ± 4.12 ถึง 88.48 ± 2.47 ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้นต่างๆ

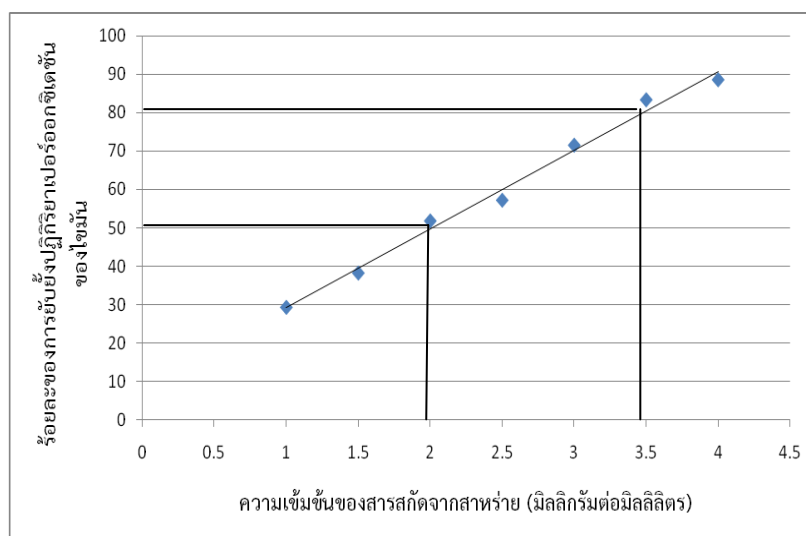
ความเข้มข้นของสารสกัด สาหร่าย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ¹
1.0	$29.31^g \pm 4.12$
1.5	$38.22^f \pm 2.22$
2.0	$51.77^e \pm 0.83$
2.5	$57.16^d \pm 1.48$
3.0	$71.47^c \pm 0.60$
3.5	$83.28^b \pm 1.04$
4.0	$88.48^a \pm 2.47$

หมายเหตุ

¹ ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่าย แสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$)

² เมื่อพิจารณาในแนวตั้งตัวอักษร a-g ที่แตกต่างกันแสดงถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

และเมื่อนำความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่าย และ ค่าร้อยละการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันมาพล็อตกราฟ เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.24)



รูปที่ 4.24 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 และร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน

และเมื่อเปรียบเทียบ ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ของสารกันหืนสังเคราะห์ BHT ที่ความเข้มข้น 1.0-4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเช่นเดียวกัน พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 82.38 ± 0.27 ถึง 93.52 ± 1.23 (ตารางที่ 4.8) โดยที่ความเข้มข้นของสารละลาย BHT ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน เป็น 82.38 ± 0.27 ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 3.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.24)

ตารางที่ 4.8 ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของ BHT ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยา ¹ เปอร์ออกซิเดชันของไขมัน
1	$82.38^{c2} \pm 0.27$
1.5	$85.07^b \pm 1.05$
2	$87.73^b \pm 0.21$
2.5	$89.97^b \pm 0.38$
3	$91.11^a \pm 0.47$
3.5	$91.97^a \pm 0.42$
4	$93.52^a \pm 1.23$

หมายเหตุ

¹ ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารละลาย BHT โดยแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

² a,b,c เมื่อพิจารณาในแนวตั้งตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.5.3 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 ที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ร้อยละ 50 ซึ่งพบว่ามีค่าเท่ากับ 1.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงทดลองใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายเป็น 2 3 และ 4 เท่าของ IC_{50} โดยใช้ความเข้มข้นเป็น 4.0 6.0 และ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการแช่แผ่นเซลลูโลส จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสที่ผ่านการแช่สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้นต่างๆ มาวิเคราะห์ร้อยละของความสามารถ ในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ด้วยวิธี TBARS พบว่าร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันมีค่าเพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่ายที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.25) โดยที่แผ่นเซลลูโลสที่แช่ สารสกัดสาหร่ายความเข้มข้น 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 60.31 ± 3.36 รองลงมาได้แก่แผ่นเซลลูโลสที่แช่สารสกัดสาหร่ายความเข้มข้น 6.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีร้อยละในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันเท่ากับ 54.52 ± 3.62 และ 46.61 ± 3.55 ตามลำดับ

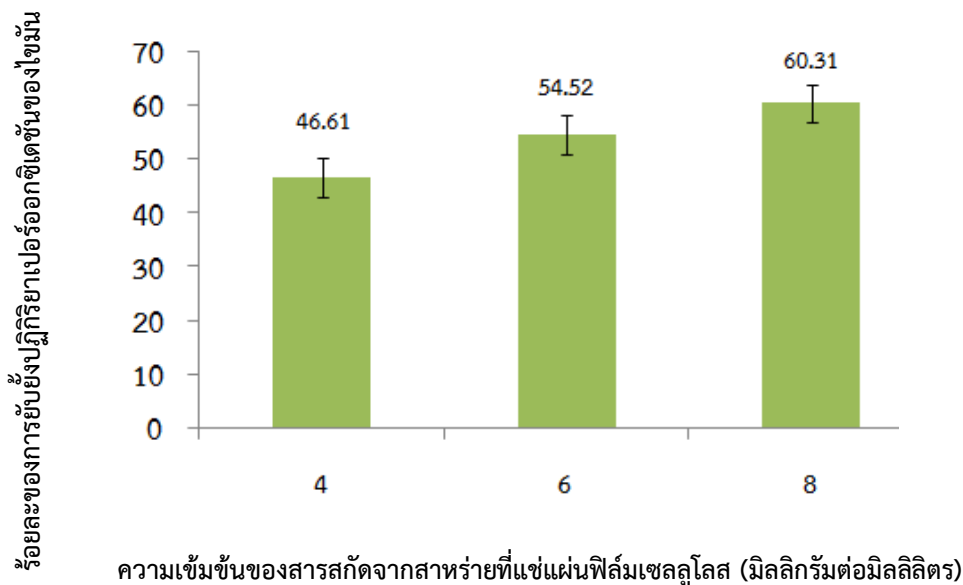
ตารางที่ 4.9 ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของแผ่นเซลลูโลสที่แช่สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่าย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ¹
4.0	$46.61^{c2} \pm 3.55$
6.0	$54.52^b \pm 3.62$
8.0	$60.31^a \pm 3.36$

หมายเหตุ

¹ ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดจากสาหร่าย แสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)

² เมื่อพิจารณาในแนวตั้งตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.25 ร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันโดยใช้สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 4 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งจากการผลศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นหากใช้สารสกัดสาหร่ายที่มีความเข้มข้น 4.0 6.0 และ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปแช่แผ่นฟิล์มเซลลูโลส แผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่แช่สารสกัดจากสาหร่ายด้วยความเข้มข้นดังกล่าวควรมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ร้อยละ 100 150 และ 200 ตามลำดับ แต่จากผลการทดลองพบว่าสามารถยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้เพียงร้อยละ 46.61 ± 3.55 54.52 ± 3.62 และ 60.31 ± 3.36 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่แช่สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลดลงไ้มากกว่าครึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของสารสกัดของสารสกัดที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 88.48 ± 2.47

4.6 การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมูขึ้นรูป

ค่า TBARS เป็นการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน โดยการวัดสารประกอบพวมาโลนัลดีไฮด์ (malonaldehyde, MDA) ซึ่งเป็นตัวที่เกิดจากการเสื่อมของ lipid hydroperoxide สารประกอบนี้ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันสูง (Laguerre และคณะ, 2007) ในการวิเคราะห์จะเติมกรดไทโอบาร์บิทริกในสภาวะกรด สาร MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทริกได้เป็นสารมีสี เรียกว่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)

เมื่อเติมสารสกัดทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันลงไป จะทำให้สารสีนั้นจางลงจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร (โอภา และคณะ , 2549) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณค่า TBARS ในรูปของมิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง

ในการทดลองได้ทำการเตรียมแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ผ่านการแช่สารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้น 4 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่นฟิล์มที่ได้มาห่อหุ้มกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่มีขนาด 1x1.5 นิ้ว โดยเปรียบเทียบกับกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ไม่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลส และกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ไม่แช่สารสกัด จากนั้นนำตัวอย่างกุนเชียงหมูทั้งหมดไปเก็บรักษาโดยใช้สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ทำการตรวจวิเคราะห์ค่า TBARS ทุกๆ 3 วัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.26 ซึ่งพบว่า ใน 3 วันแรกของการเก็บรักษา ตัวอย่างกุนเชียงหมูชิ้นรูปทุกทรีตเมนต์มีค่า TBARS เพิ่มขึ้นจากระยะเวลาเริ่มต้นซึ่งมีค่าเท่ากับ 161.50 ± 3.89 มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง โดยกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ไม่ห่อหุ้ม ด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลส กุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ไม่แช่สารสกัด กุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่แช่สารสกัด 4 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า TBARS ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 245.65 ± 2.94 245.65 ± 1.47 258.78 ± 3.87 242 ± 5.10 และ 241.40 ± 5.30 มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง ตามลำดับ และตั้งแต่วันที่ 6 ของการเก็บรักษาค่า TBARS ของตัวอย่างมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่การเพิ่มขึ้นของค่า TBARS ในตัวอย่างกุนเชียงที่ไม่ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสและตัวอย่างห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ไม่แช่สารสกัดมีค่าสูงกว่ากุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่แช่สารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และในวันสุดท้ายของการเก็บรักษา (วันที่ 15) ตัวอย่างกุนเชียงที่ไม่ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสและตัวอย่างห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ไม่แช่สารสกัด มีค่า TBARS เพิ่มขึ้นเป็น 289.85 ± 10.30 และ 280.50 ± 2.55 มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง ตามลำดับ ส่วนกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่แช่สารสกัด 4 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า TBARS ที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 15 ของการเก็บรักษาเป็น 246.50 ± 3.89 253.30 ± 8.95 และ 255.85 ± 10.61 ตามลำดับซึ่งพบว่าค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ดังนั้นจากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่ากุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยสารสกัดจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 สามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในระหว่างการรักษาเมื่อเปรียบเทียบกับกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ไม่ได้ห่อหุ้มแผ่นฟิล์มเซลลูโลส หรือกุนเชียงหมูชิ้นรูปที่ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสที่ไม่ผ่านการแช่สารสกัดจากสาหร่าย

ความสามารถในการชะลอการเกิดออกซิเดชันของไขมันในกุนเชียงหมูขึ้นรูประหว่างการเก็บรักษา อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบที่เป็นสารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากสาหร่าย เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารสีคลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และ ฟิโอฟราไบด์ เอ เป็นต้น ซึ่งจากผลการทดลอง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด ด้วยเอทานอลจาก *Scenedesmus* sp. W53 พบว่ามีค่าเท่ากับ 27.90 ± 2.69 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัม สารสกัด และจากการศึกษาของระพีพันธ์ และคณะ (2554) ได้ศึกษาปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดของ *Scenedesmus* sp. W53 พบว่ามีค่าเท่ากับ 2.5523 ± 0.53 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน พบว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ 88.80 ± 3.54 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Lopez และคณะ (2011) ได้ทำการสกัดสารสกัดจากสาหร่ายสี น้ำตาล *Stypocaulon scoparium* โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ และเมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่วิเคราะห์ได้กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

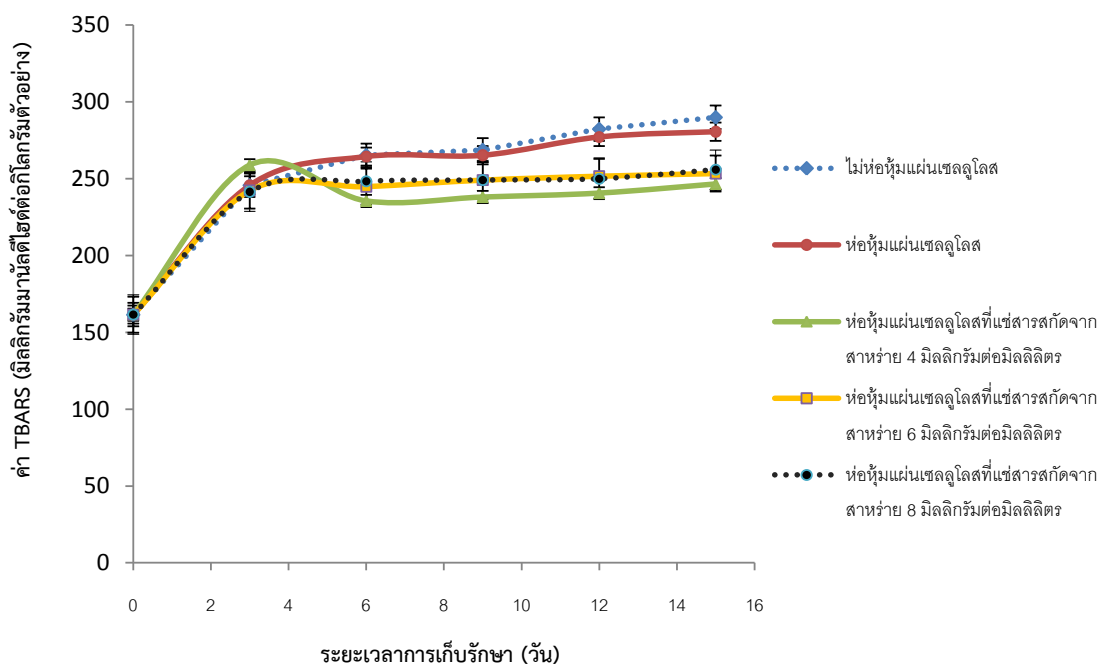
ตารางที่ 4.10 ค่า TBARS ของตัวอย่างกุ้งแช่แข็งรูปปั้นระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 วัน

ตัวอย่างกุ้งแช่แข็งรูปปั้น	ค่า TBARS (มิลลิกรัมของมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมตัวอย่าง) ¹					
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)					
	0	3	6	9	12	15
ไม่ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลส	161.50 ^a ² ± 3.89	245.65 ^a ± 2.94	265.20 ^a ± 2.55	268.60 ^a ± 2.94	282.20 ^a ± 3.89	289.85 ^a ± 10.30
ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสที่ไม่แช่สารสกัด	161.50 ^a ± 3.89	245.65 ^a ± 1.47	264.35 ^a ± 3.89	265.20 ^a ± 6.75	277.10 ^a ± 5.31	280.50 ^a ± 2.55
ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสที่แช่สารสกัด	161.50 ^a ± 3.89	258.78 ^a ± 3.87	235.45 ^b ± 5.89	238.00 ^b ± 6.42	240.55 ^c ± 5.31	246.50 ^b ± 3.89
4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร						
ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสที่แช่สารสกัด	161.50 ^a ± 3.89	242.25 ^a ± 5.10	244.67 ^b ± 11.02	249.05 ^b ± 3.89	251.60 ^b ± 1.47	253.30 ^b ± 8.95
6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร						
ห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสที่แช่สารสกัด	161.50 ^a ± 3.89	241.40 ^a ± 5.30	248.20 ^b ± 10.62	249.05 ^b ± 7.79	249.90 ^b ± 2.55	255.85 ^b ± 10.61
8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร						

หมายเหตุ

¹ ค่า TBARS (มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมตัวอย่าง) ที่ได้แสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

² เมื่อพิจารณาในแนวตั้งตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.5)



รูปที่ 4.26 การเปลี่ยนแปลงค่า TBARS (มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโกรัมตัวอย่าง) ของกุ้งเชียงใหม่ขึ้นรูปทรีทเมนต์ต่างๆ ที่เก็บรักษาอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

เมื่อพิจารณาการเพิ่มขึ้นโดยรวมของค่า TBARS จากวันที่ 0 ถึงวันที่ 15 ของการเก็บรักษาของตัวอย่างกุ้งเชียงใหม่ขึ้นรูปทรีทเมนต์ต่างๆ (ตารางที่ 4.11) พบว่ากุ้งเชียงใหม่ขึ้นรูปที่ไม่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มเซลลูโลสมีค่า TBARS ที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 128.35 ± 7.65 มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโกรัมตัวอย่าง ซึ่งสูงที่สุด รองลงมาได้แก่กุ้งเชียงใหม่ขึ้นรูปห่อหุ้มแผ่นเซลลูโลสที่ไม่ผ่านการแช่สารสกัดจากสาหร่าย และกุ้งเชียงใหม่ขึ้นรูปที่แช่สาร BHT 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า TBARS ที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 119.00 ± 5.89 และ 119.00 ± 3.89 มิลลิกรัมมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ แต่พบว่า ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.11 ค่า TBARS ที่เพิ่มขึ้นของตัวอย่างกุ้งแช่แข็งหมูขึ้นรูปในวันที่ 15 ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างกุ้งแช่แข็งหมูขึ้นรูป	ค่า TBARS ที่เพิ่มขึ้น ¹
ไม่ห่อหุ้มแผ่นเซลล์โลส	128.35 ^{a 2} ± 7.65
ห่อหุ้มแผ่นเซลล์โลสที่ไม่แช่สารสกัด	119.00 ^a ± 5.89
ห่อหุ้มแผ่นเซลล์โลสที่แช่สารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	84.87 ^b ± 3.94
ห่อหุ้มแผ่นเซลล์โลสที่แช่สารสกัด 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	89.25 ^b ± 8.83
ห่อหุ้มแผ่นเซลล์โลสที่แช่สารสกัด 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	94.35 ^b ± 12.75

หมายเหตุ

¹ค่า TBARS ที่เพิ่มขึ้นในกุ้งแช่แข็งหมูขึ้นรูป แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

²เมื่อพิจารณาในแนวตั้งตัวอักษร a-b ที่แตกต่างกันแสดง ถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการวิเคราะห์ปริมาณฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลจากสาหร่ายสีเขียวจำนวน 10 สายพันธุ์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากสาหร่ายมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด โดยทั่วไปสารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่ารวมทั้งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ นอกจากนี้ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากสาหร่ายที่นำมาศึกษาไม่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ได้ โดยสารสกัดด้วยเอทานอลของ *Monoraphidium* sp. W53 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด (EC_{50} เท่ากับ 1.1492 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดด้วยเอทานอลของ *Chlorella* sp. W54 มีความสามารถในการยับยั้งเพอร์ออกไซด์ไอออนสูงที่สุด (IC_{50} เท่ากับ 0.3665 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดด้วยเอทานอลของ *Scenedesmus* sp. W53 มีค่าร้อยละความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันสูงสุดเท่ากับ 88.79 ± 3.54 และค่าที่ได้พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน BHT ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 94.42 ± 1.39

เมื่อนำสารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Scenedesmus* sp. W53 ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาประยุกต์ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในกุนเชียงหมูขึ้นรูปในระหว่างการเก็บรักษา ผลการทดลองพบว่า การห่อหุ้มกุนเชียงหมูขึ้นรูปด้วยแผ่นฟิล์มที่แช่สารสกัดจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. W53 ที่ความเข้มข้น 4 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในระหว่างการเก็บรักษาได้เมื่อเปรียบเทียบกับกุนเชียงหมูขึ้นรูปที่ไม่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มและกุนเชียงหมูขึ้นรูปที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นฟิล์มที่ไม่แช่สารสกัด

ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวน 10 สายพันธุ์มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน เช่น บางสายพันธุ์มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงแต่มีความสามารถในการยับยั้งกับเพอร์ออกไซด์ไอออนต่ำ ในขณะที่บางสายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันสูงแต่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ไม่สูงมากนัก ดังนั้นควรเลือกใช้สารสกัดจากสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ให้เหมาะกับวัตถุประสงค์ที่นำสารสกัดมาใช้งาน นอกจากนี้พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่

วิเคราะห์ได้ในสารสกัดไม่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ใช้ทดสอบ ดังนั้นควรมีการศึกษาหาสารประกอบทางเคมีที่ออกฤทธิ์สำคัญ รวมทั้งทำให้สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น นอกจากนี้ อาจจะต้องมีการปรับปรุงคุณสมบัติของแผ่นฟิล์มเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียเพื่อให้สามารถดูดซับสารสกัดจากสาหร่ายได้มากขึ้นและปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ออกมาอย่างช้าๆ เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้น เช่นการใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน (Microencapsulation) เป็นต้น

