รายงานผลการวิจัย

ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2561

เรื่อง

การศึกษาประสิทธิภาพพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้เป็นพรีไบโอติก

Study on Efficiency of Polysaccharide from Marine Seaweed for Applied to Prebiotic

เอนก โสภณ อภิชาติ กาญจนทัต และเอกธิดา ทองเด็จ

สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พฤศจิกายน 2561

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการศึกษาประสิทธิภาพพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้เป็นพรีไบโอติก เป็นโครงการที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2561 ซึ่งคณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง นอกจากนั้น งานวิจัยนี้สามารถดำเนินการจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจนสามารถมีผลผลิตเป็นรายงานฉบับสมบูรณ์ การนำเสนอในการประชุมวิชาการต่างๆ รวมทั้งมีแผนการจะจัดทำเป็นบทความในวารสารวิชาการภายในประเทศ โดยได้รับการสนับสนุนจากบุคคลและหน่วยงานต่างๆ ดังนี้

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ และสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกด้านสถานที่การวิจัย รวมทั้งคณะกรรมการประเมินผลงานวิจัยในครั้งนี้ทุกท่านที่กรุณาให้คำปรึกษาและให้ข้อคิดเห็นในการดำเนินงานโครงการจนสามารถดำเนินการสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร.มณฑกานติ ท้ามติ้น ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งเพชรบุรี กรมประมง ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผักกาดทะเล และคุณจิรรัตน์ สังข์ทอง เจ้าของฟาร์มสาหร่ายผมนาง อำเภอสะเดา จังหวัดสงขลา ที่ให้ความอนุเคราะห์สาหร่ายผมนางสำหรับการทดลองครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวสุชารัตน์ สุกใส นิสิตปริญญาโท ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ช่วยวิจัยประจำโครงการที่เป็นกำลังสำคัญในการปฏิบัติงานวิจัยครั้งนี้ให้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดียิ่ง

ทางผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยชิ้นนี้จะสามารถนำไปต่อยอดหรือนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อเกษตรกร นิสิตนักศึกษา และผู้ที่สนใจตามเจตนารมณ์ของการวิจัยได้

บทคัดย่อ

โครงการการศึกษาประสิทธิภาพพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้เป็นพรีไบโอติก โดยการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการและพอลิแซ็กคาไรด์ จากสาหร่ายทะเล 3 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) และสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria fisheri*) พบว่าคุณค่าทางโภชนาการของคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายผักกาดทะเลสดและอบแห้งมีโปรตีนร้อยละ 1.68 และ 10.51 ตามลำดับ ไขมันร้อยละ 0.08 และ 5.24 ตามลำดับ ความชื้นร้อยละ 80.72 และ 10.15 ตามลำดับ เถ้าร้อยละ 4.86 และ 50.24 ตามลำดับ และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 12.66 และ 23.86 ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายพวงองุ่นสดและอบแห้งมีโปรตีนร้อยละ 0.57 และ 4.63 ตามลำดับ ไขมันร้อยละ 0.10 และ 2.15 ตามลำดับ ความชื้นร้อยละ 89.92 และ 10.28 ตามลำดับ เถ้าร้อยละ 2.80 และ 64.32 ตามลำดับ และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 6.61 และ 18.62 ตามลำดับ และสาหร่ายผมนางสดและอบแห้งมีโปรตีนร้อยละ 1.64 และ 8.23 ตามลำดับ ไขมันร้อยละ 0.15 และ 3.64 ตามลำดับ ความชื้นร้อยละ 81.62 และ 10.12 ตามลำดับ เถ้าร้อยละ 4.62 และ 57.50 ตามลำดับ และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 11.97 และ 20.51 ตามลำดับ ผลการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำร้อนพบว่าสาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้งที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที และใช้อัตราส่วนสาหร่าย 1 กรัมต่อน้ำ 75 มิลลิลิตร ให้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 165.02 $\pm$ 1.11 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายพวงองุ่นอบแห้งและสาหร่ายผมนางอบแห้งที่ให้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 24.74 $\pm$ 0.67 และ 32.48 $\pm$ 0.72 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง ในปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้สกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายแต่ละชนิดตามลำดับ และเมื่อคำนวณค่า degree of polymerization (DP) เพื่อประมาณขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์สาหร่ายผักกาดทะเลสดมีค่า DP ประมาณ 14 และพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้งมีค่า DP ประมาณ 7 ในขณะที่สาหร่ายพวงองุ่นสดและสาหร่ายพวงองุ่นอบแห้งมีค่า DP เท่ากับ 10 และ 5 ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายผมนางสดและสาหร่ายผมนางอบแห้งมีค่า DP เท่ากับ 12 และ 6 ตามลำดับ

จากการศึกษาชนิดของน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์จากพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางพบว่า ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส กาแล็กโทส แมนโนส และแรมโนส เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิด มาผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์เพกทิเนส 5 ยูนิต ใช้เวลาในการบ่ม 40 นาที สามารถผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเลได้สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของพอลิโกแซ็กคาไรด์เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า DP เท่ากับ 4.8 ส่วนสาหร่ายพวงองุ่นสามารถผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด เมื่อความเข้มข้นของพอลิโกแซ็กคาไรด์เท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า DP เท่ากับ 2.6 และสาหร่ายผมนางสามารถผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของพอลิโกแซ็กคาไรด์เท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า DP เท่ากับ 3.8

ส่วนการศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลอบแห้งทั้ง 3 ชนิด พบว่าในสาหร่ายแต่ละชนิดมีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกสำหรับเชื้อโพรไบโอติก *Bacillus subtilis* ที่ความเข้มข้นของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ต่างกัน โดยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จาก

สาหร่ายผักกาดทะเล และสาหร่ายพวงองุ่น ที่มีความเหมาะสมสูงสุดสำหรับการเป็นพรีไบโอติกสำหรับเชื้อโพรไบโอติก *B. subtilis* อยู่ที่ความเข้มข้น 3.0, 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผมนางที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกสำหรับเชื้อโพรไบโอติก *B. subtilis* สูงที่สุด ซึ่งประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของเชื้อโพรไบโอติก *B. subtilis* ขึ้นอยู่กับปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์และการแตกตัวออกมาเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่แตกต่างกัน และเมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผมนาง ที่ความเข้มข้นซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกดีที่สุดในสาหร่ายแต่ละชนิดแล้ว พบว่า พรีไบโอติกที่สกัดได้จากสาหร่ายผักกาดทะเลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดีกว่าพรีไบโอติกที่สกัดได้จากสาหร่ายผมนางและสาหร่ายพวงองุ่น ดังนั้น สาหร่ายผักกาดทะเลจึงนับว่าเป็นสาหร่ายที่มีศักยภาพที่จะนำมาสกัดพรีไบโอติกที่ดีที่สุดจากการวิจัยครั้งนี้และมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาต่อยอดเพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus* ที่จะเกิดขึ้นในสัตว์น้ำต่อไป

คำสำคัญ: สาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น สาหร่ายผมนาง พอลิแซ็กคาไรด์

Abstract

The project of study on efficiency of polysaccharide from marine seaweed for prebiotic were few studies on the extract and the application of these algae. This research studied nutritional values and polysaccharides from Sea Lettuce (*Ulva rigida*), Sea Grape (*Caulerpa lentillifera*) and Gracilaria (*Gracilaria fisheri*). The nutritional values from fresh Sea Lettuce and dried Sea Lettuce were found 1.68% and 10.51% protein, 0.08% and 5.24% fat, 80.72% and 10.15% moisture, 4.86% and 50.24% ash and 12.66% and 23.86% carbohydrate, fresh Sea Grape and dried Sea Grape were 0.57% and 4.63% protein, 0.10% and 2.15% fat, 89.92% and 10.28% moisture, 2.80% and 64.32% ash and 6.61% and 18.62% carbohydrate and fresh Gracilaria and dried Gracilaria were 1.64% and 8.23%, 0.15% and 3.64% fat, 81.62% and 10.12% moisture, 4.62% and 57.50% ash and 11.97% and 20.51% carbohydrate. Polysaccharide was extracted from dried Sea Lettuce by the hot water extraction method at 90^{o}C, 60 minutes and used the ratio of dried seaweed 1 gram per 75 ml distilled water was the polysaccharide yield 165.02 $\pm$ 1.11 mg/100 g wet weight. That polysaccharide yield from dried Sea Lettuce was higher than polysaccharide from dried Sea Grape and dried Gracilaria in the optimum condition of each marine seaweed extraction. The degree of polymerization (DP) was approximately 14 for fresh Sea Lettuce and 7 for dried Sea Lettuce while DP was approximately 10 and 12 for fresh Sea Grape and fresh Gracilaria, respectively. The degree of polymerization (DP) was approximately 5 and 6 for dried Sea Grape and dried Gracilaria, respectively. Thin layer chromatography (TLC) showed various monosaccharides in crude polysaccharide, i.e. glucose, arabinose, galactose, mannose and rhamnose. Polysaccharide was digested with 5 units of pectinase, for 40 minutes. The degree of polymerization was highest reduced to 4.8 from 20 mg/L Sea Lettuce, DP 2.6 from 15 mg/L Sea Grape and DP 3.8 from 30 mg/L Gracilaria.

This study showed that the maximum prebiotic properties of the extracted polysaccharides from all three dried seaweed species, they found that the maximum prebiotic properties for promote highest *Bacillus subtilis* of Sea Lettuce and Sea Grape were 3.0 mg/L and 0.5 mg/L, respectively and Gracillaria was 1.0 and 3.0 mg/L. The efficacy of prebiotic depended on the amount of polysaccharide and the dissociation of the different oligosaccharides and the efficiency of prebiotic extracted of Sea Lettuce at 3.0 mg/L was found to inhibit the growth of *Vibrio parahaemolyticus* better than prebiotics extracted from Sea Grape and Gracillaria at 0.5 and 3.0 mg/L, respectively. This results revealed that Sea Lettuce was considered as the potential algae specie to extract the best prebiotic and it was possible to inhibit *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic animals.

Keywords: Sea Lettuce, Sea Grape, Gracilaria, polysaccharide

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		I
บทคัดย่อ		II
Abstract		III
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	การทบทวนเอกสารและงานวิจัย	6
บทที่ 3	ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	28
บทที่ 4	ผลการวิจัย	33
บทที่ 5	อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย	48
บทที่ 6	สรุปผลการวิจัย	52
บรรณานุกรม		54
ภาคผนวก		65

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) (กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	17
ตารางที่ 2	ปริมาณสารเยื่อใย (Dietary Fiber) ในสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)	17
ตารางที่ 3	ปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นในสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)	18
ตารางที่ 4	ปริมาณกรดอะมิโนไม่จำเป็นในสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)	18
ตารางที่ 5	ปริมาณแร่ธาตุในสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง)	19
ตารางที่ 6	สภาวะการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ในสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิด	31
ตารางที่ 7	อัตราส่วนน้ำหนักของสาหร่ายทะเลสดกับสาหร่ายทะเลอบแห้ง	33
ตารางที่ 8	คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายผักกาดทะเลสดและสาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้ง	34
ตารางที่ 9	คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายพวงองุ่นสดและสาหร่ายพวงองุ่นอบแห้ง	34
ตารางที่ 10	คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายผมนางสดและสาหร่ายผมนางอบแห้ง	34
ตารางที่ 11	ระดับอุณหภูมิ ระยะเวลา และอัตราส่วนสาหร่ายต่อปริมาตรน้ำในการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ให้ได้ปริมาณสูงสุด	36
ตารางที่ 12	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่า DP ในพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผมนาง	37
ตารางที่ 13	สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล 3 ชนิดโดยใช้เอนไซม์เพกทิเนสเพื่อนำไปใช้เป็นพรีไบโอติก	39
ตารางที่ 14	ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายผักกาดทะเลในหน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร	41
ตารางที่ 15	ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายพวงองุ่นในหน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร	42
ตารางที่ 16	ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายผมนางในหน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร	44

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 17 ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* และ *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในหน่วย log cfu ต่อมิลลิลิตร 46

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะของสาหร่ายผมนาง	15
ภาพที่ 2	ลักษณะของสาหร่ายผักกาดทะเล	20
ภาพที่ 3	ลักษณะของสาหร่ายพวงองุ่น	23
ภาพที่ 4	สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล	33
ภาพที่ 5	แผ่น TLC แสดงน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล	36
ภาพที่ 6	ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเลที่ความเข้มข้นต่างๆ	41
ภาพที่ 7	ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพวงองุ่นที่ความเข้มข้นต่างๆ	43
ภาพที่ 8	ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผมนางที่ความเข้มข้นต่างๆ	44
ภาพที่ 9	ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* และ *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ	47

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสอดคล้องและความเชื่อมโยงของโครงการวิจัยกับนโยบายและยุทธศาสตร์ของประเทศ

1.1 ความสอดคล้องของโครงการวิจัยกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ. 2555-2559)

โครงการการศึกษาประสิทธิภาพพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้เป็นพรีไบโอติก เป็นโครงการวิจัยที่มีความสอดคล้องกับ ***"ยุทธศาสตร์ความเข้มแข็งภาคเกษตร ความมั่นคงของอาหารและพลังงาน"*** ของแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ. 2555-2559) เนื่องจากปัจจุบันประเทศไทยมีศักยภาพและองค์ความรู้ในการผลิตสินค้าจากการเกษตรและการประมงมากขึ้นเป็นลำดับ ซึ่งผลผลิตทางการเกษตรส่วนใหญ่จะเป็นสินค้าที่เกษตรกรนำมาจำหน่ายให้ผู้บริโภคซึ่งนับเป็นการเสริมสร้างความเข้มแข็งและความมั่นคงด้านอาหารตามยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติอยู่แล้ว แต่ประเด็นที่สำคัญอย่างยิ่ง คือ การเพิ่มมูลค่าของผลิตผลทางการเกษตร นอกเหนือจากคุณค่าทางอาหารตามธรรมชาติที่มีอยู่ในแต่ละผลผลิตแต่ละชนิดแล้ว ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่า การเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งที่จะทำให้คุณค่าและราคาของผลผลิตการเกษตรสูงตามไปด้วย การเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรมีหลายรูปแบบ เช่น การแปรรูป การสกัดองค์ประกอบเพื่อเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง หรือเป็นส่วนผสมในอาหารเสริมหรือเพิ่มภูมิต้านทานในมนุษย์และสัตว์ ซึ่งกำลังได้รับความนิยมจากผู้บริโภคในปัจจุบัน องค์ประกอบของอาหารเสริมเหล่านี้ส่วนใหญ่จะพบอยู่ในพืชผลทางการเกษตรหลายชนิด ซึ่งสาหร่ายทะเลหลายชนิดเป็นพืชที่มีศักยภาพและแนวโน้มที่จะนำมาวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มมูลค่าเป็นอาหารเสริม เพื่อสุขภาพได้เช่นเดียวกัน

1.2 ความสอดคล้องของโครงการวิจัยกับนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2555-2559)

โครงการการศึกษาประสิทธิภาพพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้เป็นพรีไบโอติก เป็นโครงการที่สอดคล้องกับ ***"ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 2 การสร้างศักยภาพและความสามารถเพื่อการพัฒนาทางเศรษฐกิจ"*** กลยุทธ์การวิจัยที่ 1 เรื่อง การสร้างมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรและการพัฒนาศักยภาพในการแข่งขันและการพึ่งพาตนเองของสินค้าเกษตร และแผนงานวิจัยที่ 1.3 เรื่อง การวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับประมงและการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มและนำไปสู่การแข่งขันและการพึ่งพาตนเอง เนื่องจากการผลิตสาหร่ายทะเลเป็นส่วนหนึ่งของการเพาะเลี้ยงชายฝั่งประเภทการผลิตพืชน้ำ ซึ่งเป็นแหล่งอาหารประเภทโปรตีนชั้นดีของมนุษย์ รวมทั้งสามารถนำมาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพได้อีกด้วย

1.3 ความสอดคล้องของโครงการวิจัยกับยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติรายประเด็น

โครงการการศึกษาประสิทธิภาพพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้เป็นพรีไบโอติก เป็นโครงการที่สอดคล้องกับโครงการวิจัยกับยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติใน ***ประเด็น : เกษตรเพื่อความยั่งยืน*** เป็นการวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตร เพื่อพัฒนาศักยภาพของผลผลิต นำไปสู่การสร้างรายได้ให้กับชุมชน เป็นการวิจัยเพื่อต่อยอดภูมิปัญญาให้เกิดประโยชน์เชิง

พาณิชย์ เกิดประโยชน์ต่อชุมชน ท้องถิ่น และสาธารณะ รวมทั้งการพัฒนาคุณภาพสินค้าและผลิตภัณฑ์ มาตรฐานสินค้าและผลิตภัณฑ์ ความปลอดภัยของอาหาร (Food Safety) และความมั่นคงด้านอาหาร (Food Security)

1.4 ความสอดคล้องของโครงการวิจัยกับยุทธศาสตร์ประเทศ (Country Strategy)

โครงการการศึกษาประสิทธิภาพพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้เป็นพรีไบโอติก มีความสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ของประเทศในประเด็นตาม***ยุทธศาสตร์ที่ 1 คือ การเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศ เพื่อหลุดพ้นจากประเทศรายได้ปานกลาง (Growth & Competitiveness)*** ซึ่งมีประเด็นหลักที่สอดคล้อง 2 ประการได้แก่ ด้านการเกษตร และการวิจัยและพัฒนา เนื่องจากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ที่นำมาใช้ในโครงการวิจัยและพัฒนาครั้งนี้เป็นสาหร่ายที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ และเกษตรกรสามารถเพาะเลี้ยงได้จริง

1.5 ความสอดคล้องของโครงการวิจัยกับนโยบาย/เป้าหมายของรัฐบาล

จากคำแถลงนโยบายของรัฐบาล พลเอก ประยุทธ์ จันทร์โอชา ต่อสภานิติบัญญัติแห่งชาติ เมื่อวันศุกร์ที่ 12 กันยายน 2557 และประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 131/ตอนพิเศษที่ 180ง/หน้า 1-21/12 กันยายน 2557 ซึ่งรัฐบาลมีนโยบายในเรื่องต่างๆ จำแนกเป็น 11 ด้าน โดยนำยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศว่าด้วยการเข้าใจเข้าถึง และพัฒนาตามแนวพระราชดำริของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวมาเป็นหลักสำคัญ ใช้ปรัชญาของเศรษฐกิจพอเพียงซึ่งทรงเน้นความพอดีพอสมพอควรแก่ฐานะ ความมีเหตุมีผล และการมีภูมิคุ้มกันมาเป็นแนวคิด ใช้แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 นั้น พบว่าโครงการการศึกษาประสิทธิภาพพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้เป็นพรีไบโอติก มีความสอดคล้องกับ***นโยบายของรัฐบาลด้านที่ 8 ว่าด้วยการพัฒนาและส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี การวิจัยและพัฒนาและนวัตกรรม*** ซึ่งรัฐบาลให้ความสำคัญต่อการวิจัย การพัฒนาต่อยอด และการสร้างนวัตกรรมเพื่อนำไปสู่การผลิตและบริการที่ทันสมัย เพื่อให้ประเทศมีความสามารถในการแข่งขันและมีความก้าวหน้าทัดเทียมกับประเทศอื่นที่มีระดับการพัฒนาใกล้เคียงกัน และจัดระบบบริหารงานวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัย และนวัตกรรมให้มีเอกภาพและประสิทธิภาพ โดยให้มีความเชื่อมโยงกับภาคเอกชน

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันประชาชนต่างหันมาให้ความสำคัญกับการดูแลสุขภาพมากขึ้น การบริโภคอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและประกอบกับการออกกำลังกาย และการพักผ่อนที่พอเหมาะจะทำให้มีสุขภาพที่ดี แต่จากสภาวะเร่งรีบในปัจจุบันทำให้ไม่สามารถรับประทานอาหารให้ครบ 5 หมู่ทุกมื้อ ฉะนั้นอาหารเสริมสุขภาพจึงมีบทบาทมากขึ้นตามความต้องการของคนในยุคปัจจุบัน เพื่อให้ผู้บริโภคได้รับโภชนาการที่เหมาะสม มีบทบาทเสริมสารอาหารในส่วนที่ร่างกายขาดไป นอกจากนั้นอาหารเสริมบางชนิดมีส่วนต่อการทำหน้าที่ต่างๆ ในร่างกาย ซึ่งส่งผลดีต่อสุขภาพโดยมีบทบาทในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรค ซึ่งรู้จักกันในชื่อ อาหารฟังก์ชัน (functional food) ซึ่งพรีไบโอติก (prebiotic) จัดอยู่ในกลุ่มของอาหารฟังก์ชั่นชนิดหนึ่ง โดย พรีไบโอติก คือ อาหารซึ่งเมื่อบริโภคแล้วไม่ถูกย่อยสลาย และไม่ถูกดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก แต่จะถูกหมักให้ย่อยสลายโดยแบคทีเรีย โพรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ ก่อให้เกิดสารต่างๆ ที่ให้ประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของผู้บริโภค โดยทั่วไปอาหารพรีไบโอติก คือ อาหารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตบางชนิดโดยเฉพาะ โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ซึ่งสามารถแยกเป็นชนิด

ย่อยๆ ได้อีกหลายชนิด ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญเหล่านี้สามารถพบได้ในสาหร่ายทะเลที่สามารถเลี้ยงได้ในประเทศไทย

สาหร่ายทะเล (Seaweed, Marine algae) เป็นพืชชนิดหนึ่งในทะเล (Grass of the sea) เป็นส่วนหนึ่งของระบบนิเวศวิทยา (ecosystem) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในฐานะผู้ผลิตหรือผู้สร้างอาหาร (producer) หน่วยแรกของห่วงโซ่อาหาร (food chain) จัดเป็นทรัพยากรจากทะเลที่เป็นประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อมและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจสามารถขึ้นได้ในแหล่งน้ำกร่อยหรือแหล่งน้ำธรรมชาติ สาหร่ายทะเลที่สามารถเพาะเลี้ยงเพื่อการอุตสาหกรรมได้จัดอยู่ในกลุ่ม สาหร่ายสีเขียว (Division Chlorophyta) สาหร่ายสีน้ำตาล (Division Phaeophyta) และสาหร่ายสีแดง (Division Rhodophyta) ในประเทศไทยมีสาหร่ายทะเลที่มีคุณค่าทางโภชนาการอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น สาหร่ายผมนาง, สาหร่ายมงกุฎหนาม, สาหร่ายขนนก, สาหร่ายโพรง, สาหร่ายผักกาดทะเล, สาหร่ายใบ, สาหร่ายเม็ดพริกและสาหร่ายพวงองุ่น โดยเฉพาะสาหร่ายวุ้นในสกุล *Gracilaria* spp. หรือที่เรียกแตกต่างกันตามท้องถิ่นว่า สาหร่ายผมนาง สาหร่ายเขากวาง สาหร่ายข้อ และสาหร่ายหิน ขึ้นงอกตามธรรมชาติมากกว่าชนิดอื่น ๆ ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่จัดส่งสาหร่ายทะเลเป็นสินค้าออกประมาณปีละ 20-200 ตัน โดยน้ำหนักแห้ง คิดเป็นมูลค่า 4-10 ล้านบาทเศษ สาหร่ายทะเลแห้งส่วนใหญ่จะเป็นสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria* spp.) ซึ่งส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น เยอรมันตะวันตก และฮ่องกง สาหร่ายผมนางจะได้รับการแปรรูป(สกัด)เป็นวุ้นส่งกลับเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทยอีกประมาณปีละ 200-300 ตัน คิดเป็นมูลค่า 50-100 ล้านบาท สาหร่ายที่แปรรูปเป็นวุ้นเหล่านี้บางส่วนจะนำมาใช้ประโยชน์และบริโภคในประเทศ บางส่วนจะนำมาปรุงแต่งและแยกบรรจุส่งออกจำหน่ายต่างประเทศประมาณ 8.4 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1.5 ล้านบาท ในปี 2527 (http://www.nicaonline.com, 2558)

ดังนั้น แนวทางในการจัดทำโครงการวิจัยนี้ จึงเป็นการวิจัยและพัฒนาเพื่อต่อยอดและเพิ่มมูลค่าสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ในอีกรูปแบบหนึ่ง นอกเหนือจากการใช้ประโยชน์เพื่อการบริโภคของมนุษย์และสัตว์ โดยแนวคิดที่สำคัญคือ การใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตในสาหร่ายซึ่งมีปริมาณค่อนข้างสูงมากกว่า 50% เมื่อเทียบกับสารอาหารชนิดอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบในสาหร่าย มาศึกษาถึงประสิทธิภาพและคุณสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ในการเป็นพรีไบโอติก ทั้งนี้หากพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่มีคุณสมบัติด้านเป็นพรีไบโอติกดังกล่าว จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพอื่นๆ ที่มีมูลค่าสูงต่อไป

3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

3.1 เพื่อศึกษาคุณค่าทางโภชนาการพื้นฐานซึ่งได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เส้นใย และเถ้าของสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa* sp.) และสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria* sp.)

3.2 เพื่อศึกษาปริมาณของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ และชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa* sp.) และสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria* sp.) ที่มีคุณสมบัติด้านโพรไบโอติก

4. ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีขอบเขตเพื่อศึกษาประสิทธิภาพและปริมาณสารสกัดพอลิแซคคาไรด์ที่มีในสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ 3 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa* sp.) และสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria* sp.) และนำมาทดสอบการมีคุณสมบัติด้านโพรไบโอติก

5. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

- ทฤษฎีของโครงการวิจัย

สาหร่ายทะเลขนาดใหญ่เป็นพืชที่มีการสร้างพลังงานจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthesis) และสามารถเปลี่ยนพลังงานมาสะสมในรูปของคาร์โบไฮเดรตได้ โดยคาร์โบไฮเดรตชนิดที่เป็นพอลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) โดยเฉพาะโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) มีคุณสมบัติด้านโพรไบโอติก

- สมมติฐานของโครงการวิจัย

สาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ที่มีความสำคัญและสามารถเลี้ยงได้ง่าย มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa* sp.) และสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria* sp.) มีพอลีแซคคาไรด์ที่มีประสิทธิภาพและคุณสมบัติด้านพรีไบโอติก

- กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

แนวคิดหลักของโครงการวิจัยคือ การศึกษาประสิทธิภาพคาร์โบไฮเดรตที่สาหร่ายทะเลขนาดใหญ่สร้างขึ้นและสะสมในรูปของพอลีแซคคาไรด์ที่มีคุณสมบัติด้านโพรไบโอติก เพื่อเป็นแนวทางศึกษาต่อยอดในการวิจัยและพัฒนาอาหารเสริมสุขภาพของมนุษย์และสัตว์

6. ผลผลิตของโครงการวิจัย

6.1 ด้านวิชาการ ความคาดหมาย ศักยภาพและวิธีการหรือแนวทางที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่

1) การเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการเป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

2) การสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีความรู้ความสามารถทางด้านการสกัดพอลิแซ็คคาไรด์จากพืชและการทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติก

3) การบริการแก่นิสิตนักศึกษาในรูปแบบการฝึกงาน

6.2 ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ ความคาดหมาย ศักยภาพและวิธีการหรือแนวทางที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ การนำสามารถนำผลงานวิจัยไปประยุกต์ต่อยอดเช่น การผลิตโพรไบโอติกจากสาหร่ายทะเลเชิงพาณิชย์เพื่อใช้เพิ่มผลผลิตและสร้างภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำมีอัตราการรอดเพิ่มขึ้น

6.3 ด้านสังคมและชุมชน ความคาดหมาย ศักยภาพและวิธีการหรือแนวทางที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ ชุมชนสามารถนำศักยภาพและคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของสาหร่ายทะเลซึ่งเป็นสาหร่ายที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย มีการเจริญเติบโตรวดเร็วเพื่อจำหน่ายให้แก่ผู้บริโภค

หรือผู้ที่สนใจนำไปผลิตเป็นโพรไบโอติก ซึ่งจะเป็นการสร้างรายได้และเป็นอาชีพทางเลือกให้แก่ชุมชนต่อไป

7. หน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์ ได้แก่

- หน่วยงานภาครัฐ เช่น กรมประมง สถาบันในระดับอุดมศึกษาต่างๆ
- ภาคเอกชน ได้แก่ องค์กรที่ผลิตโพรไบโอติกสำหรับมนุษย์และสัตว์ ซึ่งจะเป็นพืชทางเลือกที่มีความสำคัญในอนาคต

8. ผลกระทบของโครงการวิจัย (impact)

ผลลัพธ์ (outcome) ของงานวิจัยจะทำให้เกิดผลกระทบตามยุทธศาสตร์ของประเทศและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติรายประเด็น ดังนี้

8.1 ยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ

โครงการวิจัยนี้จะให้ผลลัพธ์ตาม*"ยุทธศาสตร์ความเข้มแข็งภาคเกษตร ความมั่นคงของอาหารและพลังงาน"* โดยส่งผลกระทบโดยตรงต่อความปลอดภัยและความมั่นคงทางอาหารของประเทศ

8.2 นโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ

โครงการวิจัยนี้จะให้ผลลัพธ์ตาม***ยุทธศาสตร์การวิจัยเพื่อการสร้างศักยภาพและความสามารถเพื่อการพัฒนาทางเศรษฐกิจ*** โดยเน้นการสร้างมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรและการพัฒนาศักยภาพในการแข่งขันและการพึ่งพาตนเองของสินค้าเกษตร รวมทั้งการวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับประมงและการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มและนำไปสู่การแข่งขันและการพึ่งพาตนเอง

8.3 ยุทธศาสตร์ประเทศ

โครงการวิจัยนี้จะให้ผลลัพธ์ที่ส่งผลกระทบต่อการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศ เพื่อหลุดพ้นจากประเทศรายได้ปานกลาง (Growth & Competitiveness) ซึ่งมีประเด็นหลักที่สอดคล้อง 2 ประการได้แก่ ด้านการเกษตร และการวิจัยและพัฒนา เนื่องจากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ที่นำมาใช้ในโครงการวิจัยและพัฒนาครั้งนี้เป็นสาหร่ายที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ และเกษตรกรสามารถเพาะเลี้ยงได้จริง

8.4 นโยบาย/เป้าหมายของรัฐบาล

โครงการวิจัยนี้จะให้ผลลัพธ์ที่ส่งผลกระทบตามนโยบายของรัฐบาลด้านที่ 8 ว่าด้วย***การพัฒนาและส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี การวิจัยและพัฒนาและนวัตกรรม*** ซึ่งรัฐบาลให้ความสำคัญต่อการวิจัย การพัฒนาต่อยอด และการสร้างนวัตกรรมเพื่อนำไปสู่การผลิตและบริการที่ทันสมัย เพื่อให้ประเทศมีความสามารถในการแข่งขันและมีความก้าวหน้าทัดเทียมกับประเทศอื่นที่มีระดับการพัฒนาใกล้เคียงกัน และจัดระบบบริหารงานวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัย และนวัตกรรมให้มีเอกภาพและประสิทธิภาพ โดยให้มีความเชื่อมโยงกับภาคเอกชน

บทที่ 2
การทบทวนเอกสารและงานวิจัย

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับคาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรต เป็นสารประกอบพวกอินทรียสาร(organic compounds) ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) โดยมีไฮโดรเจนเป็นสองเท่าของคาร์บอนและออกซิเจนเสมอ สูตรทั่วไปของคาร์โบไฮเดรต คือ $C_nH_{2n}O_n$ ดังจะเห็นได้จากสูตรทางเคมีของน้ำตาลทั่วไปคือ $C_6H_{12}O_6$ เมื่อ n = 6 คาร์โบไฮเดรตเกิดจากการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช (photosynthesis) โดยอาศัยคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอยู่ในอากาศ น้ำที่อยู่ในดินและแสงสว่างทำให้เกิดการสังเคราะห์ด้วยแสง พืชเก็บสะสมน้ำตาลไว้เป็นพลังงาน โดยเก็บไว้ตามส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ราก หัว เมล็ด เป็นต้น คนและสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตได้เช่นเดียวกับพืช จึงจำเป็นต้องได้รับสารคาร์โบไฮเดรตจากพืช (อัจฉรา ดลวิทยาคุณ, 2550) คาร์โบไฮเดรตแบ่งตามลักษณะส่วนประกอบทางเคมีได้ 3 ชนิด คือ

1. มอโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) เป็นน้ำตาลโมเลกุลเชิงเดี่ยว และเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีขนาดของโมเลกุลเล็กที่สุด ไม่สามารถถูกย่อยให้เล็กลงได้อีก บางครั้งเรียกว่า simple sugar มีสูตรทั่วไปคือ $(CH_2O)_n$ n จะมีค่าตั้งแต่ 3-7 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลมีทั้งที่เป็นพอลิไฮดรอกซีแอลดีไฮด์และพอลิไฮดรอกซีคีโตน จึงเรียกว่าเป็นน้ำตาลแอลโดส (aldose) และ คีโตส (ketose) ตามลำดับ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2553) ร่างกายสามารถดูดซึมน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ได้ทันที เป็นน้ำตาลที่พบในธรรมชาติและได้จากการทำให้บริสุทธิ์ มีรสหวาน ละลายน้ำได้ และตกผลึกง่าย มีอยู่หลายตัวที่มีความสำคัญทางโภชนาการ ได้แก่ กลูโคส ฟรักโทส กาแล็กโทส เป็นต้น (อัจฉรา ดลวิทยาคุณ, 2550)

น้ำตาลรีดิวส์ reducing sugar) เป็นน้ำตาลที่มีกลุ่มอัลดีไฮด์ (aldehyde) หรือคีโตน (ketone) ที่เป็นอิสระ ถูกออกซิไดส์ได้ง่ายด้วยตัวออกซิไดส์ (oxidizing agent) อย่างอ่อน ตัวอย่างของน้ำตาลพวกนี้ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทุกชนิด เช่น กลูโคส กาแล็กโทส ฟรักโทส น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) บางชนิด เช่น น้ำตาลแล็กโทส มอลโทส เป็นต้น (Food network solution, 2010)

2. โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เกิดจากการรวมตัวของน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันตั้งแต่ 2-10 โมเลกุล ถ้าประกอบด้วยน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ 2 โมเลกุล เรียกว่า ไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide, double sugar) ซึ่งจะไม่พบน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ในร่างกาย เนื่องจากน้ำย่อยในร่างกายจะย่อยให้เป็นน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ หรือเมื่อทำการย่อยน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ด้วยกรดหรือเอนไซม์ จะแตกตัวเป็นน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ 2 โมเลกุล น้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ที่มีความสำคัญ ได้แก่ ซูโครส (sucrose) หรือที่เรารู้จักคือ น้ำตาลทราย มอลโทส (maltose) แล็กโทส (lactose) เป็นต้น ถ้าโอลิโกแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ 3 โมเลกุล เรียกว่า ไตรแซ็กคาไรด์ ที่สำคัญ ได้แก่ แรฟฟิโนส (raffinose) ประกอบด้วยน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ 3 ชนิด คือ กาแล็กโทส กลูโคส ฟรักโทส และถ้าโอลิโกแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ 4 โมเลกุล เรียกว่า เททระแซ็กคาไรด์ ที่สำคัญ ได้แก่ สแตชิโอส (stachyose) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ 4 ชนิด คือ กาแล็กโทส แล็กโทส กลูโคส ฟรักโทส ร่างกายจะย่อยแรฟฟิโนสและสแตชิโอสได้ยาก ถ้าร่างกายได้รับแรฟฟิโนสและสแตชิโอส โมเลกุลที่ไม่ย่อยจะเคลื่อนที่ไปยังลำไส้ใหญ่ แบคทีเรียจะย่อยและใช้เป็นแหล่งพลังงาน รวมทั้งผลิตก๊าซทำให้เกิดท้องอืดขึ้นในกระเพาะ (นัยนา บุญทวียุวัฒน์, 2546)

3. พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยมอโนแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 10 โมเลกุล ถึงมากกว่า 3,000 โมเลกุล คาร์โบไฮเดรตพวกนี้ไม่มีรสหวาน ละลายน้ำได้ยากหรือไม่ละลายน้ำและไม่ตกผลึกหรือเป็นเกล็ด เมื่อย่อยหรือทำให้แตกตัวจนถึงขั้นสุดท้ายจะได้น้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ สามารถแบ่งตามการย่อยในร่างกายได้ 2 ประเภท (อัจฉรา ดลวิทยาคุณ, 2550) คือ

3.1 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ร่างกายสามารถย่อยได้ (digestible polysaccharide) เป็นพอลิ-แซ็กคาไรด์ที่ร่างกายมีเอนไซม์ย่อยให้เป็นโมเลกุลเล็กและดูดซึมได้ พอลิแซ็กคาไรด์ประเภทนี้ที่สำคัญต่อร่างกาย คือ

3.1.1 แป้ง (starch) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่พืชเก็บสะสมไว้ตามส่วนต่างๆของพืช เช่น เมล็ด ราก หัว ลำต้น เป็นต้น ในรูปของเม็ดแป้ง (starch granules) ประกอบด้วยกลูโคสเรียงต่อกันเป็นเส้นยาวและเป็นกิ่งก้าน แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกทิน (amylopectin)

3.1.2 ไกลโคเจน (glycogen) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสมในร่างกายของคนและสัตว์ ประกอบด้วยกลูโคสที่มีลักษณะโครงสร้างเหมือนอะไมโลเพกติน แต่มีการแตกกิ่งก้านสาขามากกว่า ร่างกายเก็บสะสมไกลโคเจนที่ตับประมาณ 1/3 ในกล้ามเนื้อ 2/3 ของคาร์โบไฮเดรตที่ร่างกายได้รับ แต่ปริมาณที่สะสมไม่เกิน 400 กรัม เมื่อร่างกายต้องการใช้พลังงานไกลโคเจนจะถูกดึงมาใช้เป็นพลังงาน

3.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ (indigestible polysaccharides) เป็นพอลิแซ็กคาร์ไรด์ที่ร่างกายไม่มีเอนไซม์ย่อย และต้องขับออกทางอุจจาระ (นัยนา บุญทวียุวัฒน์, 2546) จึงไม่ให้พลังงานแก่ร่างกาย เรียกพอลิแซ็กคาร์ไรด์ที่ร่างกายย่อยไม่ได้ว่า “ใยอาหาร” (dietary fiber) แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

3.2.1 ใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble dietary fiber) ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ใยอาหารประเภทนี้มักเป็นส่วนประกอบโครงสร้างหลักของพืชมีลักษณะที่แตกต่างกัน ดังนี้

ก. เซลลูโลส (cellulose) เป็นส่วนของผนังเซลล์ของพืช แต่ละโมเลกุลประกอบด้วยกลูโคสมากกว่า 3,000 หน่วย เกาะกันอยู่ด้วยพันธะบีตา 1-4 ไกลโคซิดิก ที่น้ำย่อยในร่างกายไม่สามารถย่อยได้ ดังนั้นเมื่อร่างกายได้รับเซลลูโลส เซลลูโลสจะซับน้ำไว้ทำให้เกิดการพองตัวช่วยทำให้กากอาหารมีลักษณะนิ่ม จึงสามารถขับถ่ายได้สะดวกขึ้น ใยอาหารประเภทนี้พบมากในพืช ผักและผลไม้

ข. เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นส่วนของผนังเซลล์ของพืชเช่นเดียว กับเซลลูโลส แต่ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดไม่ได้ประกอบด้วยกลูโคสอย่างเดียว การจับตัวของโมเลกุลจะน้อยกว่าเซลลูโลส

ค. ลิกนิน (lignin) เป็นสารเคมีที่สัตว์ไม่สามารถย่อยได้เลย ในพืชที่อ่อนจะมีปริมาณลิกนินไม่มากนัก แต่เมื่อพืชเริ่มแก่ปริมาณลิกนินจะเพิ่มมากขึ้นโดยในเนื้อไม้แข็งจะพบลิกนินถึงร้อยละ 40-50 ลิกนินถูกพืชสร้างขึ้นแทรกอยู่ในชั้นของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส

3.2.2 ใยอาหารที่ละลายน้ำ (soluble dietary fiber) ประกอบด้วย เพกทิน กัม และมิวซิเลจ ใยอาหารประเภทนี้มักอยู่รอบๆ เซลล์พืช และในเซลล์พืช มีลักษณะที่แตกต่างกันไป ดังนี้

ก. เพกทิน (pactin substance) เป็นน้ำตาลหลายชั้นที่อยู่ส่วนกลางของผนังเซลล์ ทำหน้าที่ยึดเซลล์ให้ติดกัน โครงสร้างของเพกทินไม่เรียงกันเป็นเส้นสาย โดยจะเรียงตัวกันเป็นตาข่ายแบบไม่

เป็นระเบียบ ในทางอุตสาหกรรมอาหารใช้เพกทินเป็นโครงร่างให้วัตถุดิบที่ใช้ประกอบอาหารเกิดการจับตัวกันเกิดตาข่ายเจลทำให้อาหารมีลักษณะข้นขึ้น

ข. กัม (gum) เป็นส่วนของผนังเซลล์พืชที่มีลักษณะเหนียว หรือยางของต้นพืช กัมจัดเป็นน้ำตาลหลายชั้น โครงสร้างประกอบด้วยกลูโคส กาแล็กโทส แมนโนส และอะราบิโนส เป็นต้น

ค. มิวซิเลจ (mucilage) พบในส่วนของเมล็ดพืช และสาหร่ายทะเล มีความเหนียวหนืด มีสมบัติอุ้มน้ำได้มาก มิวซิเลจจะใช้ในการอุตสาหกรรมยาเพื่อช่วยเพิ่มเนื้ออุจจาระช่วยในการระบาย

2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพอลิแซ็กคาไรด์

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทหนึ่งที่ประกอบด้วยมอโนแซ็กคาไรด์หรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมากกว่า 10 โมเลกุล เชื่อมต่อด้วยพันธะกลูโคไซดิก (glucosidic bond) ซึ่งการเชื่อมต่อของโมเลกุลมอโนแซ็กคาไรด์และจำนวนกิ่งก้านจะต่างกันไปตามชนิดโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ (Yang and Zhang, 2008; นิธิยา รัตนาปนนท์, 2553) กล่าวว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในธรรมชาติมีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง เป็นสารประกอบที่มีรูปร่างไม่แน่นอน (amorphous) ไม่มีสีและส่วนใหญ่ไม่มีรสชาติ เมื่อละลายน้ำจะได้สารละลายคอลลอยด์และสกัดแยกออกมาทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก พอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่มีหน้าที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้างของเซลล์พืชและสัตว์ ตัวอย่างเช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพกทิน เป็นองค์ประกอบอยู่ในผนังเซลล์ของพืช ไคตินเป็นองค์ประกอบในเปลือกของสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง และปู ส่วนกรดมิวรามิก (muramic acid) เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์แบคทีเรีย

พอลิแซ็กคาไรด์สามารถจำแนกได้หลายแบบ หากจำแนกออกตามลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลได้เป็น 3 กลุ่ม (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2553) ได้แก่

1. โฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ในโมเลกุลประกอบด้วยมอโนแซ็กคาไรด์เพียงชนิดเดียวเท่านั้น เช่น แป้ง ไกลโคเจน เซลลูโลส และอินนูลิน

2. เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ในโมเลกุลประกอบด้วยมอโนแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 2 หรือมากกว่า 2 ชนิดขึ้นไป เช่น เพกทิน กัม มิวซิเลจ เฮมิเซลลูโลส และเรซิน (resin)

3. สารประกอบคอนจูเกต (conjugated compounds) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดที่เกาะรวมอยู่กับสารอื่น เช่น รวมกับลิพิดเป็นไกลโคลิพิด หรือรวมกับโปรตีนเป็นไกลโคโปรตีน เป็นต้น

หากจำแนกพอลิแซ็กคาไรด์ตามหน้าที่ จะสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล, 2546) ได้แก่

1. พอลิแซ็กคาไรด์สะสมอาหาร storage polysaccharide) ได้แก่ อะไมโลส และอะไมโล-เพกทิน เป็นองค์ประกอบสำคัญของเม็ดแป้ง (starch granule) ซึ่งสะสมในเซลล์พืชทุกชนิด มีมากในเมล็ดข้าว มันฝรั่ง มันสำปะหลัง ผลไม้ที่ยังไม่สุก ฯลฯ ไกลโคเจน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์อีกชนิดหนึ่งในเซลล์จุลชีพและสัตว์ โดยในสัตว์จะอยู่เป็นเม็ดเล็กๆ ในตับซึ่งเป็นอวัยวะที่มีหน้าที่สะสมพลังงานของสัตว์และในกล้ามเนื้อ

2. พอลิแซ็กคาไรด์โครงสร้าง (structural polysaccharide) ทำหน้าที่ค้ำจุนรูปร่างลักษณะและเป็นเกราะป้องกันตัวของแบคทีเรีย พืช และสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น เพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) เซลลูโลส (cellulose) และไคทิน (chitin) ในสัตว์ชั้นสูง พอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้ เช่น พวกไกลโคแซมิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) และโพรทิโอไกลแคน (proteoglycan) ทำหน้าที่เป็นส่วนค้ำจุนโครงสร้างของสัตว์ชนิดต่างๆ ตั้งแต่ระดับเซลล์ จนเป็นเนื้อเยื่อและอวัยวะร่วมกับโปรตีนโครงสร้าง (structural protein)

สำหรับพอลิแซ็กคาไรด์จากพืช จะสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล, 2546) ได้แก่

1. ส่วนที่เป็นแป้ง (starch) เป็นแหล่งสะสมพลังงานที่สำคัญของพืช ส่วนใหญ่อยู่ในเมล็ด หัว และราก ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นกลูโคสทั้งหมดเรียกว่า กลูแคนส์ โมเลกุลของแป้งประกอบด้วย 2 ส่วนคือ

1.1 อะไมโลส amylose) คือ กลูโคสจำนวนมากมาจับกันเป็นเส้นตรงด้วยพันธะแบบแอลฟา [$\alpha(1\rightarrow4)$] มีโครงสร้างขดกันเป็นเกลียวเฮลิกซ์ (helix structure) เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีน (I) ในสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) ได้สารประกอบเชิงซ้อน amylose-iodine complex มีสีน้ำเงิน อะไมโลสไม่ละลายน้ำ แต่เมื่อเติมน้ำลงไปอะไมโลสจะเกาะตัวกันเป็นตะกอนที่ไม่ละลาย และเนื่องจากโมเลกุลของอะไมโลสเป็นสายยาว จึงมีโอกาสจับคู่กับอะไมโลสอีกโมเลกุลหนึ่ง เป็นสายยาวคู่ขนานเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรเจนกลายเป็นตาข่ายที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำลดลงและสามารถตกตะกอนได้ ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า รีโทรเกรเดชัน และตะกอนที่ได้เรียกว่า retrograded starch (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2553)

1.2 อะไมโลเพกทิน (amylopectin) เป็นส่วนที่ไม่ละลายในน้ำ ประกอบด้วยกลูโคสจำนวนมากจับกันด้วยพันธะแบบแอลฟา [$\alpha(1\rightarrow4)$] และมีการแตกแขนงด้วยพันธะแบบแอลฟา [$\alpha(1\rightarrow6)$] เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนในสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ จะได้สีม่วง

2. ส่วนที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharide; NSP) พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้ไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของสัตว์กระเพาะเดี่ยว แต่จุลินทรีย์ในลำไส้สามารถย่อยได้ เนื่องจาก NSP มีคุณสมบัติต่างกัน จึงอาจแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ เซลลูโลส (cellulose) พอลิเมอร์ที่ไม่ใช่เซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลส (non-cellulose polymer or hemicellulose) และเพกทิน

2.1 เซลลูโลส เป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีมากที่สุดในธรรมชาติเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชซึ่งถือเป็นส่วนของเยื่อใย เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ ทนต่อการย่อยด้วยกรดและด่างที่เจือจาง ประกอบด้วยกลูโคสเป็นจำนวนมากเชื่อมกันเป็นเส้นตรงด้วยพันธะแบบเบต้า [$\beta(1\rightarrow4)$] ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ร่างกายคนและสัตว์บางชนิดไม่มีเอนไซม์เซลลูเลสในระบบย่อยอาหาร ทำให้ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสจากพืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ ส่วนสัตว์ที่กินพืชเป็นอาหาร เช่น โค และกระบือ สามารถย่อยเซลลูโลสได้ เนื่องจากในกระเพาะมีจุลินทรีย์ (rumen microflora) ซึ่งมีเอนไซม์เซลลูเลสช่วยย่อยเซลลูโลสได้ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2553)

2.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นกลุ่มของเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ในโมเลกุลประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2-4 ชนิดขึ้นไป มีทั้งน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทส น้ำตาลที่พบมากคือ น้ำตาลไซโลส (D-xylose) และอะราบิโนส (L-arabinose) นอกจากนั้นยังพบน้ำตาลกลูโคส (D-glucose)

แมนโนส (D-mannose) กาแล็กโทส (D-galactose) กรดกลูคิวโรนิก (D-glucuronic acid) และ 4-O-methyl-D-glucuronic acid อีกด้วย เฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของผนังเซลล์พืช โดยรวมอยู่กับลิกนินและเซลลูโลส มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในสารละลายด่าง (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2553) ส่วนบุญล้อม ชีวะอิสระกุล (2546) กล่าวว่า เฮมิเซลลูโลสอาจจำแนกตามชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบได้เป็นแมนแนน (mannans) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลแมนโนส กาแล็กแทน (galactans) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกาแล็กโทส ไซแลน (xylans) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลส กลูโคแมนแนน (glucomannan) อะราบิโนไซแลน (arabinoxylan) และอะราบิโนกาแล็กแทน (arabinogalactan) เป็นต้น

2.3 เพกทิน (pectin) เป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในผนังเซลล์พืชอยู่รวมกับเซลลูโลส ทำหน้าที่ยึดเกาะผนังเซลล์ให้ติดกัน เพกทินเป็นพอลิเมอร์สายยาวของกรดกาแล็กทูโรนิก (D-galacturonic acid หรือ α-D-galactopyranosyluronic acid) ต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่ง $\beta(1\rightarrow4)$ ในโมเลกุลของเพกทินที่สกัดจากธรรมชาติยังมีน้ำตาลชนิดอื่นๆ ปนอยู่ด้วย เช่น น้ำตาลไซโลส กาแล็กโทส อะราบิโนส และแรมโนส โดยโมเลกุลของน้ำตาลจะเกาะอยู่เป็นสายแขนง น้ำหนักโมเลกุลของเพกทินผันแปรอยู่ในช่วงประมาณ 10,000 - 400,000 ดาลตัน และมีกรดกาแล็ก-ทูโรนิกประมาณ 300 – 800 หน่วยต่อโมเลกุลของสารประกอบเพกทิน (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2553)

ปัจจุบันให้ความสำคัญกับเรื่องเส้นใยอาหารมากขึ้น เพราะมีผลดีต่อสุขภาพ เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน คิวติน และแวกซ์ ซึ่งไม่ละลายน้ำ และมีคุณสมบัติเป็นกากอาหารแล้ว ยังมีส่วนของเพกทิน กัม และมิวซิเลจ ซึ่งทำหน้าที่ช่วยอุ้มน้ำ พองตัวเป็นวุ้น จึงช่วยให้ขับถ่ายได้สะดวก ไม่เกิดการหมักหมมของของเสียในลำไส้ใหญ่ ลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในลำไส้ได้ นอกจากนี้ยังช่วยดูดซึมสารพิษ กำจัดแบคทีเรียที่มีโทษ ดูดซับไขมัน และน้ำดี ทำให้ร่างกายต้องสร้างน้ำดีใหม่เสมอ ซึ่งการสร้างน้ำดีนั้นต้องใช้คอเลสเตอรอล จึงช่วยลดคอเลสเตอรอลได้ นอกจากนี้ยังมีการนำเส้นใยอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเภทที่ละลายน้ำได้บางส่วนมาใช้ประโยชน์ในรูปของพรีไบโอติกอีกด้วย(บุญล้อม ชีวะอิสระกุล, 2546)

2.3 ความรู้เกี่ยวกับพรีไบโอติก (prebiotic) และโพรไบโอติก (probiotic)

2.3.1 พรีไบโอติก

Gibson (2004) ได้ให้คำนิยามของพรีไบโอติก คือ ส่วนของอาหารที่ไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหาร ซึ่งมีผลทำให้กระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดในลำไส้ใหญ่ และจะส่งผลดีต่อสุขภาพของเจ้าบ้านด้วย โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวนั้นหมายถึงแบคทีเรียพวกโพรไบโอติก ซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่อยู่ในระบบของร่างกายมนุษย์และสัตว์แล้วก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยจุลินทรีย์นั้นทำหน้าที่ช่วยปรับสมดุลของสภาพแวดล้อมในระบบลำไส้ (สุญาณี พงษ์ธนานิกร, 2549)

พรีไบโอติกมักเป็นคาร์โบไฮเดรตสายสั้นหรือโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งพรีไบโอติกที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่

1. อินนูลิน (inulin) และฟรักโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructo-oligosacchride: FOS)

อินนูลินเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยมอโนแซ็กคาไรด์ คือ กลูโคส (D-glucose) และพอลิเมอร์ของน้ำตาลฟรักโทส (D-fructose) เชื่อมต่อกันด้วยรูปแบบ Glu-α $(1\rightarrow2)$ [β-Fru$(1\rightarrow2)$]n โดยมีโมเลกุลของน้ำตาลฟรักโตสต่อกันมากกว่า 10 หน่วย สาหรับฟรักโทโอลิโกแซ็กคาไรด์นั้นเป็นโอลิโก

แซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างเหมือนกับอินนูลิน แต่มีโมเลกุลของน้ำตาลฟรักโทสต่อกันน้อยกว่า ประมาณ 3 – 10 หน่วย (Gibson, 2004) จึงอาจเรียกว่า short chain FOS (scFOS) ซึ่งไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงเป็น non-digest oligosaccharide แต่ถูกหมักอย่างสมบูรณ์และรวดเร็วโดยแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ส่วนกลาง (colon) เกิดเป็นเกลืออะซิเตตและกรดไขมันที่มีโครงสร้างโมเลกุลสั้น ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้ (ศิริบุญ พูลสวัสดิ์, 2550)

2. กาแล็กโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galacto-oligosaccharide: GOS) เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและพอลิเมอร์ของน้ำตาลกาแล็กโทสเชื่อมต่อกัน ด้วยรูปแบบ Glu-α (1$\rightarrow$4)[β-Gal(1$\rightarrow$6)]n โดยมีโมเลกุลของน้ำตาลกาแล็กโทสต่อกัน 2 – 5 หน่วย สามารถผลิตได้โดยใช้แล็กโทสไซรับ (lactose syrup) เป็นสารตั้งต้น และใช้เอนไซม์บีตากาแล็กโทสิเดส (β-galactosidase) ทำให้เกิดปฏิกิริยาทรานกาแล็กโทสิเลส (trans-galactosylase) ซึ่งจะได้กาแล็กโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นผลิตภัณฑ์ (Gibson, 2004)

3. ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylo-oligosaccharide: XOS) เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันเป็นสายสั้นๆ 2-7 โมเลกุล ด้วยพันธะ β(1$\rightarrow$4) โดยทั่วไปจะเป็นกลุ่มของไซโลไบโอส (xylobiose) ไซโลไตรโอส (xylotriose) และ ไซโลเตตระโอส (xylo-tetrose) (Gibson, 2004) ซึ่งในธรรมชาติพบมากในผัก ผลไม้ น้ำผึ้ง และนม และสามารถผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรมโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ไซแลเนส (xylanase) ซึ่งมีไซแลน (xylan) ที่เป็นเฮมิเซลลูโลสที่พบมากในพืชเป็นสารตั้งต้น

ประโยชน์ของพรีไบโอติกต่อสุขภาพ ประโยชน์ต่อสุขภาพของพรีไบโอติก ได้แก่

1. ผลต่อระบบทางเดินอาหาร

พรีไบโอติกจะเป็นอาหารให้กับแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ลำไส้ใหญ่ เมื่อแบคทีเรียนาไปใช้ก็จะให้พลังงานและสารบางชนิด เช่น กรดแล็กติกและกรดไขมันชนิดสายสั้น (short-chain fatty acids) ซึ่งเป็นผลิตผลจากกระบวนการหมัก โดยจะทำให้มีการกระตุ้นการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์สุขภาพ และสภาวะความเป็นกรดที่เกิดขึ้นจะช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดในลำไส้ได้ เช่น *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli* เป็นต้น จึงมีผลช่วยป้องกันอาการท้องเดินโดยเฉพาะจากการติดเชื้อได้ นอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติเหมือนใยอาหารอื่นๆ ก็จะช่วยบรรเทาอาการท้องผูกได้ด้วย เนื่องจากผลของการเพิ่มน้ำหนักของอุจจาระและผลต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้จึงช่วยให้ขับถ่ายง่ายขึ้น (สุญาณี พงษ์ธนานิกร, 2549)

วันดี วราวิทย์ (2551) ได้กล่าวถึงกลไกการปกป้องทางเดินอาหารของจุลินทรีย์สุขภาพไว้ดังนี้

1. เชื้อจุลินทรีย์สุขภาพเกาะบนผิวเยื่อบุลำไส้ไว้ก่อน ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเกาะจับที่ผิวเยื่อบุลำไส้ได้
2. การหมักเส้นใยอาหารโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์สุขภาพ ได้ผลผลิตเป็นกรดอะซิติกและแล็กติกซึ่งหยุดยั้งการเติบโตของเชื้อฉวยโอกาสก่อโรคอื่นๆ
3. เชื้อจุลินทรีย์สุขภาพสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ทำลายเชื้อก่อโรคอื่นๆ ได้

4. เชื้อจุลินทรีย์สุขภาพแย่งอาหารทำให้เชื้อฉวยโอกาสก่อโรคไม่สามารถนำอาหารไปใช้ได้ เป็นผลให้เชื้อก่อโรคเจริญได้น้อยลง
5. เชื้อจุลินทรีย์สุขภาพกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการสื่อสารกับเนื้อเยื่อน้ำเหลืองในชั้นใต้เยื่อบุลำไส้ (gut- associated lymphocyte tissue, GALT) ทำให้มีการสร้างสารป้องกัน และกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เข้าสู่ภาวะสมดุลนำไปสู่การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายแบบป้องกันมากกว่าการตอบสนองแบบก่อการอักเสบ หรือภูมิแพ้

2. ผลต่อการเผาผลาญไขมัน

การที่จุลินทรีย์สุขภาพเจริญจำนวนมากขึ้นจะช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอล และยับยั้งการดูดซึมผ่านผนังลำไส้ หรืออาจเนื่องจากผลจากกระบวนการหมักที่ได้กรดไขมันสายสั้นบางชนิด โดยเฉพาะกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) ซึ่งสามารถไปยับยั้งการสังเคราะห์ไขมันรวมทั้งคอเลสเตอรอล ดังนั้นพรีไบโอติกอาจช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดแข็งซึ่งมีสาเหตุจากไขมันได้

3. ผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของระบบทางเดินอาหาร

พรีไบโอติกสามารถช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิต้านทานในลำไส้ มีผลเพิ่มความแข็งแรงของเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ซึ่งสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ดีด้วย รวมถึงมีผลต่อจำนวนและการทำงานของจุลินทรีย์สุขภาพ

2.3.2 โพรไบโอติก

จุลินทรีย์โพรไบโอติกนั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับพรีไบโอติก นั่นคือโพรไบโอติก สามารถใช้สารอาหารพวกพรีไบโอติกได้ ทำให้มีการเจริญของโพรไบโอติก และส่งผลดีต่อสุขภาพต่อผู้บริโภคได้ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สำหรับกลุ่มจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพนั้น ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* (Saarela *et al,* 2000) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. ลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus*

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะเป็นแท่งสั้นๆ เจริญได้ในสภาวะทั้งมีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ แยกได้จากทางเดินอาหาร ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังพบบริเวณช่องคลอดอีกด้วย เจริญได้ในสภาวะกรด *Lactobacillus* สามารถใช้น้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและผลิตกรดแล็กติกได้มากกว่าร้อยละ 85 ในการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ หรือได้กรดแล็กติกร้อยละ 50 คาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล และกรดอะซิติค ในการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ เจริญได้ที่พีเอช 4.0 - 4.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30-40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามมี *Lactobacillus* บางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ ตัวอย่างเชื้อ *Lactobacillus* ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. Bulgaricus, *L. reuteri*, *L. brevis* และ *L. rhamnosus* เป็นต้น (Klein *et al*, 1998)

2. ลักษณะของเชื้อ *Bifidobacteria*

Bifidobacteria เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่ต้องการอากาศอย่างแท้จริง มีรูปร่างเป็นแท่งคล้ายตัว Y และไม่ผลิตก๊าซ ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Tissier ในปี ค.ศ. 1900 ซึ่งแยกได้จากอุจจาระของเด็กทารก คุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสได้เป็นกรดแล็กติกโดยผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลท

(phosphoketolase pathway) เมื่ออยู่ในสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ให้มีกิ่งก้านมากมายในอาหารที่ขาด เบต้า-เมทิล-ดี-กลูโคซามีน (b-methyl-D-glucosamine) เซลล์ที่มีลักษณะเป็นสองส่วนเท่ากันจะเกิดรูปร่างที่แตกแขนงมากขึ้น และเมื่อมีการเติมกรดอะมิโนเพียงเล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อ เซลล์ที่เป็นกิ่งก้านมากมายจะเปลี่ยนเป็นแท่งโค้ง *bifidobacteria* นี้ พบได้ในลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และช่องคลอด ผลิตวิตามินบี อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37 - 41 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมคือ 5.5 - 7.0 ผลิตกรดอะซิติค กรดแล็กติก ทำให้เพิ่มความเป็นกรดในลำไส้ ตัวอย่างเชื้อ *Bifidobacteria* ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ *B. bifidum, B. adolescentis, B. animalis, B. infantis, B. longum* และ *B. thermophilum* เป็นต้น (Boylston *et al*, 2004)

ข้อมูลของเชื้อก่อโรคบางชนิดในระบบทางเดินอาหาร

จุลินทรีย์ก่อโรค หมายถึง จุลินทรีย์เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ซึ่งเป็นอันตรายในอาหาร (food hazard) ได้แก่ แบคทีเรีย รา ไวรัส และปรสิต แต่จุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคที่มีอาหารเป็นสื่อ คือ แบคทีเรีย (Food network solution, 2012) ยกตัวอย่างเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารเช่น

1. *Escherichia coli*

เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ไม่มีแคปซูล ไม่สร้างสปอร์ ที่สามารถก่อให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร เจริญได้ในสภาวะทั้งมีและไม่มีออกซิเจน เชื้อ *E. coli* จัดอยู่ใน Family Enterobacteriaceae ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นเชื้อแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร ซึ่ง *E. coli* สามารถก่อให้เกิดโรคในอวัยวะต่างๆของร่างกายได้ แต่ที่เด่นคือ ในระบบทางเดินอาหาร ในคนปกติจะไม่พบเชื้อ *E. coli* ในทางเดินอาหาร คนที่เกิดอาการของโรคจะเกิดจากการได้รับเชื้อในปริมาณมากพอ (กิจการ จันทร์ดำ, 2011) *E. coli* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นตัวชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดอาการท้องเสียบ่อยที่สุด ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ทำให้ถ่ายอุจจาระเหลว หรือเป็นน้ำ แต่อาการมักไม่รุนแรง เพราะทั้งเด็ก และผู้ใหญ่มักมีภูมิต้านทานอยู่บ้างแล้ว เนื่องจาก ได้รับเชื้อนี้เข้าไปทีละน้อยอยู่เรื่อยๆ เชื้อนี้มักปนเปื้อนมากับอาหาร น้ำ หรือมือของผู้ประกอบอาหาร *E.coli* ส่วนใหญ่ไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) แต่บางชนิด ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) หรือเรียกว่า Enterovirulent *Escherichia coli* group (EEC group) มี 4 ประเภท (Food network solution, 2010) คือ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) หรือ *E. coli* 0157:H7 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

2. *Salmonella* sp.

เป็นแบคทีเรียแกรมลบมีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ อยู่ในสกุล Enterobacteriaceae เช่นเดียวกับเชื้อ *E. coli* สมาชิกในสกุลนี้เจริญเติบโตในสภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศก็ได้ (facultative anaerobe) สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลารอบตัว (peritrichous flagella) และอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ เชื้อ *Salmonella* อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์ และสัตว์ทุกชนิด การติดต่อของเชื้อ *Salmonella* เกิดขึ้นเนื่องจากการที่มนุษย์รับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อจากอุจจาระสัตว์ การปนเปื้อนของเชื้อในอาหารนั้นไม่ได้ทำให้สีและกลิ่นของอาหารต่างไปจากปกติ อาหารที่

พบได้บ่อยว่ามีการปนเปื้อนคืออาหารที่ได้จากสัตว์ เช่น เนื้อสัตว์ ไก่ นม หรือไข่ และพืชก็สามารถปนเปื้อนเชื้อนี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการปรุงอาหารให้สุกสามารถทำลายเชื้อ *Salmonella* ได้ เชื้อ *Salmonella* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง แต่มีรายงานว่าบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อนี้เจริญได้ คือ 49.5 องศาเซลเซียส สำหรับค่า pH ที่เชื้อนี้สามารถเจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 7 – 7.5 ค่า pH ที่ต่ำสุดที่สามารถทนได้ คือ 3.8 และ pH สูงสุดอยู่ที่ 9.5 (อรุณ บ่างตระกูลนนท์, 2555) เชื้อ *Salmonella* ทุกสายพันธุ์ล้วนก่อให้เกิดโรค *Salmonellosis* (Non-Typhoidal Salmonellosis: NTS) ได้ทั้งสิ้นยกเว้น *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A, B และ C ทำให้เกิดโรค Typhoidal (อรุณ บ่างตระกูลนนท์, 2555)

2.4 สาหร่ายทะเลที่นำมาวิจัย

สาหร่ายทะเลที่นำมาวิจัยในครั้งนี้ ได้แก่ สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) สาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) และสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*)

2.4.1 สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*)

สาหร่ายผมนาง เป็นสาหร่ายสีแดง อยู่ในดิวิชั่นโรโดไฟต้า (Division Rhodophyta) คลาสโรโดไฟซี (Class Rhodophyceae) มีอยู่หลายสกุล (Genus) สกุลกราซิลาเรีย พบได้ในหลายทวีปทั่วโลก ในประเทศแถบอเมริกากลาง และอเมริกาใต้ พบในประเทศชิลี แอฟริกาใต้ บราซิล อาร์เจนติน่า คิวบา เม็กซิโก จาไมก้า และ ปานามา ทางอเมริกาเหนือก็สามารถพบได้ทั้งในประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา ในทวีปยุโรป พบในประเทศฝรั่งเศส นอร์เวย์ อิตาลี อิสราเอล และอังกฤษ ทวีปแอฟริกาพบในประเทศกาน่า ทวีปออสเตรเลียพบในประเทศนิวซีแลนด์ ส่วนในทวีปเอเชียพบได้ในหลายประเทศ ได้แก่ จีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย อินเดีย และไทย (สุรภีร์ วีรวานิช, 2543)

ในประเทศไทยพบสาหร่ายผมนางได้ทั่วไปในอ่าวไทย และฝั่งอันดามัน จัดเป็นสาหร่ายที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ สามารถนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตวุ้นชนิดที่เรียกว่า agar ได้ คำว่า agar นี้มีที่มาจากภาษามลายู ซึ่งเดิมหมายถึง สาหร่ายที่นำมาสกัดวุ้นเพื่อทำของหวานนั่นเอง และหลายชนิดก็เป็นที่นิยมบริโภคทั้งภายในและนอกประเทศ (วิทยา ศรีมโนภาษ, 2521) สาหร่ายที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตวุ้นมีอยู่หลายสายพันธุ์ และมีชื่อเรียกตามท้องถิ่น เช่น ในประเทศไทย เรียก สาหร่ายผมนาง สาหร่ายข้อ สาหร่ายเขากวาง หรือ สาหร่ายวุ้น สาหร่ายผมนางมีแพร่กระจายอยู่ตามชายฝั่งของอ่าวไทยและฝั่งมหาสมุทรอินเดีย เช่น จังหวัดตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี พัทลุง สงขลา ระนอง ปัตตานี และนราธิวาส (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์ และสุชาติ วิเชียรสรรค์, 2511 อ้างถึง ใน สุรภีร์ วีรวานิช, 2543) ส่วนมากจะขึ้นในบริเวณดินปนทราย มีการสำรวจสาหร่ายทะเลให้วุ้นกราซิลาเรียที่พบในประเทศไทยและรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายทะเลให้วุ้นในอ่าวไทยด้านตะวันออกและตะวันตก รวมทั้งฝั่งทะเลอันดามันมีหลายชนิด และที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้วมี 13 ชนิด ได้แก่ *Gracilaria bangmeiana, Gracilaria changii, Gracilaria edulis, Gracilaria euheumoides, Gracilaria firma, Gracilaria fisheri, Gracilaria irregularis, Gracilaria lemaneiformis, Gracilaria minuta, Gracilaria percurrens, Gracilaria saliconia, Gracilaria tennistipitata* และ *Gracilaria textorii* (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2536)

ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายผมนาง

สาหร่ายผมนางมีทัลลัสตั้งตรงเป็นรูปเรียวยาว ทรงกระบอก กลม หรือแบน อวบน้ำ การเจริญเติบโตเกิดได้ 2 ทาง คือ การเจริญเติบโตที่เซลล์ปลายยอด (Apical Cell) และการแตก แขนงจากด้านข้าง (สุรภีร์ วีรวานิช, 2543) มีชื่อเรียกแตกต่างกันตามท้องถิ่นและลักษณะของสาหร่าย เช่น บางชนิดเป็นข้อสั้นๆ เรียกว่า สาหร่ายข้อ ที่แตกแขนงคล้ายเขากวาง เรียก สาหร่ายเขากวาง เกือบทุกชนิดรับประทานได้ หรือนำมาสกัดวุ้น จึงรวมเรียกว่า สาหร่ายวุ้น (กฤตพล ยังวนิชเศรษฐ, 2545) สาหร่ายผมนาง เป็นสาหร่ายสีแดงมีรูปร่างและสีสันที่แตกต่างกันไป มีตั้งแต่สีแดง–ดำ แดง น้ำตาล แดง–น้ำตาลชมพู ม่วง เข้ม แดง–ม่วง เทา เขียว เหลือง หรือใส เมื่อตากแห้งจะเป็นสีน้ำตาลไหม้ ดำ เทา หรือน้ำตาล ความยาวของทัลลัสตั้งแต่ 4.00 เซนติเมตรถึง 3.50 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.500 ถึง 4.00 มิลลิเมตร (Lee, 1980 และ Santelices and Doty, 1989 อ้างถึงใน สุรภีร์ วีรวานิช, 2543) รงควัตถุหรือสารสี ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ ดี คาโรทีนอยด์ เช่น แอลฟ่า และเบต้า – คาโรทีน (α – and β – carotene) แซนโทฟิลล์มีหลายชนิด ได้แก่ ลูเทอีน (Lutein) ซีอาแซนทิน (Zeaxanthin) ไวโอลาแซนทิน (Violaxanthin) นีโอแซนทิน (Neoxanthin) และทาราแซนทิน (Taraxanthin) นอกจากนี้ยังมีไฟโคบิลิน (Phycobilin) เช่น อาร์– ไฟโคอิริทิน อาร์– ไฟโคไซยานิน ซี– ออลโลไฟโคไซยานิน เป็นต้น (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527)

ภาพที่ 1 ลักษณะของสาหร่ายผมนาง

การแพร่กระจายของสาหร่ายผมนาง

สาหร่ายสกุลกราซิลาเรียมีแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น มีประมาณไม่น้อยกว่า 160 ชนิด (Norziah and Chiang, 2000) ในธรรมชาติสาหร่ายสกุลกราซิลาเรียจะปรากฏอยู่บริเวณน้ำขึ้น – น้ำลงและบริเวณที่อยู่ใต้น้ำตลอดเวลา โดยจะพบเกาะอยู่กับวัสดุใต้น้ำ เช่น เปลือกหอย กรวดทราย หรืออยู่เป็นอิสระไม่เกาะกับวัตถุใดๆ เลย สาหร่ายสกุลกราซิลาเรียบางชนิด เช่น สายพันธุ์ *Gracilaria fisheri* สามารถเจริญเติบโตอยู่บริเวณป่าชายเลน ซึ่งเป็นน้ำกร่อยและน้ำเค็ม มักพบเกาะกับรากไม้ หรือบางส่วนจมอยู่ในโคลนเลน ถึงแม้ว่าสาหร่ายสกุลกราซิลาเรียมีขนาดไม่ใหญ่เท่าสาหร่ายสีน้ำตาล แต่บางครั้งพบว่าอาจมีความยาวถึง 90.0 เซนติเมตร และสามารถอยู่ใต้ทะเลน้ำลึกกว่า 120 เมตรได้และยังสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ในน้ำทะเลลึกๆ เพราะมีรงควัตถุชนิด Phycoerythrin (อักษร ศรีเปล่ง, 2529)

สำหรับในประเทศไทยพบแพร่กระจายอยู่ตามชายฝั่งของอ่าวไทยและฝั่งมหาสมุทรอินเดีย เช่น จังหวัดตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี พัทลุง สงขลา ระนอง ปัตตานี และนราธิวาส (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2536)

วัฏจักรชีวิตของสาหร่ายผมนาง

สาหร่ายสกุลกราซิลาเรียมีวงจรชีวิตแบบสลับระหว่างต้นมีเพศ (Gametophyte Plant) กับต้นไม่มีเพศ (Sporophyte Plant) โดยที่ต้นมีเพศจะมีทั้งที่เป็นต้นตัวผู้และต้นเพศเมีย ดังนั้น ในหนึ่งต้นจึงมี 3 ชนิดด้วยกัน วงจรชีวิตของสาหร่ายสกุลกราซิลาเรียแบ่งออกเป็น 3 ช่วง (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527; อนงค์ จีรภัทร์, 2547; ยุวดี พีรพรพิศาล, 2549) ดังนี้

1. ระยะแกมีโตไฟต์ (Gametophyte Phase) คือ ช่วงชีวิตที่เป็นต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย ต้นเพศผู้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่า สเปอร์มาเทียม (Spermatium) และต้นเพศเมียสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่า คาร์โปโกเนียม (Carpogonium) การผสมเกิดบนต้นเพศเมีย

2. ระยะคาร์โปสปอโรไฟต์ (Carposporophyte Phase) คือ ช่วงหลังการผสมของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้กับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย และมีการพัฒนาจนเป็นกระเปาะสปอร์ (Cystocarp) มีลักษณะเป็นปุ่มกลมๆ ขนาดเท่าหัวเข็มหมุด เกิดทั่วไปตามผิวของต้นเพศเมีย ภายในกระเปาะสปอร์มีคาร์โปสปอร์ (Carpospore)

3. ระยะเตตราสปอโรไฟต์ (Tetrasporophyte Phase) คือ ช่วงที่คาร์โปสปอร์มีสปอร์งอกเป็นต้นไม่มีเพศ หรือต้นเตตราสปอโรไฟต์ (Tetrasporophyte Plant) ต้นนี้จะสร้างเตตราสปอร์ (Tetraspore) ซึ่งจะงอกเป็นต้นเพศผู้ และต้นเพศเมียอย่างละเท่าๆ กัน

องค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าสารอาหารของสาหร่ายผมนาง

สาหร่ายเป็นพืชชั้นต่ำที่เต็มไปด้วยคุณค่าสารอาหารที่มนุษย์ต้องการ เช่น เป็นแหล่งของโปรตีน กรดอะมิโน กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว วิตามิน แร่ธาตุ และเยื่อใยต่างๆ นอกจากนี้ ในสาหร่ายยังมีคาร์โบไฮเดรตซึ่งส่วนใหญ่มีโพลีแซกคาไรด์ที่เอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ จึงเป็นแหล่งของสารเยื่อใยที่ให้พลังงานต่ำ เป็นที่มาของการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ อย่างมากมาย แต่กระนั้นก็ตามองค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าโภชนาการของสาหร่ายก็ขึ้นอยู่กับตัวแปรต่าง ๆ ได้แก่ ชนิดของสาหร่าย แหล่งน้ำ สภาพแวดล้อม ฤดูกาล และอุณหภูมิของน้ำ (Mabeau and Fleurence, 1993)

สำหรับองค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าสารอาหารต่างๆ ของสาหร่ายผมนางนั้น ระพีพร เรืองช่วย และคณะ (2549) ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงสาหร่ายผมนางเพื่อเป็นอาชีพทางเลือกใหม่สำหรับชาวประมงพื้นบ้านในอ่าวปัตตานี จังหวัดปัตตานี ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และคุณค่าสารอาหารของสาหร่ายผมนาง พบว่า สาหร่ายจากธรรมชาติมีปริมาณความชื้นและไขมัน คือ 8.10 และ 3.85 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายจากการเลี้ยงมีปริมาณความชื้นและไขมัน คือ 7.95 และ 2.94 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนปริมาณโปรตีนในสาหร่ายจากธรรมชาติและสาหร่ายจากการเลี้ยง พบว่า มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 7.47 และ 6.30 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สำหรับปริมาณเถ้าพบว่า สาหร่ายที่ได้จากธรรมชาติมีปริมาณเถ้าน้อยกว่าสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยง คือ 17.5 และ28.0 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ในขณะที่ปริมาณสาร

เยื่อใยทั้งหมด กลับพบว่า ในสาหร่ายจากธรรมชาติมีปริมาณสารเยื่อใยทั้งหมดมากกว่าสาหร่ายจากการเลี้ยง คือ 63.8 และ 51.1 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และเมื่อศึกษาถึงคุณค่าสารอาหารของสาหร่ายทั้ง 2 แหล่ง พบว่า มีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายต่างๆ กัน ได้แก่ Valine, Leucine และ Isoleucine เป็นต้น (ตารางที่ 3) และมีปริมาณกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นต่อร่างกายต่างๆ กัน ได้แก่ Alanine, Aspartic Acid และ Glutamic Acid เป็นต้น (ตารางที่ 4) การศึกษาปริมาณแร่ธาตุในสาหร่ายทั้ง 2 แหล่ง พบว่า มีโพแทสเซียมและคลอไรด์ในปริมาณค่อนข้างสูง รวมทั้งมีแร่ธาตุชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส โซเดียม และแมกนีเซียม เป็นต้น (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) (กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)

องค์ประกอบทางเคมี	**สาหร่ายจากธรรมชาติ**	**สาหร่ายจากการเลี้ยง**
ความชื้น	8.10	7.95
โปรตีน	7.47	6.30
ไขมัน	3.85	2.94
เถ้า	17.5	28.0

ที่มา: ระพีพร เรืองช่วย และคณะ (2549)

ตารางที่ 2 ปริมาณสารเยื่อใย (Dietary Fiber) ในสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)

ชนิดสารเยื่อใย	**สาหร่ายจากธรรมชาติ**	**สาหร่ายจากการเลี้ยง**
สารเยื่อใยทั้งหมด	63.8	51.1
สารเยื่อใยที่ไม่ละลายน้ำ	11.0	12.8
สารเยื่อใยที่ละลายน้ำ	52.8	38.3

ที่มา: ระพีพร เรืองช่วย และคณะ (2549)

ตารางที่ 3 ปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นในสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)

กรดอะมิโนจำเป็น	**สาหร่ายจากธรรมชาติ**	**สาหร่ายจากการเลี้ยง**
Arginine	0.0900	1.14
Leucine	0.290	0.750
Isoleucine	0.210	0.550
Lysine	0.180	0.400
Phenylalanine	0.200	0.600
Threonine	0.190	0.700
Valine	0.260	0.590

ที่มา: ระพีพร เรืองช่วย และคณะ (2549)

ตารางที่ 4 ปริมาณกรดอะมิโนไม่จำเป็นในสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)

กรดอะมิโนไม่จำเป็น	**สาหร่ายจากธรรมชาติ**	**สาหร่ายจากการเลี้ยง**
Alanine	0.360	0.760
Aspartic Acid	0.500	1.14
Glutamic Acid	0.580	1.18
Glycine	0.250	0.710
Proline	0.170	0.430
Serine	0.200	0.680
Tyrosine	0.0800	0.400

ที่มา: ระพีพร เรืองช่วย และคณะ (2549)

ตารางที่ 5 ปริมาณแร่ธาตุในสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง)

แร่ธาตุ	สาหร่ายจากธรรมชาติ	สาหร่ายจากการเลี้ยง
Ca	182	82.0
P	245	237
Na	438	165
K	4,389	10,794
Mg	303	485
Fe	61.0	90.0
Cu	0.300	0.200
Zn	2.20	0.700
Cl	1.89	1.86

ที่มา: ระพีพร เรืองช่วย และคณะ (2549)

การเลี้ยงสาหร่ายผมนาง

สาหร่ายผมนางสามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเลี้ยงในบ่อดิน โดยเฉพาะบ่อดินที่ผ่านการเลี้ยงสัตว์น้ำเช่น กุ้งกุลาดำ หรือปลากะพงขาว มาแล้ว ปัจจัยที่สำคัญในการเจริญเติบโตของสาหร่ายผมนางได้แก่ ความเข้มแสง สาหร่ายในสกุลนี้สามารถเลี้ยงได้ที่ความเข้มแสงในช่วงที่ค่อนข้างกว้าง ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย เช่น *Gracilaria cornea* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มแสงช่วง 100-800 μmol photon $m^{-2}s^{-1}$ และเมื่อความเข้มแสงมากกว่า 1,000 μmol photon $m^{-2}s^{-1}$ จะยับยั้งการเจริญเติบโต (Dawes *et al*, 1999)

ความสำคัญของสาหร่ายผมนาง

สาหร่ายผมนาง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ทั้งที่เกี่ยวกับอาหารและไม่เกี่ยวกับอาหาร หรือนำมาบริโภคได้โดยตรง เช่น นำไปลวกให้สุกแล้วยำ ซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคมาก โดยเฉพาะในภาคใต้ของประเทศไทย เพราะชาวมุสลิมนิยมนำมารับประทานในช่วงเทศกาลถือศีลอด เนื่องจากทำให้รู้สึกอิ่มท้องและไม่รู้สึกอ่อนเพลียเมื่อเทียบกับรับประทานพืชผักอื่นๆ (ระพีพร เรืองช่วย และคณะ, 2549)

สาหร่ายผมนางสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารได้หลากหลายชนิด เช่น สาหร่ายแผ่นปรุงรส เบเกอรี่ โยเกิร์ต ไอศกรีม แยม เนย ซุป เค้กช็อกโกแลต คุกกี้ ชาเขียว มายองเนส หรือทำเป็นสาหร่ายอัดเม็ดเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพได้ เนื่องจากสาหร่ายอุดมไปด้วยสารอาหารต่างๆ มากมาย เช่น โปรตีน วิตามิน เกลือแร่ และเยื่อใย เป็นต้น ในด้านอุตสาหกรรมอาหารใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตวุ้น โดยการนำมาใช้เป็น Thickening Agent ในการทำผลิตภัณฑ์ ในอุตสาหกรรมด้านอื่นๆ เช่น ใช้ผสมในอาหารกระป๋องเพื่อป้องกันสนิมผสมในไวน์ เบียร์ ช่วยทำให้สีใสไม่ตกตะกอน ใช้เคลือบผิว

อาหารแช่แข็ง นอกจากนี้ ยังใช้ทำผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้อีก เช่น ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ใช้ผสมครีม และน้ำมันทาผิว ผลิตภัณฑ์สิ่งทอและกระดาษ เป็นต้น สำหรับประโยชน์ของสาหร่ายในด้านการแพทย์ คือ ใช้เป็นคุณสมบัติทางยา เช่น แก้ความดันโลหิตสูง ใจสั่น หลอดเลือดแข็ง บำรุงสมอง รักษาโรคกระเพาะ เป็นยาระบาย แก้โรคคอพอก ลำไส้ใหญ่อักเสบ ริดสีดวงทวาร ข้ออักเสบ โรคอ้วน และทำแคปซูลหุ้มยา หรือเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย (ระพีพร เรืองช่วย และคณะ, 2549) สุดท้ายทางด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ใช้เป็นอาหารหอยเป๋าฮื้อด้วย (สกนธ์ แสงประดับ และคณะ, 2546; กาญจนา เตี้ยวซี และคณะ, 2546)

2.4.2 สาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*)

สาหร่ายผักกาดทะเลเป็นสาหร่ายทะเลชนิดหนึ่งที่มีสีเขียว มีลักษณะแผ่นใบแผ่กว้าง ใบหยักคล้ายใบผักกาด จึงเรียกว่า สาหร่ายผักกาดทะเล ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ขนาดเล็กมากต้องส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จนถึงขนาด 65 เซนติเมตร มีการเจริญเติบโตโดยการแบ่งเซลล์ทั้งในแนวกว้างและแนวยาว จึงแผ่ออกเป็นแผ่นและมีรอบจีบอยู่ตรงขอบ (ภาพที่ 2) มีชื่อสามัญเรียกว่า sea lettuce มีชื่อ วิทยาศาสตร์ว่า *Ulva rigida* (สุวรรณา วรสิงห์ และคณะ, 2552)

ภาพที่ 2 ลักษณะของสาหร่ายผักกาดทะเล

แหล่งที่พบสาหร่ายผักกาดทะเล

สาหร่ายผักกาดทะเลมักขึ้นตามฤดูกาลและพบในบริเวณน้ำลงต่ำสุด นอกจากนี้ยังพบสาหร่ายผักกาดทะเลขึ้นตามชายฝั่งทะเลของจังหวัดภูเก็ต โดยเฉพาะในพื้นที่แหล่งหญ้าทะเลที่มี สาหร่ายชนิดนี้ขึ้นปะปนอยู่หรือหลุดลอยตามผิวน้ำเคลือบทับบนหญ้าทะเลและที่ทางสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดตราดได้มีการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายผักกาดทะเลมาใช้ในการเพาะเลี้ยงปลากะรังจุดฟ้า และพ่อแม่พันธุ์หอยหวานเพื่อเป็นอาหารและบำบัดให้น้ำมีคุณภาพดีด้านการเจริญเติบโตจัดเป็นสาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว โดยมีการแบ่งเซลล์ทั้งในแนวกว้างและ แนวนอน ซึ่งจะมีการแผ่ออกเป็นแผ่นและมีรอยจีบอยู่ตรงขอบถือเป็นการเพิ่มพื้นที่ในการขยายการเจริญของเซลล์และพื้นที่ผิวของสาหร่ายที่แผ่กว้างนั้นทำให้สามารถดูดซับธาตุอาหารได้มาก จึงเหมาะแก่การนำมาปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ (สุวรรณา วรสิงห์, 2552)

วัฏจักรชีวิตของสาหร่ายผักกาดทะเล

การเจริญเติบโตโดยการแบ่งเซลล์ทั้งในแนวกว้างและแนวยาว จึงแผ่ออกเป็นแผ่น และมีรอยจีบอยู่ตรงขอบ วัฏจักรชีวิตเป็นแบบไอโซมอร์ฟิก (isomorphic) คือ มีการสลับกันระหว่างระยะของ gametophytes และ sporophytes ซึ่ง gametophytes เป็นแฮพพลอยด์ (haploid) เปลี่ยนรูปเป็น biflagellate gametes มีหนวด 2 เส้น มักเข้าหาแสง (positively phototactic) เข้าสู่กระบวนการ mitosis ส่วน sporophytes ผลิตซูโอสปอร์เป็นแฮพพลอยด์ มีหนวด 4 เส้น (quadriflagellate haploid zoospores) ซึ่งโดยปกติมักหนีแสง (negatively phototactic) เข้าสู่กระบวนการ meiosis (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527 และ Lee, 1995)

การแพร่พันธุ์ของสาหร่ายผักกาดทะเล มี 2 แบบ คือ แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) สร้าง gamete และแบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยการสร้าง zoospores ที่เคลื่อนที่ได้ และ aplanospores เคลื่อนที่ไม่ได้ ผลิตเป็น vegetative cells เซลล์ที่เป็น zoospores ไม่แตกต่างจากที่เป็น vegetative cells (Dhargalkar, 2004) จากการศึกษาพบการเจริญของเซลล์แบบ vegetative cells และ reproductive cells ซึ่งเป็นไปตาม Kirby (2001) รายงานว่า การเจริญของ reproductive cells เกิดขึ้นใกล้ขอบของใบสาหร่าย ส่วนที่มีการผสมพันธุ์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเล็กน้อย ซึ่งอาจทำการศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคขั้นสูง เช่น การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของสาหร่าย การทำ scanning electron microscope เป็นต้น การเจริญเติบโตและการแพร่พันธุ์ของสาหร่ายผักกาดทะเล สามารถเกิดขึ้นได้มากหรือน้อยนั้น ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ชนิดของสาหร่ายผักกาดทะเล ซึ่งบางชนิดสามารถปล่อยสปอร์ได้ทุกวันสามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้ตลอดทั้งเดือนประมาณ 20 – 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสิ่งมีชีวิตทั้งหมด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับฤดูกาล อัตราการสังเคราะห์แสงสูงจะให้ reproductive cells

การเลี้ยงสาหร่ายผักกาดทะเล

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายผักกาดทะเล สามารถกระทำได้ทั้งแบบที่เป็นการเลี้ยงแบบชนิดเดียว (monoculture) หรือแบบการเลี้ยงกับสัตว์น้ำชนิดต่างๆ (polyculture) ในบ่อซีเมนต์ หรือบ่อดิน เช่น ปลากะรังจุดฟ้า หอยหวาน ฯลฯ ทั้งนี้หากทำการเลี้ยงสาหร่ายแบบชนิดเดียวในการเลี้ยงยังมีความจำเป็นต้องใช้ปุ๋ยเพิ่มแร่ธาตุอาหารแก่สาหร่าย แต่หากทำการเลี้ยงสาหร่ายร่วมกับสัตว์น้ำโดยนำสาหร่ายชนิดนี้มาช่วยปรับคุณภาพน้ำให้สามารถนำน้ำกลับมาใช้แบบระบบหมุนเวียนได้ โดยไม่จำเป็นต้องใช้ปุ๋ยใดๆ เลย ซึ่งเป็นการช่วยลดปริมาณก๊าซแอมโมเนียในน้ำ ลดปริมาณไนไตรท์ ไนเตรท ฯลฯ ได้เป็นอย่างดี สาหร่ายจะเป็นผลพลอยได้จากระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำซึ่งมีคุณค่าขึ้นมาได้ ตามรายงานของ Msuya and Neori (2002) กล่าวว่าสาหร่าย *Ulva reticulata* สามารถดึงไนโตรเจนจากน้ำทิ้งในบ่อปลาเปลี่ยนไปเป็นรูปโปรตีนในสาหร่ายชนิดนี้

ความเค็มของน้ำทะเลมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเล ที่ความเค็มของน้ำระดับต่างๆ กัน ทำให้สาหร่ายผักกาดทะเลมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน จากการทดลองของสุวรรณา วรสิงห์(2551) เพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเลที่ระดับความเค็มต่างๆ พบว่าสาหร่ายผักกาดทะเลชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำทะเลที่มีความเค็มตั้งแต่ระดับ 15 – 40 ส่วนในพันส่วน อัตราการเจริญเติบโตโดยสาหร่ายมีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุดเมื่อเลี้ยงในน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน ช่วงเวลาการเลี้ยงตั้งแต่ 15 – 20 วัน มีค่าอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยค่อนข้างสูงกว่าช่วงเวลาการเลี้ยงอื่นๆ

การเก็บเกี่ยวสาหร่ายผักกาดทะเลให้ได้ผลผลิตสูงในระยะเวลาที่เหมาะสม ควรเก็บเกี่ยวภายใน 21 วัน หรือสัปดาห์ที่ 3 ซึ่งสาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเนื้อที่ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย โดยใช้สาหร่ายเริ่มต้นความหนาแน่น 0.1 - 0.5 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ภายในระยะเวลา 21 วัน สาหร่ายเจริญเติบโตจนมีความหนาแน่น 2 กิโลกรัมต่อตารางเมตร

ประโยชน์ของสาหร่ายผักกาดทะเล

1. เป็นอาหารมนุษย์และสัตว์

สุวรรณา วรสิงห์และคณะ (2552) รายงานว่า สาหร่ายชนิดนี้สามารถนำมาปรุงเป็นอาหารในรูปแบบต่างๆ อาทิเช่น สาหร่ายชุบแป้งทอด เทมปูระ ใส่ในสลัด ก๋วยเตี๋ยว ซุปแกงจืด ยำ สปาเก็ตตี้ ฯลฯ นอกจากนี้ยังได้คิดค้นวิธีทำการแปรรูปผักกาดทะเล เพื่อให้สามารถเก็บรักษาไว้ได้ นานยิ่งขึ้นโดยการนำสาหร่ายมาล้างน้ำจืดให้สะอาด นำมาลวกด้วยน้ำเดือด 5 วินาที ตากแห้งด้วยแสงแดด ในฤดูฝนอาจใช้วิธีอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการกลับสาหร่ายทุกๆ 2 – 3 นาทีเพื่อให้สาหร่ายแห้งทั่วทั้งแผ่น จนได้สาหร่ายอบแห้งที่สามารถเก็บไว้รับประทานได้นานขึ้น โดยการรับประทานสาหร่ายอบแห้งนั้นให้นำมาแช่น้ำจืดประมาณ 2-3 นาที แล้วล้างให้สะอาดอีกครั้งแล้วสามารถนำไปปรุงเป็นอาหารที่ต้องการได้เลย โดยสาหร่ายผักกาดทะเลมีคุณค่าทางอาหารหลายชนิดที่มีประโยชน์แก่ร่างกาย มหาวิทยาลัยแห่งประเทศบราซิลได้รายงาน องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายผักกาดทะเลว่าประกอบด้วย โปรตีน 13 – 18 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.3 – 1.9 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 53 – 58 เปอร์เซ็นต์ ใยอาหาร 9 – 12 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง และความชื้น 15 – 20 เปอร์เซ็นต์ (Padua *et al*., 2004 อ้างถึงใน สุวรรณา วรสิงห์, 2552) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับไข่ซึ่งมีโปรตีน 10 – 15 เปอร์เซ็นต์ เนื้อวัวมีโปรตีน 18 – 20 เปอร์เซ็นต์ และในปลาทูปลาอินทรีย์มีโปรตีน 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากจะมีสารอาหารดังกล่าว แล้ว สาหร่ายผักกาดทะเลยังอุดมไปด้วยวิตามินและเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ เช่น วิตามินบี วิตามินซี แคลเซียม และไอโอดีน เป็นต้น อีกทั้งยังเป็นอาหารที่ย่อยง่ายและไขมันต่ำ จึงเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการจะลดน้ำหนัก และยังมีสรรพคุณช่วยรักษาโรคกระดูกผุ ชำระล้างหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดมีความยืดหยุ่น ช่วยลดคลอเลสเตอรอล ลดความดันโลหิต รักษาโรคท้องผูก สมานแผลใน กระเพาะอาหาร กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค บรรเทาไขข้ออักเสบ เป็นยาระงับประสาท และช่วยกำจัดแบคทีเรียบางชนิดที่ก่อสารมะเร็งได้ อาจกล่าวได้ว่าสำหรับประโยชน์ด้านอาหาร สาหร่ายทะเลมีคุณสมบัติทั่วไปเช่นเดียวกับพืชบกที่มีโปรตีนและไขมันไม่มากนัก มีแคลเซียมต่ำ แต่กลับมีกากใยอาหารสูง คุณค่าทางอาหารที่แตกต่างจากพืชบก คือ สาหร่ายทะเลจะมีปริมาณวิตามินและเกลือแร่สูง อาทิเช่น วิตามินเอ วิตามินบี วิตามินซี วิตามินดีวิตามินอีและวิตามิน แร่ธาตุ แมกนีเซียม แคลเซียม สังกะสี ทองแดง เหล็ก ไอโอดีน เป็นต้น ซึ่งล้วนแต่เป็นพวกที่ร่างกายมนุษย์ต้องการแทบทั้งสิ้น และการที่สาหร่ายผักกาดทะเลมีกากใยสูงถึง 33-75 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง ส่งผลให้ผู้บริโภคขับถ่ายสะดวก ป้องกันท้องผูกและเกิดริดสีดวงทวารได้เป็นอย่างดี ตัวอย่างเมนูจากธรรมชาติที่มีคุณค่าต่อสุขภาพ เช่น สาหร่ายเทมปุระ สลัดสาหร่าย สาหร่ายชุบแป้งทอด นอกจากสาหร่ายผักกาดทะเลจะเป็นอาหารของมนุษย์แล้ว สาหร่ายผักกาดทะเลยังเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของพวกแอมฟิพอด หอย ลิ้นทะเล หอยขมทะเล และหอยเม่น (อนุสรา แก่นทอง, 2555)

2. ปรับปรุงคุณภาพน้ำ

สุวรรณา วรสิงห์และคณะ (2552) กล่าวถึงประโยชน์ด้านการประมงและด้านระบบนิเวศ เป็นงานวิจัยต่อยอดในการใช้สาหร่ายผักกาดทะเล บำบัดน้ำเสียในฟาร์มของสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง

จังหวัดตราด พบว่าสาหร่ายชนิดนี้สามารถดูดซับแอมโมเนียจากน้ำทิ้งทางการเกษตร นอกจากนี้ยังดึงสารประกอบไนโตรเจนจากน้ำทิ้งมาเป็นปุ๋ย ทำให้คุณภาพของน้ำดีขึ้น ช่วยให้ผู้ประกอบการลดปริมาณการเปลี่ยนถ่ายน้ำ สาหร่ายผักกาดทะเลยังสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Bioindicators) ในแหล่งน้ำธรรมชาติได้กล่าวคือ หากมีสาหร่ายชนิดนี้มากในแหล่งน้ำแสดงว่า ในแหล่งน้ำดังกล่าวมีความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารมาก เช่น ไนโตรเจน และฟอสเฟต ในทางกลับกันหากสาหร่ายลดจำนวนลงก็จะบ่งชี้ได้ว่าแหล่งน้ำกำลังประสบปัญหาการปนเปื้อน จนทำให้สาหร่ายผักกาดทะเลไม่สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ

2.4.3 สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*)

สาหร่ายพวงองุ่น มีชื่อสามัญว่า Sea Grape หรือ Green Caviar เป็นสาหร่ายทะเลสีเขียว ลักษณะของสาหร่ายสกุล *Caulerpa* มีทัลลัส (Thallus) เป็นท่อติดต่อกันตลอด มีรากเป็นฝอย (Rhizoid) ทำหน้าที่ยึดเกาะ ทัลลัสที่ทอดแขนงมีลักษณะคล้ายไหล (Stolon) ออกเป็นระยะ ส่วนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงมีลักษณะคล้ายใบเรียกว่า รามูลัส ผนังเซลล์ภายในรามูลัสเป็นผนังเซลล์ซึ่งเรียกว่า Trabecula ซึ่งเป็นส่วนของผนังเซลล์ชั้นในที่เจริญยื่นเข้าไปในช่องเซลล์ (Cell cavity) มีลักษณะเป็นตาข่ายสานกัน โดยไม่ได้ปิดกั้นการไหลเวียนของโพรโทพลาสต์ภายในเซลล์ ทัลลัสของสาหร่ายสกุลนี้จะมีรูปร่างลักษณะแตกต่างกัน บางชนิดกลม, แบน หรือเป็นเส้นเหมือนขนนก และทัสลัสมีขนาดเล็กใหญ่แตกต่างกัน บางชนิดยาวกว่า 1 เมตร สาหร่ายสกุลนี้มักพบขึ้นอยู่ตามพื้นทรายปนโคลน หรือเกาะบนซากปะการัง (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527)

ภาพที่ 3 ลักษณะของสาหร่ายพวงองุ่น

การแพร่กระจาย

การแพร่กระจายของสาหร่ายในสกุล *Caulerpa* นั้น จะพบได้ทั่วไปในแถบชายฝั่งทะเลเขตร้อนและเขตอบอุ่นทั่วโลก ซึ่งมักพบเจริญเติบโตโดยยึดเกาะซากปะการัง ก้อนหินใต้น้ำ ในบริเวณที่น้ำทะเลค่อนข้างใสและมีความเค็มสูง 32 – 34 ส่วนในพัน พบได้ที่ความลึก 2 – 5 เมตร (อนันต์ สาระยา และคณะ, 2526; นัยนา เพชรน้อย, 2529; Dawson, 1966) ในบางพื้นที่อาจพบสาหร่ายพวงองุ่นขึ้นอยู่ตามบริเวณพื้นทรายปนโคลน ตามแนวหินที่ตื้น สาหร่ายพวงองุ่นที่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติตั้งแต่บริเวณชายฝั่งทะเลเขตน้ำตื้นเรื่อยไปจนถึงทะเลลึกนั้น มีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่ควบคุมชนิดและการแพร่กระจายของสาหร่ายได้แก่ แสง, อุณหภูมิ, ความลึก, ความเค็ม, พื้นที่ยึดเกาะของสาหร่าย และการ

เคลื่อนที่ของมวลน้ำในแหล่งน้ำนั้น (Lewmanomont and Ogawa, 1995) โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีปริมาณฟอสเฟตในน้ำสูง ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเติบโตของสาหร่าย ฤดูกาลที่พบว่าสาหร่ายพวงองุ่นมีการเจริญเติบโตได้ดี อยู่ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม และจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในเดือนมีนาคม เนื่องจากน้ำมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิน้ำเริ่มลดลงในเดือนพฤศจิกายน การเจริญเติบโตของสาหร่ายก็จะลดลงและรูปร่างหดสั้น (ธีรพงษ์ จรัญญากรณ์, 2545)

การสืบพันธุ์ของสาหร่ายพวงองุ่น

การสืบพันธุ์ของสาหร่ายพวงองุ่นมี 2 แบบคือ

1. การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction) โดยการแบ่งเซลล์ของทัลลัสและรามูลัส ซึ่งแต่ละทัลลัสและรามูลัสก็จะเจริญเติบโตต่อไป

2. การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual reproduction) การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะเกิดขึ้นในช่วงอากาศอบอุ่น ซึ่งจะเห็นบนผิวของทัลลัสที่โตเต็มที่จะมีลักษณะรูปร่างเป็นตาข่ายอย่างชัดเจน ในระยะนี้ภายในไซโตพลาซึมจะมีการเคลื่อนตังของแกมมีตซึ่งมีหนวดสองเส้นทั้งเพศผู้และเพศเมีย (Bi-flagellated gamete) แกมมีตก็จะถูกปล่อยออกมา หลังจากนั้นก็จะเกิดการคอนจูเกต (Conjugation) กัน เป็นไซโกต (Zygote) เกาะลงบนพื้นหรือก้อนหิน แล้วงอกเป็นต้นใหม่ ส่วนสาหร่ายต้นเดิมหลังจากปล่อยแกมมีตแล้วสีจะซีดลง

องค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าสารอาหารของสาหร่ายพวงองุ่น

สาหร่ายพวงองุ่นมีองค์ประกอบทางเคมีดังนี้ โปรตีน 24.8เปอร์เซ็นต์, คาร์โบไฮเดรท 33.8 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 10.6เปอร์เซ็นต์ (Kaliaperumal *et al.*, 1995) สาหร่ายสกุลนี้มีสารเคมีพวก Caulerpin และ Caulerpicin ซึ่งบางคนที่แพ้สารพวกนี้เมื่อรับประทานเข้าไปจะทำ ให้เกิดอาการคัน, ลิ้นและริมฝีปากชา

การใช้ประโยชน์จากสาหร่ายพวงองุ่น

สาหร่ายพวงองุ่นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ ได้มากมาย เช่น

1. เป็นอาหารมนุษย์และสัตว์

ปัจจุบันมีการนำสาหร่ายพวงองุ่นมาบริโภคเป็นอาหาร เป็นสมุนไพร หรือใช้เพื่อการเลี้ยงสัตว์กันอย่างแพร่หลายมากขึ้นกว่าในอดีต

2. ใช้เพื่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ

การเลี้ยงสาหร่ายพวงองุ่น

Trono and Denila (1987) กล่าวถึงการคัดเลือกพื้นที่สำหรับทำฟาร์มสาหร่าย *Caulerpa* sp. ในประเทศฟิลิปปินส์ว่าควรอยู่ห่างไกลจากอิทธิพลของน้ำจืดและเป็นพื้นที่ที่น้ำทะเลมีความเค็มสูง บ่อที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายควรสามารถเปลี่ยนถ่ายน้ำได้ดีและอยู่ในแหล่งที่สามารถกำบังคลื่นลมได้ ส่วนพื้นบ่อซึ่งไว้สำหรับเป็นที่ยึดเกาะของสาหร่ายควรเป็นดินเหนียว ไม่เป็นกรด และห่างไกลจากมลภาวะ ซึ่งสาหร่ายอาจดูดซึมเข้าไป เช่น พวกโลหะหนัก สารพิษต่างๆ แล้วไปมีผลต่อผู้บริโภค

ในประเทศฟิลิปปินส์มีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสกุลนี้เป็นจำนวนมากเพื่อใช้บริโภคภายในประเทศและส่งออกทั้งในรูปของสาหร่ายสดและสาหร่ายแห้งหมักด้วยเกลือ (Llana, 1991) ทำ

รายได้เข้าประเทศมากกว่า 37 ล้านเหรียญสหรัฐ ในปี ค.ศ. 1989 โดยตลาดส่วนใหญ่อยู่ที่ญี่ปุ่น, ยุโรป และอเมริกา

สาหร่ายพวงองุ่นจะมีความไวต่อแสงมาก หากได้รับแสงมากเกินไปจะทำให้ชะงักการเจริญเติบโต (นิสราภรณ์ ภักดีพันธ์, 2544) ซึ่งระดับความเข้มแสงที่เหมาะสมของสาหร่ายพวงองุ่นอยู่ในช่วง 15,000-20,000 ลักซ์ หากความเข้มแสงมากขึ้นสาหร่ายก็จะไม่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ในอัตราที่สูงขึ้น (อลิสา โชควิวัฒนวนิช, 2543) การเลี้ยงสาหร่ายพวงองุ่นให้ได้รับแสงโดยตรงจะทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ด้วยแสง เนื่องจากสาหร่ายได้รับแสงที่มีความเข้มสูงมากเกินไป ซึ่งวิธีการควบคุมแสงได้ง่ายและใช้ได้ผลดีคือ การใช้แผ่นผ้าพลาสติกกรองแสง (Slant) ที่มีการจำหน่ายในท้องตลาด จากการศึกษาพบว่า สาหร่ายที่ได้รับการพรางแสงร้อยละ 80 ด้วยผ้าพลาสติกจะยังสภาพเซลล์ที่ดีกว่าสาหร่ายที่ไม่ได้รับการพรางแสง (ธีรพงษ์ จรัญญากรณ์, 2545)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kim *et al*. (2003) ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัด Soybean oligosaccharide (SOS) จาก Defatted soybean meal (DSM) โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ตัวแปรที่ทำการศึกษาได้แก่ อัตราส่วนระหว่าง DSM ต่อน้ำ (1:5, 1:7.5 และ 1:10 w/v) เวลาในการสกัด (1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง) ขนาดอานุภาคที่ผ่านการบดและไม่ผ่านการบด และอุณหภูมิในการสกัด (25, 50, 65 และ 80 องศาเซลเซียส) นอกจากนี้ยังศึกษาผลของการกวนต่อการสกัด โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผลจากการทดลองพบว่า อัตราส่วนระหว่างน้ำกลั่นต่อ DSM ที่เหมาะสมคือ 5:1 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส การกวนและการใช้ DSM ที่ไม่ผ่านการบดทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดดีขึ้น และการใช้เอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ จะให้ประสิทธิภาพดีกว่าใช้เฉพาะน้ำกลั่นอย่างเดียว

Herodez *et al*. (2003) ทำการสกัดสาร Antioxidants จาก Balm leaves โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่า การลดขนาดอนุภาค การเพิ่มอุณหภูมิจาก 0-20 องศาเซลเซียส และการเพิ่มปริมาณตัวทำละลายทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดเพิ่มขึ้น ซึ่งผลได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในตอนเริ่มต้นของการสกัดและจะลดลงหลังจากนั้น โดยกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วนั้นเกิดจากการที่ตัวทำละลายละลายตัวถูกทำละลายที่อยู่บริเวณผิวนอกของอนุภาค และในขั้นตอนที่เกิดขึ้นช้านั้นจะสอดคล้องกับการสกัดตัวละลายที่อยู่ภายในอนุภาคจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ผลได้ในช่วงต้นของการสกัดไม่ขึ้นกับขนาดของอนุภาค แต่ผลได้ทั้งหมดเพิ่มขึ้นเมื่อลดขนาดอนุภาคลง และในช่วงท้ายของการสกัด การแพร่ของตัวทำละลายเข้าไปภายในอนุภาคกับการแพร่ออกมาของตัวทำละลาย-ตัวถูกละลายจากอนุภาคเป็นขั้นตอนควบคุมอัตราการสกัดของกระบวนการ โดยสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ ขนาดอนุภาคอยู่ระหว่าง 0.20-0.25 มิลลิเมตร ตัวทำละลาย 4 dm^3/kg Balm leaves และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

Ekvall *et al* (2006) ได้ทำการทดลองเพื่อหา Raffinose family oligosaccharides (RFOs) ใน Leguminous vine peas โดยใช้สารละลายเอทานอลเป็นตัวทำละลาย ความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้คือ 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ v/v อุณหภูมิในการสกัด คือ อุณหภูมิห้อง (21 องศาเซลเซียส) กับอุณหภูมิจุดเดือด (83 องศาเซลเซียส) เวลาในการสกัดเป็น 145, 30 และ 60 นาที ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอทานอลต่อประสิทธิภาพในการสกัด โดยควบคุมอุณหภูมิในการสกัดเป็น 21 องศาเซลเซียส เวลาในการสกัดเป็น 30 นาที ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการสกัด โดยควบคุมความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ v/v เวลาในการสกัดเป็น 30 นาที และศึกษาผลของเวลาในการสกัดต่อประสิทธิภาพ

ในการสกัด โดยควบคุมความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ v/v อุณหภูมิในการสกัดเท่ากับ 21 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่า ผลได้ของ oligosaccharides มีค่าโดยเฉลี่ยประมาณ 2 เท่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Oligosaccharides ทั้ง 3 ชนิดคือ Raffinose, Stachyose และ Verbascose ยกเว้น Verbascose ที่ผลได้จะใกล้เคียงกันที่การสกัดด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอุณหภูมิมีผลต่อผลได้ของ RFOs น้อยมาก เมื่อสกัดด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มอุณหภูมิอาจช่วยเร่งการสกัด RFOs แต่การดำเนินการที่จุดเดือดอาจส่งผลกับความเข้มข้นของเอทานอลได้ และยากต่อการควบคุมการก่อให้เกิดโปรตีน และผลของการสกัดพบว่า เมื่อใช้เวลาในการสกัด 15 นาที ให้ผลต่ำกว่าที่ 30 และ 60 นาที (ที่ 30 นาที และ 60 นาที ให้ผลได้ใกล้เคียงกัน) นั่นคือ สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือ ที่อุณหภูมิห้อง (21 องศาเซลเซียส) เวลาในการสกัด 30 นาที โดยความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ และการเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผลได้ลดลง

สุพจน์ นวลละออง (2551) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพรีไบโอติกจากพืชเกษตรด้วยเครื่องมือแบบแบชท์ ซึ่งพืชที่ใช้ในการทดลองได้แก่ เปลือกลูกตาลส่วนที่หุ้มเนื้อ และเมล็ดขนุน จากผลการทดลองพบว่า แม้สารสกัดจากเปลือกลูกตาลจะมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC พบองค์ประกอบของน้ำตาลที่เป็นพรีไบโอติกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในขณะที่พบคุณสมบัตินี้ในเมล็ดขนุนมากกว่า ซึ่งเมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดน้ำตาลที่เป็นพรีไบโอติกในเมล็ดขนุน ได้แก่ ตัวทำละลายเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดขนุนควรมีขนาด 1.0-2.0 มิลลิเมตร อุณหภูมิในการสกัดเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 90 นาที

นิรัญญา บุญติ้น (2530) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกโพรไบโอติกจากสัตว์ทะเลและการใช้สารสกัดจากพืชหัวเป็นพรีไบโอติก พบว่า สารสกัดจากมันเทศสีขาวเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง มีองค์ประกอบของสารสกัดที่ไม่ถูกย่อยเป็น 75.37, 84.25, 74.29 และ 88.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารสกัดดังกล่าวสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Lactobacillus plantarum, L. acidophilus, Bifidobacterium bifidum* และ *Enterococcus faecium* โดยสามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. plantarum* ได้ดีที่สุด

ยรรยง สุขคล้าย (2547) ทำการทดลองสกัดสารสำคัญจากฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) โดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลายในถังกวน ซึ่งมีใบพัดกวนแบบพิชต์เบลดเทอร์ไบน์ ที่เข้าด้านข้างถัง และได้ทดสอบหามุมเพลาของใบกวนที่เยื้องจากจุดศูนย์กลางถังที่สามารถให้การกระจายของอนุภาคของแข็งในของเหลวอย่างสม่ำเสมอ การทดสอบทำโดยใช้เม็ดพลาสติกในน้ำ ผลการทดสอบแสดงว่ามุมที่เหมาะสมที่สุด คือ 145 องศา ค่ามุมนี้ถูกใช้ในการสกัดที่มีอัตราส่วนของวัตถุดิบซึ่งเป็นส่วนของลำต้น และก้านของฟ้าทะลายโจรที่บดแห้ง ต่อตัวทำละลายเป็นอัตราส่วน 1:10 และมีความเร็วของใบกวนเท่ากับ 560, 840 และ 1,120 รอบต่อวินาที ผลการทดลองแสดงว่า การกระจายตัวของอนุภาควัตถุดิบสม่ำเสมอทุกการทดลอง และอัตราเร็วของการสกัดใกล้เคียงกันทุกความเร็วของใบกวน การสกัดถือได้ว่าสมดุลเมื่อใช้เวลาปฏิบัติการประมาณ 4 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณสารสำคัญในวัตถุดิบที่ถูกสกัดได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์

Siddenshwar *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกและการหาปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ในผลไม้ ผัก และรากพืช โดยการสสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า

แครอท กระเจี๊ยบ หัวหอม กระเทียม บีทรูท มันแกว ฝรั่ง แอปเปิ้ล มะเขือเทศ และกล้วย เป็นแหล่งพรีไบโอติกที่ดีในการนำมาสกัดในเชิงการค้า และพบว่าการอบแห้งไม่มีผลต่อกระบวนการ Enzymatic hydrolysis ของโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างสด

กิตติยา ภิญโญ (2555) ได้ศึกษาศักยภาพของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายเตา [*Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing] ในการใช้เป็นพรีไบโอติก พบว่า พบว่าคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายเตาสดและสาหร่ายเตาแห้งมีดังนี้ โปรตีน 25.49 เปอร์เซ็นต์ และ 23.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไขมัน 7.04 เปอร์เซ็นต์ และ 5.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เส้นใย 11.60 เปอร์เซ็นต์ และ 7.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เถ้า 10.36 เปอร์เซ็นต์ และ 8.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และคาร์โบไฮเดรต 45.60 เปอร์เซ็นต์ และ 55.04 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ผลการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำร้อน พบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ 12.85–15.89 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง โดยพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายเตาสดมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมากกว่าสาหร่ายเตาแห้ง คือ 42.24 ± 2.32 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และ 38.18 ± 0.87 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ตามลำดับ แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายเตาแห้งมีมากกว่าสาหร่ายเตาสด คือ 5.50 ± 0.43 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และ 2.92 ± 0.28 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่า DP เพื่อประเมินขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์พบว่า ในสาหร่ายเตาสดมีขนาดใหญ่กว่าสาหร่ายเตาแห้ง โดยมีค่า DP ประมาณ 14 และ 7 ตามลำดับการศึกษาชนิดของน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์จากพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางพบว่า ประกอบ ด้วยน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส กาแล็กโทส แมนโนส และแรมโนส เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายเตาสดและสาหร่ายเตาแห้งมาย่อยให้ได้โอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์เพกทิเนส 5 ยูนิต ที่ pH 4.8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มนาน 40 นาที มีผลให้ค่า DP ของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายเตาสดและสาหร่ายเตาแห้งลดลงเหลือประมาณ 6 และ 4 ตามลำดับ จากการทดสอบความสามารถในการเป็นพรีไบโอติกโดยการเลี้ยงแบบเชื้อผสม พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ และโอลิโกแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายเตา สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus fermentum* CM33 และยับยั้งเชื้อก่อโรค *Salmonella enteritidis* ได้ อย่างไรก็ตามไม่พบการยับยั้ง *Escherichia coli* O157: H7

บทที่ 3
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สาหร่ายที่ใช้ในการศึกษา

สาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้แก่ สาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) และสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria fisheri*)

3.2 การรวบรวมสาหร่ายทะเล และการวิเคราะห์หาอัตราส่วนน้ำหนักของสาหร่ายทะเลสดกับสาหร่ายทะเลอบแห้ง

3.2.1 สาหร่ายทะเลสด รวบรวมสาหร่ายทะเลสด 3 ชนิด จากแหล่งต่างๆ ดังนี้

1) สาหร่ายผักกาดทะเล และสาหร่ายพวงองุ่นได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พัฒนาประมงชายฝั่งจังหวัดเพชรบุรี และแฟมมิลี่ฟาร์ม จังหวัดเพชรบุรี

2) สาหร่ายผมนาง ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณจิรรัตน์ สังข์ทอง เจ้าของฟาร์มสาหร่ายผมนางในอำเภอสะเดา จังหวัดสงขลา

3.2.2 การวิเคราะห์หาอัตราส่วนน้ำหนักของสาหร่ายทะเลสดกับสาหร่ายอบแห้ง

เตรียมสาหร่ายทะเลสด ล้างทำความสะอาดโดยเปิดน้ำสะอาดไหลผ่าน 5 นาที จากนั้นบีบน้ำออกจนหมาด ชั่งสาหร่ายทะเลสดประมาณ 20 กรัม และบันทึกค่าน้ำหนักที่แน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในฟรอยด์ที่อบจนได้น้ำหนักคงที่แล้ว จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนสังเกตเห็นว่าสาหร่ายแห้งแล้ว จึงนำมาทำการชั่งน้ำหนักเป็นระยะ จนเห็นว่าน้ำหนักคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงแล้ว ชั่งน้ำหนักสาหร่ายอบแห้งที่แน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) แล้วนำค่าน้ำหนักสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายอบแห้งที่ได้เปรียบเทียบกัน

3.3 การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่าย

นำสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายทะเลอบแห้งทั้ง 3 ชนิด มาหาคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่

- ปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ AOAC (2000)
- ปริมาณไขมัน ตามวิธีของ AOAC (2000)
- ปริมาณความชื้น ตามวิธีของ AOAC (2005)
- ปริมาณเถ้า ตามวิธีของ AOAC (2005)
- ปริมาณเส้นใย ตามวิธีของ AOAC (2000)
- ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ FAO (2003)

3.4 การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล (ดัดแปลงจากวิธีของ Paradossi *et al.*, 1999)

สกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายทะเลอบแห้งทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธีใช้น้ำร้อน (hot water extraction)

1) ชั่งสาหร่ายทะเลอบแห้ง 1 กรัม และสาหร่ายทะเลสด 10 กรัม (สาหร่ายอบแห้ง 1 กรัมเท่ากับสาหร่ายสด 10 กรัม) ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์โดยต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ระดับอุณหภูมิ ระยะเวลา และอัตราส่วนสาหร่ายต่อปริมาตรน้ำแตกต่างกัน เพื่อหาระดับอุณหภูมิ ระยะเวลาและอัตราส่วนสาหร่ายต่อปริมาตรน้ำที่เหมาะสมของสาหร่ายทะเลแต่ละชนิดที่ให้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาในปริมาณสูงสุด

2) กรองผ่านผ้าขาวบาง แล้วนำส่วนกากที่กรองได้มาทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์อีกครั้ง

3) นำสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งรวมกัน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยเครื่องระเหยแห้ง (evaporator) ให้เหลือปริมาตรของสารละลาย 1 ใน 4 ส่วนของปริมาตรเดิม

4) ทำการปั่นเหวี่ยงสารละลายที่เหลือด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดตะกอนของสารปนเปื้อนออก

5) นำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอล 95% โดยเติมเอทานอลในอัตราส่วนสารละลายต่อเอทานอล 1:2 โดยปริมาตร แล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6) เก็บตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ปั่นเหวี่ยงความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้อบให้แห้งที่ 55 องศาเซลเซียส

7) นำพอลิแซ็กคาไรด์แห้งมาชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์แห้ง ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายอบแห้ง โดยเทียบจากสาหร่ายอบแห้ง 1 กรัม

3.5 การศึกษาขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายทะเลอบแห้ง

คำนวณค่า degree of polymerization (DP) เพื่อประมาณขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (phenol-sulfuric method) ของ Dubois *et al*. (1956) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด (dinitrosalicylic acid method: DNS method) ของ Miller (1959) แล้วคำนวณค่า DP ได้ดังสูตร

$$DP = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด}}{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์}}$$

3.6 การศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้โดยวิธีโครมาโทรกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography: TLC) (ดัดแปลงจากวิธีของ Fang and Wang, 2004)

1) ทำการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดซัลฟูริก 6 % โดยชั่งพอลิแซ็กคาไรด์ให้มีปริมาณของน้ำตาลทั้งหมด 10 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้นลงไป 120 ไมโครลิตร นำไปใส่หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกกรดออกโดยวิธีตกตะกอนด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต

2) นำสารละลายไปตรวจสอบชนิดของน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโทรกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography: TLC) เปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำตาลมาตรฐาน ได้แก่ แมนโนส ฟรักโทส ไซโลส กลูโคส อะราบิโนส กาแล็กโทส แรมโนส และกรดกลูคิวโรนิก โดยใช้ TLC silica gel 60 F254 เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) และใช้สารละลายที่ประกอบด้วย ไอโซโพรพานอล: บิวทานอล: น้ำ (Iso-propanol: butanol: water) ในอัตราส่วน 12: 6: 4 เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำให้น้ำตาลปรากฏโดยนำแผ่น TLC จุ่มในสารละลาย 5% กรดซัลฟูริกในเมทานอลอย่างรวดเร็ว แล้วนำแผ่น TLC ไปอบที่ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลโดยใช้เอนไซม์เพกทิเนสเพื่อนำไปใช้เป็นพรีไบโอติก (ดัดแปลงจากวิธีของ Intarata, 2007)

เตรียมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายทะเลอบแห้ง โดยมีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 5, 10, 15, 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน acetate buffer 50 mM pH 4.8 จากนั้นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เพกทิเนสที่ความเข้มข้น 5 ยูนิต เป็นเวลา 40 นาที แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส (กิตติยา ภิญโญ, 2555) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อคำนวณหาค่า DP ของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายทะเลอบแห้ง ที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายทะเลอบแห้งปริมาณต่างๆกัน

3.8 การศึกษาปริมาณของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa* sp.) และสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria* sp.) ที่มีคุณสมบัติด้านพรีไบโอติก

1) เตรียมเชื้อ *Bacillus subtilis* (Ferreira et al., 2015; Travers et al, 1987) โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่อยู่บน LB agar plate ลงในหลอด LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปใช้ทดสอบคุณสมบัติด้านพรีไบโอติกของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล

2) เตรียมสาหร่ายทั้งสามชนิด โดยนำสาหร่ายสดทั้งสามชนิดมาล้างทำความสะอาดสาหร่าย เปิดน้ำสะอาดไหลผ่าน 5 นาที ซับน้ำออกจนหมาด ชั่งสาหร่ายทะเลสด และบันทึกค่าน้ำหนักที่ชั่งได้ อบที่

อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บสาหร่ายที่แห้งแล้วในภาชนะดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักสาหร่ายแห้งที่มีค่าคงที่แล้วคำนวนร้อยละของน้ำหนักสาหร่ายแห้งที่ได้

3) นำสาหร่ายอบแห้งที่ได้ไปสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยสภาวะการสกัดดังตารางที่ 6 แล้วเก็บสารสกัดพอลิแซ็กคาร์ไรด์ที่สกัดได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบคุณสมบัติด้านพรีไบโอติก

ตารางที่ 6 สภาวะการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ในสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิด

ชนิดสาหร่ายทะเล	อัตราส่วน สาหร่ายแห้ง : น้ำ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (นาที)
สาหร่ายผักกาดทะเล	1:75	90	30
สาหร่ายพวงองุ่น	1:75	90	30
สาหร่ายผมนาง	1:75	90	60

3) เตรียมชุดการทดลองๆละ 4 ซ้ำ ในหลอด Culture tube ปริมาตรหลอดละ 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้อุณหภูมิของอาหารลดลงจนเหลืออุณหภูมิห้อง ก่อนใช้ทดสอบคุณสมบัติด้านพรีไบโอติก โดยแต่ละชุดการทดลองมีรายละเอียด ดังนี้

ชุดควบคุม เป็นชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ลงใน LB broth

ชุดการทดลองสารสกัดจากสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) เติมสารสกัดจากสาหร่ายผักกาดทะเลให้ได้ความเข้มข้นของคาร์บอนเป็น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงใน LB broth

ชุดการทดลองสารสกัดจากสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa* sp.) เติมสารสกัดจากสาหร่ายพวงองุ่นให้ได้ความเข้มข้นของคาร์บอนเป็น 0.5, 1 และ 2.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงใน LB broth

ชุดการทดลองสารสกัดจากสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria* sp.) เติมสารสกัดจากสาหร่ายผมนางให้ได้ความเข้มข้นของคาร์บอนเป็น 1, 3 และ 4.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงใน LB broth

4) ทดสอบคุณสมบัติด้านพรีไบโอติกของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด โดยถ่ายเชื้อ (inoculation) *B. subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามชุดการทดลองข้างต้น ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อที่เพิ่มขึ้นในแต่ละชุดการทดลองโดยวิธีตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐาน (Total plate count; TPC) ที่เวลาของการบ่ม 0, 24 และ 48 ชั่วโมง (Lam et al., 2017; Korsten and Cook., 1996)

3.9 การศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นโพรไบโอติกของ *Bacillus subtilis* ที่ได้รับพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa* sp.) และสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria* sp.) เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus*

1) เตรียมเชื้อ *Bacillus subtilis* (Ferreira et al., 2015; Travers et al, 1987) โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่อยู่บน LB agar plate ลงในหลอด LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพโพรไบโอติกของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล

2) เตรียมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (Fishbein and Wentz, 1973; Vanderzant and Nickelson, 1972) โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่อยู่บน TCBS Agar plate และ TSA Agar plate ลงใน TSA broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพโพรไบโอติกของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล

3) เตรียมชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ในหลอด Culture tube ปริมาตรหลอดละ 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้อุณหภูมิของอาหารลดลงจนเหลืออุณหภูมิห้อง ก่อนใช้ทดสอบคุณสมบัติด้านโพรไบโอติก โดยแต่ละชุดการทดลองมีรายละเอียด ดังนี้

ชุดควบคุม เป็นชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ลงใน LB broth

ชุดการทดลองสารสกัดจากสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida)* เติมสารสกัดจากสาหร่ายผักกาดทะเลให้ได้ความเข้มข้นของคาร์บอน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงใน LB broth

ชุดการทดลองสารสกัดจากสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa* sp.) เติมสารสกัดจากสาหร่ายพวงองุ่นให้ได้ความเข้มข้นของคาร์บอน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงใน LB broth

ชุดการทดลองสารสกัดจากสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria* sp.) เติมสารสกัดจากสาหร่ายผมนางให้ได้ความเข้มข้นของคาร์บอน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงใน LB broth

4) ทดสอบคุณสมบัติด้านโพรไบโอติกของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธีการเลี้ยงร่วมกับเชื้อก่อโรค โดยถ่ายเชื้อ (inoculation) *B. subtilis* และ *V. parahaemolyticus* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามชุดการทดลองข้างต้น ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อที่เพิ่มขึ้นในแต่ละชุดการทดลองโดยวิธีตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐาน (Total plate count; TPC) ที่เวลาของการบ่ม 0, 24 และ 48 ชั่วโมง บน LB Agar plate สำหรับ *B. Subtilis* และ TCBS Agar plate และ TSA Agar plate สำหรับ *V. parahaemolyticus* (Vaseeharan and Ramasamy, 2003; Interaminense et al 2018)

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. Subtilis และ V. parahaemolyticus* ในแต่ละชุดการทดลองโดยใช้วิธี T-test และ One-way ANOVA โปรแกรม SPSS

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การวิเคราะห์หาอัตราส่วนน้ำหนักของสาหร่ายทะเลสดกับสาหร่ายทะเลอบแห้ง

จากการนำสาหร่ายทะเลสดจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผมนาง มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักแห้ง โดยการนำสาหร่ายทะเลสดทั้ง 3 ชนิดมาอบให้แห้งแล้วนำมาใส่ตู้ดูดความชื้น จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักของสาหร่ายทะเลที่อบแห้งแล้วด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยของสาหร่ายผักกาดทะเลสด 100.0 $\pm$ 0.1356 กรัม ได้สาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้งเฉลี่ย 4.8623 $\pm$ 0.0154 กรัม ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 20.57 น้ำหนักแห้ง น้ำหนักเฉลี่ยของสาหร่ายผักกาดพวงองุ่นสด 100.0 $\pm$ 0.1267 กรัม ได้สาหร่ายพวงองุ่นอบแห้งเฉลี่ย 2.8218 $\pm$ 0.0162 กรัม ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 35.44 น้ำหนักแห้ง และน้ำหนักเฉลี่ยของสาหร่ายผมนางสด 100.0 $\pm$ 0.1562 กรัม ได้สาหร่ายผมนางอบแห้งเฉลี่ย 4.6225 $\pm$ 0.0123 กรัม ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 21.63 น้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 อัตราส่วนน้ำหนักของสาหร่ายทะเลสดกับสาหร่ายทะเลอบแห้ง

ชนิดสาหร่าย	น้ำหนักเฉลี่ยสด (กรัม)	น้ำหนักเฉลี่ยอบแห้ง (กรัม)	อัตราส่วนของน้ำหนักสาหร่ายสดต่อน้ำหนักสาหร่ายอบแห้ง (ร้อยละ)
สาหร่ายผักกาดทะเล	100.0 $\pm$ 0.1356	4.8623 $\pm$ 0.0154	20.57
สาหร่ายพวงองุ่น	100.0 $\pm$ 0.1267	2.8218 $\pm$ 0.0162	35.44
สาหร่ายผมนาง	100.0 $\pm$ 0.1562	4.6225 $\pm$ 0.0123	21.63

4.2 การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่าย

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายทะเล 3 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผมนาง ทั้งที่เป็นสาหร่ายสดและสาหร่ายอบแห้ง พบว่า สาหร่ายผักกาดทะเลสดและอบแห้งมีโปรตีนร้อยละ 1.68 และ 10.51 ตามลำดับ ไขมันร้อยละ 0.08 และ 5.24 ตามลำดับ ความชื้นร้อยละ 80.72 และ 10.15 ตามลำดับ เถ้าร้อยละ 4.86 และ 50.24 ตามลำดับ และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 12.66 และ 23.86 ตามลำดับ (ตารางที่ 8) ส่วนสาหร่ายพวงองุ่นสดและอบแห้งมีโปรตีนร้อยละ 0.57 และ 4.63 ตามลำดับ ไขมันร้อยละ 0.10 และ 2.15 ตามลำดับ ความชื้นร้อยละ 89.92 และ 10.28 ตามลำดับ เถ้าร้อยละ 2.80 และ 64.32 ตามลำดับ และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 6.61 และ 18.62 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) และสาหร่ายผมนางสดและอบแห้งมีโปรตีนร้อยละ 1.64 และ 8.23 ตามลำดับ ไขมันร้อยละ 0.15 และ 3.64 ตามลำดับ ความชื้นร้อยละ 81.62 และ 10.12 ตามลำดับ เถ้าร้อยละ 4.62 และ 57.50 ตามลำดับ และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 11.97 และ 20.51 ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

จะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นองค์ประกอบในสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์ในครั้งนี้ พบว่าสาหร่ายผักกาดทะเลสดและอบแห้งมีร้อยละของคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุดเท่ากับ 12.66 และ 23.86 ตามลำดับ ในขณะที่สาหร่ายพวงองุ่นสดและอบแห้งมี

ร้อยละของคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 6.61 และ 18.62 ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายผมนางสดและอบแห้งมีร้อยละของคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 11.97 และ 20.51 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายผักกาดทะเลสดและสาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้ง

คุณค่าทางโภชนาการ	**ปริมาณ (ร้อยละของน้ำหนัก)**	
	สาหร่ายสด	**สาหร่ายอบแห้ง**
โปรตีน	1.68	10.51
ไขมัน	0.08	5.24
ความชื้น	80.72	10.15
เถ้า	4.86	50.24
คาร์โบไฮเดรต	12.66	23.86

ตารางที่ 9 คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายพวงองุ่นสดและสาหร่ายพวงองุ่นอบแห้ง

คุณค่าทางโภชนาการ	**ปริมาณ (ร้อยละของน้ำหนัก)**	
	สาหร่ายสด	**สาหร่ายอบแห้ง**
โปรตีน	0.57	4.63
ไขมัน	0.10	2.15
ความชื้น	89.92	10.28
เถ้า	2.80	64.32
คาร์โบไฮเดรต	6.61	18.62

ตารางที่ 10 คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายผมนางสดและสาหร่ายผมนางอบแห้ง

คุณค่าทางโภชนาการ	**ปริมาณ (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)**	
	สาหร่ายสด	**สาหร่ายอบแห้ง**
โปรตีน	1.64	8.23
ไขมัน	0.15	3.64
ความชื้น	81.62	10.12
เถ้า	4.62	57.50
คาร์โบไฮเดรต	11.97	20.51

4.3 การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล (ดัดแปลงจากวิธีของ Paradossi *et al.*, 1999)

สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายทะเลอบแห้งด้วยน้ำร้อน พบว่าได้พอลิแซ็กคาไรด์มีลักษณะสีขาวนวล ดังภาพที่ 4 พอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวละลายน้ำได้น้อย เมื่อถูกน้ำจะมีลักษณะเป็นเมือกลื่น

ภาพที่ 4 สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองหาระดับอุณหภูมิ ระยะเวลาที่เหมาะสม และอัตราส่วนสาหร่ายต่อปริมาตรน้ำที่ใช้ในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลแต่ละชนิดที่สามารถให้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาในปริมาณสูงสุด ซึ่งสรุปผลได้ดังตารางที่ 11

จากตารางที่ 11 พบว่าสาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้งที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที และใช้อัตราส่วนสาหร่าย 1 กรัมต่อน้ำ 75 มิลลิลิตร ให้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 165.02 $\pm$ 1.11 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายพวงองุ่นอบแห้งและสาหร่ายผมนางอบแห้งที่ให้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 24.74 $\pm$ 0.67 และ 32.48 $\pm$ 0.72 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง ในปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้สกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายแต่ละชนิด ตามลำดับ

แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายทะเลอบแห้งในแต่ละชนิดแล้ว พบว่าปริมาณสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากสาหร่ายสดและสาหร่ายอบแห้งของสาหร่ายแต่ละชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 11 ระดับอุณหภูมิ ระยะเวลา และอัตราส่วนสาหร่ายต่อปริมาตรน้ำในการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ให้ได้ปริมาณสูงสุด

ชนิดสาหร่าย	รูปแบบ	ปัจจัยที่เหมาะสม			ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (มก./100 ก.ของน้ำหนักสาหร่าย)
		อุณหภูมิ (^{o}C)	ระยะเวลา (นาที)	อัตราส่วนสาหร่ายต่อน้ำ (ก/มล.)	
สาหร่ายผักกาดทะเล	สด	100	70	1:75	160.12 ± 1.63^{a}
	อบแห้ง	90	60	1:75	165.02 ± 1.11^{a}
สาหร่ายพวงองุ่น	สด	90	60	1;125	22.43 ± 0.81^{a}
	อบแห้ง	80	45	1:125	24.74 ± 0.67^{a}
สาหร่ายผมนาง	สด	90	80	1;125	32.48 ± 0.72^{a}
	อบแห้ง	80	45	1:125	39.50 ± 0.43^{a}

4.4 การศึกษาขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายทะเลอบแห้ง

คำนวณค่า degree of polymerization (DP) เพื่อประมาณขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (phenol-sulfuric method) ของ Dubois *et al*. (1956) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด (dinitrosalicylic acid method: DNS method) ของ Miller (1959) แล้วคำนวณค่า DP ได้ดังสูตร

$$DP = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด}}{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์}}$$

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ในพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายทะเลอบแห้งของสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิด เมื่อนำมาคำนวณหาขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์หรือค่า degree of polymerization (DP) พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์สาหร่ายผักกาดทะเลสดมีค่า DP ประมาณ 14 และพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้งมีค่า DP ประมาณ 7 ในขณะที่สาหร่ายพวงองุ่นสดและสาหร่ายพวงองุ่นอบแห้งมีค่า DP เท่ากับ 10 และ 5 ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายผมนางสดและสาหร่ายผมนางอบแห้งมีค่า DP เท่ากับ 12 และ 6 ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

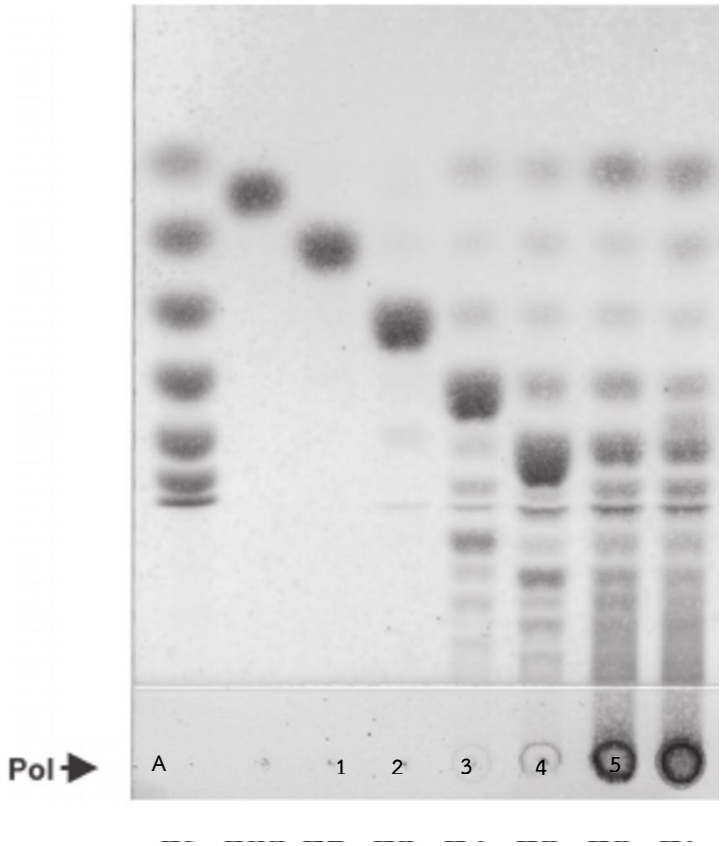
จากค่า DP ของสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิดพบว่า ขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายผักกาดทะเลสดมีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายพวงองุ่นและสาหร่ายผมนางทั้งที่เป็นสาหร่ายสดและสาหร่ายอบแห้ง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่สาหร่ายผักกาดทะเลจะมีชนิดของน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นพรีไบโอติกในปริมาณที่มากกว่าสาหร่ายพวงองุ่นและสาหร่ายผมนางด้วย

ตารางที่ 12 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่า DP ในพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผมนาง

ชนิดสาหร่าย	รูปแบบ	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ก./ก.)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ก./ก.)	ค่า DP
สาหร่ายผักกาดทะเล	สด	0.536 ± 0.032	0.037 ± 0.003	14
	อบแห้ง	0.463 ± 0.012	0.066 ± 0.006	7
สาหร่ายพวงองุ่น	สด	0.203 ± 0.026	0.020 ± 0.002	10
	อบแห้ง	0.155 ± 0.034	0.031 ± 0.004	5
สาหร่ายผมนาง	สด	0.323 ± 0.022	0.027 ± 0.002	12
	อบแห้ง	0.214 ± 0.015	0.036 ± 0.003	6

4.5 การศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้โดยวิธีโครมาโทรกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography: TLC) (ดัดแปลงจากวิธีของ Fang and Wang, 2004)

เมื่อย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผมนางที่อยู่ในรูปแบบสดและแห้งด้วยกรดซัลฟูริก 6% แล้วนำมาแยกชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย TLC พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผมนางที่อยู่ในรูปแบบสดและแห้งมีชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบเหมือนกันได้เก่ กลูโคส (Glucose) อะราบิโนส (Arabinose) กาแลคโตส (Galactose) แมนโนส (Mannose) และแรมโนส (Ramnose) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 แผ่น TLC แสดงน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล

เมื่อ 1 = แรมโนส 2 = แมนโนส 3 = อะราบิโนส
4 = กลูโคส 5 = กาแล็กโทส A = พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล

4.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลโดยใช้เอนไซม์เพกทิเนสเพื่อนำไปใช้เป็นพรีไบโอติก (ดัดแปลงจากวิธีของ Intarata, 2007)

จากการศึกษาการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผมนางอบแห้งด้วยเอนไซม์เพกทิเนส โดยมีความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนี้ 5, 10, 15, 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เพกทิเนสที่ความเข้มข้น 5 ยูนิต เป็นเวลา 40 นาที ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย (กิตติยา ภิญโญ, 2555) จากผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์เพกทิเนสสามารถทำปฏิกิริยากับพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในช่วงความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ 5 – 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเลได้สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของพอลิโกแซ็กคาไรด์เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า DP เท่ากับ 4.8 ส่วนสาหร่ายพวงองุ่นสามารถผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของพอลิโกแซ็กคาไรด์เท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า DP เท่ากับ 2.6 และสาหร่ายผมนางสามารถผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของพอลิโกแซ็กคาไรด์เท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า DP เท่ากับ 3.8 (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล 3 ชนิด โดยใช้เอนไซม์เพกทิเนสเพื่อนำไปใช้เป็นพรีไบโอติก

ชนิดสาหร่าย	ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า DP
สาหร่ายผักกาดทะเล	5	4.2
	10	4.5
	15	4.6
	20	4.8
	30	4.2
	40	4.3
สาหร่ายพวงองุ่น	5	2.0
	10	2.3
	15	2.6
	20	2.5
	30	2.4
	40	2.3
สาหร่ายผมนาง	5	2.2
	10	2.5
	15	3.5
	20	3.6
	30	3.8
	40	3.6

4.7 การศึกษาปริมาณของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa* sp.) และสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria* sp.) ที่มีคุณสมบัติด้านพรีไบโอติก

การคำนวณหาอัตราส่วนน้ำหนักของสาหร่ายทะเลสดกับสาหร่ายทะเลอบแห้งที่นำมาใช้ในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์สำหรับทดสอบคุณคุณสมบัติด้านพรีไบโอติก พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยของสาหร่ายผักกาดทะเลสด 0.69 $\pm$ 0.13 กิโลกรัม ได้สาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้งเฉลี่ย 0.09 $\pm$ 0.02 กิโลกรัม ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 12.77 $\pm$ 5.81น้ำหนักแห้ง น้ำหนักเฉลี่ยของสาหร่ายผักกาดพวงองุ่นสด 1.60 $\pm$ 0.01 กิโลกรัม ได้สาหร่ายพวงองุ่นอบแห้งเฉลี่ย 0.03 $\pm$ 0.02 กิโลกรัม ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 1.78 $\pm$ 0.15 น้ำหนักแห้ง และน้ำหนักเฉลี่ยของสาหร่ายผมนางสด 1.48 $\pm$ 0.15 กิโลกรัม ได้สาหร่ายผมนางอบแห้งเฉลี่ย 0.19 $\pm$ 0.02 กิโลกรัม ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 12.62 $\pm$ 0.30 น้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 7)

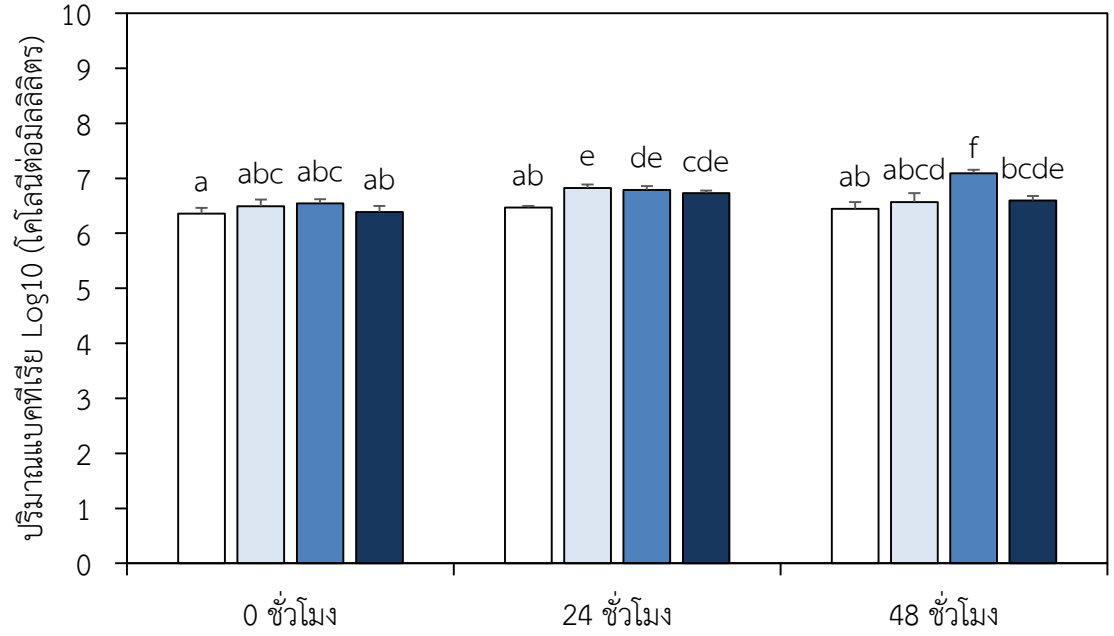
ผลการทดสอบคุณสมบัติด้านพรีไบโอติกของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* และเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งการเจริบโตของแบคทีเรียในแต่ละชุดการทดลองนั้นสามารถทำได้โดยการสังเกตเบื้องต้นจากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เปลี่ยนแปลงไปและวิธีตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐาน (Total plate count) ซึ่งแสดงถึงปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในแต่ละชุดการทดลอง พบว่า เมื่อครบ 24 และ 48 ชั่วโมงของการทดลอง สีของอาหาร LB ในทุกชุดการทดลองเปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสีเหลืองขุ่นและจากการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธีตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐาน ยังพบว่า สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายอบแห้งทั้ง 3 ชนิด มีคุณสมบัติด้านพรีไบโอติก เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณเชื้อ *B. Subtilis* ได้มากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย 3 ชนิด ดังนี้

4.7.1 ความสามารถในการเพิ่มปริมาณ *Bacillus subtilis* ของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*)

ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* (หน่วยเป็น log cfu ต่อมิลลิลิตร) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่เติมและไม่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายผักกาดทะเลแสดงดังตารางที่ 14 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียครบ 24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 6.79 $\pm$ 0.07 log cfu ต่อมิลลิลิตรและ 6.82 $\pm$ 0.07 log cfu ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยมีค่ามากกว่าปริมาณเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นอื่นๆ รวมถึงชุดการทดลองที่เป็นชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อเลี้ยงต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ในชุดการทดลองที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็ยังสามารถเจริญเติบโตต่อจนมีปริมาณ 7.09 $\pm$ 0.06 log cfu ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ปริมาณแบคทีเรียในชุดการทดลองที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าลดลงเหลือ 6.45 $\pm$ 0.12, 6.57 $\pm$ 0.16 และ 6.60 $\pm$ 0.08 log cfu ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 14 ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายผักกาดทะเลในหน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติ)

ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ในแต่ละระยะเวลา (ชั่วโมง) ในหน่วย log cfu ต่อมิลลิลิตร		
	0	24	48
0	6.36 ± 0.11^{a}	6.47 ± 0.03^{ab}	6.45 ± 0.12^{ab}
1.0	6.49 ± 0.12^{abc}	6.82 ± 0.07^{e}	6.57 ± 0.16^{abcd}
3.0	6.54 ± 0.07^{abc}	6.79 ± 0.07^{de}	7.09 ± 0.06^{f}
5.0	6.39 ± 0.11^{ab}	6.73 ± 0.05^{cde}	6.60 ± 0.08^{bcde}



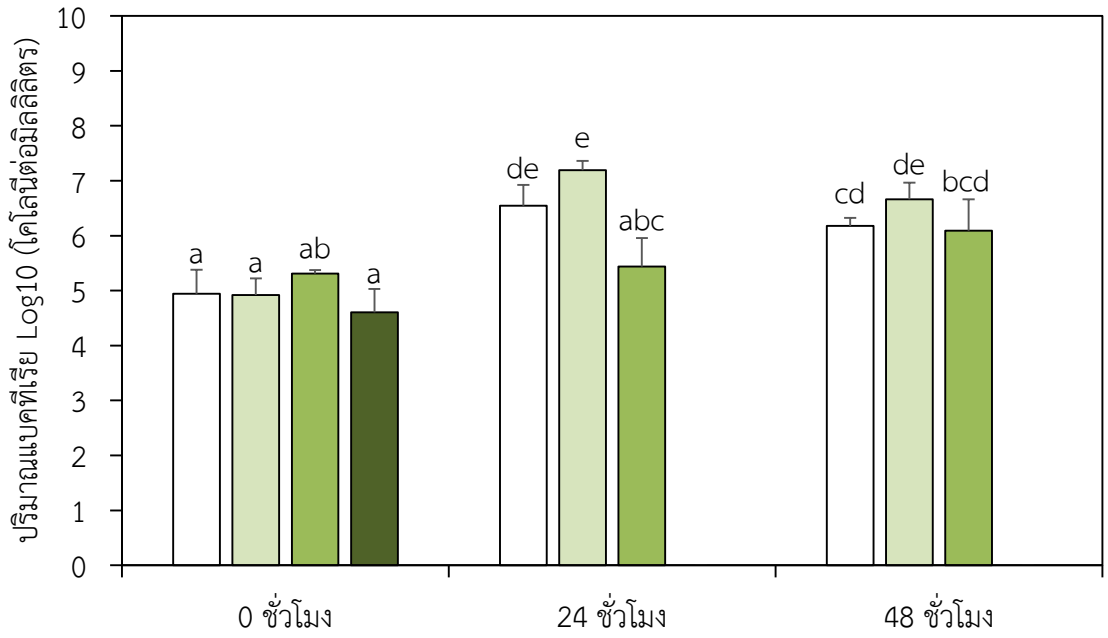
ภาพที่ 6 ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเลที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแท่งสีขาวแทนความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร แท่งสีฟ้าอ่อนแทนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แท่งฟ้าเข้มแทนความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและแท่งสีน้ำเงินเข้มแทนความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติ)

4.7.2 ความสามารถในการเพิ่มปริมาณ *Bacillus subtilis* ของสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*)

ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* (log cfu ต่อมิลลิลิตร) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่เติมและไม่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายพวงองุ่นแสดงดังตารางที่ 15 โดยพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียครบ 24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) คือ 7.19 ± 0.17 log cfu ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์มีค่า 6.54 ± 0.38 log cfu ต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 1.0 มีค่า 5.44 ± 0.52 log cfu ต่อมิลลิลิตรและไม่พบเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 2.7 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง ก็ยังพบว่าปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ในชุดการทดลองที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังคงมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ คือมีค่า 6.66 ± 0.30 log cfu ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในชุดการทดลองอื่นๆ ทั้งในอาหาร LB broth ที่ไม่ได้เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความเข้มข้น 1.0 และ 2.7 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 6.18 ± 0.15, 6.09 ± 0.57 และ 0 log cfu ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 7)

ตารางที่ 15 ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายพวงองุ่นในหน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติ)

ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ในแต่ละระยะเวลา (ชั่วโมง) ในหน่วย log cfu ต่อมิลลิลิตร		
	0	24	48
0	4.94 ± 0.44^{a}	6.54 ± 0.38^{de}	6.18 ± 0.15^{cd}
0.5	4.92 ± 0.30^{a}	7.19 ± 0.17^{e}	6.66 ± 0.30^{de}
1.0	5.31 ± 0.06^{ab}	5.44 ± 0.52^{abc}	6.09 ± 0.57^{bcd}
2.7	4.60 ± 0.43^{a}	0	0



ภาพที่ 7 ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพวงองุ่นที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแท่งสีขาวแทนความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร แท่งสีเขียวอ่อนแทนความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แท่งสีเขียวมะกอกแทนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแท่งสีเขียวเข้มแทนความเข้มข้น 2.7 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติ)

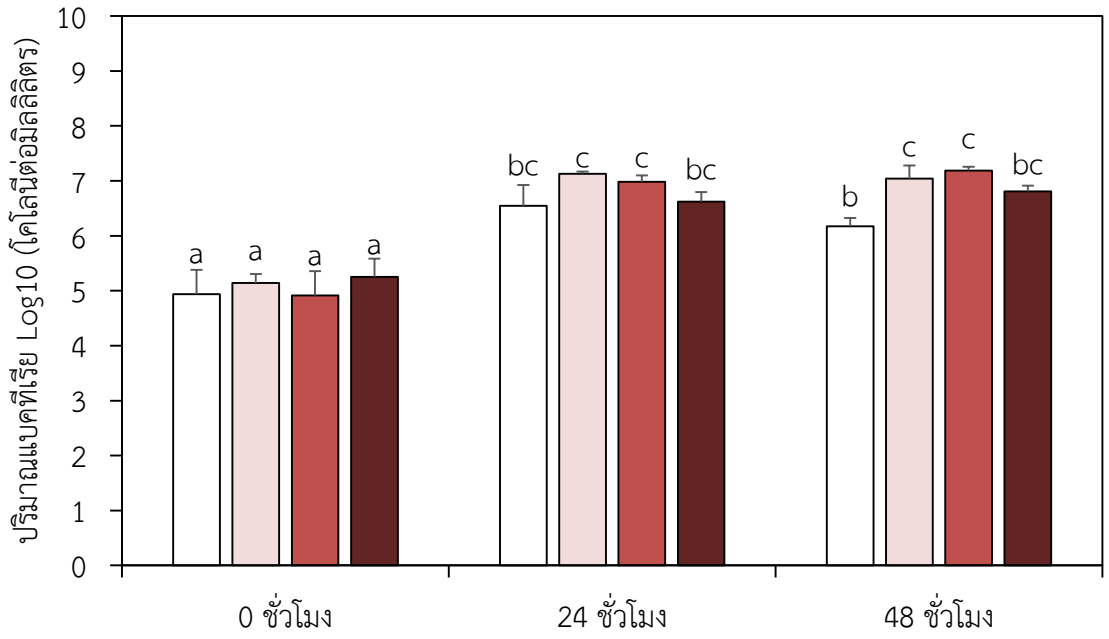
4.7.3 ความสามารถในการเพิ่มปริมาณ *Bacillus subtilis* ของสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria fisheri*)

ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* (log cfu ต่อมิลลิลิตร) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่เติมและไม่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายผมนางแสดงดังตารางที่ 16 โดยพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียครบ 24 และ 48 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 1.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่ามากกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์และชุดการทดลองที่ใช้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 4.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 1.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียครบ 24 ชั่วโมงมีค่า 7.13 $\pm$ 0.04 และ 6.98 $\pm$ 0.12 log cfu ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์และเติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 4.3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า 6.54 $\pm$ 0.38 และ 6.62 $\pm$ 0.17 log cfu ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากทั้งชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ 1.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังมีค่าใกล้เคียงกันคือ 7.04 $\pm$ 0.24 และ 7.19 $\pm$

0.07 ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งก็มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ที่ช่วงเวลาเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 16 ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายผมนางในหน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติ)

ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ในแต่ละระยะเวลา (ชั่วโมง) ในหน่วย log cfu ต่อมิลลิลิตร		
	0	24	48
0	4.94 ± 0.44^{a}	6.54 ± 0.38^{bc}	6.18 ± 0.15^{b}
1.0	5.14 ± 0.17^{a}	7.13 ± 0.04^{c}	7.04 ± 0.24^{c}
3.0	4.92 ± 0.44^{a}	6.98 ± 0.12^{c}	7.19 ± 0.07^{c}
4.3	5.25 ± 0.33^{a}	6.62 ± 0.17^{bc}	6.81 ± 0.11^{bc}



ภาพที่ 8 ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผมนางที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแท่งสีขาวแทนความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร แท่งสีชมพูแทนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แท่งสีชมพูเข้มแทนความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและแท่งสีแดงเลือดนกแทนความเข้มข้น 4.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

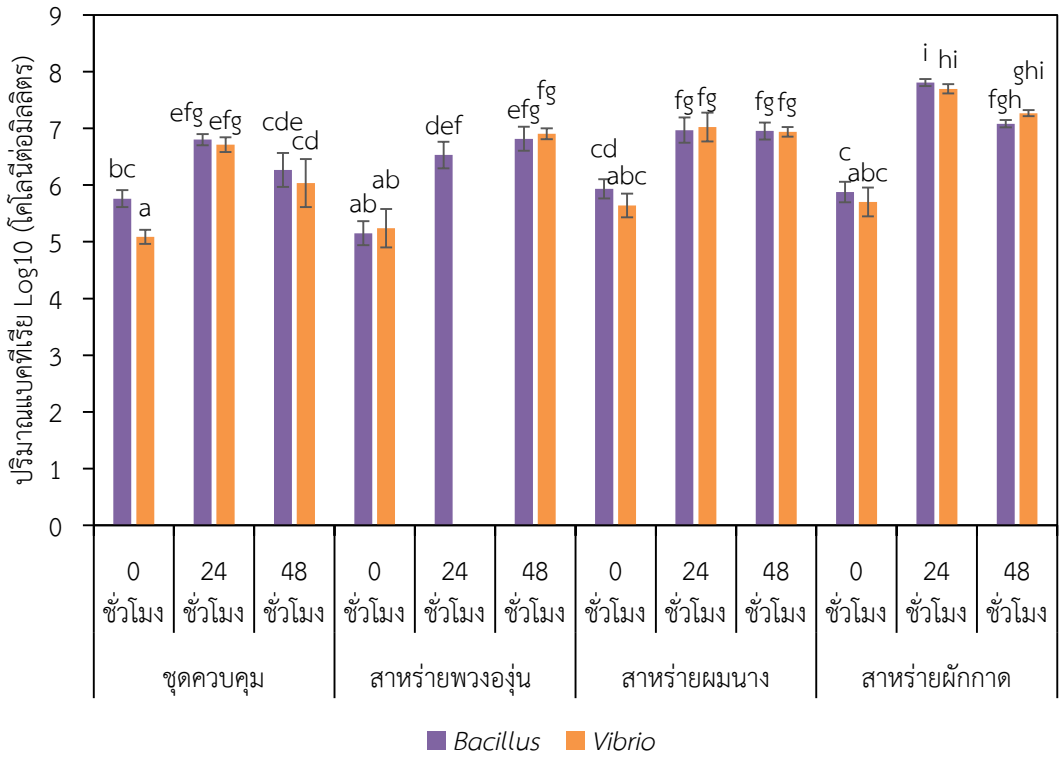
จะเห็นได้ว่าที่สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลต่างชนิดมีตวามเข้มข้นที่มีศักยภาพในการเป็นพรีไบโอติกต่างกัน โดยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้งความเข้มข้นอยู่ที่ 3.0 mg/l สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์สาหร่ายพวงองุ่นอบแห้งความเข้มข้นอยู่ที่ 0.5 mg/l และสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายผมนางอบแห้งความเข้มข้นอยู่ที่ 1.0 และ 3.0 mg/l

4.8 การศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นโพรไบโอติกของ *Bacillus subtilis* ที่ได้รับพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa* sp.) และสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria* sp.) เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus*

ผลของทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นโพรไบโอติกของ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิด ร่วมกับเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus* แสดงดังตารางที่ 17 ซึ่งพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรค์จากสาหร่ายผักกาดทะเลเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรค์จากสาหร่ายผักกาดทะเลเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 7.81 $\pm$ 0.06 และ 7.70 $\pm$ 0.08 log cfu ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณเชื้อ *B. subtilis* มีค่ามากกว่าปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* รวมถึงยังมีค่ามากกว่าชุดควบคุมและชุดที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) และเมื่อเลี้ยงต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง พบว่า ในชุดการทดลองที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร LB broth ที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเลเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตาม ชุดการทดลองนี้ ยังคงเป็นชุดการทดลองที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดใกล้เคียงกันและสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นที่เวลาเดียวกัน คือ มีค่า 7.08 $\pm$ 0.06 log cfu ต่อมิลลิลิตร ในเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ 7.27 $\pm$ 0.06 log cfu ต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 17 ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* และ *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในหน่วย log cfu ต่อมิลลิลิตร (ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติ)

ความเข้มข้นสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ (หน่วย มิลลิกรัมต่อลิตร)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)					
	0		24		48	
	B. subtilis	*V. parahaemolyticus*	*B. subtilis*	*V. parahaemolyticus*	*B. subtilis*	*V. parahaemolyticus*
0	5.76 ± 0.15^{bc}	5.09 ± 0.12^{a}	6.80 ± 0.10^{efg}	6.71 ± 0.13^{efg}	6.26 ± 0.30^{cde}	6.03 ± 0.42^{cd}
0.5 (จากสาหร่ายพวงองุ่น)	5.15 ± 0.21^{ab}	5.24 ± 0.34^{ab}	6.53 ± 0.23^{def}	0	6.82 ± 0.21^{efg}	6.90 ± 0.10^{fg}
1 (จากสาหร่ายผมนาง)	5.93 ± 0.17^{cd}	5.64 ± 0.21^{abc}	6.97 ± 0.22^{fg}	7.02 ± 0.25^{fg}	6.95 ± 0.15^{fg}	6.94 ± 0.08^{fg}
3 (จากสาหร่ายผักกาด)	5.88 ± 0.18^{c}	5.70 ± 0.25^{abc}	7.81 ± 0.06^{i}	7.70 ± 0.08^{hi}	7.08 ± 0.06^{fgh}	7.27 ± 0.06^{ghi}



ภาพที่ 9 ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* และ *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยแท่งสีม่วงแทนเชื้อ *B. subtilis* และแท่งสีส้มแทนเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติ)

4.9 การเผยแพร่ผลงานวิจัย

ผลจากการศึกษาโครงการการศึกษาประสิทธิภาพพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้เป็นพรีไบโอติกบางส่วนได้นำไปเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ เรื่อง การนำเสนอผลงานวิชาการนานาชาติ เรื่อง Optimization of Extraction Process of Polysaccharides from Macro Algae *Ulva rigida* Using Response Surface Methodology ในการประชุมวิชาการนานาชาติ The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference November 23-25, 2017 Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand รายละเอียดดังภาคผนวก

บทที่ 5
อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการวิจัยของโครงการการศึกษาประสิทธิภาพพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้เป็นพรีไบโอติก พบว่า

1. การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายทะเล 3 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผมนาง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นองค์ประกอบของสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิด พบว่าสาหร่ายผักกาดทะเลสดและอบแห้งมีร้อยละของคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด เท่ากับ 12.66 และ 23.86 ตามลำดับ ในขณะที่สาหร่ายพวงองุ่นสดและอบแห้งมีร้อยละของคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 6.61 และ 18.62 ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายผมนางสดและอบแห้งมีร้อยละของคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 11.97 และ 20.51 ตามลำดับ ดังนั้นสาหร่ายผักกาดทะเลจึงมีศักยภาพสูงที่สุดที่จะนำคุณสมบัติในส่วนนี้มาศึกษาทางด้านพอลิแซ็กคาไรด์หรือคาร์โบไฮเดรตในรูปอื่นๆ เพิ่มเติม รองลงมาได้แก่ สาหร่ายผมนาง และสาหร่ายพวงองุ่น นอกจากนี้สาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้งยังมีปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 10.51 จึงมีศักยภาพที่นำมาเป็นส่วนผสมในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์น้ำควบคู่กับโปรตีนจากปลาป่นและถั่วเหลืองได้อีกด้วย

2. การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเล การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลสดและอบแห้งด้วยน้ำร้อน พบว่าสาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้งที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที และใช้อัตราส่วนสาหร่าย 1 กรัมต่อน้ำ 75 มิลลิลิตร ให้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 165.02 + 1.11 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายพวงองุ่นอบแห้งและสาหร่ายผมนางอบแห้งที่ให้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 24.74 + 0.67 และ 32.48 + 0.72 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง ในปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้สกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายแต่ละชนิด ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลอบแห้งจะได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าการสกัดจากสาหร่ายสดเพียงเล็กน้อย แต่สาหร่ายทะเลอบแห้งสามารถเก็บไว้ได้นานกว่าการเก็บสาหร่ายสดที่จะเก็บไว้ได้ไม่เกิน 15 วัน

ในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลโดยใช้น้ำร้อนเป็นตัวทำละลายนั้น อาจจะไม่ใช่วิธีการที่จะสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ให้ได้ปริมาณมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ตัวทำละลายประเภทอื่นๆ เช่น Oxalate, KOH 1 M และ 4 M และ sodium chlorite ซึ่งผลจากการสกัดด้วยสารละลายเหล่านี้จะทำให้ได้พอลิแซ็กคาไรด์กลุ่มย่อยๆ ได้แก่ Sulfated Glucuronorhamnoxylo-glycans, Hemicellulosic (ประกอบด้วย Glucuronans และ Glucoxylans) และ Sulfated Polysaccharides (ประกอบด้วย Glucose, Xylose, Mannose และ Protein) (Ray and Lahaye, 1955) แต่เนื่องจากวัตถุประสงค์หลักในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากการศึกษาครั้งนี้จะต้องนำสารสกัดที่ได้ไปใช้เพื่อเป็นพรีไบโอติก ซึ่งต้องคำนึงถึงตัวทำละลายที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ เช่น Bacillus หรือ Lactobacillus ด้วย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องเลือกใช้น้ำร้อนเป็นตัวทำละลายในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ในการศึกษานี้

3. การศึกษาขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายทะเลอบแห้ง ผลการศึกษาขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์จากค่า DP ในพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายสดและอบแห้ง พบว่ามีค่าแตกต่างกัน คือ พอลิแซ็กคาไรด์สาหร่ายผักกาดทะเลสดมีค่า DP ประมาณ 14 และพอลิแซ็กคา

ไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้งมีค่า DP ประมาณ 7 ในขณะที่สาหร่ายพวงองุ่นสดและสาหร่ายพวงองุ่นอบแห้งมีค่า DP เท่ากับ 10 และ 5 ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายผมนางสดและสาหร่ายผมนางอบแห้งมีค่า DP เท่ากับ 12 และ 6 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากในการอบแห้งของสาหร่ายทะเลนั้น จะต้องนำสาหร่ายทะเลสดมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งในช่วงเวลานี้อาจทำให้จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาจากการเก็บเกี่ยวนั้นสามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลได้ (สังคม เตชะวงค์เสถียร, 2547) และในขั้นตอนนี้จะสังเกตเห็นลักษณะของสาหร่ายทะเลเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม คือเส้นใยของสาหร่ายทะเลจะมีลักษณะยุ่ยและเละ ดังนั้น เมื่อพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายทะเลอบแห้งถูกย่อยไปบางส่วนแล้ว จึงทำให้ค่า DP ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลอบแห้งจึงมีขนาดต่ำกว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลสด แต่อย่างไรก็ตามขนาดพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายอบแห้งที่นำมาศึกษามีค่าค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายชนิดอื่น เช่น ลภัสรดา มุ่งหมาย (2549) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายลอนมีค่า DP มากกว่า 20 และ ณัฐญาณี เตียติวฐิยะกุล (2554) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ จากสาหร่ายทะเลสีแดง *Acanthophora spicifera* และ *Gracilaria changii* มีค่า DP ประมาณ 41 และ 39 ตามลำดับ เป็นต้น ซึ่งการที่มีค่า DP ต่ำ หรือขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์เล็กนี้ จะทำให้ง่ายต่อการนำไปย่อยเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ แต่อย่างไรก็ตามค่า DP ที่ได้จากการศึกษาในแต่ละครั้งนั้นจะเป็นค่าโดยประมาณ ฉะนั้น ในการศึกษาจึงต้องหาค่า DP เริ่มต้นของการทดลองแต่ละครั้งก่อนเสมอ เพื่อความแม่นยำในการนำผลมาเปรียบเทียบ

4. การศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้โดยวิธีโครมาโทรกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography: TLC) จากการศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายทะเลสดและอบแห้งด้วยวิธี TLC พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลสดและสาหร่ายอบแห้งมีชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบเหมือนกันได้แก่ กลูโคส อะราบิโนส กาแล็กโทส แมนโนส และแรมโนส ซึ่งเป็นน้ำตาลกลุ่มที่พบในสาหร่ายเตาจากการวิจัยของ Ikegaya et al. (2008) ที่ได้สกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายเตาโดยใช้ 24% KOH และวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์ ด้วยวิธี gas-liquid chromatography และ paper chromatography ผลที่ได้พบว่าน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายเตา ได้แก่ แรมโนส ฟูโคส อะราบิโนส ไซโลส แมนโนส กาแล็กโทส และกลูโคส และพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากการรายงานของ Ikegaya et al. (2008) พบว่าเป็นเฮมิเซลลูโลสกลุ่ม ไซโลกลูแคน (xyloglucan) โดย Yuguchi et al. (2004) กล่าวว่า ไซโลกลูแคนประกอบไปด้วยเซลลูโลส (cellulose) เป็นแกนกลางและมีกิ่งของน้ำตาลไซโลส ในบางกิ่งอาจประกอบด้วยน้ำตาลกาแล็กโทส หรือกาแล็กโทสเชื่อมกับฟูโคส (Hayashi, 1989) ดังนั้น งานวิจัย Ikegaya et al. (2008) จึงพบน้ำตาลไซโลสและฟูโคสเป็นองค์ประกอบด้วย

5. การผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลโดยใช้เอนไซม์เพกทิเนส การผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลนั้น ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เอนไซม์เพกทิเนสในการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เนื่องจากจากการศึกษาชนิดของน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์พบว่า ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส กาแล็กโทส แมนโนส และแรมโนส ซึ่งคล้ายกับน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในเพกทิน (Willats, 2006) จากการศึกษาการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลด้วยเอนไซม์เพกทิเนสพบว่าสามารถลดค่า DP ของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลลงได้ โดยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ทุกๆ ความเข้มข้นสามารถลดค่า DP ลงได้ใกล้เคียงกัน แม้ว่าจะเพิ่มระยะเวลาในการบ่มนานขึ้นก็สามารถลดค่า DP ลงได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาของ

เอนไซม์เพกทิเนสถูกยับยั้งด้วยปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระบบ เมื่อระบบอิ่มตัวด้วยผลิตภัณฑ์ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการปรับปรุงระบบการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยจะต้องมีการนำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระบบออก เพื่อไม่ให้ในระบบมีปริมาณผลิตภัณฑ์มากเกินจนมีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Lai and Bi, 2007)

6. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลอบแห้งทั้ง 3 ชนิด พบว่าในสาหร่ายแต่ละชนิดมีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกสำหรับเชื้อโพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ความเข้มข้นของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ต่างกัน โดยในสาหร่ายผักกาดสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกสำหรับเชื้อโพรไบโอติก *B. subtilis* อยู่ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์มีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกสำหรับเชื้อโพรไบโอติก *B. subtilis* ของสาหร่ายพวงองุ่นอยู่ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และในสาหร่ายผมนางความเข้มข้นของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์มีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกสำหรับเชื้อโพรไบโอติก *B. subtilis* อยู่ที่ 1.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทั้งนี้ การที่สาหร่ายทั้ง 3 ชนิดมีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกสำหรับเชื้อโพรไบโอติก *B. subtilis* ต่างกันอาจเนื่องมาจากปริมาณที่แตกต่างกันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในสาหร่ายแต่ละชนิด โดยสาหร่ายผักกาดทะเลเป็นสาหร่ายที่สามารถสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาได้ง่าย พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ประกอบด้วย β-(1,4)-xyloglucan, glucuronan และ cellulose ซึ่งเป็น water soluble dietary fiber สามารถทนต่อเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และการย่อยสลายของแบคทีเรียในลำไส้ได้ (colonic bacteria) พอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวไม่ได้เป็นพรีไบโอติกโดยตรง แต่มีศักยภาพเป็นพรีไบโอติกได้เมื่อถูกไฮโดรไลต์จนกลายเป็นโอลิแซ็กคาไรด์ (O'Sullivan et al., 2010) จากการศึกษาครั้งนี้สาหร่ายผักกาดทะเลถูกสกัดโดยการต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 90°C เป็นระยะเวลา 30 นาที ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์บางส่วนอาจถูกไฮโดรไลต์ด้วยความร้อนจนกลายเป็นโอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งมีศักยภาพเป็นพรีไบโอติก ในขณะเดียวกันก็ยังเหลือพอลิแซ็กคาไรด์อยู่บางส่วนทำให้การเติบโตของแบคทีเรียในชุดที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ยาวนานกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้เติม เนื่องจากโดยทั่วไปแบคทีเรียจะเติบโตในน้ำตาลพอลิแซ็กคาไรด์ทุกชนิดได้ยาวนานกว่าในน้ำตาลเชิงเดี่ยวหรือและน้ำตาลเชิงคู่ (Oligosaccharide) ยกเว้นน้ำตาลพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดไกลโคเจน (Glycogen) และ Oat Beta-glucan (Ka-Lung Lam, 2018)

สาหร่ายพวงองุ่นจัดเป็นสาหร่ายสีเขียวเช่นเดียวกับสาหร่ายผักกาดทะเล จึงทำให้ชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้คล้ายคลึงกัน ทำให้แนวโน้มการเติบโตของ *B. subtilis* มีความคล้ายคลึงกันด้วย แต่จากผลการทดลองพบว่าสาหร่ายพวงองุ่นสามารถใช้ที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำกว่าซึ่งอาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของสัดส่วนชนิดพอลิแซ็กคาไรด์ที่แตกต่างกัน

สาหร่ายผมนางเป็นสาหร่ายที่อยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีแดงหรือ Rhodophyta พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็น galactan ซึ่งเป็น linear polymer ที่สามารถแตกออกเป็น agarose และ agaropectin โดย agarose เป็นส่วนที่เป็นเจล (gelling fraction) เป็น neutral linear molecule ที่ไม่มีหมู่ sulfate นำไปใช้เป็น microbiological media และประยุกต์ใช้ในงาน Biotechnology รวมทั้งการทดสอบการเป็นพรีไบโอติกด้วย ในขณะที่ agaropectin เป็นส่วนที่ไม่เป็นเจล (non-gelling fraction) และยังมีหมู่ sulfate สัดส่วนของน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถผันแปรได้ตาม

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมและชนิดของสาหร่ายทะเล (Sullivan et al., 2010) จากผลการทดลองแนวโน้มการเติบโตของ *B. subtilis* คล้ายคลึงกับชุดการทดลองที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเลและสาหร่ายพวงองุ่น คือชุดการทดลองที่เติมสารสกัดจากสาหร่ายผมนางมีการเติบโตของแบคทีเรียที่ดีและนานกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติม ซึ่งอาจเป็นผลมาจากกระบวนการไฮโดรไลสิสทำให้พอลิแซ็กคาไรด์บางส่วนเปลี่ยนไปเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ส่งเสริมการเติบโตของแบคทีเรีย ในขณะเดียวกันพอลิแซ็กคาไรด์ส่วนที่เหลือก็ช่วยให้การเติบโตของแบคทีเรียมีระยะเวลายาวนานขึ้น

7. การศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นโพรไบโอติกของ *Bacillus subtilis* ที่ได้รับพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa* sp.) และสาหร่ายผมนาง (*Gracillaria* sp.) เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus* พบว่า ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* มีค่ามากกว่าปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหาร LB broth ที่เติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเลเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง และมากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Vaseeharan และ Ramasamy (2003) ที่พบความสามารถของเชื้อโพรไบโอติก *B. subtilis* BT23 ในการยับยั้งการเพิ่มขึ้นของเชื้อก่อโรค *V. harveyi* เมื่อเลี้ยงร่วมกัน โดยปริมาณเริ่มต้นของเชื้อ *B. subtilis* BT23 มีผลต่อการลดลงของเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ซึ่งปริมาณของเชื้อ *B. subtilis* ที่ควรใช้เริ่มต้นในการเลี้ยงร่วมกับเชื้อก่อโรคจะอยู่ในช่วง 10^7-10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้ แม้ว่าเชื้อ *B. subtilis* เริ่มต้นจะอยู่ที่ 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แต่ยังคงแสดงความสามารถในการยั้บยั้งเชื้อก่อโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกันกับการรายงานของ Interaminense et al. (2018) ที่พบความสามารถของเชื้อ *B. subtilis* ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus และ V. alginolyticus* (in vitro) ทั้งนี้ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของเชื้อ *B. subtilis* อาจเนื่องมาจากเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* มีความสามารถในการสร้างเพปไทด์หลากหลายชนิด เช่น แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) เป็นต้น เพื่อต้านแบคทีเรียชนิดอื่น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เชื้อชนิดอื่นลดลงได้ (Abriouel et al, 2010) นอกจากนี้ การลดลงของเชื้อก่อโรคอาจเกี่ยวข้องการสร้างสารเมตาบอไลท์ที่มีคุณสมบัติการต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียโพรไบโอติกอีกด้วย (Interaminense et al. 2018)

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่าย 3 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผมนาง พบว่าคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายผักกาดทะเลสดและอบแห้งมีโปรตีนร้อยละ 1.68 และ 10.51 ตามลำดับ ไขมันร้อยละ 0.08 และ 5.24 ตามลำดับ ความชื้นร้อยละ 80.72 และ 10.15 ตามลำดับ เถ้าร้อยละ 4.86 และ 50.24 ตามลำดับ และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 12.66 และ 23.86 ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายพวงองุ่นสดและอบแห้งมีโปรตีนร้อยละ 0.57 และ 4.63 ตามลำดับ ไขมันร้อยละ 0.10 และ 2.15 ตามลำดับ ความชื้นร้อยละ 89.92 และ 10.28 ตามลำดับ เถ้าร้อยละ 2.80 และ 64.32 ตามลำดับ และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 6.61 และ 18.62 ตามลำดับ และสาหร่ายผมนางสดและอบแห้งมีโปรตีนร้อยละ 1.64 และ 8.23 ตามลำดับ ไขมันร้อยละ 0.15 และ 3.64 ตามลำดับ ความชื้นร้อยละ 81.62 และ 10.12 ตามลำดับ เถ้าร้อยละ 4.62 และ 57.50 ตามลำดับ และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 11.97 และ 20.51 ตามลำดับ

เมื่อสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผมนาง ด้วยน้ำร้อน พบว่าสาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้งที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที และใช้อัตราส่วนสาหร่าย 1 กรัมต่อน้ำ 75 มิลลิลิตร ให้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 165.02 ± 1.11 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายพวงองุ่นอบแห้งและสาหร่ายผมนางอบแห้งที่ให้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 24.74 ± 0.67 และ 32.48 ± 0.72 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง ในปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้สกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายแต่ละชนิด ตามลำดับ และเมื่อคำนวณค่า degree of polymerization (DP) เพื่อประมาณขนาดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์สาหร่ายผักกาดทะเลสดมีค่า DP ประมาณ 14 และพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเลอบแห้งมีค่า DP ประมาณ 7 ในขณะที่สาหร่ายพวงองุ่นสดและสาหร่ายพวงองุ่นอบแห้งมีค่า DP เท่ากับ 10 และ 5 ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายผมนางสดและสาหร่ายผมนางอบแห้งมีค่า DP เท่ากับ 12 และ 6 ตามลำดับ

เมื่อทำการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิด ด้วยกรดซัลฟูริกเพื่อหาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ พบว่า น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผมนาง ประกอบด้วยกลูโคส อะราบิโนส กาแล็กโทส แมนโนส และแรมโนส เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ของสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิด มาผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์เพกทิเนส 5 ยูนิต ใช้เวลาในการบ่ม 40 นาที สามารถผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผักกาดทะเลได้สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของพอลิโกแซ็กคาไรด์เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า DP เท่ากับ 4.8 ส่วนสาหร่ายพวงองุ่นสามารถผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด เมื่อความเข้มข้นของพอลิโกแซ็กคาไรด์เท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า DP เท่ากับ 2.6 และสาหร่ายผมนางสามารถผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของพอลิโกแซ็กคาไรด์เท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า DP เท่ากับ 3.8

จากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายทะเลอบแห้งทั้ง 3 ชนิด พบว่าในสาหร่ายแต่ละชนิดมีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกสำหรับเชื้อโพรไบโอติก *Bacillus subtilis* ที่ความเข้มข้นของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ต่างกัน โดยในสาหร่ายผักกาดทะเลสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกสำหรับเชื้อโพรไบโอติก *B. subtilis* อยู่ที่ความเข้มข้น 3.0

มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์มีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกสำหรับเชื้อโพรไบโอติก *B. subtilis* ของสาหร่ายพวงองุ่นอยู่ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และในสาหร่ายผมนางความเข้มข้นของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์มีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกสำหรับเชื้อโพรไบโอติก *B. subtilis* อยู่ที่ 1.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของเชื้อโพรไบโอติก *B. subtilis* ขึ้นอยู่กับปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์และการแตกตัวออกมาเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่แตกต่างกัน และเมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายพวงองุ่น และสาหร่ายผมนาง ที่ความเข้มข้นซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกดีที่สุดในสาหร่ายแต่ละชนิดแล้วพบว่า พรีไบโอติกที่สกัดได้จากสาหร่ายผักกาดทะเลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดีกว่าพรีไบโอติกที่สกัดได้จากสาหร่ายผมนางและสาหร่ายพวงองุ่น ดังนั้นสาหร่ายผักกาดทะเลจึงนับว่าเป็นสาหร่ายที่มีศักยภาพที่จะนำมาสกัดพรีไบโอติกที่ดีที่สุดจากการวิจัยครั้งนี้และมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาต่อยอดเพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus* ที่จะเกิดขึ้นในสัตว์น้ำต่อไป

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

กาญจนา เตี้ยวซี, กฤตพล ยังวนิชเศรษฐ และผุสดี จันทร์เมือง. 2546. การเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อด้วยสาหร่ายผมนางในบ่อคอนกรีต. เอกสารวิชาการฉบับที่ 23/2546. ปัตตานี: สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดปัตตานี กรมประมง.

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527. สาหร่าย ALGAE. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 342 หน้า.

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2536. สาหร่ายวุ้นสกุล *Gracilaria* ในประเทศไทย. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31 สาขาสัตว์ ประมง สัตวแพทยศาสตร์ 3 – 6 กุมภาพันธ์ 2536. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 303 – 312.

กิจการ จันทร์ดำ. 2011. *Escherichia coli* STEC. [online]. Available: http://infectious.

thaihealth. net/ escherichia-coli-e-coli-stec [2012, April 6].

กิตติยา ภิญโญ. 2555. ศักยภาพของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายเตา [*Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing] ในการใช้เป็นพรีไบโอติก. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 74 หน้า

กฤตพล ยังวนิชเศรษฐ. 2545. การเลี้ยงสาหร่ายผมนางและการใช้สาหร่ายในการเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ. ค้นวันที่ 10 สิงหาคม 2559 จาก http://www.nicaonline.com/articles5/site /view article.asp?idarticle=87.

เกรียงไกร แก้วสุรลิขิต. 2537. การใช้สาหร่าย *Gracilaria fisheri* (Xia&Abbott) Abbott, Zhang & Xia ช่วยลดปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท และฟอสเฟต ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

คณิต ไชยาคำ และ ดุสิต ตันวิไล. 2535. การทดลองใช้หอยแมลงภู่และสาหร่ายผมนางเพื่อบำบัดน้ำทิ้งทางชีวภาพจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2535. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. 35 หน้า.

คณิต ไชยาคำ และคุสิต ตันวิไลย. 2535. การทดลองเลี้ยงสาหร่ายผมนาง *Gracilaria fisheri* บริเวณทะเลสาบสงขลาตอนนอก.เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 7. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์ฯชายฝั่ง, กรมประมง 13 หน้า.

ชนัดดา เกตุมา, ชัชรี แก้วสุรลิขิต, จริยาวดี สุริยพันธุ์, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด, สาธิต ประเสริฐศรี, เดชานาท ทองพิทักษ์ และประยูร หงส์รัตน์. 2551. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไก่ (*Ulva intestinalis* Linnaeus) ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ, *ใน* การประชุมวิชาการของมหาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 46/2551สาขาประมง, คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. เล่มที่ 3 : 200-209.

ชาญยุทธ สุดทองคง. 2551. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายพวงองุ่นเชิงพาณิชย์ในจังหวัดตรัง. รายงานฉบับสมบูรณ์. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชมงคลศรีวิชัย.

ชมรมเกษตรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2544. เกษตรออแกนิคและสิ่งแวดล้อม โดยเทคนิคน้ำสกัดชีวภาพ (Bioextract; BE) กองพัฒนาการบริหารงานเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ไชยวัฒน์ ไชยสุต. 2553. น้ำหมักชีวภาพ. ศูนย์หนังสือ สวทช. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 85 หน้า

ณัฐญาณี เตียติวฐิยะกุล. 2554. การสกัดโพลีแซคคาไรด์ และไขมันจากสาหร่ายทะเลสีแดงบางชนิด. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ธวัช ศรีวีระชัย, ชัชวาล วุฒิเมธี และจุฑารัตน์ ศิริสมบัติ. 2548. การเพาะเลี้ยงหอยหวาน *Babylonia areolata* Link, 1807 ในบ่อซีเมนต์ระบบปิดชีวภาพแบบก้าวหน้า. เอกสารวิชาการฉบับที่ 59/2548. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง, กรมประมง. 17 หน้า.

ธวัช ศรีวีระชัย และสุริยะ แพงดี. 2548. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเขากวาง *Gracilaria edulis* (Gmelin) Silva และสาหร่ายมงกุฎหนาม *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen ในบ่อบำบัดน้ำทิ้งโรงเพาะอนุบาลสัตว์น้ำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 18/2548.สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดตราด,กรมประมง. 16 หน้า.

ธีรพงษ์ จรัญญากรณ์. 2545. การใช้สาหร่ายช่อพริกไทย (*Caulerpa lentillifera*) เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2553. เคมีอาหาร. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร.

นิคม ละอองศิริวงศ์, ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร และทองเพชร สันบูกา. 2549. การทดลองใช้สาหร่ายหนาม (*Najas indica* (WILLD) CHANE) กำจัดสารประกอบไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 27/2549. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง. 24 หน้า.

นิรัญญา บุญติ้น. 2550. การคัดเลือกโปรไบโอติกจากสัตว์ทะเลและการใช้สารสกัดจากพืชหัวเป็นพรีไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

นิสราภรณ์ ภักดีพันธ์. 2544. การเจริญเติบโตและคุณค่าทางอาหารของสาหร่ายพวงองุ่น, *Caulerpa lentillifera* J. Agardh. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ. 110 หน้า.

นัยนา บุญทวียุวัฒน์. 2546. ชีวเคมีทางโภชนาการ. บริษัทซิกม่า ดีไซน์กราฟฟิก จำด, กรุงเทพมหานคร

นัยนา เพชรน้อย. 2529. อนุกรมวิธานของสาหร่ายทะเลที่เกาะสมุย จังหวัดสุราษฎร์ธานี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ.

บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2546. ชีวเคมีทางสัตวศาสตร์. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

บุญส่ง สิริกุล และวิวรรธน์ สิงห์ทวีศักดิ์. 2530. การทดลองเลี้ยงสาหร่ายวุ้นในเขตจังหวัดจันทบุรี. โครงการเพาะเลี้ยงและแปรรูปสาหร่ายทะเล. กองประมงน้ำกร่อย, กรมประมง,กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 25 หน้า.

ประมัยพร ทองคณารักษ์ และ ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร. 2551. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาหร่าย 4 ชนิดในการลดปริมาณไนโตรเจน และฟอสเฟตในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงปลากะรังดอกแดง (*Epinephelus coioides*Hamilton, 1822). เอกสารวิชาการฉบับที่ 40/2551.สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง. 32 หน้า.

พิมพ์ชนก บัวเพชร, สรวิศ เผ่าทองศุข และอัญชนา ประเทพ. 2550. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณอย่างมากของสาหร่ายสีเขียว *Ulva reticulata* Forsskal (Chlorophyta), บริเวณชายฝั่งของจังหวัดภูเก็ต ประเทศไทย. ใน: การประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 3 วันที่ 21-23 มีนาคม 2550 ณ อาคารมหามกุฎ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร. หน้า 45.

พัชราภรณ์ ภูไพบูลย์ ศิริวัลย์ สร้อยกล่อม และวาสนา บัวงาม. 2552. การวิเคราะห์การสะสมไนเตรทในผักสด. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาพืช วันที่ 17-20 มี.ค. 2552. หน้า 289-298.

ไพโรจน์ พรหมานนท์. 2541. การเพาะพันธุ์สาหร่ายวุ้นโดยใช้เปลือกหอยรองรับการเกาะของคาร์โปสปอร์. วารสารการประมง 51(4) : 307-318.

ไพโรจน์ พรหมานนท์ และ คณิต ไชยาคำ. 2541. การศึกษาการเลี้ยงสาหร่ายวุ้นโดยใช้อวนโพลีเป็นวัสดุดักล่อสปอร์ในทะเลสาบสงขลาตอนนอก. วารสารการประมง 51(2) : 125-134.

มยุรา ภูราศี และสมใจ เถาว์ชาลี. 2544. การศึกษาปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในน้ำหมักที่ได้จากพืชและสัตว์ที่มีระยะเวลาการหมัก 30 วัน. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏมหาสารคาม.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546. สาหร่ายวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 497 หน้า.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: โรงพิมพ์โชตนาพรินท์.

ยรรยง สุขคล้าย. 2547. การสกัดสาระสำคัญจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร โดยใช้ถังกวน, วิศวกรรมศาสตร์ มก. 18, 52 (เม.ย.-ก.ค. 2547): 10-18

ระพีพร เรืองช่วย, โชคชัย เหลืองธุวประณีต, นิรัติศัย เพชรสุภา, อมมี คุณอารี และพายัพ มาศนิยม. 2549. รายงานการวิจัยเรื่อง โครงการการเลี้ยงสาหร่ายผมนางเพื่อเป็นอาชีพสำหรับชาวประมงพื้นบ้านในอ่าวปัตตานี จังหวัดปัตตานี. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

ลภัสรดา มุ่งหมาย. 2549. การเพาะเลี้ยงและการหาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ของสาหร่ายกินได้บางชนิดจากแม่น้ำน่าน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่

ลือชัย ดรุณชู. 2534. การทดลองเลี้ยงสาหร่ายทะเล (*Polycavernosa fastigiata*) ในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งทะเล. เอกสารวิชาการ เลขที่ 4. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจังหวดจันทบุรี กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. 25 หน้า.

ลือชัย ดรุณชู. 2534. การศึกษานิเวศน์วิทยาบางประการของแหล่งเกิดสาหร่ายทะเลตามธรรมชาติจังหวัดตราด. เอกสารวิชาการ เลขที่ 3. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจังหวดจันทบุรี กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. 24 หน้า.

ลือชัย ดรุณชู. 2546. การทดลองเลี้ยงสาหร่ายทะเลในบ่อดิน. เอกสารวิชาการที่ 2. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี กรมประมง. 15 หน้า.

วราภรณ์ แก้วไทย, วัลลภ ทิมดี, อาภรณ์ เทพพานิช และ อุทัย รัตนอุบล. 2547. การทดลองเลี้ยงสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*), สาหร่ายพริกไทย (*Caulerpa lentillifera*) และสาหร่ายมงกุฎหนาม (*Acanthophora spicifera*) ในบ่อดิน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 23. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี กรมปะมง. 8 หน้า.

วิวรรธน์ สิงห์ทวีศักดิ์, บุญส่ง สิริกุล และ อรุณี มีกิริยา. 2538. การเลี้ยงสาหร่ายผมนาง *Gracilaria fisheri* (Xia & Abbott) Abbott, Zhang & Xiaแบบผลผลิตสูงในบ่อดิน. เอกสารวิชาการเลขที่58 /2538. ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี, กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 25 หน้า.

วิวรรธน์ สิงห์ทวีศักดิ์ และ ทรงสิทธิ์ ลิ้มสกุล. 2543. การเลี้ยงสาหร่ายผมนาง *Gracilaria fisheri* (Xia & Abbott) Abbott, Zhang & Xia ร่วมกับปลากะพงขาว, *Lates calcarifer Bloch* ในบ่อดิน, เอกสารวิชาการเลขที่14/2543. ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี, กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง , กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 27 หน้า.

วิทยา ศรีมโนภาษ. 2521. สาหร่ายทะเลที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของไทย. เอกสารเผยแพร่ ฉบับที่ 3, สถานีวิจัยประมงทะเล, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 14 หน้า.

วันดี วราวิทย์. 2551. โพรไบโอติกและพรีไบโอติก (Probiotics and Prebiotics). คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร.

วัลลภ สุวรรณอาภา. 2548. การใช้จุลินทรีย์ในท้องถิ่น (IMO) กับการยอมรับของเกษตรกร อำเภอขุนยวม จังหวัดแม่ฮ่องสอน. รายงานฉบับสมบูรณ์. สำนักงานสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ศิริบุญ พูลสวัสดิ์. 2550. โอลิโกฟรุกโตส: พรีไบโอติกส์ที่น่าสนใจ. โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ, กรุงเทพมหานคร.

ศิริวรรณ คิดประเสริฐ. 2538. การใช้สาหร่ายทะเลช่วยลดปริมาณสารประกอบไนโตรเจนในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 90 หน้า.

ศุลีมาศ สุทธิเนียม, สมหมาย เชี่ยววารีสัจจะ, จารุณี เชี่ยววารีสัจจะ และคมน์ ศิลปาจารย์. 2552. ประสิทธิภาพการบำบัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสของสาหร่ายขนนกในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมแบบพัฒนา.วารสารการประมง.ปีที่ 62 ฉบับที่ 3 เดือนพฤษภาคม-มิถุนายน 2552.หน้า 215-220.

สกนธ์ แสงประดับ, ทวี โรจนสารัมภกิจ และมะลิ บุณยรัตผลิน. 2546. ผลของสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria ftisheri*) ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพอาหารและอัตราการรอดตายของหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis asinina*). ใน การประชุมสัมมนาวิชาการประมงประจำปี พ.ศ. 2546 วันที่ 7 – 9 กรกฎาคม 2546. กรุงเทพมหานคร: กรมประมง. หน้า 134.

สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2545. การศึกษาแนวทางการนำกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียกลับมาใช้ประโยชน์ในพื้นทีเทศบาลเมืองแสนสุข. รายงานการวิจัย.

สิริ ทุกข์วินาศ, สุชาติ เตชนราวงศ์ และ ศราวุธ เจะโส๊ะ. 2529. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายผมนาง แบบพื้นบ้านที่อ่าวปัตตานี. วารสารการประมง 39(2) : 145-150.

สิทธิศักดิ์ อุปริวงศ์ สรศักดิ์ ประชันกาญจนา เทพฤทธิ์ ตุลาพิทักษ์ และชัยทัศน์ ไพรินทร์. 2546. การปรับปรุงผลิตภัณฑ์ปุ๋ยน้ำชีวภาพของชุมชนเกษตรเทพารักษ์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สุพิศ ทองรอด, ชูชาติ ชัยรัตน์, มนทกานติ ท้ามติ้น และอนันต์ ตันสุตะพานิช. 2545. ผลของสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) และสาหร่ายหนาม (*Acanthophora spicifera*) ต่อการเจริญเติบโตของหอยเป๋าฮื้อ. วารสารการประมง 55(5) : 423-429.

สุพจน์ นวลละออง. 2551. การสกัดสารพรีไบโอติกจากพืชเกษตร. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 146 หน้า

สุรภีร์ วีรวานิช. 2543. การวิเคราะห์คุณค่าอาหารของสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) บริเวณทะเลสาบสงขลาตอนนอก. กรุงเทพมหานคร: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏสงขลา.

สุวรรณา วรสิงห์, ธวัช ศรีวีระชัย และ จุฑารัตน์ ศิริสมบัติ. 2550. ผลของระดับความเค็มน้ำทะเลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายหนาม *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen ,1910 สาหร่ายพวงองุ่น *Caulerpa lentillifera* J. Agardh, 1837 และ สาหร่ายไส้ไก่ *Enteromorpha clathrata* (Roth) Greville 1830. . เอกสารวิชาการฉบับที่ 25/2550.ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งตราด กรมประมง. 28 หน้า.

สุวรรณา วรสิงห์. 2551. ผลของความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida* C. Agardh, 1823). เอกสารวิชาการฉบับที่ 35/2551. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งตราด กรมประมง. 19 หน้า.

สุวรรณา วรสิงห์, ธวัช ศรีวีระชัย, อรุณ ศรีอนันต์ และภาคภูมิ วงศ์แข็ง. 2552. สัณฐานวิทยาการเลี้ยงและการนำมาใช้ประโยชน์ของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida* C. Agardh, 1823). เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2552.ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งตราด กรมประมง. 28 หน้า.

สุวรรณา วรสิงห์, ธวัช ศรีวีระชัย และ อรุณ ศรีอนันต์. 2553. ผลของขนาดใบต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida* C. Agardh, 1823). เอกสารวิชาการฉบับที่ 13/2553.ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งตราด กรมประมง. 22 หน้า.

สุญาณี พงษ์ธนานิกร. 2549. พรีไบโอติกและโพรไบโอติก: อาหารสุขภาพ. ภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร.

สมเกียรติ สุวรรณศีรี จตุรงค์ พวงมณี จำลอง โพธาเจริญ และสิทธิชัย ลอดแก้ว. 2545. การวิจัยและพัฒนาน้ำสกัดชีวภาพเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สังคม เตชะวงค์เสถียร. 2547. สรีรวิทยาของพืชสวน. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น

สันติ ปริยะวาที, พุทธ ส่องแสงจินดา, สถาพร ดิเรกบุษราคม, ปิติวงษ์ ตันติโขดก และ สมหมาย เชี่ยววารี สัจจะ. 2546. สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera* : J. Agardh). วารสารการประมง 56(5) : 443-448.

อนุสรา แก่นทอง. 2555. ประโยชน์ชองสาหร่ายผักกาดทะเล (Sea Lettuce). วันที่สืบค้น 1 กันยายน 2559, เข้าถึงได้จาก http://www.nicaonline.com/index.php?option=com_content&view=article&id=522:-sea-lettuce&catid =39:2012-02-20-02-59-03&Itemid=121

อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2555. อุจจาระร่วง ที่เรียกว่า Salmonellosis (Non-Typhoidal Salmonellosis: NTS). [online]. Available: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c [2015, July 7].

อรุณี มานะกล้า. 2539. การเลี้ยงสาหร่ายเขากวาง, *Gracilaria changii* (Xia & Abbott) Abbott} Zhang & Xia, ในกระชังในบ่อดิน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 19/2539. ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. 15 หน้า.

อลิสา โชควิวัฒนวนิช. 2543. ประสิทธิภาพของสาหร่ายช่อพริกไทย (*Caulerpa lentillifera*) และสาหร่ายหนาม (*Acanthophora spicifera*) ในการบำบัดสารประกอบไนโตรเจนในน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อนงค์ จีรภัทร์. 2547. เอกสารประกอบคำสอนรายวิชา 252421 สาหร่ายวิทยา. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาชีววิทยาการประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อักษร ศรีเปล่ง. 2529. สาหร่าย. กรุงเทพมหานคร: ฝ่ายสื่อการศึกษา สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัจฉรา ดลวิทยาคุณ. 2550.พื้นฐานโภชนาการ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร.

อนันต์ สาระยา, บรรเจิด ศีละมรรค, ยอดชาย กรรณสูต และมณฑา ลอยชูศักดิ์. 2526. สาหร่ายที่พบบริเวณเกาะภูเก็ต. รายงานวิชาการฉบับที่ 24. กองประมงน้ำกร่อย, กรมประมง, กรุงเทพ ฯ. 24 หน้า.

อำไพ ล่องลอย.2548.การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนนก (*Caulerpa racemosavar.* Corynephora) เพื่อการบริโภค.บทคัดย่อสัมมนาวิชาการด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจำปี 2548. วันที่ 26-29 พฤษภาคม 2548. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง. หน้า 34.

ภาษาอังกฤษ

Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., and Gálvez, A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. FEMS microbiology reviews, 35(1), 201-232

Anderson, R. A. 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, USA. 578 pp.

AOAC. 2000. Official Method of Analysis. The Association of Official Analytical Chemist. 17thed. Gaithersburg, Maryland.

AOAC. 2005. Official Method of Analysis. The Association of Official Analytical Chemist 18thed. Gaithersburg, Maryland

Arkive. 2007. Images of life on earth. Wildscreen, Italy. http://www.arkive.org/species /ARK/plants_and_algae/*Ulva_lactua*/more_info.html.

Blomster, J. 2004. Green Algal Phylogenetics – GAP. http://www.helsinki.fi/ bioscience /gap/ research/SystUlva.htm University of Helsinki, Finland.

Boylston,T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B. and Reinheimer, J. A. 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. International Dairy Journal 14: 375–387.D'Aoust, J.Y. 1 9 9 1 . Psychrotrophy and foodborne Salmonella. International Journal of Food Microbiology, 12:207 – 16.

Dawes, C.J., Orduna-Rojas, J., and Robledo, D. 1999. Response of the tropical red seaweed *Gracilaria cornea* to temperature, salinity, irradiance. Journal of Appllied Phycology 10: 410-425.

Dawson, E. Y. 1966. Marine Botany : An Introduction. Holt, Rinehart and Winston, New York. 371 p.

Dhargalkar, V. K. 2004. Seaweeds – a field manual. National Institute of Oceanography, India. 36 pp.

Druehl, L. 2002. Pacific Seaweeds. http://www.racerocks.com/racerock/eco/taxalab/bio2002/ ulval.htm.

Ekvall, J., Stegmark, R., Nyman, M. 2007. Optimization of extraction methods for determination of the raffinose family oligosaccharides in leguminous vine peas (*Pisum sativum* L.) and effects of blanching. Journal of Food Composition and Analysis, 20: 13-18

Fang, Y. and Wang, Q. 2004. Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. Journal of Chromatography B, 812: 309–324.

FAO. 2003. Food and Nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Fishbein and Wentz 1973 *Vibrio parahaemolyticus* Methodology for Isolation from Seafoods and Epidemic Specimens.

Food network solution. 2010. *Escherichia coli*. [online]. Available: http://www.

foodnetwork solution.com/vocab/wordcap/Escherichia%20coli [2015, April 15]

Herodez, S., Hadolin, M., Skerget, M. and Knez, Z. 2003. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis*) leaves. Food Chemistry, 80: 275-282

Higa, T. and J.F. Parr. 1994. Beneficial and Effective Microorganisms for Sustainable Agriculture and Environment. http://www.agriton.nl/higa.html

Horstman, U. 1983. Cultivation of the green alga, *Caulerpa recemosa*, in tropical waters and some aspects of its physiological ecology. Aquaculture 32: 361-371.

Gibson, G. R. 2004. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept).Clinical Nutrition Supplement, 1: 25-31.

Hayashi, T. 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol, 40: 139-168.

Intarata, M. 2007. Feasibility of Utilizing Polysaccharides from *Moo-Noi* (*Cissampelpareira*) Leaves as Prebiotics. M.S. Thesis, Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai.

Ikegaya, H., Hayashi, T., Kaku, T., Iwata, K., Sonobe, S. and Shimmen, T. 2008. Presence of xyloglucan-like polysaccharide in Spirogyra and possible involvement in cell–cell attachment. Phycological Research, 56: 216–222

Interaminense, J. A., Vogeley, J. L., Gouveia, C. K., Portela, R. W., Oliveira, J. P., Andrade, H. A., .and Bezerra, R. S. 2018. In vitro and in vivo potential probiotic activity of *Bacillus subtilis* and Shewanella algae for use in *Litopenaeus vannamei* rearing. Aquaculture, 488, 114-122.

Kakodkar, A. P., D. P. Kavlekar and C. T. Achuthankutty. 2005. Conservation of genetic diversity of edible seaweed *Ulva lactuca* through automated spatial distribution modeling. Bioinformatics Centre, National Institute of Oceanography, India. (abstract).

Ka-Lung Lam, H.-Y. K., Kim-Chun Ko, Hoi-Shan Kwan, Peter Chi-Keung Cheung. 2018. In vitro fermentation of beta-glucans and other selected carbohydrates by infant fecal inoculum: An evaluation of their potential as prebiotics in infant formula. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber, 14, 20 - 24.

Kaliaperumal, N., S. Kalimuthu. and J. R. Ramalingam. 1995. Economically Important Seaweeds. Special Publication No. 62. Central Marine Fisheries Research Institute, Indian Council of Agricultural Research, India. pp. 28 - 29.

Kim, S., Kim, W., and In K. Hwang. 2003. Optimization of the extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal/ International Journal of Food Science and Technology, 38: 337-342

Kirby, A. 2001. Marine botany. http://www.mbari.org/staff/conn/botany/greens/anna/default.htm.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte1, Ch. and Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 41: 103–125.

Lee, R. E. 1995. Phycology. Cambridge University Press, USA. 645 pp.

Lewmanomont, K. and H. Ogawa. 1995. Common Seaweeds and Seagrasses of Thailand. Faculty of Fisheries, Kasetsart University. pp. 29 - 40.

Lai, Zh. and Bi, Sh. 2 0 0 7 . The silica-coated chitosan particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization. Enzyme and Microbial Technology 4 0 : 1442–1447.

Llana, G. E. 1991. Production and utilization of seaweeds in the Philippines. Infofish International Number 1/19, Jan/Feb, MC(P) No. 96/5/85. pp. 12 – 16.

Mabeau, S. and Fleurence, J. 1993. Seaweed in Food Products: Biochemical and Nutritional Aspects. Trend in Food Science & Technology. 4 (April): 103 – 107.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31(3): 426-428.

Msuya, F. E. and A. Neori. 2002. *Ulva reticulata* and *Gracilaria crassa*: Macroalgae that can biofilter effluent from tidal fishponds in Tanzania. Western Indian Ocean J. Mar. Sci. 1(2) : 117-126.

Norziah, M.H., and Chiang, C.Y. 2000. Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. Food Chemistry. 68:69-76.

O'Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P. G., Hughes, H., & Gardiner, G. E. 2010. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. Mar Drugs, 8 (7): 2038-2064.

Paradossi, G., Cavalieri, F., Pizzoferrato, L. and Liquori, A.M. 1999. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. Biological Macromolecules, 25: 309-315.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, 84 : 197–215.

Siddenwar} S. 2008. Screening and estimation of prebiotic oligosaccharides in fruits and vegetables. Biotechnology and Pharmacy. 2(1): 183-191

Schwoerbel, J. 1 9 8 4 . Handbook of Limnology, Ellis Horwood Limited, Publishers, University of Freiburg and Konstanz, Chichester.

Trono, G. C., Jr. and H. L. Denila. 1987. Study on pond culture of *Caulerpa*. Philippine Journal of Science 17 : 83 - 98.

Vanderzant, C., & Nickelson, R. 1972. Procedure for isolation and enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*. Applied microbiology, 23 (1): 26-33

Vaseeharan, B. A. R. P., & Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Letters in applied microbiology, 36(2) : 83-87

Verstrete, W.1991. Biotechnological Process in Environmental Technology. University

Willats, G.T.W., Knox, P.J. and Mikkelsen, J. D. 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. Trends in Food Science & Technology, 17: 97–104

Yang, L. and Zhang, L. 2008. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. Carbohydrate Polymers, 76: 349–361.

Yuguchi, Y., Kumagai, T., Wu, M., Hirotsu, T. and Hosokawa, J. 2004. Gelation of xyloglucan in water/alcohol systems. Cellulose, 11: 203–208

Zamora, A. 2012. Carbohydrate–Chemical structure. [online]. Available: http://www .scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates1.html [2015, March 3].

ภาคผนวก

Optimization of extraction process of polysaccharides from macro algae *Ulva rigida* using response surface methodology

Papassara Sangtanoo[1], Anek Sopon[2], Aphichart Karnchanatat[1,*]

[1]*Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand*

[2]*Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand*

*****Corresponding author. E-mail: Aphichart.K@chula.ac.th*

ABSTRACT

Polysaccharides from macro algae *Ulva rigida* were extracted using hot water extraction method at various extraction conditions. Response surface methodology (RSM) was combined for experimental design and analysis, aiming to evaluate the effects of the extraction parameters on the extraction yield of *U. rigida* and to obtain the optimal extraction conditions. The extraction temperature, extraction time, and powder to water ratio were found to have a significant influence on the extraction yield of *U. rigida*. The most relevant variable was extraction time. A powder to water ratio at 77 mg/ml, a temperature of 90ºC and an extraction time of 59 min were found to be optimal for polysaccharides. The experimental yield 165.02 mg/100 g dry wt. under optimized conditions was closely agreed with the predicted yield 166.03 mg/100 g dry wt. of the model, and exhibited high levels of free radical scavenging activities towards DPPH with 39.74%. The results suggest that *U. rigida* polysaccharides could be potential source of natural antioxidant and be contributor to the health benefits of *U. rigida*.

Keywords: polysaccharide, response surface methodology, antioxidant, *Ulva rigida*

INTRODUCTION

Algae are organisms that resulted from photosynthesis process. There are two major categories of algae namely macroalgae and microalgae. They grow in an aquatic

environment, and contain secondary metabolites which are synthesized at the end of the growth phase and/or due to metabolic alterations induced by environmental stress conditions (Shalaby, 2011). Some of these compounds such as sulfated polysaccharides, novel amino acids and mineral compounds, growth hormones and colloidal elements are used in a variety of applications in agri- and horticulture (Anisimov et al., 2013; Alves et al.,2013), pharmaceutical industry (Khanavi et al., 2012), and recently for production of biofuel (Eshaq et al., 2010).

Macroalgae are a type of multicellular plants that grow in saltwater medium. It can grow rapidly until it reaches 60 meters in length (Demirbas and Demirbas, 2010). Macroalgae are classified into three groups based on their pigments. They are brown algae (Phaeophyceae), red algae (Rhodophyceae), and green algae (Chlorophyceae). *Ulva rigida* belongs to the macroalgae family and it is widespread locally areas. Indeed, *U. rigida* is common and abundant at mid and low shore levels, and their abundance and easy access can guarantee their quantity for further biotechnological exploitation in the future.

Polysaccharides are polymeric biomacromolecules commonly composed of more than 10 monosaccharide units existing in plants, bacteria, algae and animals. For example, the polysaccharides from *Enteromorpha* and *Porphyridium* have demonstrated strong antitumor and immuno modulating properties, those from *Caulerpa cupressoides* and *Dyctiota menstrualis* are good antinociceptive agents, and the polysaccharides from *Cladosiphon okaramanus* showed angiogenic, gastro- and cardioprotective bioactivities (de Jesus Raposo et al., 2015).

Several reports about the monosaccharide composition of polysaccharides from *U. rigida* have been published (Leiro et al., 2007). However, there is no much studying on the extraction optimization and bioactivities of polysaccharides from *U. rigida*. This situation significantly restricts the further development of *U. rigida* in other fields, including the energy, medical and food industries.

The objective of this study was to develop an economical and efficient extraction of antioxidant polysaccharides from *U. rigida*, and to investigate the effect of extraction parameters on polysaccharide yield. RSM was employed to optimize extraction conditions (liquid-solid ratio, temperature and time) in order to obtain the maximal polysaccharide yield. Meanwhile, antioxidant activity of *U. rigida* polysaccharides was studied.

MATERIALS AND METHODS

Materials

U. rigida was collected from Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Koh Srichang, Chonburi province, Thailand. Algae were washed with seawater and brushed extensively to remove macroscopic epiphytes and

sand particles. The resulting clean algae were washed with tap water to remove adhering salt. Samples were air-dried at 25°C up to four days followed by thermostat dry at 60°C for 12 hours. Dried algae were hand crushed and powdered with grinder. The powder (moisture content 12-15% on dry basis) stored in dark bags to prevent from moisture and light. All the other chemicals and reagents used in the experiment were of analytical grade.

Experimental design

The Central Composite Design (CCD) with three factors and three levels was employed to optimize the extraction conditions in order to obtain the highest polysaccharide yield. Temperature (X_1), time (X_2), and Liquid-solid ratio (X_3) were chosen as independent variables in this design. An aliquot of the dried algae was extracted with distilled water. The water extract solution was collected after autoclave treatment and centrifugation (5,000×*g* for 15 min). Based on the single-factor experiments (Table 1), were determined as critical levels with significant effect on polysaccharide extraction. The complete design consisted of seventeen combinations including five replicates of the center point (Table 2).

Table 1. Level and range of variables chosen for experiment.

Factor	Level					
	code	-2	-1	0	+1	+2
Temperature (°C)	X_1	60	70	80	90	100
Time (min)	X_2	15	30	45	60	75
Liquid-solid ratio (g/mL)	X_3	1:25	1:75	1:125	1:175	1:225

Determination of polysaccharide content

The determination of polysaccharide content was done by phenol-sulfuric acid method (Yan et al., 2014). Briefly, 1 ml of crude polysaccharide solution was mixed with 3 ml concentrated sulphuric acid to initiated the reaction, following 0.6 ml of 5% phenol was added and the mixture was kept at 100°C for 15 min, after cooling to the room temperature, the absorbance of the reaction mixture was measured at 490 nm using spectrophotometer. Polysaccharide content was calculated with D-glucose as standard.

DPPH radical-scavenging activity

DPPH radical-scavenging activity was determined according to the method described by Hamid et al. (2012) with slight modifications. Serial dilutions of the spotted babylon hydrolysate were prepared immediately prior to conducting the assay. DPPH solution (0.004%) was then added to each dilution of the polysaccharides, and the resulting mixture was incubated in the dark at room temperature for 30 min. The absorbance of each mixture was then measured at 517 nm using a microplate reader. Ascorbic acid was used as a positive control.

Table 2. CCD experimental design, results, and radical-scavenging activity of polysaccharides from *U. rigida*.

Run No.	Temperature (◦C)	Time (min)	Ratio (mg/ml)	Polysaccharide Actual (mg/100 g dry wt.)	Polysaccharide Predicted (mg/100 g dry wt.)	Radical-scavenging activity (%)
1	70	60	175	80.00	79.50	26.36±2.91
2	80	45	225	70.29	70.69	14.08±3.64
3	90	30	175	75.16	74.86	23.41±1.20
4	80	15	125	82.01	81.49	14.48±0.97
5	90	30	75	125.01	126.95	17.67±1.11
6	80	45	125	120.00	120.00	18.85±0.74
7	80	45	125	120.79	120.00	3.65±1.70
8	70	60	75	73.82	75.55	17.49±3.23
9	80	45	125	120.62	120.00	16.05±3.36
10	100	45	125	140.46	139.35	18.51±4.96
11	80	45	25	120.66	118.83	21.83±2.17
12	60	45	125	60.03	59.72	29.62±1.94
13	90	60	175	122.99	124.01	21.56±2.86
14	70	30	75	91.41	91.83	13.43±3.35
15	80	75	125	115.27	114.36	28.06±1.69
16	70	30	175	85.29	85.71	23.04±2.30
17	90	60	75	165.02	166.03	39.74±2.65

Percentage inhibition

The percentage inhibition of the percentage of radical-scavenging activity was calculated as follows:

$$\left[\frac{\left(\text{Abs}\,control - \text{Abs}\,blank\right) - \left(\text{Abs sample} - \text{Abs}\,background\right)}{\left(\text{Abs}\,control - \text{Abs}\,blank\right)}\right] \times 100,$$

where *Abs* control is the absorbance of the control (no sample), *Abs* sample is the absorbance of the polysaccharides, *Abs* background is the color absorbance of the sample and *Abs* blank is the absorbance of the deionized water.

Statistical analysis

"Design Expert" software statistical package was also used for the regression analysis of variance (ANOVA). All of the experiments were conducted in triplicate, and the average value was recorded as the response. The quality of fit of the polynomial model equation was expressed by the coefficient of determination R^2 and the adjusted R^2 (R^2_{adj}), and its statistical significance was assessed with an F-test.

RESULTS AND DISCUSSION

CCD experiment

The extraction conditions including temperature, time and liquid-solid ratio, as independent variables were optimized for the maximum polysaccharide yield. The CCD design and the corresponding response values are shown in Table 1. A second-order polynomial model describing the correlation between polysaccharide yield and the three variables in this study was obtained in Equation 1 below:

$$Y = 119.99 + 19.91X_1 + 8.22\,X_2 - 12.03\,X_3 + 13.84X_1X_2 - 11.49\,X_1X_3 + 2.51X_2X_3 - 5.12\,X_1^2 - 5.52\,X_2^2 - 6.31\,X_3^2 \quad (1)$$

The statistical significance of Equation 1 was checked by F-test, and the results of analysis of variance (ANOVA) are shown in Table 3. The model P-value of 0.0145 obtained by ANOVA indicated that the model was significant ($p<0.05$). Meanwhile, the lack of fit P-value of 0.0517 indicated that the lack of fit was not significant ($p>0.05$). For the model fitted, the coefficient of determination (R^2) was 0.9988 implying that the sample variation of 99.88% for the polysaccharide yield was attributed to the independent variables. These results suggested that the developed model could adequately represent the real relationship among the parameters chosen.

Effects of temperature, time and liquid-solid ratio on polysaccharides extraction

As is shown in Table 3, temperature had significant linear effect ($p<0.05$) on polysaccharides extraction; liquid-solid ratio and time had significant quadratic effect ($p<0.05$) on polysaccharides extraction. However, none of the independent variables (temperature, time and liquid-solid ratio) interacted significantly ($p>0.05$). Figure 1(a) shows the effect of temperature and time on polysaccharide extraction from *U. rigida* at a constant liquid-solid ratio of 75 mg/ml. When time was set, the polysaccharide yield increased rapidly when temperature was raised, which also implied that polysaccharide yield was significantly influenced by temperature. The polysaccharide yield increased when extraction time was extended from 45 to 60 min h but slowly decreased when time continued to be extended. This phenomenon could be explained in terms of polysaccharides degradation. Biomacromolecule, such as polysaccharides, polyphenols

and colorants, might degrade due to long time treatment under high temperature condition (Zou et al., 2010).

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) of the response surface regression model.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	P-value
Model	13437.45	9	1493.05	635.2	< 0.0001[a]
A-A	6340.94	1	6340.94	2697.68	< 0.0001[a]
B-B	1080.44	1	1080.44	459.66	< 0.0001[a]
C-C	2317.46	1	2317.46	985.94	< 0.0001[a]
AB	1532.36	1	1532.36	651.93	< 0.0001[a]
AC	1056.62	1	1056.62	449.53	< 0.0001[a]
BC	50.6	1	50.6	21.53	0.0024[a]
A^2	506.9	1	506.9	215.66	< 0.0001[a]
B^2	589.54	1	589.54	250.81	< 0.0001[a]
C^2	770.76	1	770.76	327.91	< 0.0001[a]
Residual	16.45	7	2.35		
Lack of Fit	16.11	5	3.22	18.63	0.0517
Pure Error	0.35	2	0.17		
Cor Total	13453.9	16			
R-Squared	0.9988				
Adj R-Squared	0.9972				
Pred R-Squared	0.9905				

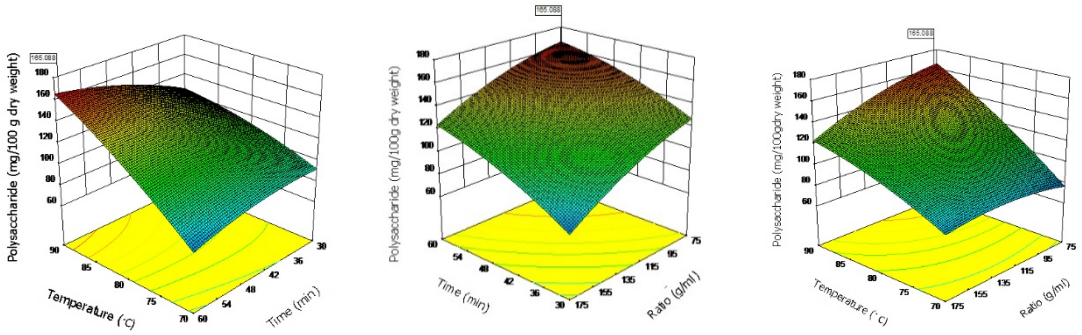
Effects of temperature, time and liquid-solid ratio on polysaccharides extraction

As is shown in Table 3, temperature had significant linear effect ($p<0.05$) on polysaccharides extraction; liquid-solid ratio and time had significant quadratic effect ($p<0.05$) on polysaccharides extraction. However, none of the independent variables (temperature, time and liquid-solid ratio) interacted significantly ($p>0.05$). Figure 1(a) shows the effect of temperature and time on polysaccharide extraction from *U. rigida* at a constant liquid-solid ratio of 75 mg/ml. When time was set, the polysaccharide yield increased rapidly when temperature was raised, which also implied that polysaccharide yield was significantly influenced by temperature. The polysaccharide yield increased when extraction time was extended from 45 to 60 min h but slowly decreased when time continued to be extended. This phenomenon could be explained in terms of

polysaccharides degradation. Biomacromolecule, such as polysaccharides, polyphenols and colorants, might degrade due to long time treatment under high temperature condition (Zou et al., 2010).

Figure 1(b) shows the effect of liquid-solid ratio and time on polysaccharide extraction from *U. rigida* at a constant temperature of 80°C. The increase of both liquid-solid ratio and time accelerated extraction of polysaccharides. However, above the optimal liquid-solid ratio (about 75 mg/mL) and time (about 60 min), the increase in liquid-solid ratio and time would not further increase the polysaccharide yields. These findings make the whole process of polysaccharides extraction economically more feasible and efficient in the potential application in food industry.

Figure 1(c) shows the effect of liquid-solid ratio and temperature on polysaccharides extraction from *U. rigida* at a constant time of 75 min. At a fixed liquid-solid ratio, the polysaccharide yield increased rapidly when temperature reached a certain value, and then leveled off. At a fixed temperature, the polysaccharide yield first increased and then decreased when the liquid-solid ratio was raised, but the variety of polysaccharide yield was slight when the temperature exceeded 90ºC. This indicated that extraction temperature was the principal effect on the polysaccharide yield. At a higher temperature, the solubility of polysaccharides in *U. rigida* could be enhanced and the viscosity of the solvent decreased. Therefore, the whole extraction of polysaccharides was accelerated. However, increasing extraction temperature might result in more solvent volatilization, more energy cost and more impurities extraction (Lianfu and Zelong, 2008). Therefore, the optimum extraction temperature should be about 90 ºC in the present study.



(a) (b) (c)

Figure 1. Response surface plot showing the effect of (a) temperature and time, (b) temperature and liquid-solid ratio, and (c) liquid-solid ratio and temperature on polysaccharides extraction from *U. rigida*.

Radical scavenging activity of *U. rigida* polysaccharides

In the current study, the scavenging abilities of *U. rigida* polysaccharides are shown in Table 2. The free radical scavenging activity against DPPH was measured. The radical scavenging activities of *U. rigida* polysaccharides were found to be the highest at with 39.74% under optimal condition. DPPH radical scavenging method was used to

evaluate the antioxidant capacity of the algae extracts, because the use of DPPH radical provided an easy, rapid and convenient method to evaluate the antioxidants and radical scavengers (Nickavar et al. 2007).

CONCLUSION

The extraction conditions of *U. rigida* polysaccharides were optimized by a three variable, three levels CCD experiment design. Correlation analysis of the quadratic polynomial regression model indicated that the model could be employed to optimize conditions for polysaccharides extraction. The combination of liquid-solid ratio (77 mg/mL), temperature (90°C) and time (59 min) was determined to obtain the highest polysaccharide yield (165.10 mg/100 g dry wt.). The antioxidant activities of *U. rigida* polysaccharides were evaluated by DPPH radical scavenging assay. Results from this study indicated that *U. rigida* polysaccharides could be potentially used as a natural antioxidant.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University for their support and providing access to their facilities.

REFERENCES

Alves, A., Sousa, R. A., & Reis R. L. (2013). A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *Journal of Applied Phycology 25*, 407-424.

Anisimov, M. M., Skriptsova, A. V., Chaikina, E. L., & Klykov, A. G. (2013). Effect of water extracts of seaweeds on the growth of seedling roots of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *International Journal of Recent Research and Applied Studies 16*(2), 282-287.

Demirbas A., Demirbas M.F. (2010). Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel. Springer London Dordrecht Heidelberg, New York.

Eshaq, F. S., Ali, M. N., & Mohd, M. K. (2010). Spirogyra biomass a renewable source for biofuel (bioethanol) Production. *International Journal of Engineering Science and Technology 2*(12), 7045-7054.

Hamid, T., Ahmad, A., and Jamshidkhan, C. (2012) An antioxidant peptide derived from ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysates. *Food Research Internaltional 49*, 105-111.

de Jesus Raposo M. F., de Morais, A. M., de Morais, R. M. (2015) Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine Drugs. 13*(5), 2967-3028.

Khanavi, M., Gheidarloo, R., Sadati, N., Ardekani, M. R. S., & Nabavi, S. M. B. (2012). Cytotoxicity of fucosterol containing fraction of marine algae against breast and colon carcinoma cell line. *Pharmacognosy Magazine 8*, 60-64

Leiro, J. M., Castro, R., Arranz, J. A., Lamas, J. (2007) Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International Immunopharmacology 7*, 879-888.

Lianfu, Z., and Zelong, L. (2008). Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrasonics Sonochemistry 15*(5), 731-737.

Nickavar, B., Kamalinejad, M., Izadpanah, H. (2007) *In vitro* free radical scavenging activity of five Salvia species. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 20*(4): 291-294.

Shalaby, E. A. (2011). Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signaling & Behavior* 6, 1338-1350.

Yan, F., Yang, X., Liu, C., Huang, S., Liao, L., & Fu, C. (2014). Extraction optimization of antioxidant polysaccharides from leaves of *Gynura bicolor* (Roxb. &Willd.) DC. *Food Science and Technology 34*(2), 402-407.

Zou, Y., Xie, C., Fan, G., Gu, Z., & Han, Y. (2010). Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin from *Auricularia auricula* fruit bodies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *11*(4), 611-615.